

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2007

Milan Aldorf

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

KATEDRA RYBÁŘSTVÍ A MYSLIVOSTI

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rybářství



**REZISTENCE EMBRYÍ NĚKTERÝCH DRUHŮ RYB
KE KRYOPROTEKTIVŮM PŘI NÍZKÝCH TEPLOTÁCH**

Vedoucí diplomové práce
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.

Autor
Milan Aldorf

2007

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra rybářství
Akademický rok: 2004/2005

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Milan ALDORF**

Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**

Studijní obor: **Rybářství**

Název tématu: **Rezistence embryí některých druhů ryb ke kryoprotektivům při nízkých teplotách**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem práce je zjištění úrovně rezistence embryí u některých kaprovitých ryb ke kryoprotektivům při teplotách okolo 0oC. Dlouhodobě uchovávat embrya ryb v sobě skrývá perspektivu neuchovávat pouze jednu z gamet tedy spermii, ale embrya v době embryogeneze. U kapra a lína obecného jsou procesy od aktivace gamet, oplození a inkubace vajíček rutinně zvládnuty v provozních, poloprovozních nebo laboratorních podmínkách (Linhart et al., 2000, 2003, Rodina et al., 2004). Přechodem ze zmrazování gamet na zmrazování embryí bude možné v rámci ochrany genových zdrojů hospodářských zvířat, snížit kvantitu zmrazovaných dávek gamet a rovněž kvantitu živých zvířat. U embryí budou testovány základní funkce kryoprotektiv (etanol, metanol, DMSO) v koncentraci do 20 % a jejich toxicita pro embrya v období 24 h po oplození, včetně sledování vlivů dalších látek a farmak vhodných pro stabilizaci buněčných membrán embryí. Výsledkem práce bude nalezení vhodného kryokonzervačního média s koncentrací na úrovni 20 %, které po dobu ekvilibrace, tzn. 30 minutu při 0oC, zabezpečí líhnivost embryí na úrovni 20-50 %.

Rozsah práce: 30 - 40 stran
Rozsah příloh: 10 grafů
Forma zpracování diplomové práce: tištěná


Seznam odborné literatury:

- Linhart O., Gela D., Flajšhans M., Duda P., Rodina M. and Novák V., 2000. Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture*, 191, 303-308 (IF 1,5).
Linhart O., Rodina M., Gela D., Kocour M. and M. Rodriguez, 2003. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of eggs stickiness. *Aquat.Liv.Res.*, 16, 450-456 (IF 0.8)
Rodina M., Cosson J., Gela D., Linhart O., 2004. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench *Tinca tinca* L. *Aquaculture International*, 12, 119-131 (IF 0.4).
Ahammad M.M., Bhattacharyya D., Jana B.B., 2003. Hatching of common carp *Cyprinus carpio* L. embryos stored at 4 and -2 degrees C in different concentrations of methanol and sucrose *Theriogenology* 60 (8), 1409-1422


Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
Katedra genetiky

Datum zadání diplomové práce: 10. února 2005
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2007

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.
děkanka

L.S.


doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. března 2005

Prohlašuji, že jsem tuto práci sepsal samostatně na základě vlastních měření a za použití citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 13.4. 2007

.....
Milan Aldorf

PODĚKOVÁNÍ

Je mi ctí na tomto místě poděkovat všem spolupracovníkům a kolegům, kteří mi věnovali svůj drahocenný čas a cenné rady. Zvláště děkuji vedoucímu práce prof. Ing. Otomaru Linhartovi, DrSc. a pracovníkům oddělení šlechtění a genetiky ryb při VÚRH JU ve Vodňanech.

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1. ÚVOD | 8 |
| 2. CÍL PRÁCE | 10 |
| 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED - metod umělé reprodukce vybraných druhů, zmrazování jiker a embryí ryb | 11 |
| 3.1. Umělá reprodukce u lína obecného (<i>Tinca tinca</i>)..... | 11 |
| 3.2. Umělá reprodukce u kapra obecného (<i>Cyprinus carpio</i>)..... | 14 |
| 3.3. Uchovávání jiker a embryí..... | 16 |
| 3.3.1. Krátkodobé uchovávání jiker..... | 16 |
| 3.3.2. Uchovávání jiker v extendorech pro budoucí účely zmrazování..... | 17 |
| 3.3.3. Rezistence embryí ke kryoprotektivům pro účely zmrazování | 19 |
| 4. MATERIÁL A METODIKA | 24 |
| 4.1. Charakteristika experimentů | 24 |
| 4.2. Generační ryby..... | 24 |
| 4.2.1. Výtěr a inkubace jiker lína obecného | 24 |
| 4.2.2. Výtěr a inkubace jiker kapra obecného..... | 25 |
| 4.3. Vlastní uspořádání experimentů | 25 |
| 4.3.1. I. Experiment u lína obecného k ověření vnímavosti embryí v různém stádiu vývoje k teplotním změnám a kryokonzervačním mediím..... | 25 |
| 4.3.2. II. Experiment u kapra obecného k ověření vnímavosti embryí v různém stádiu vývoje ke kryokonzervačním mediím při teplotě 22 °C..... | 28 |
| 4.3.3. III. Experiment u kapra obecného k ověření vnímavosti embryí k postupnému přidávání kryokonzervačních médií při teplotě 18 °C..... | 29 |
| 4.3.4. IV. Experiment u kapra obecného k vitrifikačnímu zmrazení embryí do -196 °C..... | 29 |
| 4.4. Kontrola líhivosti u všech experimentů | 30 |
| 4.5. Statistická analýza..... | 31 |
| 5. VÝSLEDKY | 32 |
| 5.1. I. Experiment u lína obecného k ověření vnímavosti embryí v různém stádiu vývoje k teplotním změnám a kryokonzervačním mediím..... | 32 |
| 5.2. II. Experiment u kapra obecného k ověření vnímavosti embryí v různém stádiu vývoje ke kryokonzervačním mediím při teplotě 22 °C | 34 |
| 5.3. III. Experiment u kapra obecného k ověření vnímavosti embryí k postupnému přidávání kryokonzervačních médií při teplotě 18 °C | 35 |
| 5.4. IV. Experiment u kapra obecného k vitrifikačnímu zmrazení embryí do -196 °C | 36 |
| 6. DISKUZE | 37 |
| 6.1. Vyhodnocení experimentu I. u lína obecného | 37 |
| 6.2. Vyhodnocení experimentu II., III. a IV. u kapra obecného | 38 |
| 7. ZÁVĚR | 40 |
| 8. SUMMARY | 41 |
| 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 42 |

1. ÚVOD

Výzkum reprodukce ryb má v Českých zemích dlouholetou tradici. Úspěšnost tohoto výzkumu byla povětšinou spojována se zvládnutím technologie umělého výtěru. První umělý výtěr se na našem území uskutečnil u lososa obecného (*Salmo salar*) v Horažďovicích již v roce 1784. Naopak mezi poslední úspěšně propracované metody v současném období patří umělý výtěr lína obecného (*Tinca tinca*), sumce velkého (*Silurus glanis*), lipana podhorního (*Thymallus thymallus*), bolena dravého (*Aspius aspius*) a dalších druhů ryb. Výzkum reprodukce se soustředil především na vyhledávání nejvhodnějších GtH a analogů Gn-RH pro úspěšnou ovulaci a spermiaci se sledováním vlivu na kvalitu a kvantitu gamet. Vedle toho se rozvíjel výzkum posuzování kvality spermií s novými postupy video záznamů, včetně studia penetrace spermií mikropylí elektronovým mikroskopem, studium krátkodobého a dlouhodobého uchování gamet s uplatněním nových inseminačních postupů. Výzkum v této sféře umožnil rozvoj genomových manipulací, které se pouze povrchně dají rozvíjet bez dobré znalosti reprodukce a manipulace s gametami.

Základním předpokladem dosažení dobrých hospodářských výsledků v chovu ryb je úspěšná reprodukce ryb, zvládnutí metody odchovu ryb s dobrou přípravou budoucího generačního hejna ryb. V současných ekonomických podmínkách je přirozená reprodukce s tradičními metodami reprodukce nedostatečná, může posloužit pouze jako doplňková metoda. Vysoká plodnost ryb, kdy např. dobře připravená jikernačka kapra obecného může produkovat až 1 mil. plnohodnotných jiker, dává velmi dobrý předpoklad pro úspěšné uplatnění umělé reprodukce. Proto také v současných podmínkách rybnářství je tato oblast rybnářské výroby z hlediska ekonomiky tvorby zisku jednou z nejefektivnějších, ale také velmi rizikovou u druhů, kde metodika umělého výtěru nebyla detailně propracována. Úspěšně zvládnuta umělá reprodukce umožňuje nejen snížení nákladovosti a rozvoj chovu, ale je také příležitostí k odzkoušení dalších zásahů v průběhu technologie výtěru a chovu, kterými jsou uchování gamet. Logickým předpokladem rozvoje manipulací s gametami bylo zaměření se na podpůrné směry reprodukce, které podmiňují úspěšnost indukce genomových manipulací. Patří k nim vedle indukce ovulace a spermiace také manipulace s pohlavními produkty, tzn. posuzování jejich kvality a kvantity s možnostmi jejich imobilizace z důvodů nefyziologické motility spermií po odběru spermatu nebo krátkodobé uchování gamet

z důvodu transportu při gynogenezi a androgenezi a dlouhodobé uchování originálních gamet s opačným heterochromozomovým genotypem a uchování genetických rezerv ([Linhart, 1996](#)).

V kapitole 2 je specifikován cíl méj diplomové práce a očekávané výsledky. Dostupné literární zdroje o uchovávání gamet a embryí ryb (z Web of Science z let 1949–2007) jsou shrnuty v kapitole 3. Způsob metodického provádění práce, sběr dat a jejich zpracováním se zabývá kapitola 4: Materiál a metodika. Vlastní výsledky hodnotící jednak rezistenci embryí (vybraných modelových druhů ryb) vůči kryoprotektivům při zchlazování embryí do $1,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ u lína, tak i postupné vyrovnávání koncentrací za konstantní teploty u embryí kapra (18 a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Slibných výsledků bylo použito pro následné zmrazení na úroveň $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (kapitola 5). Kritické srovnání mých výsledků s údaji v literatuře lze najít v kapitole 6: Diskuze. Následuje celkové zhodnocení rezistence embryí vůči kryoprotektivům a možnost uchování zmrazením do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (kapitola 7: Závěr).

2. CÍL PRÁCE

Obecným cílem práce bylo:

- 1) získání dalších základních poznatků o krátkodobém uchování embryí v kryprotektivních mediích;
- 2) vytvoření tzv. vitrifikačních médií pro budoucí zmrazování embryí u kapra případně lína;
- 3) odzkoušet první metody zmrazování embryí;

Vzhledem ke skutečnosti, že na Web of Science je do současnosti publikováno pouze několik prací s úspěšným zmrazením embryí sladkovodních ryb do úrovně $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo naplnění cílů této diplomové práce poměrně obtížné a průkopnické.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED - metod umělé reprodukce vybraných druhů, zmrazování jiker a embryí ryb

3.1. Umělá reprodukce u lína obecného (*Tinca tinca*)

Přirozený výtěr lína obecného probíhá obvykle v červnu až srpnu a vyznačuje se porcovým dozráváním a porcovým výtěrem jiker ([Pekař, 1965](#)). Plodnost jikernaček je vysoká na úrovni od 140 000 do 230 000 jiker.kg⁻¹ hmotnosti jikernaček ([Chábera, 1980](#); [Horváth at al., 1984](#)). Průměr suchých jiker je velmi variabilní od 0,4 do 1,0 mm ([Kubů a Kouřil, 1985](#)). Sperma je barvy a konzistence mléčné s koncentrací od 1,0 do 20.10⁹ spermií. Po odběru spermatu byl zjištěn spontánní pohyb spermií způsobený kontaminací močí. Masový progresivní pohyb spermií se pohybuje od 36 do 52 sekund s celkovou periodou pohybu od 161 do 188 sekund ([Linhart at al., 1986a](#)). Celkové množství spermií po jednom odběru je na úrovni od 2,0 do 15.10⁹ spermií na mlíčáka, tj. 18,50.10⁹.kg⁻¹ hmotnosti mlíčáka ([Linhart a Kvasnička, 1992](#); [Žuromska, 1981](#)).

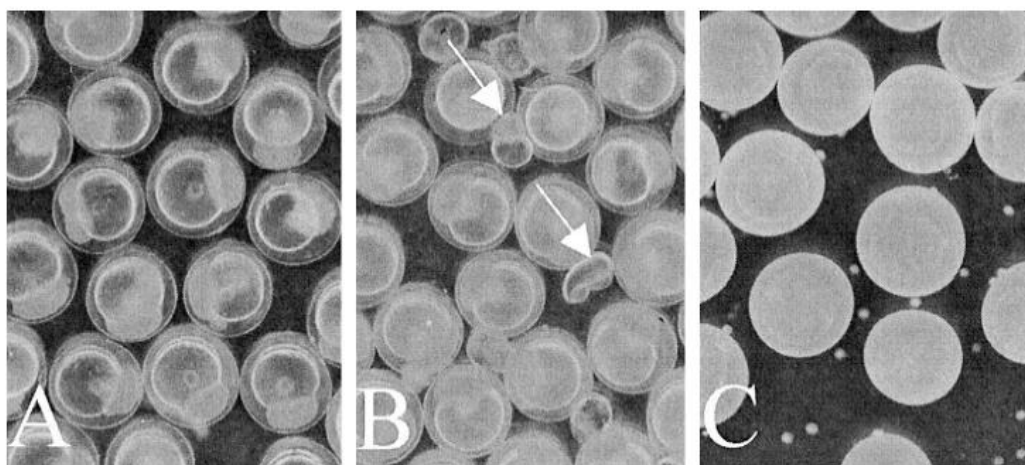
Základní metoda umělé reprodukce je následující: 20–30 jikernaček a 20–30 mlíčáků schopných výtěru jsou chováni v kaprových rybnících a selektováni v červnu v líhni ([Horváth at al., 1984](#)). Mlíčáci jsou injikováni 24 hodin před odběrem spermatu 1 mg.kg⁻¹ kapří hypofýzou nebo GnRH analogem [D-Tle⁶, GnRH ProNHET] v dávce 10 µg.kg⁻¹ hmotnosti mlíčáka s možností spermiace po dobu 3 dnů nebo s [D-Arg⁶, Pro⁹NHET] salmon GnRH v dávce 20 µg.kg⁻¹ hmotnosti mlíčáka s indukcí spermiace po dobu 5 dnů ([Linhart at al., 1991c](#)). Jikernačky jsou injikovány kapří hypofýzou při 20–23 °C dávkou 3–10 mg.kg⁻¹ hmotnosti mlíčáka s ovulací po 400^oh (hodinových stupních) nebo s GnRH analogem [D-Ala⁶, GnRH ProNHET; Kobarelin] v dávce 5–20 µg.kg⁻¹ hmotnosti jikernačky s ovulací po 680–750^oh ([Kouřil at al., 1986](#)). Sperma je vytíráno přímo na jikry nebo odebíráno do imobilizačních roztoků (85 mM NaCl, 27 mM KCl, 75 mM glycin, pH 7,0 nebo 180 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,0) v poměru >0,9:1. Následně jsou jikry smíšeny se spermatem a aktivovány 34 mM NaCl nebo vodou z líhne s mlékem v poměru 5:1. Objem spermatu a imobilizačního roztoku k jikrám je v poměru 1 ml : 100 g jiker; jikry k aktivačnímu roztoku jsou v poměru 4:1. Lepivost jiker je eliminována enzymem. Jikry jsou 3 minuty po osemenění a aktivaci ošetřeny enzymem alkaláza po dobu 2 minut. Nejvyšší signifikantní úroveň vykulleného váčkového plůdku bylo dosaženo při ošetření jiker dávkou o koncentraci 10,0 ml.l⁻¹ enzymu. Tradiční odlepkovací procedura (suspenze

mléka s jílem) zapříčiňuje signifikantně nižší líhnivost na úrovni 74,1 %. Experiment v praktických podmínkách líhně přinesl ještě markantnější rozdíly v líhnivosti mezi tradiční a metodou odlepování enzymem. Nejvyšší úroveň líhnivosti plůdku 88,1 % bylo dosaženo při ošetření jiker enzymem o koncentraci 10 ml.l⁻¹. S tradičním prostředkem mléko/jíl došlo k výraznému poklesu líhnivosti a to na úroveň pouhých 30 % ([Gela et al., 2002](#); [Linhart et al., 2000](#)).

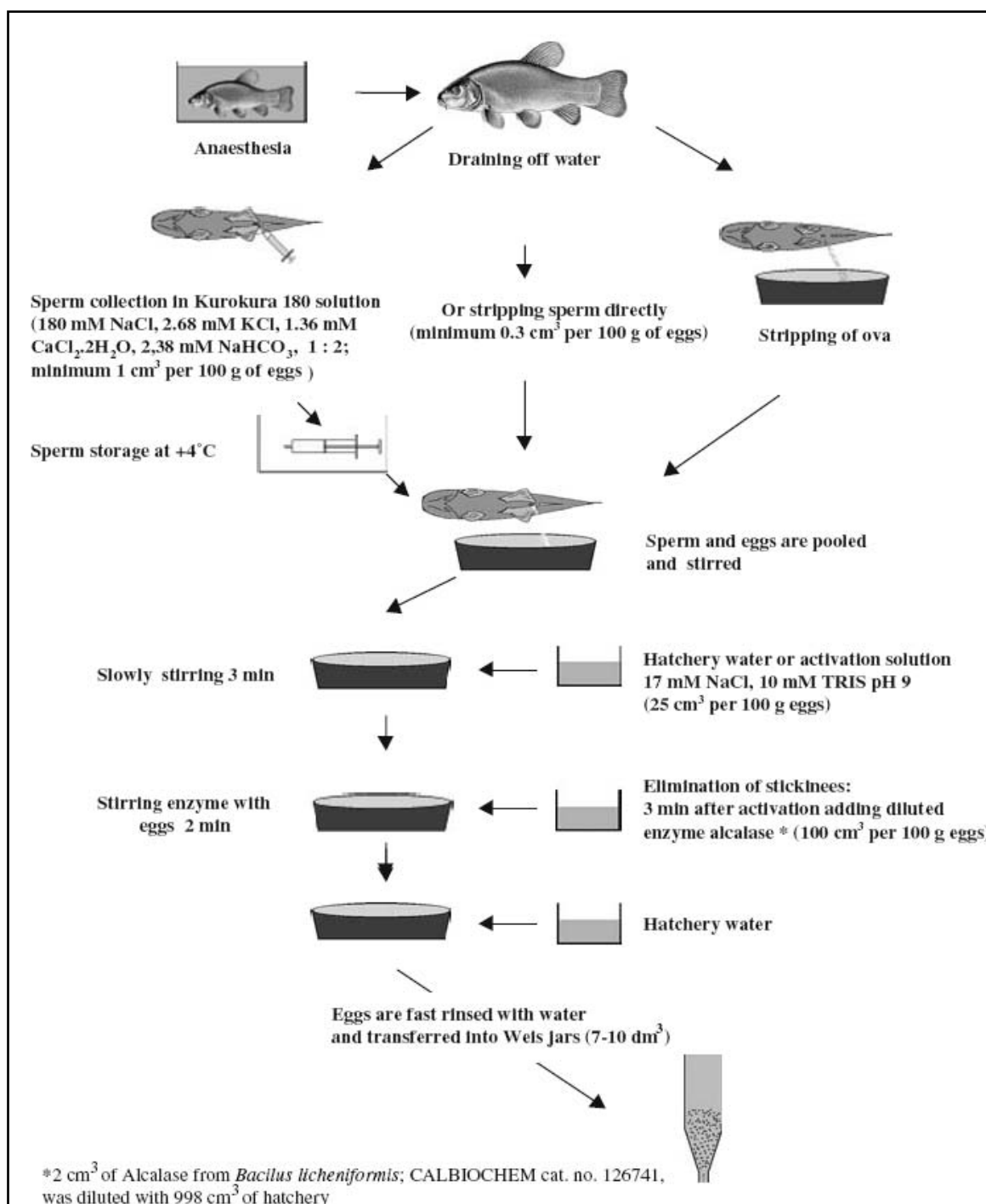
34 mM NaCl s mléčným roztokem v poměru 4:1 k jikrám po dobu 30–40 minut a následně se suspenzí jílu 20 g.l⁻¹ po dobu 10 min ([Linhart a Kvasnička, 1992](#)). Jikry jsou inkubovány ve Weisových láhvích při 22 °C po dobu 60–70 °d (denních stupních).



Obr. 1: Ukázka odběru spermatu lína obecného z pohlavní papily do injekční stříkačky (5 cm³) se 2 cm³ imobilizačního roztoku a 1 cm³ spermatu ([Linhart et al., 2006](#))



Obr. 2: Mikrosnímky oplodněných jiker lína s různým ošetřením: A) 5–15 ml.l⁻¹ alkalasy; B) 20 ml.l⁻¹ alkalasy (šipky ukazují poškození obalu); C) mléko/jíl ([Linhart et al., 2000](#))

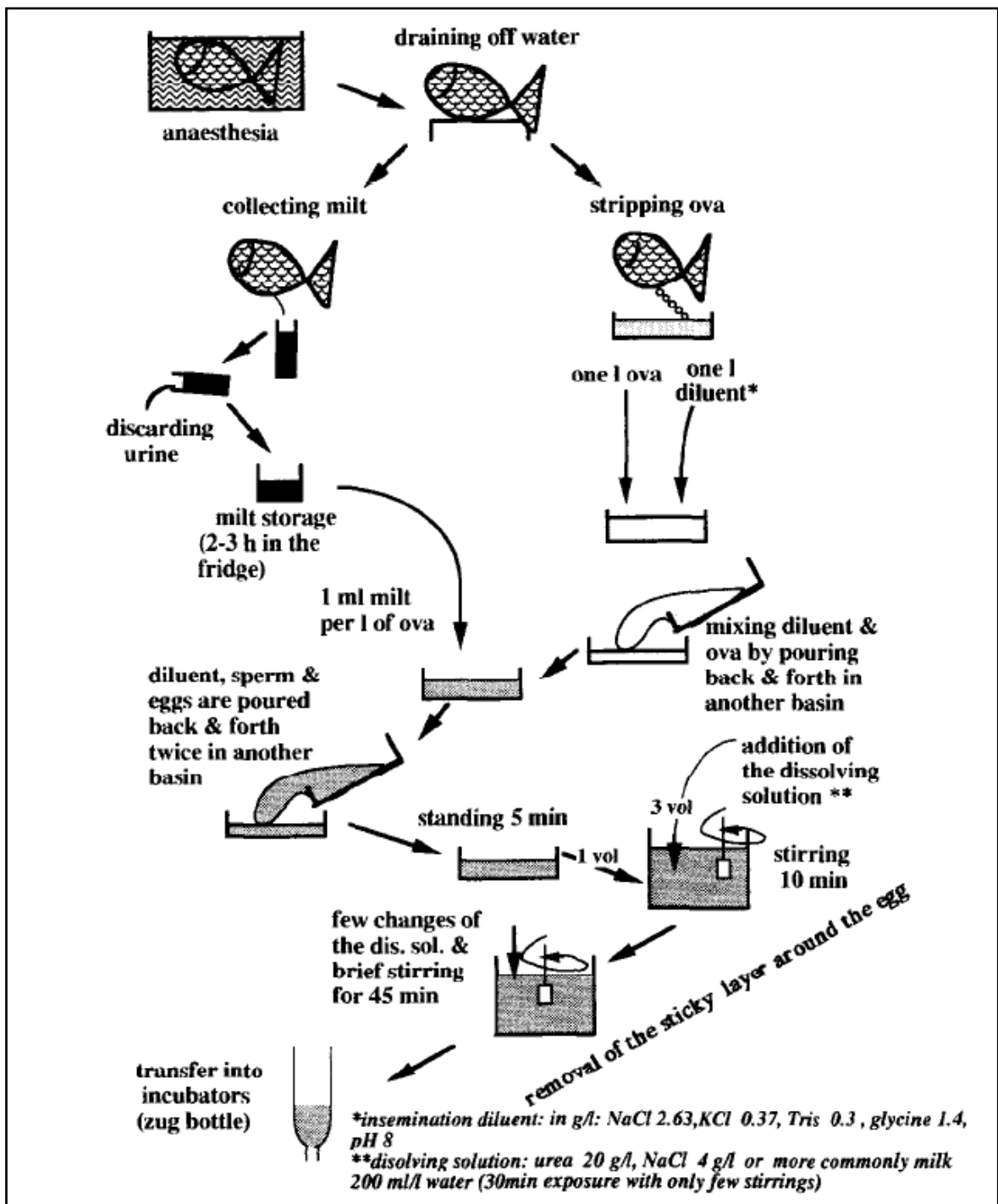


Obr. 3: Umělý výtěr lína obecného (*Tinca tinca*) (dle [Linhart et al., 2006](#))

3.2. Umělá reprodukce u kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

Kontrola reprodukce kapra byla poprvé rozpracována v padesátých letech s určitými metodickými pokyny pro praxi ([Woynarovich, 1962](#); [Rothbard, 1981](#); [Woynarovich and Woynarovich, 1980](#); [Horvath et al., 1984](#)). Velké množství podrobných studií bylo věnováno fyziologii spermií ([Billard et al., 1986](#); [1995](#)), jikrám a oplození ([Linhart et al., 1995](#)), endokrinní úrovni při gametogenezi a indukci ovulace ([Yaron et al., 1995](#)) a umělému osemenění ([Saad a Billard, 1987](#); [Billard, 1988](#); [1990](#); [Billard et al., 1995](#)).

Obdobně jako u lína byl v posledním období kladen důraz na vypracování podrobné metody umělého osemenění, zjištění nutného počtu spermií k dobrému oplození jiker, ověřen aktivační roztok včetně jeho pH s koncentrací Na^+ K^+ iontů, přičemž k odlepkování jiker se využil úspěšně chymotrypsin a alkaláza. Za optimální množství gamet pro dobré oplození a líhivost je uváděn poměr od 8490 do 23672 spermií na jikru. Optimální poměr mezi jikrami a vodou z líhně při aktivaci gamet byl definován od 1:1 do 1:2. Z porovnávaných aktivačních roztoků pouze 20 mM Tris-HCl pH 9 zvýšil oplození a líhivost ve srovnání s vodou z líhně. Adhesivita, tedy lepivost jiker, byla úspěšně odstraněna ALCALASE DX (PLN 04715) ve dvou stupních po celkovou dobu odlepkování 25 minut. Bohužel tato metoda prozatím nebyla zavedena do praxe vzhledem k vysoké ekonomické náročnosti a velmi dobrému rutinnímu zvládnutí odlepkování mlékem s automatickým mícháním vzduchem v inkubačních lahvích ([Linhart et al., 2003](#)).



Obr. 4: Schematické znázornění pracovního postupu při umělém výtěru kapra obecného (Billard et al., 1995)

3.3. Uchovávání jiker a embryí

Současné uchovávání jiker a embryí ryb obecně můžeme rozdělit do dvou směrů. Prvním jsou zaběhlé postupy v praktickém provozu akvakultur, především krátkodobé uchovávání jiker během provozu líhně a druhé jako snaha o dlouhodobé uchovávání zmrazením jiker či embryí, jehož jedním z hlavních cílů je mít trvale k dispozici gametu či embrya po neomezenou dobu ([Bart, 2000](#); [Zhang, 2004](#)).

3.3.1. Krátkodobé uchovávání jiker

Uchovávání jiker v současné praxi slouží především z důvodů technologických postupů při výtěrech velkého množství jiker, z důvodu jejich transportu jiker, meziliniového a mezidruhového křížení a při havarijních stavech na líhni související s úhynem jikernaček. První možností uchování ovulovaných ovocytů poskytuje přímo tělo jikernačky (tzv. uchování *in vivo*), dále jako vytřené jikry neoplozené v ovariální plazmě (tzv. uchování *in vitro*), jako vytřené jikry neoplozené v izotonickém roztoku. Poslední varianta se v praxi doposud nevyužívá z důvodů malé efektivity izotonických roztoků ([Takano et al., 1973](#)). Dále je možné uchovávat vytřené jikry osemenné. Vzhledem k různé úrovni koncentrace iontů a dalších látek v ovariální a semenné plasmě se tato metoda nedoporučuje. Především ovariální plasma může v některých případech předčasně aktivovat spermie a tím snížit budoucí efekt oplození. Vhodnější je vždy uchovávat *in vitro* gamety do oplození odděleně ([Linhart, 1984](#)).

Z těla jikernačky je nutné co nejrychleji vytřít ovulované ovocyty z tělní dutiny či ovária. U studenomilných druhů je možné uchování oplozovací schopnosti ovulovaných ovocytů až 48 hodin (lososovité ryby, štika). Rovněž u uhynulých lososovitých jikernaček s ovulovanými ovocyty je možné uchovat *in vivo* jejich oplozovací schopnost po dobu až 24 hodin při nízkých teplotách ([Springate et al., 1984](#)). U teplomilných druhů jako je kapr a býložravé ryby není možné uchovávat ovulované ovocyty *in vivo* ([Linhart et al., 1995](#)). Jikernačky je nutné okamžitě vytřít. U sumce velkého s opožděným výtěrem ovulovaných ovocytů se snižuje líhivost plůdku a narůstá množství deformit ([Linhart a Billard, 1995](#)). Prozatím se v líhních osvědčilo uchovávání vytřených jiker v ovariální plazmě jako nejpřirozenější a nejstabilnější prostředí pro jikry ([Jensen a Alderdice, 1984](#); [Linhart, 1984](#)). Jikry se po výtěru uchovávají v aerobním prostředí, v dostatečně velkých miskách, přikrytých vlhkou

utěrkou. Teplota uchování je závislá na druhu ryby. U teplomilných druhů je teplota uchování řádově nižší o 2–4 °C než je při konstantní výtěrové teplotě s dostatečnou vlhkostí ([Rothbard et al., 1996](#)). Například jikry kapra obecného je možné uchovávat až 6 hodin s oplozovací schopností 80 % při teplotě 18 až 20 °C. U studenomilných druhů, tedy lososovitých ryb je možné uchování až 80 % oplozovací schopnosti jiker in vitro 24–48 h při 4 °C ([Linhart, 1984](#)). Jikry lze uchovat in vitro pouze nekontaminované močí, výkaly a vodou, při výtěru se moč odstraňuje a znečištěné jikry se obvykle nepoužívají k oplození. Při aktivaci jiker se používá velké množství spermatu, s použitím aktivačních roztoků a přesných technologických postupů, vzhledem ke snížené fertilitě jiker po uchování ([Linhart, 1991](#)).

3.3.2. Uchovávání jiker v extendorech pro budoucí účely zmrazování

Přestože, metody pro uchovávání zmrazením rybiho spermatu do –196 °C byly vyvinuté pro více než 80 sladkovodních a mořských druhů ryb ([Rana, 1995](#); [Figiel a Tiersch, 1997](#)), metody dlouhodobého uchování jiker zmrazením byly vždy neúspěšné.

První studie zaměřené na uchovávání spermatu ryb zmrazením, sahají do začátku druhé poloviny 20. století ([Blaxter, 1953](#)), snahy o uchování jiker jsou však mnohem pozdější ([Horton a Otto, 1976](#)). Tyto první výzkumy byly předně zaměřeny na jikry komerčně zajímavých (lososovitých) ryb, které se podařilo krátkodobě během několika minut uchovávat v 8 až 14 % dimetylsulfoxidu (DMSO) při teplotě –20 °C a embrya při –55 °C ([Zell, 1978](#); [Stoss a Donaldson 1983](#); [Erdahl a Graham, 1987](#)). Autoři však přesně nespecifikovali rychlost chlazení, přesnou dobu uchování a další důležité faktory pro zmrazování. Zdá se, že jikry a embrya byly pouze zchlazené a k vlastnímu zmrazení tzn. krystalizaci vůbec nedošlo.

Pokusy vyvinout zmrazovací procedury pro jikry a embrya ryb byly založené v první řadě na empirických přístupech. Savčí model zmrazovaných postupů vzhledem k jiným specifickým obalům a velikosti embryí, nebyl vhodný pro uchovávání rybiích embryí ([Gwo et al., 1995](#); [Zhang a Rawson, 1996a, 1996b](#)). Principiálně se jedná o jednoduchý proces, kdy je do embryí vpravována látka tzv. kryoprotektivum (prvně byl tento postup použit pro savčí buňky [Polge et al., 1949](#)), která výrazně sníží bod tání a koncentraci vody, kterou embrya obsahují a zabrání tak tvorbě ledových krystalů

poškozující buňky. U ryb, vzhledem k biofyzikálním parametrům obalů jiker a embryí, jsou však zmrazovací postupy, na rozdíl od savčích, komplikované.

Mezi tyto parametry patří především propustnost zárodečných obalů pro vodu a kryoprotektivní látky (v závislosti na hydraulické vodivosti a teplotě s pravděpodobností změn osmotických koncentrací) a s tím spojenou tvorbu vnitrobuněčných krystalů ledu, závislých na rychlosti ochlazování a zpětného rozmrazení.

Tabulka 1: Seznam běžně používaných kryoprotektiv („fridexy“) v kryobiologii

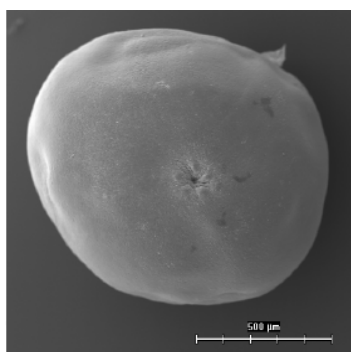
| Kryoprotektivum | Průnik přes membránu |
|----------------------------|----------------------|
| Dimethyl sulfoxid (DMSO) | pronikající |
| Glycerol | pronikající |
| Ethylen glykol | pronikající |
| Methanol | pronikající |
| Dimethyl acetamid | pronikající |
| Polyvinyl pyrrolidon (PVP) | nepronikající |
| Hydroxyethyl škrob (HES) | nepronikající |
| Dextrans | nepronikající |
| Albumin | nepronikající |
| Polyethylen glycol | nepronikající |

Dalšími parametry jsou také velikost rybích jiker a embryí v závislosti na druhových rozdílech (příkladem je průměrná velikost 0,95 mm u jiker mnoha mořských druhů nebo 6 mm u lososovitých ryb), dále citlivost na poškození při ochlazování a vysoký obsah žloutku v jikrách. Všechny tyto faktory způsobují složitější uchovávání jiker zmrazováním, než v případě mrazení velmi malých objektů jakými jsou rybí spermie ([Arii et al., 1992](#); [Ujihira et al., 1994](#)).

Za uvedení stojí studie o změně buněčné propustnosti vůči kryoprotektivům v závislosti na oplozenosti jiker, která byla demonstrována u štiky obecné (*Esox lucius*) a lososa atlantského (*Salmo salar*). Oplozené jikry inkubované ve vodě s 10 % DMSO vykazovaly nižší propustnost pro DMSO než pro neoplozené jikry inkubované rovněž v 10 % DMSO. Vyšší permeabilita tak byla zjištěna u jiker před oplozením ([Schmel a Graham, 1986](#)).

Studium je nyní věnováno propustnosti jednotlivých membrán a to nejen vnějších, ale i vnitřních a to především žloutkových. Propustnost jednotlivých vývojových stádií a oocytů byla studována u lososa, pstruha obecného (*Salmo trutta*) a rovněž u halančíka japonského (*Oryzias latipes*) ([Routray et al., 2002](#)). U halančíka bylo prokázáno, že propustnost kryoprotektiv do oocytu je menší než do embryí. Navíc je známo, že se u jeho embryí propustnost membrány zvyšuje s postupujícím vývojem. ([Arii et al., 1987](#), [Routray et al., 2002](#)).

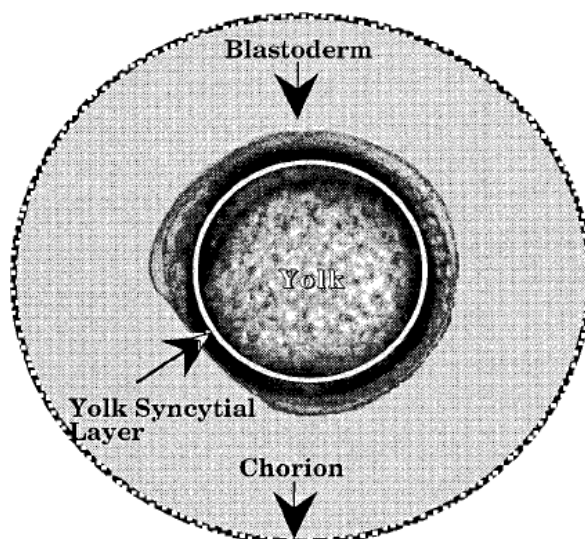
Množství variant experimentálních pokusů při zmrazování jiker je velmi početné, avšak dosažené výsledky jsou poměrně žalostné ([Zhang 2004](#)). Bohužel musíme také konstatovat, že o problematice zmrazování jiker, jak před oplozením tak po oplození, je jen velmi málo publikováno.



Obr. 5: Elektronový snímek jikry lína obecného s mikropylárním otvorem ([Linhart et al., 2006](#))

3.3.3. Rezistence embryí ke kryoprotektivům pro účely zmrazování

Úspěšné uchování rybích embryí pomocí zmrazování do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ zůstává stále nedosaženým cílem ([Adams et al., 2005](#)). Obdobně jako u jiker, i zde je určitý počet limitujících faktorů, jako je nadměrná velikosti embryí vytvářející fyzikálně malý povrch ve vztahu k objemu embrya s velkým tkáňovým rozdělením, vysokou citlivostí embryí k nízkým teplotám a nízkou membránovou propustností ([Zhang, 2004](#); [Hagedorn a Kleinhans, 2000](#)). Nízká membránová propustnost rybích embryí způsobuje, že jen malé množství kryoprotektiv pronikne membránami během ekvilibrace do vnitřních oddělení a ven se tak vytlačí pouze malé množství vody. Následkem toho jsou rybí embrya málo odvodněná a během chlazení, při procesu formování vnitrobuněčných krystalů, dojde k porušení buněk a tím i k destrukci embryí ([Hagedorn et al., 2004](#)).



Obr. 6: Obrázek identifikuje hlavní oddělení embrya dania pruhovaného (*Danio rerio*). YSL – žloutková syncytiální vrstva je pro názornost zvýrazněna ([Hagedorn et al., 1997](#))

Po oplození jikry se vytváří tzv. oplozovací obal. Uvnitř oplozovacího obalu se vytváří tzv. perivitelní prostor, vytvořený z koloidů a enzymů uvolněných z kortikální alveoly a vody, která byla aspirována z externího prostředí ([Coward et al., 2002](#)). Povrchová část chorionu a to především tzn. lepkavá část povrchu, je volně propustná vodou a malými molekulami ([Zhang a Rawson 1996b](#)). Studium prokázalo snižující se propustnost právě v době oplození vytvořením perivitelního prostoru ([Rawson et al., 2000](#)). Jak se zárodek vyvíjí, propustnost obalů se postupně znovu zvětší, ale zůstává významně nižší než před oplozením. Vyřené jikry lososa, vykázaly vyšší permeabilitu pro vodu v průběhu oplození po inkubaci v upraveném Ringerově roztoku pro lososovité ryby, než v říční vodě, destilované vodě nebo izotonické glukóze. Podobně embrya štiky obecné ukázaly v řadě vývojových stádií na vyšší permeabilitu obalů pro vodu při inkubaci embryí v Ringerově roztoku pro lososovité ryby ([Loeffler, 1971](#)). Na rozdíl od předchozích údajů, embrya a larvy tilápie mosambické (*Oreochromis mossambicus*), signalizovala sníženou propustnost obalů pro vodu při přenesení z vody sladké do mořské ([Miyazaki et al., 1998](#)). Embrya kambaly velké (*Scophthalmus maximus*) nevykázaly žádnou změnu v propustnosti obalů při různé koncentraci mořské soli ([Tytler a Ireland, 1993](#)). Snižování koncentrace vápníku při inkubaci jiker ukázalo v některých studiích na zvýšení membránové propustnosti pro vodu u embryích tresky obecné (*Gadus mythus*) a u některých vývojových stádií kambaly velké ([Tytler](#)

[a Ireland, 1993](#)). Naopak, nízká koncentrace vápníku nebo sodíku v prostředí inkubace jiker lososa má za následek, snížení poklesu propustnosti obalů v oplozené jikře ([Potts a Rudy, 1963](#)). Alternativní vysvětlení změn membránové propustnosti je závislé na druhové specifitě a vazbě na prostředí, v kterém ryby žijí a reprodukují se.

Od počátku 90. let minulého století byly rozsáhlé studie zaměřeny na nalezení vhodného kryoprotektiva a optimálního času na vyrovnání koncentrací vně a uvnitř rybích embryí, pro jejich úspěšné uchování při nízkých teplotách. [Zhang et al. \(1993\)](#) zjistil, že methylalkohol byl pro embrya dáňia pruhovaného efektivnějším kryoprotektivem než DMSO nebo etandiol. Celé embryo bylo prostoupeno methylalkoholem zhruba do 15 minut od počátku inkubace. Pro pozdější období vývoje se propustnost hlavních oddělení embryí tak významně mění, že inkubace po 2.5 hodinovém ošetření kryoprotektivy od oplození nemá již žádný efekt ([Hagedorn et al., 1997](#)). Zajímavostí je, že použitím ultrazvuku se zvětšuje propustnost obalů u oplozených jiker dáňia pruhovaného ([Bart, 2000](#)). Snížená citlivost k ochlazení a zvýšená propustnost kryoprotektiva (2 M methylalkoholu) byla zjištěna u dechoriováných embryí v období organogeneze. Z dalších kryoprotektiv se vedle methylalkoholu rovněž DMSO a propylenglykol projevovaly toxicky pro embrya dáňia až po 30 minutách od aktivace gamet. Rovněž DMSO se projevilo jako netoxické kryoprotektivum pro embrya halančika japonského ([Arii et al., 1987](#)). Naopak 1.5 M roztoky glycerinu a etylenglykolu toxické již byly ([Hagedorn et al., 1997](#)). U kapra obecného bylo odzkoušeno kryoprotektivum ve složení sacharózy a methylalkoholu jako nejvhodnější pro uchování embryí ve stádiu organogeneze ([Dinnyes et al., 1998](#)). [Harvey et al. \(1983\)](#) potvrdil pomocí označeného DMSO a glycerinu izotopem, že kryoprotektiva skutečně pronikly do dechoriováných embryí dáňia pruhovaného.

Citlivost k chladu u různých vývojových stádií v průběhu embryogeneze byla postupně nalezena u celé řady druhů ryb. Obecným výsledkem bylo zjištění, že při ochlazení embryí jsou nejméně citlivá k poškozením postgastrulární vývojová stádia ([Ahammad et al. 2003](#); [Hagedorn et al., 1997](#); [Zhang a Rawson, 1995](#)). [Ahammad et al. \(2003\)](#) zjistil že, 24 hodin stará embrya kapra obecného inkubovaná při teplotě 20 °C v roztoku 2.0 M methylalkoholu s 0.1 M trehalosou použitého jako ochranný prostředek, jsou možné přenést do teploty od 4 do -2 °C a následně uchovávat po dobu 14 dnů.

Použití „vitrifikace“, jako metody zmrazování, bylo prozatím označeno za nejslibnější volbu pro zmrazení rybích embryí z důvodu její schopnosti nevytvářet

krystaly, ale pouze amorfni hmotu ([Zhang a Rawson, 1996a](#)). [Hagedorn et al. \(2004\)](#) recentně studoval tvorbu ledových krystalů v závislosti na zmrazovací teplotě u embryí dánie pruhovaného. Demonstroval, že pomalé mrazení není vhodnou metodou.

Vitrifikační technika byla úspěšně aplikována na savčí embrya ([O'Neil et al., 1998](#)) a u některých mořských bezobratlých ([Chao et al., 1997](#)). Bohužel, u ryb zatím uspokojivě využita nebyla. Práce na embryích kambaly velké a dánie pruhovaného dokazují, že vitrifikační metodické postupy musí být ještě detailně prostudovány. Aby požadované roztoky byly pro vitrifikaci efektivní, musí obsahovat vysoké koncentrace kryoprotektiv a zároveň maximálně omezit jejich toxicitu. Díky druhové specifitě logicky vyplývá nutnost vyvíjet přesná vitrifikační media a postupy pro jednotlivé druhy ryb ([Cabrita et al., 2003](#); [Robles et al., 2003, 2004](#)).

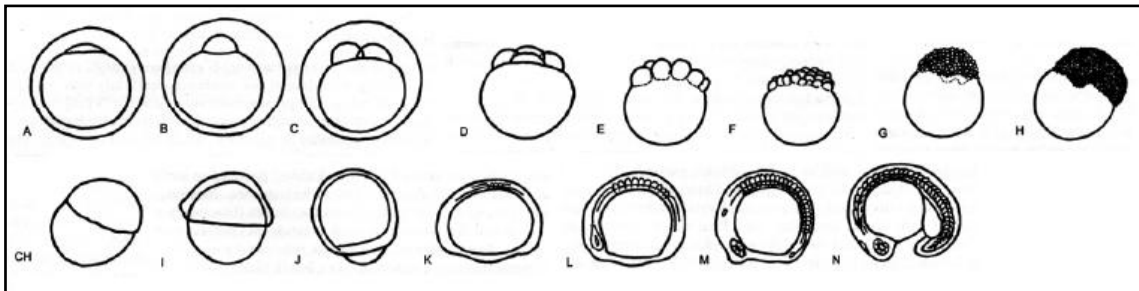
První úspěšné přežití embryí po vitrifikaci bylo oznámeno u platýse amerického ([Robles et al., 2005](#)). Jedná se o arktický druh, který je díky přítomnosti antimrazících proteinů odolnější vůči ochlazení, zatím však jejich vliv u těchto druhů nebyl potvrzen, rovněž tak jejich použití u jiných druhů nevykazuje žádné úspěchy.

Většina studií popisující uchování embryí sladkovodních ryb zmrazením byla provedena zejména na modelovém druhu dánie pruhovaném, halančíku japonském a kapru obecném ([Dinnyes et al., 1998](#); [Liu et al., 1998](#); [Hagedorn et al., 2004](#)). Pokusy s mořskými druhy ryb jsou poměrně recentní a to jak u kambaly tak platýse ([Cabrita et al., 2003](#); [Robles et al., 2004](#); [Zhang et al., 2005](#), [Edashige et al., 2006](#)). [Robles et al. \(2004\)](#) publikoval, že po vitrifikaci a následném rozmrazení trpí kambalová embrya méně buněčným poškozením než embrya dánie pruhovaného. [Cabrita et al. \(2006\)](#) potvrzuje svými výsledky při studiu embrií japonského platýse závěry, že hlavním problémem selhávání zmrazování při vitrifikační metodě, je špatný průnik kryoprotektiv do embryí, jehož důsledkem je malé procento odvodnění a následné formování ledových krystalů.

Získávané poznatky studií významně ovlivňují pohled na poškození embryí při ochlazení ([Liu et al., 1993](#); [Zhang a Rawson, 1995](#)) a toxicitu kryoprotektiv v různých stupních vývoje ([Liu et al., 1993](#); [Robertson a Lawrence, 1988](#); [Suzuki et al., 1995](#)). Z dosavadních pokusů překvapivě vyplývá, že je vhodné uchovávat embrya v kryoprotektivech bez významného snížení líhivosti a poškození, v pozdějším období vývoje, tzn. v období gastrulace ([Adams et al., 2005](#); [Rawson a Zhang, 2005](#)).

Dramatický pokles rybích společenstev vyžaduje nutnou akci pro uchování ohrožených druhů, především z důvodu udržení vysoké biodiverzity. Zmrazování gamet

a embryí je jedním z přístupů, jak udržet genofond a zajistit tím přežití těchto druhů. Teoreticky by takový program uchování zahrnoval kryobanku jiker, spermií a embryí. Tato práce by měla být přínosem pro poznání této problematiky.



Obr. 7: Vývojová stádia kapra obecného (*Cyprinus carpio*) v průběhu embryonální periody – vývojové etapy 1 až 6 (A–N): Časový úsek vývoje 40 minut až 21 hodin; A, B blastodisk, C–H morula, CH blastula, I, J gastrula, K–N organogeneze. Podle Peňáze ([1983 in Baruš a Oliva, 1995](#) – upraveno)

| Type | Reproductive Material | References |
|-------------------------|-----------------------|--|
| Freshwater fish | | Lahnsteiner, 2000; Leveroni and Maise, 1998, 1999; Maise, 1996; Rana and Oilmour, 1996 |
| Salmonid | Sperm, blastomere | |
| Cyprinids | Sperm, blastomere | |
| Silurids | Sperm | |
| Marine fish | | Bolla et al., 1987; Gwo, 2000a, b; Labbe et al., 1998; Mounib, 1978; Pullin, 1972 |
| Clupeiformes Gadiformes | Sperm | |
| Perciformes | Sperm | |
| Pleuronectiformes | Sperm | |
| Tetraodontiformes | Sperm | |
| Echinoderms | | Barros et al., 1997; Dunn and McLachlan, 1973; Naidenko and Kol'tsova, 1998 |
| Sea urchin | Sperm, larvae | |
| Starfish | Sperm | |
| Sand dollar | Sperm | |
| Molluscs | | Chao et al., 1997; Lin and Chao, 2000; Paniagua et al., 1998a, b; Tsai and Chao, 1994 |
| Oyster | Sperm, embryo, larvae | |
| Abalone | Sperm | |
| Clam | Embryo | |
| Crustacea | | Bhavanishankar and Subramoniam, 1997; |
| Shrimp | Sperm | Diwan and Joseph, 2000 |
| Crab | Sperm | |
| Rotifer | Embryo | Toledo and Kurokura, 1990 |
| Polychaete | Sperm, larvae | Bury and Olive, 1993; Olive and Wang, 1997 |

Obr. 8: Úspěšné zmrazení reprodukčních materiálů vodních druhů do roku 2004 ([Zhang 2004](#))

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Charakteristika experimentů

Jako modelové druhy ryb byly zvoleny lín obecný (*Tinca tinca*) a kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Experimenty se uskutečnily v průběhu let 2005–2006 na líně VÚRH JU oddělení genetiky a šlechtění ryb VÚRH JU. Jedná se o experimenty s embryi kdy bylo v určitém časovém intervalu od oplození s vlastními embryi manipulováno za účelem nalezení toxické úrovně kryokonservačních medií, či ověřována úroveň možnosti zmrazení

Všechny použité chemikálie byly vysoké čistoty, zakoupené od firmy Sigma – Aldrich Co. (Deisenhofen, Německo).

4.2. Generační ryby

Ryby určené k umělému výtěru byly do doby samotného výtěru drženy odděleně, nejprve v rybnících a poté na líně v nádržích o objemu 4 m³, s přítokem vody asi 0,2 l.s⁻¹. Teplota vody v tancích byla udržována v rozmezí 18–22 °C, obsah kyslíku ve vodě činil 6–7 mg.l⁻¹. Před každou manipulací byly generační ryby anestetovány v hřebíčkovém oleji a to v dávce 0,3 ml na 100 l vody.

4.2.1. Výtěr a inkubace jiker lína obecného

Experiment probíhal v průběhu měsíce června. Bylo použito deset mlíčáků a devět jikernaček, které byly drženy odděleny v nádržích při průtoku 0,2 l.s⁻¹ a teplotě 22–23 °C. Spermie mlíčáků bylo docíleno do 24 hodin po injekci kapří hypofýzou v dávce 10 mg.kg⁻¹ hmotnosti mlíčáků. Ovulace jikernaček proběhla do 30 hodin po indukaci savčím GnRHa v dávce 5 µg.kg⁻¹. Sperma bylo při výtěru jímáno do imobilizačního roztoku (Kurokura 180 = 180 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.36 mM CaCl₂ and 2.38 mM NaHCO₃) a uchovávalo se v ledničce při 4–6 °C po dobu 4 hodin ([Rodina et al., 2004](#)). Směs jiker o hmotnosti 100 g na 1 ml spermatu s imobilizačním roztokem (objemový poměr 0,5 dílu spermatu : 1 dílu imobilizačního roztoku) byla aktivována 100 ml vody z líhne o teplotě 22 °C. Po třech minutách byl přebytek roztoku slit a za stálého míchání nádobou bylo doplněno 100 ml odlepkovacího roztoku v koncentraci

2 ml enzymu Alcalasy, *Bacillus licheniformis*; CALBIOCHEM cat. no. 12674120, naředěného 998 ml vodou z líhně s expozicí po dobu dvou minut. Po této expozici byly oplozené jikry za stálého míchání rychle propláchnuty vodou z líhně a inkubovány v Zugských lahvích při 22 °C do odběru pro experimentální účely.

4.2.2. Výtěr a inkubace jiker kapra obecného

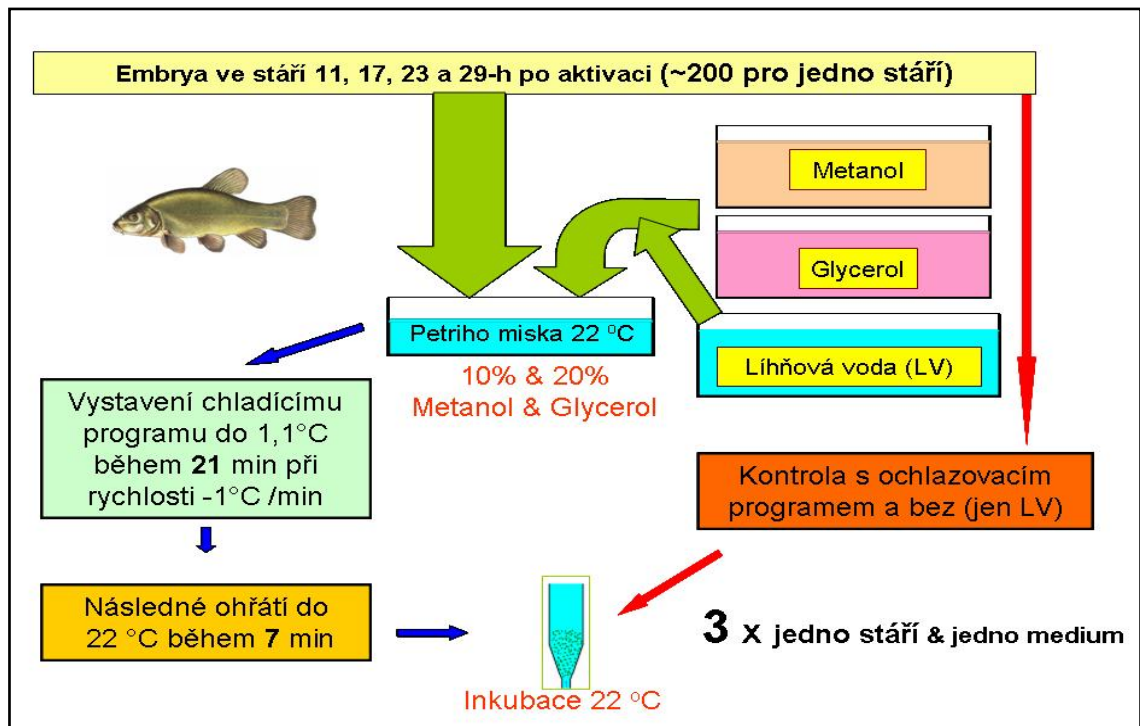
Výtěr u kapra v průběhu května byl indukován injekční aplikací suspenze kapří hypofýzy do hřbetní svaloviny. Pro mlíčáky v dávce 1 mg.kg⁻¹ a to 24 hodin před předpokládanou dobou výtěru. Jikernačkám byla nejprve injekčně aplikována dávka 0,4 mg.kg⁻¹ a to 24 hodin před výtěrem, druhá dávka 2,1 mg.kg⁻¹ a to 12 hodin před samotným výtěrem. V době očekávaného výtěru byly ryby neustále kontrolovány. Sperma mlíčáků kapra bylo jímáno do suchých plastových nádob, původně určených pro pěstování buněčných kultur. Poměrně velký objem nádob vůči relativně malému objemu jímaného spermatu umožňoval skladování spermatu v tenké vrstvě a s přístupem vzduchu při 4–6°C po dobu 5 hodin do experimentu. V době inseminace byly použity jikry od tří jikernaček v celkové hmotnosti 1 kg a spermatu o objemu 10 ml aktivovaného vodou z líhně o teplotě 22 °C po dobu 2 minut a následně odlepováno v suspenzi mléka po dobu 45 minut s inkubací v Zugské láhvi při 22 °C pro experiment II. a 18 °C pro experiment III. a IV. do odběru pro experimentální účely.

4.3. Vlastní uspořádání experimentů

4.3.1. I. Experiment u lína obecného k ověření vnímavosti embryí v různém stádiu vývoje k teplotním změnám a kryokonzervačním mediím

Experiment probíhal v roce 2005. Embrya lína byly odebírány ve stáří 11, 17, 23 a 29 hodin po oplození jiker. Vždy do jedné Petriho misky o průměru 10 cm bylo umístěno zhruba 200 embryí. Proběhly vždy tři opakování pro každou proměnnou (tzn. pro stáří embrya a konzervační médium) Embrya byla přelita 20 ml konzervačního média: 10 % methanolu, 20 % methanolu, 10 % glycerínu a 20 % glycerínu naředěných vodou z líhně. Kontrolou byla voda z líhně s nebo bez ochlazovacího režimu. Před

vlastním experimentem byla embrya inkubována v Zugských lahvích. Po experimentu v experimentálních žlabech při konstantní teplotě 22 °C (viz obr. 9, 10 a 11).



Obr. 9: Schéma experimentu I.



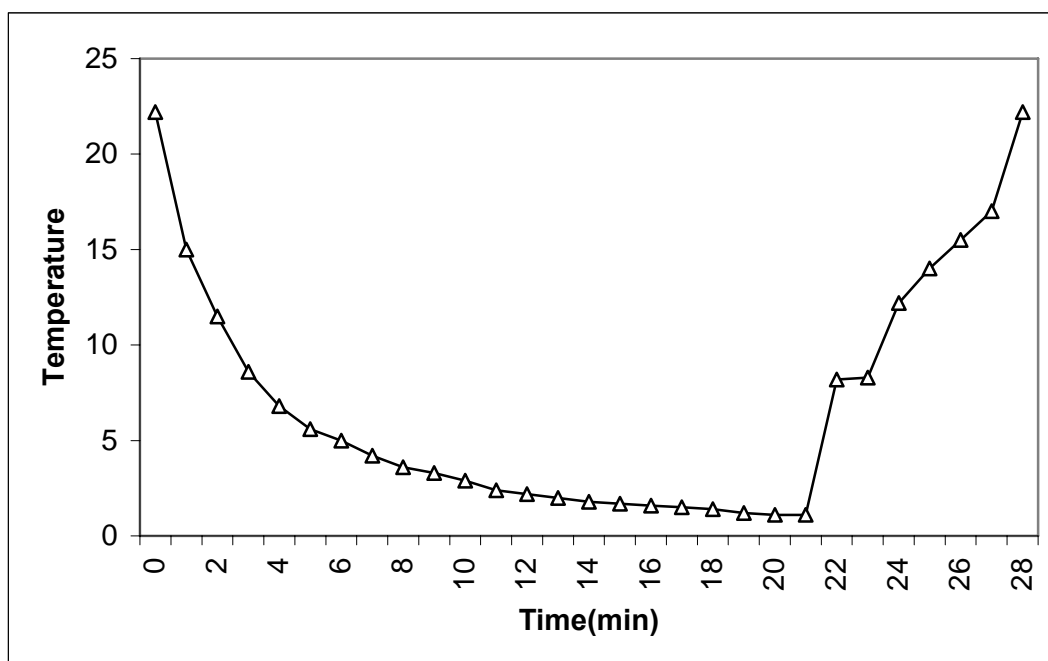
Obr. 10: Experimentální žlaby



Obr. 11: Experimentální žlaby – detail průtočného boxu

4.3.1.1. Ochlazovací režim

Embrya po umístění do konzervačních medií nebo vody z líhně ve čtyřech stupních vývoje byla v Petriho misce podrobena ochlazovací proceduře z 22 °C do 1.1 °C v průběhu 21 minut a dále ohřívány po dobu sedmi minut do 22 °C. Následně byla embrya umístěna do experimentálních průtočných boxů o objemu 0,5 l kde byla inkubována při 22 °C do vylíhnutí (obr. 11).

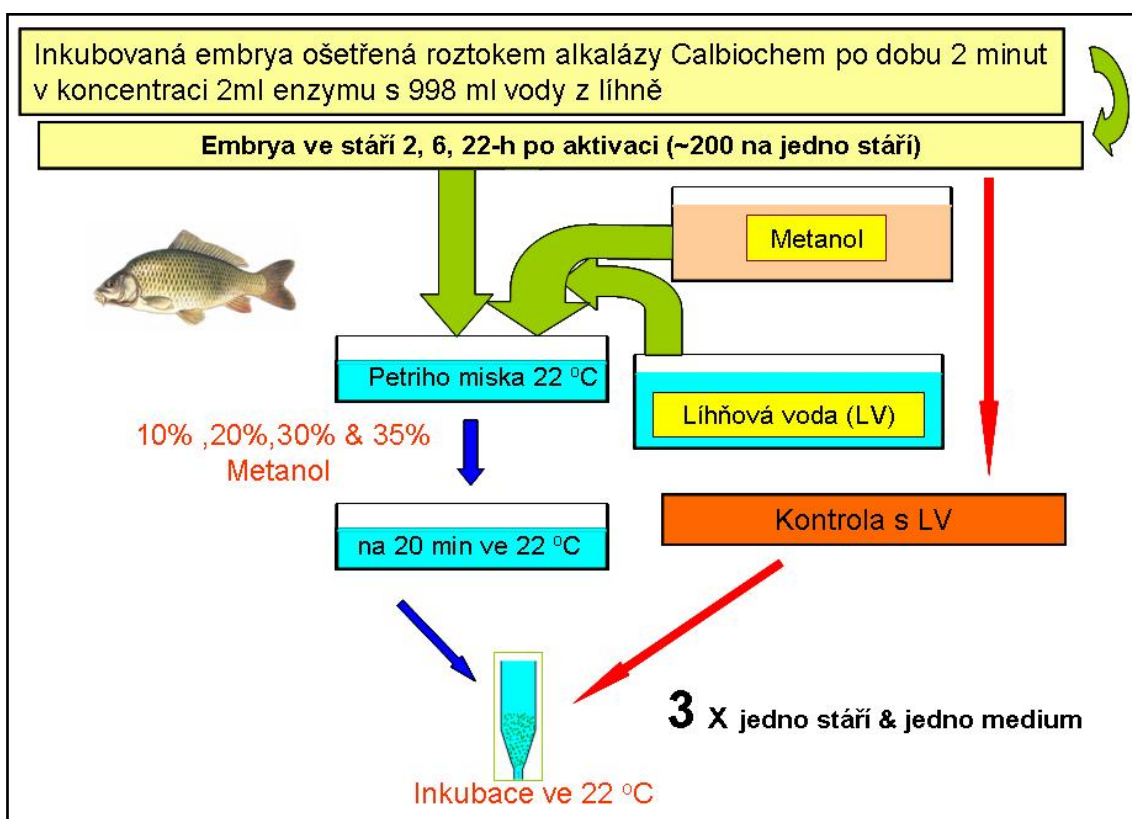


Graf 1: Snižování a zvyšování teploty u embryí lína ve stáří 11, 17, 23 a 29 hodin po oplození jiker v pěti různých médiích (10 a 20 % methanol, 10 a 20 % glycerín a voda z líhně)

4.3.2. II. Experiment u kapra obecného k ověření vnímavosti embryí v různém stádiu vývoje ke kryokonzervačním mediím při teplotě 22 °C

Vzhledem k uvažovanému využití vitrifikačních metod tzv. šokového zmrazení z +20 °C do -196 °C jsme v roce 2006 upustili od prověřování ochlazovací rezistence embryí k teplotám blízkým 0 °C, neboť ztratily na svém významu. Zmrazení při vitrifikaci trvá v řádu 1–3 s a období ochlazení není pro přežití embryí rozhodující.

Před vlastním ošetřením embryí v kryokonzervačních médiích jsme inkubovaná embrya ošetřili roztokem alkalázy (Calbiochem) po dobu dvou minut v koncentraci 2 ml enzymu s 998 ml vody z líhně. U kapra, obdobně jako u lína, jsme prověřovali vliv methanolu na přežití embryí kapra. Bylo použito 10, 20, 30 a 35 % roztoku methanolu naředěného vodou z líhně. Pro dokreslení se jednalo o koncentrace 2.47, 4.94, 7.41 a 8.65 mmol.l⁻¹. Vždy 200 kapřích embryí ve stáří 2, 6 a 22 hodin po oplození bylo inkubováno v Petriho miskách o průměru 10 cm ve 20 ml kryokonzervačního media po dobu 20 minut při teplotě 22 °C. Následně byla embrya přenesena do inkubačních boxů s obdobnou teplotou a inkubována až do vylíhnutí (viz schéma obr. 12).



Obr. 12: Schéma experimentu II.

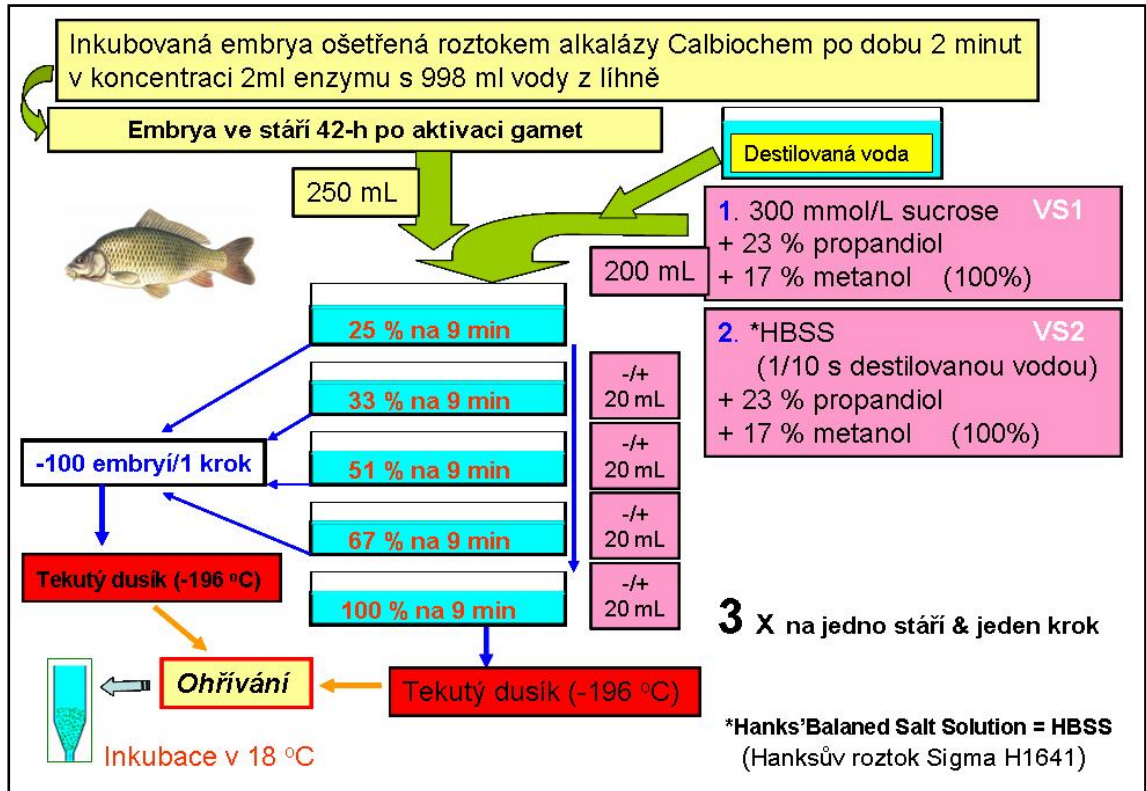
4.3.3. III. Experiment u kapra obecného k ověření vnímavosti embryí k postupnému přidávání kryokonzervačních médií při teplotě 18 °C.

Na podkladě výsledků docílených u experimentu II. a v závislosti na poznatcích z literatury, že starší embrya jsou méně vnímavá k toxicitě kryoprotektiv jsme testovali embrya stará 24 hodin od oplození a inkubovaná při 18 °C. K testu jsme využili kryokonzervačního roztoku dle [Chen a Tian \(2005\)](#) č. 1 (pod označením VS1), což je: cukrůsa 300 mmol.l⁻¹ doplněná o 23 % propandiolu a 17 % methanolu a roztoku č. 2 (pod označením VS2), což byl Hanksův roztok Sigma H1641 naředěný 1:10 destilovanou vodou a doplněný o 23 % propandiolu a 17 % methanolu. Oba roztoky jsme postupně přidávali k embryím a to vždy 25 ml (300 embryí v ml) o stáří 24 hodin +20 ml média a to v intervalu devíti minut se zvyšováním koncentrační řady kryoprotektivního media č.1 a č.2 z 25 % na 33 %, 51 %, 67 % a finálně na 100 % základního roztoku (roztoky byly naředěny destilovanou vodou na příslušnou koncentraci). Mezi jednotlivými koncentračními řadami jsme vždy po 100 embryích (se třemi opakováními) dali inkubovat do inkubačních boxů s teplotou 18 °C a příslušné médium o nižší koncentraci jsem opatrně slili a přidali 20 ml koncentrovanějšího média. Časově tak došlo k postupnému zvyšování koncentrace vždy v 0, 9, 18, 27 a 36 minutách s maximální inkubací po dobu 45 minut u 100 % roztoku. Nižší inkubační teplota byla zvolena záměrně vzhledem k teplotě vzduchu na líně. Teplota z předchozího experimentu se nedala dodržet. Odebrané množství embryí v průběhu koncentrační řady jsme k celkovému objemu a nepřesnostem v odstraňování médií s nižší koncentrací považovali za zanedbatelné (viz obr. 13).

4.3.4. IV. Experiment u kapra obecného k vitrificačnímu zmrazení embryí do -196 °C.

Metodicky jsme využili úspěšného pokusu III. s použitím roztoku č. 2 (VS2) tzn. Hanksova roztoku s 23 % propandiolu a 17 % methanolu v koncentrační a časové řadě kopírující experiment III. Na rozdíl od experimentu III. jsme použili 250 ml ošetřených embryí alkalazou ve stáří 42 hodin a přidávali postupně po 9 minutách 200 ml roztoku VS2 o koncentraci 33, 51, 67 a 100 %. Vždy na závěr inkubace příslušné koncentrace jsme zmrazili zhruba 100 embryí s opakováním (3 x). Zmrazování v principu představovalo pouze vhození zhruba 0,3–0,4 ml embryí do kapalného dusíku a po

1 minutě následovalo rozmrazení a to přenesením zmrazených embryí z kapalného dusíku do inkubační lázně o teplotě 18 °C. Obdobným způsobem byla inkubována kontrolní embrya bez zmrazení a inkubace v médiu (viz obr. 13).



Obr. 13: Společné schéma experimentu III. a IV. (není znázorněna kontrola)

4.4. Kontrola líhivosti u všech experimentů

Během líhnutí byly odstraňovány a zaznamenávány neoplozené jikry a jikry zasažené plísní. Po vykulení (cca 1–4 dny při 22 °C) byl určen počet vykulených jedinců a líhivost vůči celkovému počtu jiker takto inkubovaných. Procento líhivosti (H_r) bylo určeno pro každý inkubační box kdy množství vylíhlých embryí (H_l) bylo děleno množstvím nasazených embryí (E_t): $H_r = (H_l/E_t).100$

Procento životaschopných embryí (E_l) bylo rovněž určeno pro každý inkubační box, přičemž množství životaschopných embryí tedy normálně vyvinutých bylo (E_n) děleno množstvím vylíhlých embryí (E_h) kdy: $E_l = (E_n/E_h).100$

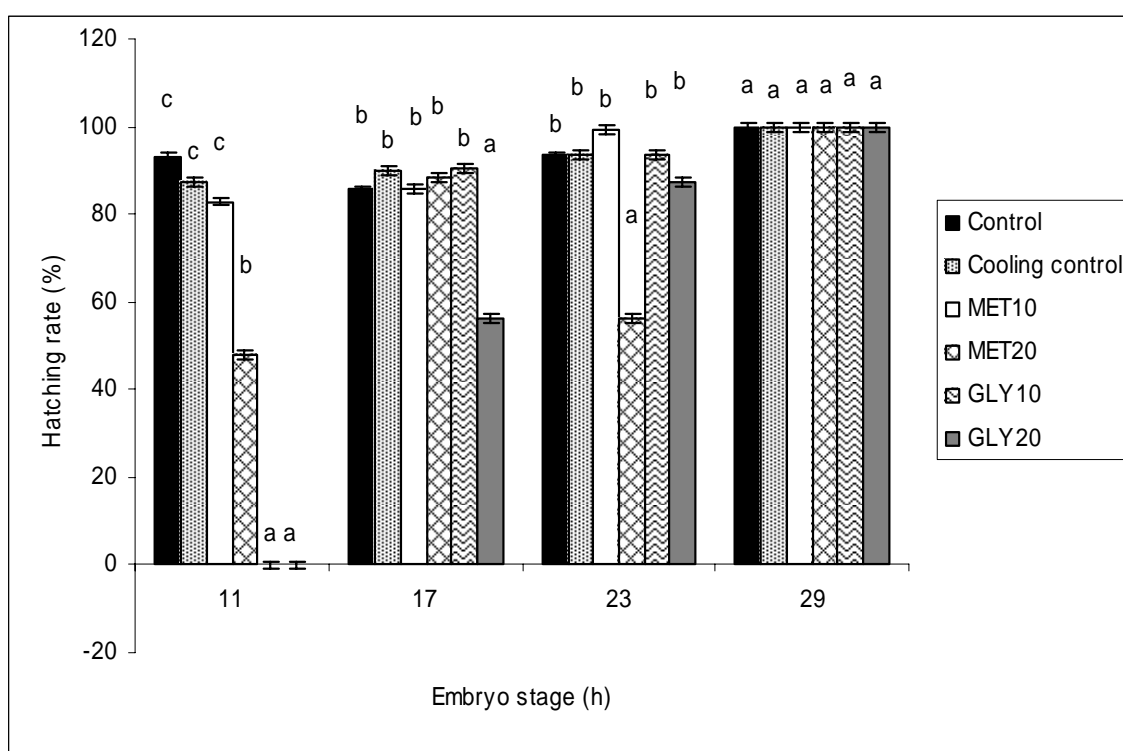
4.5. Statistická analýza

Průměr byl vždy vypočítán ze tří opakování doplněný směrodatnou odchylkou souboru (SD). Statistická průkaznost byla zjišťována při využití několikanásobné analýzy variance (ANOVA, Statgraphics version 5 ([ANONYMUS 2001](#))), následovaný několikanásobným Tukey HSD range testem. Pravděpodobnost na hladině významnosti $p < 0,05$ byla považována za průkaznou.

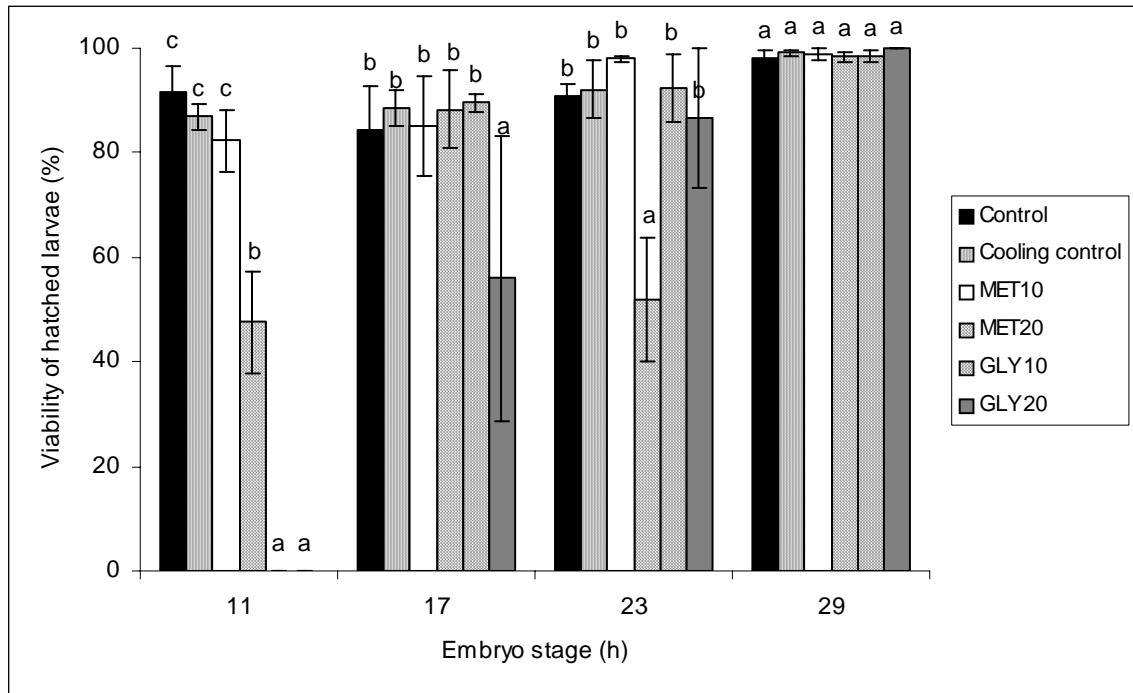
5. VÝSLEDKY

5.1. I. Experiment u lína obecného k ověření vnímavosti embryí v různém stádiu vývoje k teplotním změnám a kryokonzervačním mediím

Z dosažených výsledků je patrné, že nejlepší úroveň uchování embryí lína a vzhledem k 100 % líhivosti (graf 2) a nulovému poškození embryí (graf 3) došlo ve stáří 29 hodin od oplození ve všech kryokonzervačních mediích, včetně kontrol. Embrya jsou v tom to období velmi rezistentní. Pro embrya ve stáří 11 hodin od oplození byl glycerín na úrovni 10 nebo 20 % toxický s nulovou líhivostí.



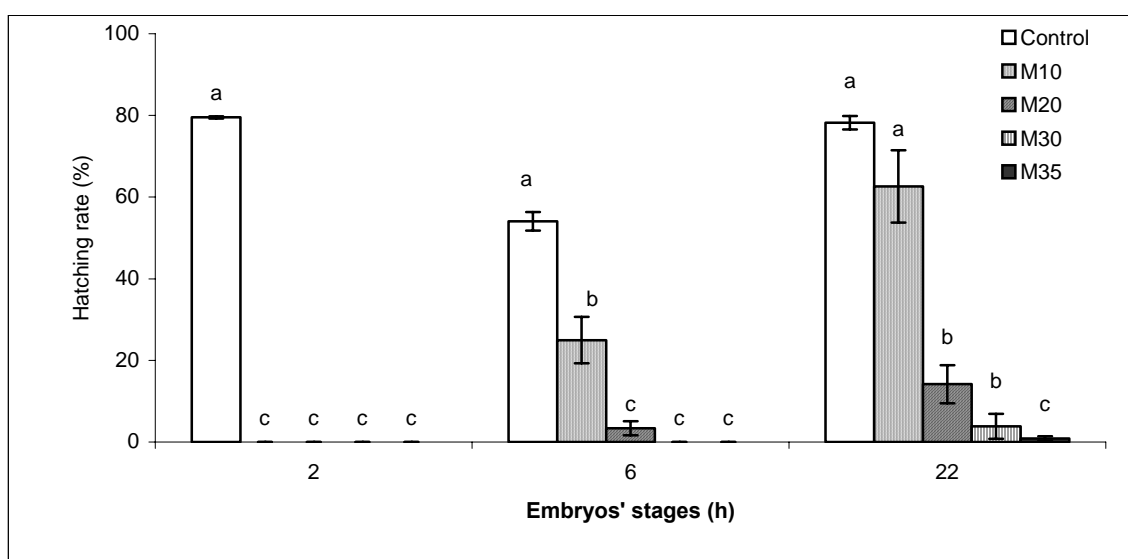
Graf 2: Efekt kryokonzervačních médií na líhivost embryí ošetřených v různém stáří v hodinách od oplození. *Control* – kontrola s požitím vody z líhně, *Cooling kontrol* – kontrola s použitím vody z líhně včetně ochlazovacího režimu, *MET* 10, 20 – methanol v procentech, *GLY* 10, 20 – glycerín v procentech; U hodnot se stejným alfabetickým znakem nebyl nalezen průkazný rozdíl.



Graf 3: Efekt kryokonzervačních médií na líhivost životaschopných nemalformovaných embryí ošetřených v různém stáří v hodinách od oplození. *Control* – kontrola s použitím vody z líhně, *Cooling control* – kontrola s použitím vody z líhně včetně ochlazovacího režimu, *MET* 10, 20 – methanol v procentech, *GLY* 10, 20 – glycerín v procentech; U hodnot se stejným alfabetickým znakem nebyl nalezen průkazný rozdíl.

5.2. II. Experiment u kapra obecného k ověření vnímavosti embryí v různém stádiu vývoje ke kryokonzervačním mediím při teplotě 22 °C

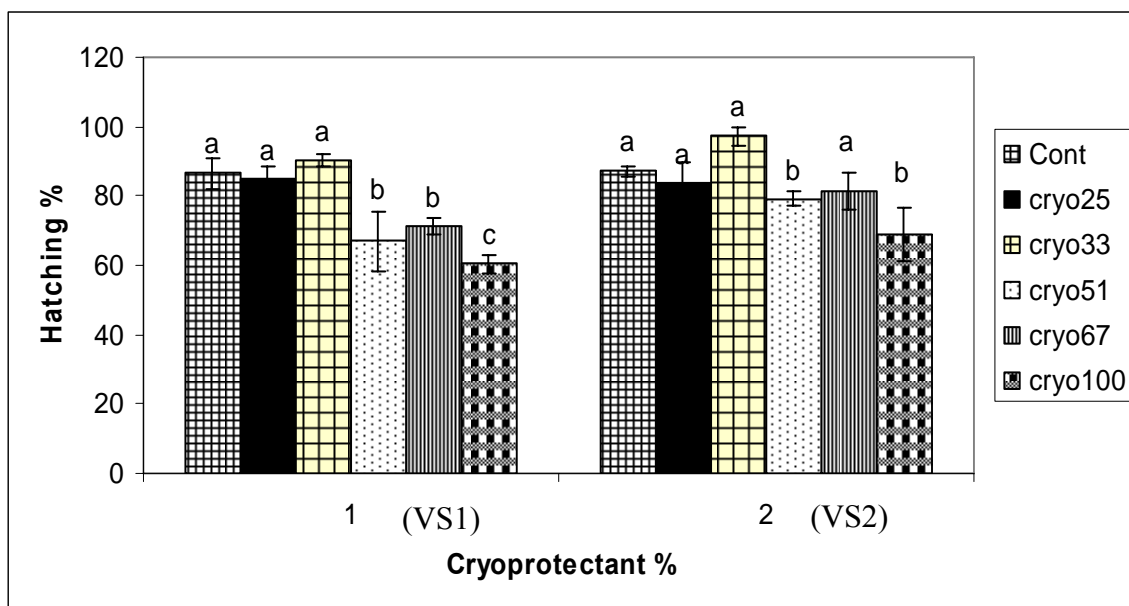
U embryí kapra obecného obdobně jako u lína nejlepších hodnot uchování embryí bylo dosaženo u nejstarších embryí. Na rozdíl od lína ovšem došlo k jednoznačnému poklesu líhivosti v závislosti na zvyšující se koncentraci methanolu. Pouze 10 % methanol uchoval dostatečnou líhivost embryí (graf 4). V případě inkubace embryí kapra ve stáří 2 hodin byla rezistence embryí k metanolu nulová. Embrya v tomto období nejsou rezistentní ke kryoprotektivum.



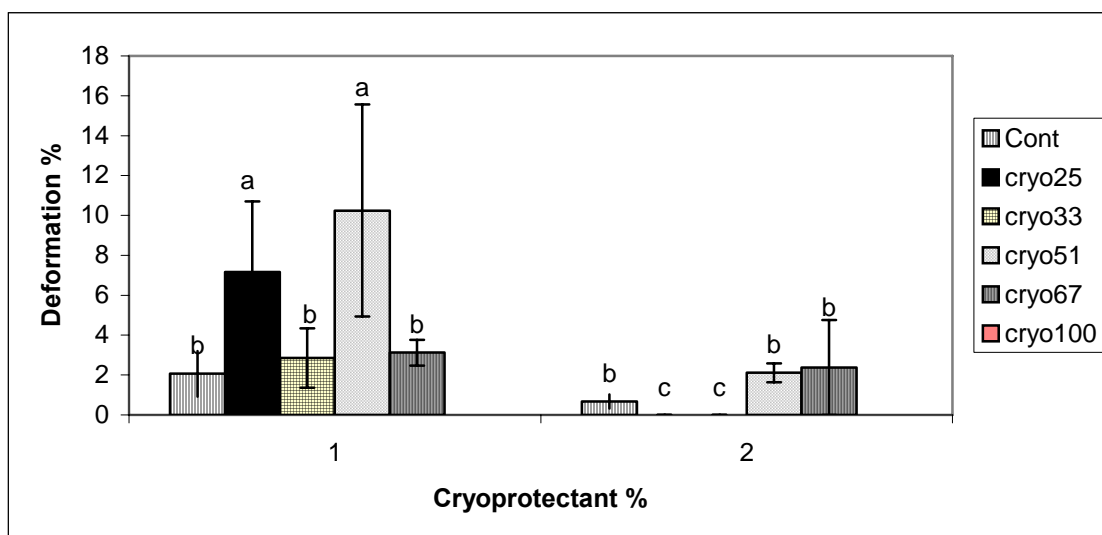
Graf 4: Efekt kryokonzervačních médií na líhivost embryí ošetřených v různém stáří (v hodinách) od oplození. *Control* – kontrola s požitím vody z líhně, *M* 10, 20, 30, 35 – methanol v procentech; U hodnot se stejným alfabetickým znakem nebyl nalezen průkazný rozdíl.

5.3. III. Experiment u kapra obecného k ověření vnímavosti embryí k postupnému přidávání kryokonzervačních médií při teplotě 18 °C.

U embryí kapra obecného ve stáří 24 hodin bylo dosaženo poměrně stabilních výsledků uchování líhnivosti v postupně se zvyšující koncentraci kryoprotektivních látek (graf 5) až po docílení úrovně se 40 % obsahem kryoprotektiv (míněno 23 % propandiolu + 17 % methanolu) u roztoku pod označením č. 2 (VS2) obsahující dále Hanksův roztok ředěný 1/10 (viz. graf 5, *cryoprotectant 2*, *cryo – 100*). Cukrosa obsazena v roztoku č. 1 (VS1) se ukázala jako nevhodná, neboť docházelo k líhnutí velkého množství malformací, tzn. neživotného váčkového plůdku (graf 6). Postupné „pumpování“ kryoprotektiv do embrya se ukázalo jako velmi dobré, čemuž odpovídá dosažená líhnivost u neřaděného roztoku č.2 (VS2) úrovně 70 %. Líhnivost se sice liší od kontroly a nižších úrovní koncentrací, ale pokles líhnivosti nebyl do té míry tak dramatický



Graf 5: Efekt kryokonzervačních médií na líhnivost embryí ošetřených ve stáří 24 hodin od oplození. *Cont* – kontrola s požitím vody z líhně; *cryo* – 25, 33, 51, 67 a 100 – koncentrační řada zásobních roztoků v procentech, tzn. roztoku č. 1 obsahující 300 mmol/l cukrosy a č. 2 obsahující Hanksův roztok, včetně 23 % propandiolu a 17 % methanolu u obou roztoků; U hodnot se stejným alfabetickým znakem nebyl nalezen průkazný rozdíl.



Graf 6: Efekt kryokonzervačních médií na líhivost životaschopných a nedeformovaných embryí ošetřených ve stáří 24 hodin od oplození. *Cont* – kontrola s požitím vody z líhně; *Cryo* – 25, 33, 51, 67 a 100 – koncentrační řada zásobních roztoků v procentech, tzn. roztoku č. 1 (obsahující: 300 mmol/l cukrosy a č. 2 obsahující: Hanksův roztok, včetně 23 % propandiolu a 17 % methanolu u obou roztoků). U hodnot se stejným alfabetickým znakem nebyl nalezen průkazný rozdíl.

5.4. IV. Experiment u kapra obecného k vitrifikačnímu zmrazení embryí do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Výsledky dosažené při zmrazování 42 hodin starých embryí na úrovni líhivosti 4 % embryí v případě zmrazení embryí v roztoku obsahující 100 % koncentraci základního Hanksova roztoku s kryoprotektivy, ukazují na perspektivu využití metodiky postupného „pumpování“ kryoprotektivních látek do embryí s využitím šokového způsobu zmrazení bez tvorby krystalů tzv. vitrifikace do úrovně $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. DISKUZE

6.1. Vyhodnocení experimentu I. u lína obecného

Rezistence embryí lína obecného vůči kryoprotektivům byla ověřována vůbec poprvé pro tento druh. V průběhu posledních 30 let byla většina pokusů orientována na pstruha obecného (*Salmo trutta*) [Erdahl and Graham \(1980\)](#), sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) [Zell \(1978\)](#), kapra obecného (*Cyprinus carpio*) [Zhang et al. \(1989\)](#), sumečka afrického (*Clarias gariepinus*) [Magyary et al. \(1996\)](#) a dániu pruhovaném (*Danio rerio*) [Harvey et al. \(1983\)](#), [Zhang and Rawson \(1996a\)](#), [Zhang et al. \(1993\)](#) a [Wang et al. \(2006\)](#). Na základě těchto zjištění jsme v první fázi pokusu na embryích lína postupovali obdobně a jako kryoprotektivum jsem použili glycerol a methanol, které se prokázaly jako nejvhodnější

Námi zvolená vývojová stádia embryí ve stáří 11, 17, 23 a 29 hodin po oplození jiker, rovněž korespondují s publikovanými pracemi uvedených výše. Úroveň získaných výsledků prokazatelně dokazuje vyšší rezistenci ke kryoprotektivu u embrya ve stáří 29 hodin ve srovnání s kontrolou, než u embrya ve stáří 11 hodin. Prokazatelné je zároveň vyšší procento líhnivosti tak i nižší procento deformovaných jedinců. Ke stejným závěrům dospěli ve svých studiích prováděných na kapru obecném ([Dinnyes et al., 1998](#)), halančíku japonském a pstruhu duhovém ([Suzuki et al., 1995](#)) a na dániu pruhovaném ([Adams et al., 2005](#); [Rawson a Zhang, 2005](#)). Můžeme tedy potvrdit, že tolerance embryí lína ke kryoprotektivům, je závislá na vývojovém stádiu. Pozdější stádia embryí jsou tak obecně odolnější. Dokladem jsou i aktuální výsledky [Chena a Tiana \(2005\)](#), kteří zjistili, že toxicita kryoprotektivů k embryím japonského platýse (*Paralichthys olivaceus*), závisí na vývojovém stádiu. Je však třeba zdůraznit, že zde důležitou roli nehraje pouze chemická povaha kryoprotektiva a vývojové stádium embrya, ale významná je též druhová specifika ([Cabrita et al., 2006](#)).

Vliv zvyšujících se koncentrací jednotlivých kryoprotektivů byl průkazně zjištěn ve stáří 11, 17 a 23 hodin. Výsledky potvrzují skutečnost, že s vyšší koncentrací se zároveň zvyšuje i toxicita v závislosti na čase vystavení. Zvolená doba expozice a ochlazovací program byly ve shodě s pracemi na dániu pruhovaném ([Zhang a Rawson, 1995, 1996a](#)), kteří je uvádí jako perspektivní pro použití následného skokového zmrazení, tzv. vitrifikace, která byla i jedním z našich cílů.

Díky pozitivním výsledkům rezistence ke kryoprotektivům u embryí ve stáří 29 hodin, jsme se je pokusili zmrazit metodou vitrifikace. Bohužel všechny výsledky byly negativní, došlo ke zbělení embryí, tzn. tvorbě ledových krystalů a tím poškození buněčných stěn. Jedním z hlavních vysvětlení je malá membránová propustnost všech oddělení embrya, které zapříčinilo nedostatečné proniknutí kryoprotektiv, působící tvorbu těchto krystalů. Podobné výsledky uvádí [Liu et al. \(1998\)](#) při vitrifikaci embryí dávia pruhovaného. Bude třeba dalšího šetření pro vytvoření vhodnějších vitrifikačních roztoků, ale hlavně metodických postupů, jak dokazuje následující experiment u kapra obecného.

6.2. Vyhodnocení experimentu II., III. a IV. u kapra obecného

V dalším roce jsme s ohledem na nové poznatky z literatury a vlastní zkušenosti s předchozím experimentem na embryích lína obecného, zvolili upravený postup v testování rezistence kryoprotektiv a následného zmrazení metodou vitrifikace na úroveň $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Prvně byl opět testován metanol (experiment II.), který, na rozdíl od lína, průkazně vykázal se vzrůstající koncentrací snižující se procento líhivosti. Rovněž se potvrdila závislost vývojového stádia na přežití po ošetření kryoprotektivem ([Dinnyes et al., 1998](#)). Pozitivní výsledky ve stádiu 22 hodin byly určující pro volbu vývojového stádia experimentu III.

V experimentu III. jsme ověřovali použití vitrifikačních roztoků, které úspěšně použili [Chen a Tian \(2005\)](#) při vitrifikaci japonského platýse. Pozitivně se tak potvrdila skutečnost, že použitím kombinace několika kryoprotektiv, jednoho propustného (vůči membránám embrya) a jednoho nebo více nepropustných, dojde k významnému zlepšení propustnosti jednotlivých částí embrya ([Kuleshova et al., 2001](#)). Procento líhivosti nekleslo pod 70 %, což znamená dosavadní nejlepší výsledek pro embrya kapra obecného ve srovnání s dosud publikovanými pracemi [Zhang et al. \(1989\)](#), [Dinnyes et al. \(1998\)](#) a [Ahammad et al. \(2003\)](#). Úspěšné výsledky potvrzují též použití současného trendu postupného „pumpování“ kryoprotektiv do embryí jako velmi perspektivního. Tento trend popisuje [Cabrita et al. \(2006\)](#) v poslední publikované studii zabývající se zmrazováním rybích embryí.

Přidávání polymerů a cukrů, významně mění vlastnosti vitrifikačních roztoků v závislosti na použitém kryoprotektivu ([Shaw et al., 1997](#)). Tento fakt se potvrdil

u roztoku VS1, jehož součástí byla cukrósa. Zaznamenali jsem velké procento deformovaných embryí ve všech koncentracích a tím potvrdili jeho nevhodnost jako vitrifikačního média.

Získané pozitivní výsledky s roztokem VS2, byly následně využité pro zmrazení metodou vitrifikace. Přežití 4 % embryí po rozmrazení, je jedním z prvních úspěšných pokusů u sladkovodního druhu. Obdobné výsledky byly doposud získané pouze u mořských druhů [Cabrita et al. \(2006\)](#), [Edashige et al. \(2006\)](#).

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo získat další základní poznatky o krátkodobém uchovávání embryí v kryoprotektivní médiích, vytvoření tzv. vitrifikačních médií pro budoucí zmrazování embryí kapra a lína a odzkoušet následně první metody zmrazování. V literárním přehledu jsem se pokusil setřídít poznatky o dosavadních znalostech dané problematiky uchovávání rybích embryí pomocí zmrazování a s tím souvisejících aspektů, na které navazují s nově získanými údaji, které bude možno využít pro další výzkumnou činnost.

Stanovování rezistence rybích embryí ke kryoprotektivům je prvotním krokem k úspěšnému zmrazování embryí daného druhu. Získáním dalších znalostí v této problematice, by nám v budoucnu umožnilo uchovávat ohrožené druhy, tak i otevřelo cestu pro praktické potřeby produkční akvakultur.

Při vlastní experimentální práci s embryi lína a kapra prováděnou v letech 2005 a 2006 na VÚRH JU ve Vodňanech jsem dospěl k těmto závěrům:

Z dosažených významných poznatků možno uvést zejména úspěšné zmrazení embryí kapra metodou *in vitro* do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následné rozmrazení se 4 % přežitím, krátkodobé uchování embryí kapra a lína *in vitro* s vytvořením potřebných vitrifikačních roztoků. Metodika postupného „pumpování“ kryoprotektiva do embryí se zdá být velmi perspektivní, v závislosti na použití kombinace různých kryoprotektiv. Při navazujícím výzkumu se bude třeba dále zaměřit na koncentraci vitrifikačních médií, techniku vkládání embryí do tekutého dusíku a následného rozmrazení. Nutné ovšem je také prověřit otázku vzniku mutací mitochondriální a jaderné DNA, při zavádění metody zmrazování do praxe.

Význam uchovávání reprodukčního materiálu u ryb vzrůstá současně se zhoršujícím se stavem životního prostředí a zároveň stále větší celosvětovou spotřebou rybiho masa. Tato práce předkládá úspěšné poznatky na cestě za praktickým využitím uchování reprodukčního materiálu ryb pomocí zmrazování embryí.

8. SUMMARY

Different cryoprotectant media for cryopreservation of embryos has been tested on model species, i.e. common carp (*Cyprinus carpio*) and common tench (*Tinca tinca*). The aim of the study was to obtain such cryoprotectants, which will be acceptable for freezing embryos up to the temperature -196°C . Cryoprotectants of 10 % and 20 % methanol or 10 % and 20 % glycerin have been tested on the tench for 21 minutes of incubation on embryos of four stages, meaning at 11, 17, 23 and 29-hrs after activation of gametes. The results showed that the tench embryos were most resistant either to low temperature and or to the application of cryoprotectants in the stage of 29-hrs post gametes activation. On the other hand lower resistances were obtained in the stage of 11-hrs post gamete activation.

Embryos of carp 2, 6, 22, 24 and 42-hrs after gametes activation at temperature 18 and 22°C have been used for testing of concentration series of cryoprotectant methanol and two solutions marked VS1 and VS2 after previous disruption of egg envelope in enzyme alcalaze solution. Results showed linear decreasing resistance of embryos depending on increasing concentration of cryoprotectant methanol. Hatching success even at highest concentration of solution VS1 and VS2 has not declined below 70 %. Achieved results with solution VS2 have been subsequently used for freezing of carp embryos by special methods in cryobiology – vitrification. First results showed up to 4 % success of survival after freezing of embryos at -196°C .

Keywords: Carp *Cyprinus carpio*; Tench *Tinca tinca*; Cryoprotectant; Hatching; Vitrification; Embryos

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams, S. L.**, Zhang, T., Rawson, D. M. (2005). The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Theriogenology* 64 (7): 1591–1602.
- Ahammad, M. M.**, Bhattacharyya, D., Jana, B. B. (2003). Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2 degrees C in different concentrations of methanol and sucrose. *Theriogenology* 60 (8): 1409–1422.
- ANONYMUS**, (2001). Statistica for Windows [Computer program manual]. Statsoft, Tulsa
- Arii, N.**, Namai, K., Gomi, F. and Nakazawa, T. (1987). Cryopreservation of medaka embryos during development. *Zoological Science* 4: 813–818.
- Arii, K. T.**, Suzuki, R., Takai, F. and Kozima, T. (1992). Tolerance of fish eggs to dimethyl sulfoxide as the cryoprotectant. *Cryobiology* 29: 761–762.
- Bart, A.** (2000) New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: Terrence TR, Mazik PM, editors. *Cryopreservation in aquatic species*, 8. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society: 179–187.
- Baruš, V.**, Oliva, O. (eds.), (1995). *Mihulovci (Petromyzontes) a ryby (Osteichthyes)* (1). Academia, Praha: 698 pp.
- Billard, R.**, Gatty, J. L., Hollebecq, M. G., Marcel, J. and Saad, A. (1986). Biology of gametes, eggs and embryos. In: R. Billard and J. Marcel (Editor), *Aquaculture of Cyprinids*, INRA, Paris, pp. 151–164.
- Billard, R.** (1988). Artificial insemination and gamete management in fish. *Marine Behavioral Physiology* 14: 3–21.
- Billard, R.** (1990). Artificial insemination in fish. In: G.E. Lamming (Editor), *Marshall' Physiology of Reproduction*: 870–888.
- Billard, R.**, Cosson, J., Perchec, G. and Linhart, O. (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129: 95–112.
- Blaxter, J. H. S.** (1953). Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring, *Nature* 172 (4391): 1189–1190.
- Coward, K.**, Bromage, N. R., Hibbitt, O. and Parrington, J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12: 33–58.
- Cabrita, E.**, Nobles, V., Chereguini, O., Wallace, J. C. and Herráez, M. P. (2003). Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* 47: 204–213.
- Cabrita, E.**, Robles V., Wallace, J. C., Sarasquete, M. C., Herraéz, M. P. (2006). Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 251 (2–4): 245–255.
- Dinnyes, A.**, Urbanyi, B., Baranyai, B. and Magyary, I. (1998). Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* 50: 1–13.
- Edashige, K.**, Valdez, D. M., Hara, T., Saida, N., Seki, S., Kasai, M. (2006). Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. *Cryobiology* 53 (1): 96–106.
- Erdahl, D. A.** and Graham, E. F. (1980). Preservation of gametes of freshwater fish, in *Proc. Int. Congress Anim. Reprod. Artificial Insemin.*, 317–326.
- Erdahl, A. W.**, Graham, E. F. (1987). Fertility of rainbow-trout (*salmo-gairdneri*) gametes – gamete viability in artificial media. *Aquaculture* 60 (34): 323–332.
- Figiel, C. R.** and Tiersch, T. R. (1997). Comprehensive literature review of fish sperm cryopreservation. Annual meeting of the World Aquaculture Society, Seattle, Washington: 155 st.
- Gela, D.**, Linhart, O., Flajšhans, M., Rodina, M. (2003). Egg incubation time and hatching success in tench (*Tinca tinca* L.) related to the procedure of egg stickiness elimination. *Journal of Applied Ichthyology* 19, 132–133.

- Gwo, J. C.**, Stran, K. and Arnold, C. R. (1995). Changes in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenops ocellatus*) embryos during development. *Theriogenology* 43: 1155–1161.
- Hagedorn, M.**, Kleinhans, F. W., Wildt, D. E. and Rall, W. F. (1997). Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology* 34: 251–263.
- Hagedorn, M.** and Kleinhans, F. W. (2000). Problems and prospects in cryopreservation of fish embryo. *Cryopreservation in Aquatic Species*. In: Tiersch T. R. and Mazik P. M. Editors. World Aquaculture Society: 161–178.
- Hagedorn, M.**, Peterson, A., Mazur, P. and Kleinhans, F. W. (2004). High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. *Cryobiology* 49: 181–189.
- Harvey, B.**, Kelley, R. N., Ashwoodsmith, M. J. (1983). Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryo to glycerol and dimethylsulfoxide. *Cryobiology* 20 (4): 432–439.
- Horton, H. F.**, Ott, A. G. (1976). Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *Journal of the fisheries research board of Canada* 33 (4): 995–100.
- Horvath, L.**, Tamas, G., Tolg, I. (1984). *Special methods in pond fish husbandry*. Budapest. Akademia Kiado, Seattle, Halver Corporation, 147 st.
- Chábera, V.** (1980). Vyhodnocení umělého výtěru lína obecného (*Tinca tinca* L.) - plodnost jikernaček. Diplomová práce, VŠZ Č.Budějovice, 83 st.
- Chao, N.-H.**, Lin, T.-T., Chen, Y.-J., Hsu, H.-W. and Liao, I.-C. (1997). Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture* 155: 31–44.
- Chen, S. L.**, Tian, Y. S. (2005). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63, 1207–1219.
- Jensen, J. O. T.**, Alderdice, D. F. (1984). Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Aquaculture* 37: 251–265.
- Kouřil, J.**, Barth, T., Hamáčková, J. and Flégel, M. (1986). Induced ovulation in tench, *Tinca tinca* L. by various LH-RH synthetic analogues: Effect of site of administration and temperature. *Aquaculture* 54: 37–44.
- Kubů, F.** a Kouřil, J. (1985). Lín obecný (*Tinca tinca* L.). Účelová publikace Českého rybářského svazu, Naše vojsko, Praha: 100 st.
- Kuleshova, L. L.**, Shaw, J. M. and Trounson, A. O. (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43, pp. 21–31.
- Linhart, O.** (1984). Uchování jikera a embryí některých druhů ryb. *Buletin VÚRH Vodňany* 20(4): 22–30.
- Linhart, O.**, Kouřil, J. and Hamáčková, J. (1986a). The motile spermatozoa of wels, *Silurus glanis* L. and tench, *Tinca tinca* L. after sperm collection without water activation. *Práce VÚRH Vodňany* 15: 28–41.
- Linhart, O.** (1991). Evaluation of the sperm and the activation and fecundation of eggs. R.I.F.C.H., Metodika VÚRH Vodňany, 12 st.
- Linhart, O.** and Kvasnička, P. (1992). Artificial insemination in tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture and Fisheries Management*, 23: 125–130.
- Linhart, O.** and Billard, R. (1995). Survival of ovulated oocytes in the European catfish (*Silurus glanis* L.) after *in vivo* and *in vitro* storage or exposure to saline solutions and urine. *Aquatic Living Resources* 8: 317–322.
- Linhart, O.**, Kudo, S., Billard, R., Šlechta, V. and Mikodina, Y.V. (1995). Morphology composition and fertilization of carp eggs. *Aquaculture* 129: 75–93.
- Linhart, O.** (1996). Biologie gamet a studium chromozomových manipulací u některých druhů ryb, Uhřetěves, VUŽV, I, II a díl III, ~500 st.
- Linhart, O.**, Gela, D., Flajšhans, M., Duda, P., Rodina, M. and Novák V. (2000). Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture* 191, 303–308.

- Linhart, O.**, Rodina, M., Gela, D., Kocour, M. and Rodriguez, M. (2003). Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of eggs stickiness. *Aquatic Living Resources* 16, 450–456.
- Linhart, O.**, Rodina, M., Kocour, M., Gela, D. (2006). Insemination, fertilization and gamete management in tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture international* 14 (1–2): 61–73.
- Liu, K. C.**, Chou, T. C. and Lin, H. D. (1993). Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. *Aquatic and Living Resource* 6: 63–66.
- Liu, X.-H.**, Zhang, T. and Rawson, D. M. (1998). Feasibility of vitrification of zebrafish embryos using methanol, *Cryo-Letters* 19, pp. 309–318.
- Loeffler, C. A.** (1971). Water exchange in the pike egg. *Journal of Experimental Biology* 55: 797–811.
- Magyary, I.**, Dinnyes, A., Varkonyi, E., Szabo, R., and Varadi L. (1996). Cryopreservation of fish embryos and embryonic cells. *Aquaculture* 137, 103–108.
- Miyazaki, H.**, Kaneko, T., Hasegawa, S. and Hirano, T. (1998). Developmental changes in drinking rate and ion and water permeability during early life stages of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, reared in fresh water and seawater. *Fish Physiology Biochemistry* 18 (3): 277–284.
- O'Neil, L.**, Panter, S. J., Fuller, B. J. and Shaw, R. W. (1999). Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M DMSO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature. *Cryobiology* 37: 59–66.
- Pekař, Č.** (1965). Observation of the course of the spawning of tench (*Tinca tinca* L.). *Buletin VÚR Vodňany* (2): 14–18.
- Polge, C.**, Smith, A. U. and Parks, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- Potts, W. T. W.** and Rudy, P. P. (1969). Water balance in the eggs of the Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Experimental Biology* 50: 223–237.
- Rana, K.** (1995). Preservation of gametes *in* Broodstock Management and Egg and Larval Quality. N. R. Bromage and R. J. Roberts, editors. University Press, Cambridge, England: 53–75.
- Rawson, D. M.**, Zhang, T., Kalicharan, D. and Jongbloed, W. L. (2000). Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Research* 31: 325–336.
- Rawson, D. M.** and Zhang, T. (2005). New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryo. In: Villa Gualino, Turin, Italy - 5–7 March, 2005. The role of biotechnology: 209–210.
- Robertson, S. M.** and Lawrence, A. L. (1988). Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. *The Progressive Fish-Culturist* 50: 148–154.
- Nobles, V.**, Cabrita E., Real, M., Alvarez, R. and Herráez, M. P. (2003). Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology* 47: 30–39.
- Robles, V.**, Cabrita, E., de Paz, P., Cunado, S., Anel, L., Herraez, M. P. (2004). Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos, *Theriogenology* 61 (7–8): 1367–1379.
- Robles, V.**, Cabrita, E., Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Herraez, M. P., (2005). Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species, *Theriogenology* 64 (7): 1633–1646.
- Rodina, M.**, Cosson, J., Gela, D., Linhart, O. (2004). Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.), *Aquaculture international* 12 (1): 119–131.
- Rothbard, S.**, Rubinsthein, I. and Gólman, E. (1996). Storage of common carp, (*Cyprinus carpio* L.) eggs for short durations. *Aquaculture Research* 27: 175–181.

- Routray, P.**, Sužuji, T., Striissmann, C. A., Takai, R. (2002). Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka (*Oryzias latipes*). *Theriogenology* 58: 1483–1496.
- Shaw, J. M.**, Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R., Trounson, A. O. (1997). Vitrification properties of solutions of ethylene glykol in saline containing PVP, ficoll or dextran. *Cryobiology* 35, 219–229.
- Saad, A.** and Billard, R. (1987). Composition et emploi d'un dilueur d'insemination chery la carpe, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 65: 67–77.
- Schmehl, M. K.** and Graham, E. F. (1986). Changes in elemental composition of fertilized and unfertilized nonhem pike (*Esox lucius*) eggs incubated in buffer with and without diniethyl sulfoxide: an x-ray microanalysis study. *Gamete Research* 14: 911–106.
- Springate, J. R. C.**, Bromage, N. R., Elliott, J. A. K., Hudson, D. L. (1984). The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout *Salmo gairdneri* R. *Aquaculture* 43, 313–322.
- Štose, J.**, Donaldson, E. M. (1983). Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 31 (1): 51–65.
- Suzuki, T.**, Kodoma, H, Takai, R, Arii, R. and Kojima, T. T. (1995). Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and concentration in several fish embryos. *Fisheries Science* 61: 193–197.
- Takano, K.**, Hiroi, O., Yasukawa, M., Suetake, T. (1973). Studies on the retention of gametes of salmonid fishes: 1. On the fertility of chum salmon eggs after storage. *Scientific Reports of the Hokkaido Salmon Hatchery* 27: 31–37.
- Tytler, P.** and Ireland, J. (1993). The influence of temperature, salinity and external calcium on diffusional permeability of eggs of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 115 (3–4): 335–345
- Ujihira, M.**, Aizawa, N., Yamaguchi, R. and Kazuo, K. (1994). The mechanism of preservation of kilifish egg by extracellular freezing. *Cryobiology* 31: 606–607.
- Yaron, Z.** (1995). Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* 129: 49–73.
- Wang, R. Y.**, Zhang, T. T., Bao, Q. Y., Rawson, D. M. (2006): Study on fish embryo responses to the treatment of cryoprotective chemicals using impedance spectroscopy, *European biophysics journal with biophysics letters* 35 (3): 224–230.
- Woynarovich, E.** (1962). Hatching of carp eggs in zuger-glasses and breeding of carp larva until and age of 10 days, *Bamidgen* 14: 38–46.
- Woynarovich, E.** and Woynarovich, A. (1980). Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. *Aquaculture Hungarica* 2: 19–21.
- Zell, S. R.** (1978). Cryopreservation of gametes and embryo of salmonid fishes. *Annales de biologie animale biochimie biophysique* 18 (4): 1089–1099.
- Zhang, X. S.**, Zhao, L., Hua, T. C., Chen, X. H., Zhu, H.Y. (1989). A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryo. *Cryo Letters*, 10, pp. 271–278.
- Zhang, T.**, Rawson, D. M and Morfia, B. J. (1993). Cryopreservation of pre hatch embryo of zebrafish. *Aquatig Living Resource* 6: 145–153.
- Zhang, T.** and Rawson, D. M. (1995). Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo. *Cryobiology* 32: 239–246.
- Zhang, T.** and Rawson, D. M. (1996a). Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo. *Cryobiology* 33: 1–13.
- Zhang, T.** and Rawson, D. M.. (1996b). Permeability of the vitelline membrane of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to methanol and propane-I, 2-diol. *Cryo-Letters* 17: 273–280.
- Zhang, T.** (2004). Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species. Life in the frozen state. In: Fuller B. J., Lane N. and Benson E. E, Editors, CRC Press: 416–435.

- Zhang, Y. Z.**, Zhang, S.C., Liu, X. Y., Xu, Y. J., Hu, J. H., Xu, Y. Y., Li, J., Chen, S. L. (2005). Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryo. *Theriogenology* 63: 765–773.
- Żuromska, H.** (1981). Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench *Tinca tinca* (L.). Part VI. Estimation of milt quality. *Polish Arch.Hydrobiology* 28(2): 229-242.