

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta zemědělská

Bakalářská práce

**Kryokonzervace spermatu ryb na modelovém druhu kapra
obecného (*Cyprinus carpio*): vliv různých teplotních režimů
zamrazování na životnost spermií po rozmrazení.**

Denisa Sochorová

vedoucí práce:

Ing. Marek Rodina, Ph.D.

konzultant:

Dzyuba Borys, MSc., Ph.D.

České Budějovice 2012

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci na téma Kryokonzervace spermatu ryb na modelovém druhu kapra obecného (*Cyprinus carpio*): vliv různých teplotních režimů zamrazování na životnost spermií po rozmrazení vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, 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, 10. 4. 2012

Podpis:.....

Poděkování:

Mé poděkování patří především mému školiteli Ing. Marku Rodinovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady při psaní mé práce. Mé díky patří Sergeji Boryshpolci a Borysi Dzyubovi a ostatním, kteří mi poskytli potřebné informace, pomoc a radu pro vypracování této práce. Také bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu během studia.

OBSAH:

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1 Historie Kryokonzervace	2
2.2 Kapr jako objekt zájmu	3
2.2.1 Plemena kapra obecného	3
2.3 Sperma	4
2.3.1 Spermie	4
2.3.1.1 Popis spermie	4
2.3.1.1.1 Hlavička spermie	4
2.3.1.1.2 Střední část	7
2.3.1.1.3 Bičík	7
2.3.2 Spermie kostnatých druhů ryb s vnějším oplozením	8
2.3.3 Spermie chrupavčitých druhů ryb	10
2.3.4 Semená plazma	11
2.3.5 Vznik spermií	11
2.3.6 Pohyb spermií	12
2.4 Hodnocení spermatu	12
2.4.1 Makroskopické hodnocení	12
2.4.2 Mikroskopické hodnocení	13
2.5 Odběr spermatu	14
2.5.1 Odběr spermatu z živých ryb	15
2.5.2 Odběr testikulárního spermatu z čerstvě usmrcených ryb	15
2.6 Uchování spermatu ryb na krátkou dobu se zaměřením na kapra obecného (<i>Cyprinus carpio</i>)	15
2.7 Dlouhodobé uchovávání spermatu	16
2.7.1 Metodika využití hlubokého zmrazení zahrnuje následující kroky:	16
2.7.1.1 Kontrola pohyblivosti a připravení spermatu k ředění	16
2.7.1.2 Ředění médiem s kryoprotektory, plnění do pejet (pelet nebo zkumavek)	17
2.7.1.3 Vlastní zmrazování	17
2.7.1.4 Uchování zmrazeného spermatu	18
2.7.1.5 Způsob a rychlost rozmrazení spermatu	18
2.7.1.6 Oplozování jiker a hodnocení fertility spermií	19
3. Experimentální část	20
3.1 Materiály a metodika	20
3.1.1 Přechování ryb a odběr spermatu	20
3.1.2 Hodnocení pohyblivosti spermií	21
3.1.3 Kryokonzervace spermatu	21
3.1.4 Registrace teplot během zmrazování	22
3.1.5 Statistická analýza	22
3.2 Výsledky	23
3.2.1 Teploty v různých hladinách nad tekutým dusíkem (bez vzorku)	23

3.2.2 Teploty zmražení na různých hladinách ve vzorcích spermatu.....	24
3.2.3 Pohyblivost spermíí	25
3.2.4 Rychlost pohybu spermíí	27
3.2.5 Doba pohyblivosti spermíí	28
3.3 Diskuze	28
3.4 Závěr.....	30
4. Používaná literatura	32

Abstract:

Influence of temperature and freezing rate on sperm survival after thawing were objective of this study. Motility (percentage of moving sperm), velocity and duration of sperm movement before and after process of freezing were observed in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. Solutions recommended by Kopeika (1986) and Kurokura (1984) were used as a cryoprotective media. Sperm freezing was performed in 0.5 ml straws layed in styrofoam box 3, 6 and 9 cm above the level of liquid nitrogen for 20 min. Temperature changes during process of freezing were recorded inside and outside straws using thermocouple thermometer with miniature probes T type (cuprum – constantan). At a first level (corresponding to height 3 cm above level of liquid nitrogen) we recorded lowest temperature $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$, on a second (6 cm) $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ and on a third level (9 cm) $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Best results of sperm motility after freezing – thawing were achieved using Kopeika solution and freezing at first level (3 cm above liquid nitrogen) where we reported 27 % of motile spermatozoa and velocity of movement

118 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Freezing by Kurokura solution resulted in motility 14 % and velocity 76 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ whereas motility of native sperm was 88 % and velocity 136 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Key words: cryopreservation, sperm, motility, common carp, *Cyprinus carpio*

Abstrakt:

V této studii byl sledován vliv teploty a rychlosti mrazení a následného rozmrazení na životnost spermií. Motilita (procento pohyblivých spermií), rychlost a doba pohybu spermií byla sledována u kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) před a po zmrazení. Jako kryoprotektivní média byly použity roztoky doporučené Kopeikou (1986) a Kurokurou (1984).

Sperma bylo po naředění mrazeno v pejetách 0,5 ml v termoboxu 3, 6 a 9 cm nad povrchem tekutého dusíku po dobu 20 minut. Průběh teplot během zmrazování byl zaznamenáván uvnitř a vně pejet termočláňkovým teploměrem s miniaturními sondami typu T (měděno-konstantanové). Ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku, byla zaznamenána nejnižší teplota -170°C , v 6 cm -110°C a v 9 cm -70°C . Nejlepších výsledků po zmrazení a rozmrazení bylo dosaženo u roztoku Kopeika ve 3 cm nad tekutým dusíkem: 27% pohyblivých spermií, rychlost pohybu $118 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Při použití roztoku Kurokura byla dosažena motilita 14% a rychlost pohybu $76 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. U nativního spermatu byla motilita 88% a rychlost $136 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Klíčová slova: kryokonzervace, sperma, motilita, kapr obecný, *Cyprinus carpio*

1. Úvod

Lov ryb patřil od pradávna mezi základní způsoby obživy člověka. Prostý lov přecházel v průběhu staletí na záměrný chov ryb, který má v českých zemích mnoha set letou tradici. Pro úspěšný chov je především důležité správné zvládnutí rozmnožování ryb. V počátcích chovů používaná prostá přirozená reprodukce ryb byla zdokonalována přesazováním ryb. Dalším kvalitativním stupněm při pohledu na reprodukci ryb bylo zavedení tzv. poloumělého výtěru, kdy rozmnožování probíhalo v přirozených podmínkách kontrolovaných člověkem. Významným bodem v technologii rozmnožování ryb bylo uskutečnění umělého výtěru a jeho metodické propracování pro různé druhy. Na našem území byl proveden první umělý výtěr v Horažďovicích u lososa obecného (*Salmo salar*) v roce 1784. K posledním propracovaným metodám umělého výtěru patří umělý výtěr lína obecného (*Tinca tinca*), bolena dravého (*Aspius aspius*), sumce velkého (*Silurus glanis*) a dalších.

Úspěšná reprodukce ryb závisí na kvalitě a kvantitě pohlavních produktů (spermatu a jiker) a technikách s nimi spojených. Jednou z technik, jsou i metody kryokonzervace buněk- v našem případě spermií.

Kryokonzervace je metoda, která uchovává živé buňky a tkáně při velmi nízkých teplotách (nejčastěji pomocí tekutého dusíku nebo suchého ledu) a při použití ochranných látek – tzv. kryoprotektantů. Metody kryokonzervace jsou v širokém měřítku používané v různém odvětví humánní medicíny, veterinární medicíny i zootechnické praxi, jsou stále více zdokonalovány, aby se co nejsnadněji daly použít v praxi, v našem případě, v řízené reprodukci ryb. Zde se metody kryokonzervace dosud provozně nepoužívají v měřítku srovnatelném s ostatními oblastmi, ale pouze jako jeden z alternativních způsobů uchování genofondu v ex-situ. Právě proto je zaměření na zdokonalování metod a jejich praktické proveditelnosti důležité a žádoucí.

S technikou kryokonzervace jsem se seznámila v rámci letní rybářské školy, pořádané FROV JCU. Spolupracovala jsem se Sergejem Boryspoletsem, Msc. Cílem předložené práce je podhalit problematiku zmrazování a rozmazování spermií: jak ovlivňuje teplota a rychlost mrazení a rozmrazení na životnost spermií, jaká je životaschopnost, rychlost a doba pohyblivosti spermií po rozmrazení u kapra obecného (*Cyprinus carpio L.*). Jaké kryoprotektivní médium je nejlepší použít pro úspěšné přežití spermií po rozmrazení.

2. Teoretická část

2.1 Historie Kryokonzervace

Metoda kryokonzervace se uplatňovala od samých začátků jak v humánní, veterinární medicíně tak i u ryb.

Jedním z prvních pracovníků zabývajících se kryokonzervací byl James Loveck, který pracoval s krví. Předpokládal, že poškození červených krevních buněk během zmrazení může být způsobeno osmotickým tlakem. Také v roce 1950 uvádí, že zvyšující se koncentrace soli v buňce vede k dehydrataci a tudíž může způsobit škody na buňce.

Další mezníkem v historii kryokonzervace bylo roku 1949 poprvé zamrazené savčí sperma (dobytčí spermie, za pomoci glycerolu). Mezníkem v humánní medicíně bylo první narozené dítě ze zmrazených spermií v roce 1950.

V dalších letech byly vyvíjeny metody a služby s kryokonzervací spojené: např. metoda využití suchého ledu jako chladícího média byla vyvinuta v roce 1953. Tyler Medical Clinic / Westwood nabízí zmrazení spermatu v kryobankách poprvé roce 1957 (Tyler Medical Clinic, 2001). Od roku 1960 se využívá kapalný dusík k zmrazování a uchování spermatu. První komerční kryobanka byla založena v roce 1972 (lidské sperma, USA) (Cryo bio systém).

Využití výhod dlouhodobého zmrazování spermií člověka můžeme dokumentovat na následujících příkladech: v roce 1973 se narodilo první normální zdravé dítě po oplodnění spermatem uloženým více než jeden rok. V roce 1998 se narodilo dítě po oplození spermatem uchovaným dvacet let (na lékařské klinice Tyler). (Tyler Medical Clinic, 2001) (Virtual Medical Centre, 2002)

Myšlenka dlouhodobého uchování spermatu ryb sahá do počátku padesátých let (Blaxter, 1953, u sledě obecného (*Clupea harengus*)). Na území tehdejšího sovětského svazu byl v roce 1972 založen institut kryobiologie a kryomedicíny v Ukrajinském Charkově, kde se od roku 1973 věnují i kryokonzervaci rybích spermií. Jednou z prvních prací věnujících se úspěšně zmrazování spermií kapra byla práce Kurokury (1984), na kterou navazují již v osmdesátých letech i čeští autoři např. Linhart (1984), Kopeika (1986).

2.2 Kapr jako objekt zájmu

V celosvětové akvakultuře je významnou rybou kapr obecný, *Cyprinus carpio L.*, jehož roční celosvětová produkce je vyšší než 1 milion tun (FAO, 1995). Kapr obecný je jednou z nejdůležitějších sladkovodních ryb v Evropě. Celosvětová produkce z akvakulturních chovů za rok 2009 je 55,1 tun. (WORLD REVIEW OF FISHERIES AND AQUACULTURE).

V České republice je kapr produkován v rybníčních chovech na celkové rozloze 52.000 ha (520 km²). Celková produkce tržních ryb za rok 2010 byla 20 420 tun, z toho kapr obecný má kolem 17 746 tun (Odbor státní správy ve vodním hospodářství a správy povodí Ministerstvo zemědělství, Odbor ochrany vod Ministerstvo životního prostředí, 2010).

2.2.1 Plemena kapra obecného

Vzhledem k tomu, že metody kryokonzervace jsou v České republice využívány jako jeden z nástrojů k ochraně genofondu, je třeba se zmínit o variabilitě druhu kapr v širším kontextu.

Ballon (1995) uvádí, že vnitrodruhová diverzita kapra je vyšší než u ostatních druhů ryb. Po dlouhou dobu byl kapr vystaven značným selektivním vlivům na zvýšení produktivity. Zlepšena byla i odolnost vůči nemocem a stresu. Hospodářsky důležité znaky místních forem kaprů byly většinou stanoveny podle podmínek země, kde byla prováděna selekce a podle požadavků místního trhu.

Ze zoogeografického a systematického hlediska rozděluje Baruš a kol. (1995) v celosvětovém měřítku 3 poddruhy kapra: *Cyprinus carpio carpio* (rozšíření Evropa a střední Asie), *Cyprinus carpio haematopterus* (východní Asie), *Cyprinus carpio viridiviolaceus* (jihovýchodní Asie).

V rámci jednotlivých poddruhů se v areálu jejich výskytu formovali působením místních podmínek a činnosti člověka jejich místní formy (rázy, plemena, linie). V současné době jsou oficiálně registrována kapří plemena v několika zemích střední a východní Evropy. V České republice a v Rusku existuje katalog národních plemen kapra a katalog maďarských plemen kaprů byl publikován v dokumentech FAO (Global Programmes for Management of Genetic Resources, 2009).

Ne jinak tomu je i v České republice, kde z místních populací se specifickými užitkovými vlastnostmi bylo vyčleněno několik původních plemen: např. Žďárský lysec (Žd-L), Žďárský šupináč (Žd-Š), Jihočeský kapr šupinatý (C73), Mariánskolázeňský kapr šupinatý (ML), Milevský lysec (MV), Jihočeský lysec (BV), Telčský lysec (Te), C434 a C435, Pohořelického lysce (PL; od roku 1998) a Třeboňského kapra šupinatého (TŠ; od roku 2000). Názvy a popis plemen byly převzaty podle Pokorného a kol. (1995). Uvedená kapří plemena náleží do poddruhu *Cyprinus carpio carpio*.

Příkladem kapra, který náleží jinému poddruhu a chován v České republice je amurský sazan. Je reprezentantem poddruhu *Cyprinus carpio haematopterus*.

2.3 Sperma

Sperma ryb vypadá jako mléčná až smetanová tekutina skládající se z buněčné složky- spermii a nebuněčné složky- semenné plazmy (spermiální plazmy) ta tvoří 50-80% obsahu spermatu (Linhart, 1984). Plazma obsahuje ochranné a výživné látky, které příznivě ovlivňuje kvalitu spermie.

2.3.1 Spermie

Spermie - samčí pohlavní buňka se skládá z hlavičky, střední části (krčku, spojující hlavičku s bičíkem) a bičíku (3 oddíly: střední, hlavní, koncový). Hlavním úkolem spermie je přenos genetické informace (od mlíčka) do mateřské buňky (vajíčka).

2.3.1.1 Popis spermie

2.3.1.1.1 Hlavička spermie

Hlavičku tvoří jádro buňky, které představuje haploidní sadu chromozómů, po chemické stránce je tvořeno DNA a jadernými proteiny. Hlavička spermie má různou velikost a tvar v závislosti na druhu. Na vrcholu hlavičky spermie se u většiny živočichů vyskytuje různě tvarovaný membránový útvar- akrozóm, který při spermiogenezi vzniká z Golgiho aparátu. Má tvar zploštěného váčku, který obklopuje hlavičku spermie, obsahuje enzymy a proteiny, které se zabezpečují penetraci spermie do vajíčka

a účastní se procesu oplození (Baccetti a kol., 1986.). Na kaudální straně hlavičky spermie se nachází výduť- tzv. implantační jamka. Povrch hlavičky spermie je kryt cytoplazmatickou membránou, která přechází v cytoplazmatickou membránu střední části a bičíku.

Tab. 1 Parametrů spermií některých druhů (Linhart a kol., 1991)

Druh	Délka hlavičky	Šířka hlavičky	Celková délka	Autor
<i>Acipenser gueldenstaedti colchicus</i>	8,90	1,90	58,00	Detlaf a Ginsburg (1954)
<i>Acipenser stellatus</i>	6,30	1,80	47,00	Detlaf a Ginsburg (1954)
<i>Huso huso</i>	7,40	1,10	55,00	Detlaf a Ginsburg (1954)
<i>Clupea harengus pallasi</i>	2,20	1,50	43,00	Yanagimachi (1957)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2,50	1,5-2,0		Billard (1969)
<i>Salmo trutta m. lacustris</i>	2,0-2,4	1,5-2,0	31-34	Ginsburg (1968)
<i>Coregonus lavaretus asperi</i>	3,50	3,00	43,50	Rotheli a kol. (1950)
<i>Cyprinus carpio</i>	1,85	2,50	43,00	Emeljanova a Makeeva (1985)
	3,30	2,50		Billard (1970)
<i>Ctenopharingodon idella</i>	1,60		38,00	Emeljanova a Makeeva (1985)
<i>Carassius auratus</i>	3,20	3,20	60,00	Fribourgh a kol. (1970)
<i>Aristichthys nobilis</i>	1,60		37,00	Emeljanova a Makeeva (1985)
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	1,60		37,00	Emeljanova a Makeeva (1985)
<i>Esox lucius</i>	2,00	2,00	37-42	Rötheli a kol. (1950)
<i>Esox niger</i>	1,84	1,86	31,30	McLean a kol. (1982)
<i>Rhodeus ocellatus</i>	1,60		34,00	Emeljanova a Makeeva (1985)
<i>Hemiculter eigenmanni</i>	1,80		35,00	Emeljanova a Makeeva (1985)
<i>Ictalurus punctatus</i>	2,30	2,40	99,00	Jaspers a kol. (1976)
<i>Pseudorasbora parva</i>	1,85		39,00	Emeljanova a Makeeva (1985)
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	3,00	2,80	21,50	Kobayashi (1963)
<i>Perca flavescens</i>	1,70	1,60	22,60	McLean a kol. (1982)
<i>Anguilla anguilla</i>	8,0-11,0		32-47	Billard a Ginsburg (1973)
<i>Anguilla australis</i>	6,00	2,00	32-36	Todd (1976)
<i>Anguilla difenbachi</i>	8,00	3,00	26-52	Todd (1976)
<i>Anguilla japonica</i>	6,30	1,00	36,80	Colak a Yamamoto (1974)
<i>Oligocottus snyderi</i>	4,00	0,80	38,60	Fink a Haydin (1960)
<i>Oligocottus rubellio</i>	5,50	1,10	53,00	Fink a Haydin (1960)

<i>Lepomis macrochirus</i>	2,15	2,00	39,40	McLean a kol. (1982)
<i>Poecilia reticulata</i>	4,20	1,30	59,00	Ginsburg (1968)
	4,00	1,00		Billard (1969)
<i>Cymatogaster aggregata</i>	4,00		50,00	Gardiner (1978)

2.3.1.1.2 Střední část

Střední část spermie, někdy nazývána krček, spojuje hlavičku s bičíkem spermie. Krček se označuje také jako centriolový oddíl. Nasedá do implantační jamky hlavičky, obsahuje proximální a distální centrioly a různý počet mitochondrií. Stejně tak jako hlavička spermie, tak i střední část a bičík je kryt cytoplazmatickou membránou.

2.3.1.1.3 Bičík

Bičík je vlastním, funkčním pohybovým aparátem. Jeho funkční část tvoří axonema- mikrotubulární systém složen obvykle z 9 periferních a 1 centrálního dubletu mikrotubulů, tvořeného proteinem- tubulínem (9+2). Jednotlivé periferní mikrotubuly jsou mezi sebou a centrálními mikrotubuli spojeny tzv. dyneinovými raménky (Obr. 2). Rozměry struktur axonemy bičíku například u jesetera sibiřského uvádí Pšenička a kol., (2006): velikost periferních dublet mikrotubulů 35.53 ± 5.93 nm a centrálních mikrotubulů 52.94 ± 5.50 nm.

Celá spermie je kryta cytoplazmatickou membránou, která u některých druhů může tvořit laterální výběžky-tzv. lemy.

Pohyb bičíku spermie je dán vzájemným posouváním se mikrotubulů vůči sobě, čímž vzniká ohyb- vlna na bičíku, která se šíří po celé jeho délce. Vždy od hlavičky ke konci bičíku. Ve struktuře axonemy se nachází molekuly enzymu ATPázy, která štěpení ATP dodává energii pro tento pohyb. Délka bičíku se liší podle druhu např. u pstruha obecného (*Oncorhynchus mykiss*) 30-35 μ m (Billard, 1983).

2.3.2 Spermie kostnatých druhů ryb s vnějším oplozením

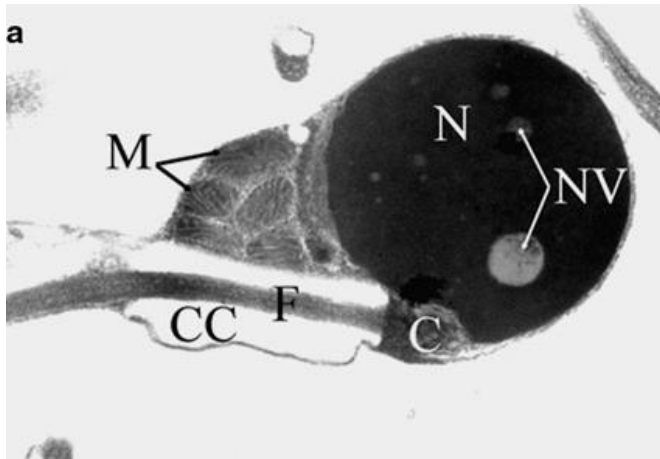
Struktura spermií kostnatých ryb je jednodušší než u savců, chrupavčitých ryb nebo kostnatých ryb s vnitřním oplozením. Hlavním znakem spermií těchto ryb je nepřítomnost akrozómu, jehož funkce v procesu penetrace nahrazuje mikropyle (otvor ve vaječných obalech na vrcholu vajíčka) (Gisburg, 1968).

Jednotlivé druhy ryb mají svůj specifický tvar a velikost hlavičky spermie: např. oválný nebo srdčitý tvar je typické pro sumečka skvrnitého (*Ictalurus punctatus*), amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*), vejčitý tvar pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), (Linhart a kol., 1991). Spermie úhoře říčního (*Anguilla anguilla*) (Gibbons a kol., 1983) mají protáhlé hlavičky s délkou do 10 μ m a šířkou 2 μ m. Extrémně protáhlé hlavičky mají mihule a latimérie (Mattei a kol., 1988), kulatý tvar je typický pro štika obecnou (*Esox lucius*) a sumce velkého (*Silurus glanis*). V tabulce č. 1 podle Linharta (1991) jsou uvedeny rozměry spermií 26 druhů.

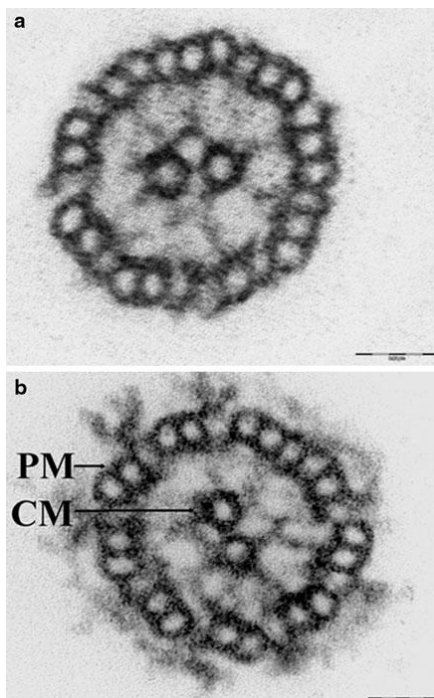
Spermie kaprovitých ryb obecně mají hlavičku, která má okrouhlý až vejčitý tvar (Baccetti, 1984). Typickým reprezentantem je kapr obecný (Billard, 1986), který má spermie eliptického tvaru s rozměry 2- 2.5 x 3 μ m.

Střední část obsahuje mitochondrie a centrioly. Počet a velikost mitochondrií je závislý na druhu. Centrioly zabezpečují vlastní spojení hlavičky a bičíku. Jejich uložení je asymetrické (Obr. 1). Pšenička a kol (2006) popisuje u spermií na řezu středního oddílu glykogenní granule a elektronlucentní měchýřky. Bičík nemá laterální lemy (Pšenička a kol., 2006).

Obr. 1 Snímek z transmisního elektronového mikroskopu: podélný řez spermii lína obecného (*Tinca tinca*) ukazuje jádro (N), nukleární váček (NV), centriolární komplex (C), bičík (F), cytoplazmatický kanál (CC) a mitochondrie (M) (Pšenička a kol., 2010).



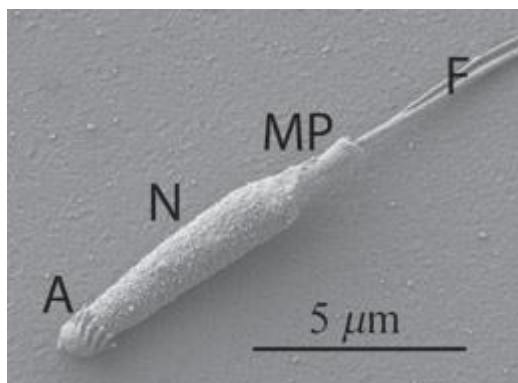
Obr. 2 Transvázální řez axonemou (svazky mikrotubulů uvnitř spermie) spermie lína obecného (*Tinca tinca*) ukazuje periferní dublety s centrálním párem mikrotubulů (PM a CM).



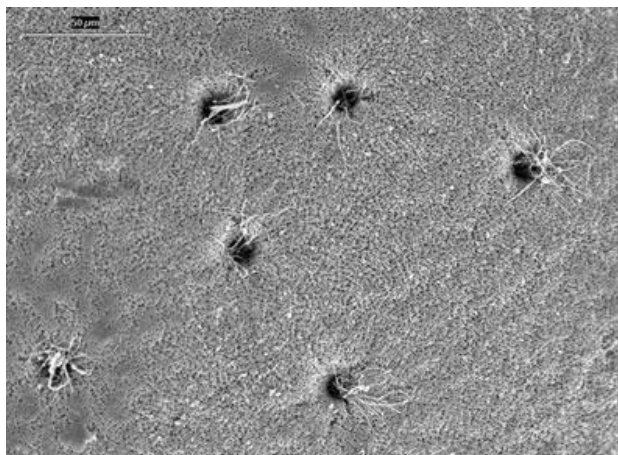
2.3.3 Spermie chrupavčitých druhů ryb

Spermie chrupavčitých ryb se od kostnatých ryb liší ve více parametrech. Hlavičky spermií jsou vždy protáhlé, velikost spermií u chrupavčitých ryb je několika násobně vyšší než u kostnatých ryb (např. u jesetera sibiřského je délka hlavičky vč. akrozomu a střední části $7.01 \pm 0.83 \mu\text{m}$ a široká za akrozomem $0.87 \pm 0.13 \mu\text{m}$, ve srovnání s línem obecným délka hlavičky spermie je $1.27 \pm 0.24 \mu\text{m}$ bez středního oddílu a široká $1.71 \pm 0.09 \mu\text{m}$) (Pšenička a kol., 2006), důvodem je vyšší obsah DNA na jádro (kapr obecný 1.61 pg a jeseter sibiřský 4.15 pg). Typickým znakem pro spermie chrupavčitých ryb je přítomnost akrozómu, tak jako tomu je např. u savčích spermií. Jeho přítomnost se může jevit jako nelogická, protože povrch jikry jeseterů je opatřen několika mikropylárními otvory (Obr. 4). Pšenička (2010) popisuje jeho účast v procesu oplození, kde vytváří fertilizační filament a funguje jako mechanická „kotva“. Střední oddíl je tvořen mitochondriální částí s elektronlucentními měchýřky a centrioly. Pohybový aparát je stejně jako u spermií kostnatých druhů charakterizován devíti dublety periferních a jedním párem centrálních mikrotubulů v bičíku (9+2), který je označován jako axonema (Cosson, 1996). Dalším charakteristickým znakem chrupavčitých ryb je laterální lem bičíku (jednostranný nebo oboustranný). Najdeme jej podél hlavní části bičíku (Nicander, 1970; Billiard, 1970; Stein, 1981; Suquet, a kol., 1993) a je kolmý na rovinu centrálních mikrotubulů (Billard, 1969).

Obr. 3 Spermie jestera sibiřského pod elektronovým mikroskopem: akrozóm (A), jádro (N), střední část (MP) a bičík (F), (Pšenička a kol., 2011).



Obr. 4 Mikropyle s vnořenými spermii (měřítko 50 μm , Pšenička a kol., 2011).



2.3.4 Semenná plazma

Linhart (1984) uvádí, že semenná plazma tvoří 50-80% objemu spermatu. Tento údaj pravděpodobně nezahrnuje jeseterovité druhy ryb, kde můžeme předpokládat obsah semenné plazmy vyšší. Semennou plazmu vytvářejí hlavně Sertoliho buňky. Není však shodná se semennou plazmou teplokrevných živočichů (rybám chybí přídatné pohlavní žlázy). Látky, které obsahuje plazma, poskytuje spermii ochranné a výživné látky. Složení semenné plazmy: anorganické látky- ionty Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- a K^+ . organické látky: proteiny, lipidy, glycidy, metabolity glykolýzy a Krebsova cyklu (Linhart, 1991). Semenná plazma u jeseterovitých ryb tj. nebuněčná část spermatu, neobsahuje pouze tekutinu produkovanou testes, ale i moč, protože vývody testes ústí přímo do ledvin a další vývod mají společně s vývody ledvin.

2.3.5 Vznik spermií

Spermie vznikají v semenotvorných kanálcích varlete. V poslední fázi spermiogeneze cysty praskají a spermie se přesouvají do lalůček varlete, odkud jsou vypuzovány chámovody na povrch urogenitální papily (Linhart a kol., 1984).

2.3.6 Pohyb spermii

V pohlavním traktu jsou spermie nepohyblivé. Hlavními faktory inhibující pohyb spermii jsou osmotický tlak, pH semenné plazmy přibližně 7, koncentrace iontů K^+ a to zejména u lososovitých ryb a jeseterovitých, u kostnatých ryb hlavně osmotický tlak (Billard a kol., 1990).

Vlastní pohyb spermii nastává po smísení s vodou nebo aktivačním médiem a trvá u kostnatých ryb v řádech desítek sekund až minut, u chrupavčitých ryb až několik minut (Tab. 2). U ryb jako kapr, lín a sumec dochází k zahájení pohybu bičíku po snížení osmotické úrovně prostředí. Pokles osmotické úrovně a koncentrace iontu draslíku na úroveň $0,5 \text{ mmol}^{-1}$ má za následek aktivaci pohybu u lososovitých ryb a u veslonosa (jeseterů) (Linhart a kol., 2003). Rychlost spermii u ryb po aktivaci je $120\text{--}300 \text{ } \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ za sekundu a v průběhu doby pohybu klesá. Pro srovnání rychlost pohybu spermii savců je $10\text{--}20 \text{ } \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Energii k pohybu poskytuje ATP z glykolytických a oxidačních procesů (Linhart a kol. 1991). Při pohybu se energie ve formě ATP spotřebovává. Po vyčerpání ATP jsou schopny spermie jeho opětovné syntézy za předpokladu, že spermie jsou přesunuty do imobilizačního roztoku (roztok, inhibující pohyb).

2.4 Hodnocení spermatu

Hodnocení spermatu vychází z pozorování makroskopického nebo mikroskopického, nebo ze stanovení parametrů, které kvalitu ovlivňují.

2.4.1 Makroskopické hodnocení

U makroskopického hodnocení se posuzují:

1. objem spermatu (ml),
2. hustota a konzistence (5 stupňů-VH – velmi husté (smetanovité), H – husté (slabě smetanovité), Ř – řídké (mléčné), VŘ – velmi řídké (vodnaté se silným mléčným zakalením), O – oligospermní/aspermické (vodové proti světlu slabě opaleskující) (Tab. 2),

3. barva a přímíseniny (čerstvé sperma- barva slonoviny, narůžovělé kontaminace krví, nazelenalé, nahnědlé kontaminace výkaly),

4. aktivita spermií: tzv. kapkový test, využívá toho, že se spermie po smísení s vodou pohybují všemi směry. Po kápnutí spermatu do vody (oplozovacího roztoku či jiného aktivačního média) se u kvalitního spermatu vytvoří kolem kapky mléčný závoj. S částečnou aktivitou se zákal vytvoří, ale část zůstane na místě. U nekvalitního spermatu se nevytvoří mléčný závoj. (Linhart a kol., 1984).

2.4.2 Mikroskopické hodnocení

Mikroskopické hodnocení vychází z mikroskopického pozorování, přičemž hodnotící parametry můžeme určovat okamžitě během pozorování nebo ze záznamu mikroskopického obrazu.

Příkladem hodnocení přímo během určování může být postup uvedený v metodice Linhart a kol. (2011): Pohyblivost spermií se pozoruje v kapce (1-2 cm²) vody (odstáté, voda z líhně, nebo aktivačního roztoku) na čistém podložním skle bez použití krycího skla. Do kapky se aktivuje malé množství spermatu pomocí špičky injekční jehly, lehkým dotykem se přesune malá část spermatu do kapky. Po otření špičky se zamíchá sperma na podložním skle a zaostří se pod mikroskopem. Doba od aktivace do začátku pozorování je okolo 10 s, dbá se na proostření celé kapky (povrch i dno). Odhad pohyblivosti spermií je důležitá pro vyřazení špatného spermatu (nepohyblivé spermie) a určení dobrého (čerstvého) spermatu, který se dál může použít pro kryokonzervaci (80% pohyblivých spermií) či k přímému oplození (50% pohyblivých spermií) (Linhart a kol., 2011).

Další parametr, který se může zjišťovat přímo během pozorování je doba pohyblivosti. Příklady u několika druhů ryb jsou udány v Tab. 2.

Ze záznamu mikroskopického obrazu pohybu spermií (pořízeného videomikroskopem) můžeme měřit rychlost pohybu spermií, a to na principu měření vzdálenosti, kterou urazí spermie mezi jednotlivými videonímky. Stejně tak můžeme přesně určit procentický podíl pohyblivých spermií-motilitu (Caille a kol., 2006).

Tab.2 Doba pohyblivosti spermií a makroskopické hodnocení spermatu u vybraných druhů ryb (Linhart a kol., 2011)

Druh	Štika obecná (<i>Esox lucius</i>)	Jeseter sibiřský (<i>Acipenser baeri</i>)	Okoun obecný (<i>Perca fluviatilis</i>)	Candát obecný (<i>Sander lucioperca</i>)	Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	Lín obecný (<i>Tinca tinca</i>)
Doba pohyblivosti spermií	1 min	Do 6 min	15-20 s	35 s	1,5-2 min	1,5 min
Makroskopické hodnocení tzn. hustota s konzistencí	Ř/VŘ	VŘ/O	VH	H	H	H/Ř

2.5 Odběr spermatu

Odběr spermatu je výchozím krokem pro uchování spermatu. Spermie jsou při ejakulaci nepohyblivé, proto se musí zabránit aktivaci spermií, která může být způsobená změnou osmotického tlaku, pH a iontovým složením spermiální plazmy, např. naředění močí, krví či sladkou vodou. K zamezení nechtěných příměsí do spermatu a ke smísení od více mlíčáků se může použít k odběru sběrače spermatu (Linhart, 1984 I).

Metody odběru spermatu lze rozdělit do dvou skupin:

- Odběr spermatu z živých ryb
- Odběr testikulárního spermatu z čerstvě usmrčených ryb (Linhart a kol., 2012)

Jednotlivé metody se mezi sebou liší podle druhů ryb, velikosti generačních mlíčáků a množství spermatu. Obecná zásada, která platí je, že ryba musí být zafixována a řádně osušena, aby nedošlo ke kontaminaci vodou a močí. U některých citlivých druhů ryb (např. lipan podhorní, candát obecný) je vhodné použít anestézii (Linhart a kol., 2012).

2.5.1 Odběr spermatu z živých ryb

Pro malé množství spermatu je vhodné použít injekční stříkačku s kanylkou nebo bez ní (okoun, štika, parma).

Pro velké množství spermatu je vhodné použít nádobky (odsávačky) s trubičkou, pracují na principu podtlaku, který vytváříme ústy (Smíšek, 1969) nebo vývěvou (pro kapra, býložravé ryby). U druhů s velkým množstvím spermatu je možností výtěr („odstříknutí“) spermatu přímo do kádinky (u pstruhů) (Linhart a kol., 2011). U jeseterovitých a veslonosovitých ryb se odebírá sperma pomocí katetru- šikmo seříznuté měkké hadičky vhodného průměru (pro jesetera malého 4 mm, pro jesetera ruského a sibiřského 4–10 mm a délky 50 cm). Odběr spermatu kontaminovaného močí, jako je u sumce velkého nebo lína obecného se musí provádět přímo do imobilizačního roztoku. Poměr imobilizačního roztoku a spermatu může být maximálně do poměru 1:0,9 (deset mililitrů imobilizačního roztoku a devět mililitrů spermatu). Sperma je přechováno v chladu (0-4°C), je umístěno v ledničce nebo v nádobě s drceným ledem (Linhart a kol., 2011).

2.5.2 Odběr testikulárního spermatu z čerstvě usmrcených ryb

Testikulární sperma- sperma získané z nastříhané tkáně vypreparovaných gonád čerstvě usmrcených ryb (Linhart a kol., 2011). Používá se u ryb, kterých je dostatek (např. klarias, štika) nebo u ryb s velmi malým množstvím spermatu, u druhů jejich sperma bývá kontaminované močí a u brzy pohlavně dospívajících ryb.

2.6 Uchování spermatu ryb na krátkou dobu se zaměřením na kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

Krátkodobé uchování může být prováděno z několika důvodů:

- přeprava spermatu,
- pro lepší využití nejkvalitnějších mlíčáků,
- pro oživení a zlepšení kvality šlechtitelských chovů.

Důležitým faktorem uchování je teplota, která ovlivňuje intenzitu metabolismu spermií. Pro co nejdelší uchování spermatu jsou nejvhodnější teploty v rozmezí 0 - 4°C.

Sperma však nesmí zmrznout (Linhart a kol., 2011). Díky nízké teplotě je zpomalen růst bakterií a dochází ke snížení aktivity enzymatických systémů v buňce, tzn. i odběr energetických látek.

Další důležitý faktor je uchování aerobního prostředí, čehož můžeme dosáhnout uchováním spermatu ve slabé vrstvě, případně v kyslíkové atmosféře. Jako ochrana před rozvojem mikrobiální mikroflóry jsou často doporučována antibiotika (v praxi se běžně nepoužívají) (Linhart a kol., 2011).

2.7 Dlouhodobé uchovávání spermatu

Pro dlouhodobé zmrazení spermatu a uchování se používají 2 principy:

- Lyofilizace (mrazová sublimace nebo dehydratace)
- Hluboké zmrazení při -196°C

Problém u obou principů je výskyt extracelulární a intracelulární vody. Pro praktické využití se nejvíce používá hluboké zmrazení na -196°C .

2.7.1 Metodika využití hlubokého zmrazení zahrnuje následující kroky:

- odběr spermatu, následná kontrola pohyblivosti a připravení spermatu k ředění (temperance)
- přidání kryoprotektorů do spermatu plnění do pejet (pelet nebo zkumavek),
- vlastní zmrazování,
- přechovávání spermatu,
- rozmrazování spermatu a jeho použití k oplození jiker.

2.7.1.1 Kontrola pohyblivosti a připravení spermatu k ředění

Pohyblivost spermií je hlavním kvalitativním ukazatelem spermatu určeného k mrazení a dlouhodobému uchování. Např. Kopeika (1968) požaduje u spermatu kapra pro potřeby mrazení pohyblivost spermií 80%. Pro neměnnou kvalitu spermatu je důležité přechovávat před další manipulací při teplotě $0-4^{\circ}\text{C}$ (na ledové tříšti), dále

zachování aerobních podmínek, tj. dodržení poměru objemu spermatu a vzduchu 1:10 (Horton a kol., 1976), ve slabé vrstvě pro lepší výměnu plynů (Stoss 1979).

2.7.1.2 Ředění médiem s kryoprotektory, plnění do pejet (pelet nebo zkumavek)

Média s kryoprotektory poskytují spermiím výživu a ochranu. Média bez kryoprotektoru můžou připomínat složením krevní sérum (Cortlandův protektor). U některých druhů je důležitý poměr kationtů draslíku a sodíku pro úspěšné uchování spermií a jejich následnou pohyblivost (Truscott, 1968). Protektor musí mít určité pH. Hodnota pH se podle druhu liší, např. Stoss a kol., (1981) pH 7-8, Stoss (1979) pH 8, Stein (1979) pH 7.4. Další důležitý faktor je osmolalita. Do média se dává kryoprotektor jako je: glycerín, EG, DMSO, methanol, propandiol, dimethylacetamid a další. Nejčastěji bývá používán DMSO (dimethylsulfoxid), s nímž jsou dosahovány velmi dobré výsledky. Ředění spermatu médiem s kryoprotektorem je doporučováno v rozmezí 1:1 nebo 1:9. Důležité je, aby se médium s kryoprotektorem postupně přikapávalo (mísilo) do spermatu. Dobu do zamrazení však nepovažujeme za ekvivalenci (Linhart 1984 I). Jde o velice krátké časové rozmezí. Zmrazování spermatu můžeme provádět v různé formě: peletách, pejetách, kryozkumavkách, kryovacích.

2.7.1.3 Vlastní zmrazování

Zamrazování spermií má více technik provedení:

- kapání na suchý led, do tekutého dusíku,
- mrazení v parách nad hladinou dusíku,
- ve zmrazovacích automatech.

První způsob je tzv. peletizační. Princip spočívá v tom, že sperma se zamrazí do pelet (kapslí) v pevném CO₂ při teplotě -79°C (Stoss a kol., I, 1981). Práce s peletami musí být rychlá, aby nedošlo k porušení struktury zmrazeného spermatu (Gamčík, 1976). Linhart a kol., 1984 testoval způsob zmrazení spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio*) na suchém ledu (CO₂). Peletky byly zamrazeny, následně rozmrazeny

a byla ověřovaná pohyblivost spermií, avšak byla negativní, protože došlo k porušení hlavičky spermií.

Další způsob je založen na využívání par dusíku. Sperma s kryoprotektorem je uloženo v pejetách (dutinkách) o daném objemu. Tento způsob využívali Moczarski (1977), Koldras a kol. (1983), Legendre a kol. (1980).

Kvalitní zmrazení u obou způsobů je podmíněná rychlostí zamrazení. Rychlost ovlivňuje především velikost intracelulárních a extracelulárních krystalů a míru dehydratace buňky. Při pomalém zmrazování dochází k dehydrataci buňky a vzniku velkých extracelulárních krystalů. Rychlé zamrazování má za následek tvorbu intracelulárních krystalů- nedochází k dehydrataci buňky, avšak velikost a struktura intracelulárních a extracelulárních krystalů může narušit strukturu a fyziologické funkce zmrazované buňky. Při velmi rychlém zmrazení nedochází k tvorbě velkých krystalů a nedochází k narušení buňky. Velmi rychlé zmrazení závisí na velikosti buňky a její permeabilitě (Mazur 1980). Legendre a kol. (1980) upřednostňují neoptimálnější rychlost zamrazení 10-40°C za minutu nad parami tekutého dusíku.

2.7.1.4 Uchování zmrazeného spermatu

Uchování zmrazeného spermatu se provádí v kontejnerech s dostatkem tekutého dusíku. Zmrazené sperma v pejetách se ukládá do nádob a vkládá či zavěšuje do kontejneru s tekutým dusíkem. Sperma, které je zmrazené v peletách se ukládá do lahviček uzavřených zátkou či vatovou ucpávkou. Životnost spermií není (teoreticky) závislá na době uchování spermatu, pokud nedojde k odpaření tekutého dusíku a následně odhalení zmrazeného spermatu (Bochard a kol., 1979).

2.7.1.5 Způsob a rychlost rozmrazení spermatu

Rozmrazení spermatu může probíhat dvěma způsoby:

1. Rozmrazení s přidáním rozmrazovacího roztoku
2. Rozmrazení bez přidání rozmrazovacího roztoku

První způsob (rozmrazování s přidáním rozmrazovacího roztoku) se většinou aplikuje při zamrazení spermatu do pelet. Tuto možnost uvedli Stoss a kol., (1981 b), Legendre a kol. (1980) a jiní. Tito autoři uvedli jako nejefektivnější výsledky s použitím

1% roztoku NaHCO_3 . Druhý způsob (rozmrazení bez přidání rozmrazovacího roztoku) používali např. Moczarski (1977) a Kopeika (1986) a jiní. Kopeika upřednostňuje rozmrazení spermatu na vodní lázni při teplotě 40°C po 30 s. Důležité je dávku spermatu rozmrazit co nejrychleji (Gamčík, 1976). K poškození spermií a tvorbě krystalů ledu (k tzv. rekrystalizaci) (Mazur, 1980) může docházet i při rozmrazení, pokud je rozmrazování pomalé. Dochází k tomu při teplotě -85°C (Rall a kol., 1980). Jiní autoři uvádějí bod rekrystalizace -60°C (Gamčík, 1976).

2.7.1.6 Oplozování jiker a hodnocení fertility spermií

Vzájemný vztah mezi kvalitou, kvantitou, počtem spermií, kvalitou jiker a složením rozmrazovacího a oplodňovacího roztoku je nezbytné k určení správných a srovnatelných výsledků. Výsledky pokusů jsou velmi odlišné, protože se neuvádí přesná koncentrace spermií na 1 jikru (Linhart, 1984 II).

3. Experimentální část

3.1 Materiály a metodika

V této studii jsou zahrnuty výsledky ze dvou experimentů: První experiment byl prováděn v roce 2009 na šesti mlíčácích kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.), (kusová hmotnost 1–1,5 kg, stáří 3 roky). Jeho náplní bylo zaznamenat průběh teplot během zmrazování spermatu v polystyrénovém termoboxu ve třech různých hladinách nad povrchem tekutého dusíku a jeho vliv na výsledek zmrazování. Jako ukazatel úspěšnosti byl použit procentický podíl pohybujících se buněk – motilita spermií po rozmrazení.

Druhou částí experimentů, konaných v roce 2010, byl srovnávací pokus na 7 mlíčácích, kde byly zaznamenávány hodnoty: motility, rychlosti a doby pohybu před a po zmrazení ve dvou různých kryoprotektivních médiích.

3.1.1 Přechování ryb a odběr spermatu

Ryby byly přechovávány v manipulačních bazénech rybí líhně Genetického rybářského centra FROV JU Vodňany při teplotě 22-23°C. Ryby byly individuálně označeny implantovaným čipem. Spermiace byla indukována injekcí suspenze kapří hypofýzy v dávce 1 mg.kg⁻¹ hmotnosti ryby, aplikovanou do dutiny tělní (pod prsní ploutev) 24 hodin před odběrem spermatu.

Sperma od mlíčáků bylo odebráno do stříkaček bez kontaminace vodou a močí.

Během všech pokusů bylo sperma udržováno na ledu.

3.1.2 Hodnocení pohyblivosti spermií

Pro hodnocení pohyblivosti spermií byla použita mikroskopická metoda. Do kapky 50 μ l aktivačního média (voda z líhně) na podložním skle bylo na špičce preparační jehly přeneseno sperma a dokonale promícháno. Pohyb spermií byl sledován pod mikroskopem Olympus BX50 v tmavém poli s použitím stroboskopické lampy (Chadwick-Helmuth). Mikroskopický obraz byl snímán videokamerou (Sony SSC-DC50AP) a zaznamenáván na DVD (DVD recorder SONY DVO1000MD).

Pro vyhodnocení byl použit program Micro Image 4.0. Tento postup využívá 5 po sobě jdoucích videosnímků záznamu mikroskopického obrazu pohybu spermií, jejichž složením v jeden se zachytí pohyb – trajektorie pohybu spermií. Živé spermie se označí barevně a mrtvé zůstanou bílé (Rodina a kol., 2008).

3.1.3 Kryokonzervace spermatu

Ředění spermatu: Nativní sperma se ředilo jednotlivými kryoprotektivními médii:

Kopeika, 1986 (**Kop**): (59mM NaCl, 0.68mM KCl, 0.68mM CaCl₂, 2.1mM Mg₂SO₄, 27mM NaHCO₃, 3.4mM sacharóza, 69mM D-manitol, 118mM Tris-HCl, pH 8.1, 16% Ethyleneglycol , 10% vaječného žloutku) v poměru 1:1.

Kurokura, 1984 (**Kk**): 62mM NaCl, 134mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 0.39mM MgCl₂, 2.4mM NaHCO₃, 16% dimethyl-sulfoxide (modified after) v poměru 1:1.

Kryoprotektivní médium se přidávalo do spermatu pomalu po kapkách, za stálého míchání!

Zmražení spermatu: naředěné sperma se plnilo do pejet (0,5 ml) a umístilo se na rámeček ("plovák"), odpovídající výšky – 3, 6 nebo 9 cm do polystyrenového boxu (60 x 40 x 35 cm) nad povrchem tekutého dusíku (sloupec dusíku 7 cm) po dobu 20 minut a následně se ponořilo do tekutého dusíku.

Rozmrazování spermatu: pejety se rozmrazovaly ve vodní lázni teploty 40°C během 6 s.

3.1.4 Registrace teplot během zmrazování

Pro registraci teplot byl použit experimentální prototyp (vyroben na zakázku-firma Sladký) vícekanálového registračního teploměru pracujícího s termočlánky typu T (měď-konstantan), které bylo možno umístit do pejet nebo volně do zmrazovacího boxu. Frekvence záznamu teplot byla 1x za sekundu.

Zmrazování a záznam teplot jsme prováděli ve třech hladinách (3, 6, a 9 cm) nad povrchem tekutého dusíku. Měření bylo prováděno podle počtu kaprů (13).

3.1.5 Statistická analýza

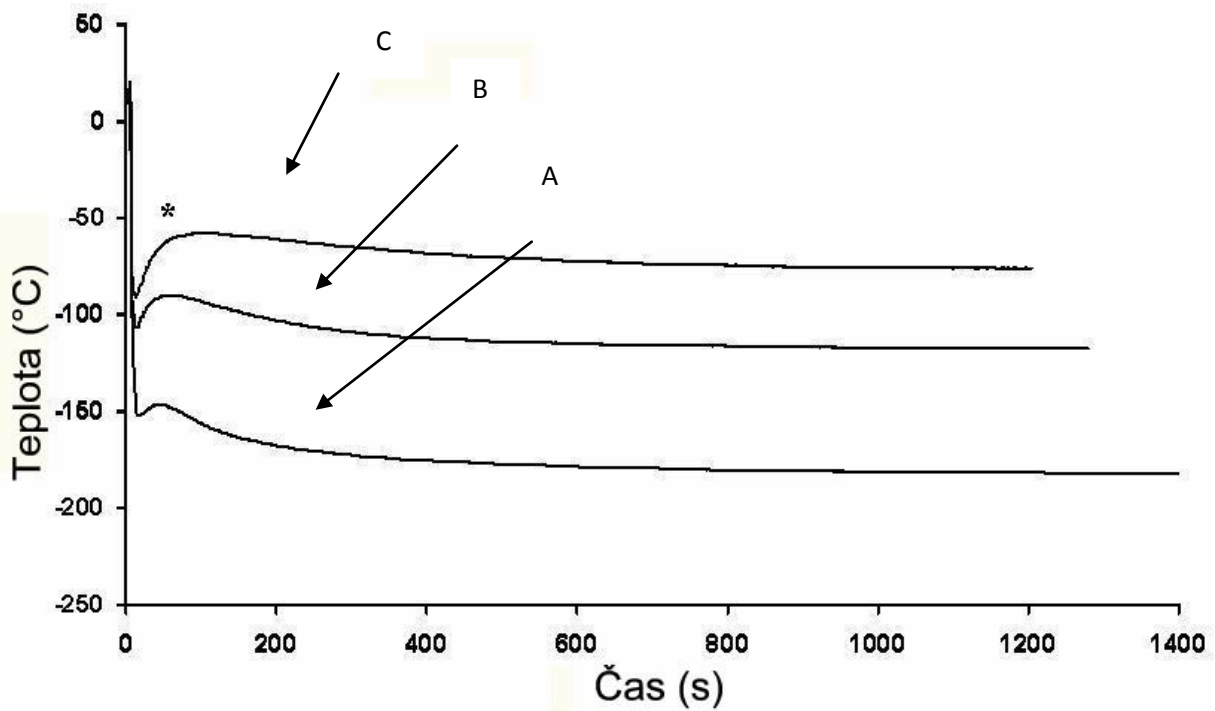
Pro statistické vyhodnocení byl použit statistický software Statistica 9.1, konkrétně analýza rozptylu ANOVA a Tukey test.

3.2 Výsledky

3.2.1 Teploty v různých hladinách nad tekutým dusíkem (bez vzorku)

Ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku, byla zaznamenána nejnižší teplota -170°C, v 6 cm -110°C a v 9 cm -70°C (Obr. 1).

Obr. 1. Teploty uvnitř boxu během 20 minut v různých hladinách nad povrchem tekutého dusíku A-3 cm, B-6 cm, C-9 cm.



Teplota po uzavření boxu na všech třech hladinách klesala až na výše uvedené hodnoty.

Výkyv teploty (Obr. 1 *) na začátku cyklu může být způsobený rámečkem ("plovákem"), zejména jeho tepelnou energií, případně uvolněním skupenského tepla a na něm vázané vlhkosti.

3.2.3 Pohyblivost spermií

Pohyblivost spermií šesti mlíčáků (2009) zmrazovaných v roztoku Kop ve třech zvolených hladinách nad povrchem tekutého dusíku uvádí Tabulka 3.

Tab. 3. Pohyblivost spermií od šesti mlíčáků (2009) zmrazovaných v roztoku Kop v procentech před a po zmrazení.

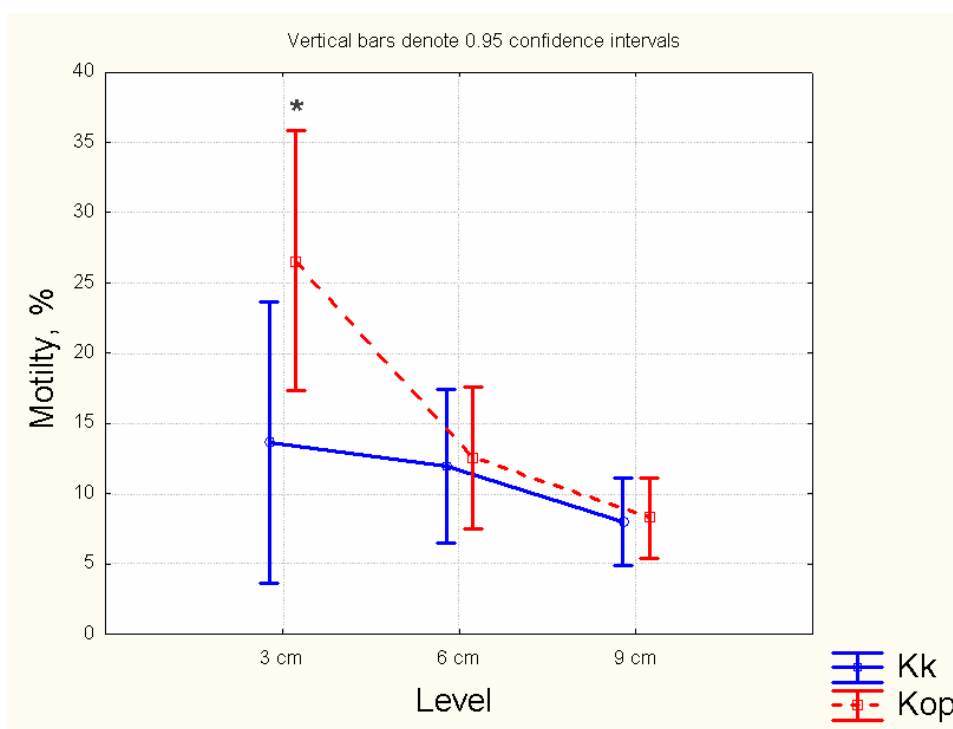
Pohyblivost spermatu, (%) (zvažovaná chyba měření $\pm 5\%$)				
Mlíčák	Nativní	3 cm nad povrchem tekutého dusíku	6 cm nad povrchem tekutého dusíku	9 cm nad povrchem tekutého dusíku
1	99	40	25	5
2	40	15	25	20
3	99	50	30	15
4	95	55	35	15
5	99	60	60	35
6	99	10	40	5
Průměr	88	37	36	17

Nejvyšší motilita po rozmrazení byla pozorována: u mlíčáků 1, 3, 4, 5 u vzorků mrazených ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku, u mlíčáků 2, 6 v 6 cm. Celková průměrná motilita u rozmrazeného spermatu byla 37% pro 3 cm, 36% pro 6 cm a 17% pro 9 cm.

Protože se zjištěné hodnoty motility pro jednotlivé hladiny zmrazování mezi sebou statisticky průkazně nelišily, rozhodli jsme se práci v následujícím experimentu (2010) rozšířit jak počtem použitých mlíčáků (k dosavadním 6 přidat dalších 7), tak počtem použitých kryoroztoků (Kop, KK), to vše za stejných teplotních podmínek zmrazování, tedy hladinou nad povrchem tekutého dusíku. Sledované parametry byly rozšířeny o rychlost a dobu pohyblivosti spermií.

Procentický podíl pohyblivých spermií po rozmrazení a aktivaci pohybu (po smíchání s aktivačním roztokem nebo vodou) spermatu, zmrazeného na třech uvedených hladinách nad povrchem tekutého dusíku, ukazuje Obr. 3. Ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku s kryoprotektivním médiem Kop byla dosažena pohyblivost 27%, s kryoprotektivním médiem Kk 14%. V 6 cm nad povrchem tekutého dusíku s kryoprotektivním médiem Kop byla dosažena pohyblivost 13%, s kryoprotektivním médiem Kk byla pohyblivost téměř totožná. V 9 cm nad povrchem tekutého dusíku s kryoprotektivním médiem Kop byla dosažena pohyblivost 8%, stejně tak jako u roztoku Kk. U nativního spermatu byla dosažena pohyblivost v průměru 88%.

Obr. 3. Pohyblivosti spermií (%) od 7 mlíčáků zmrazených ve 3, 6, 9 cm, nad tekutým dusíkem (experiment z roku 2010). Hvězdičkou označena statisticky odlišná hodnota. Použity kryoprotektivní media Kopeika (Kop) a Kurokura (Kk).

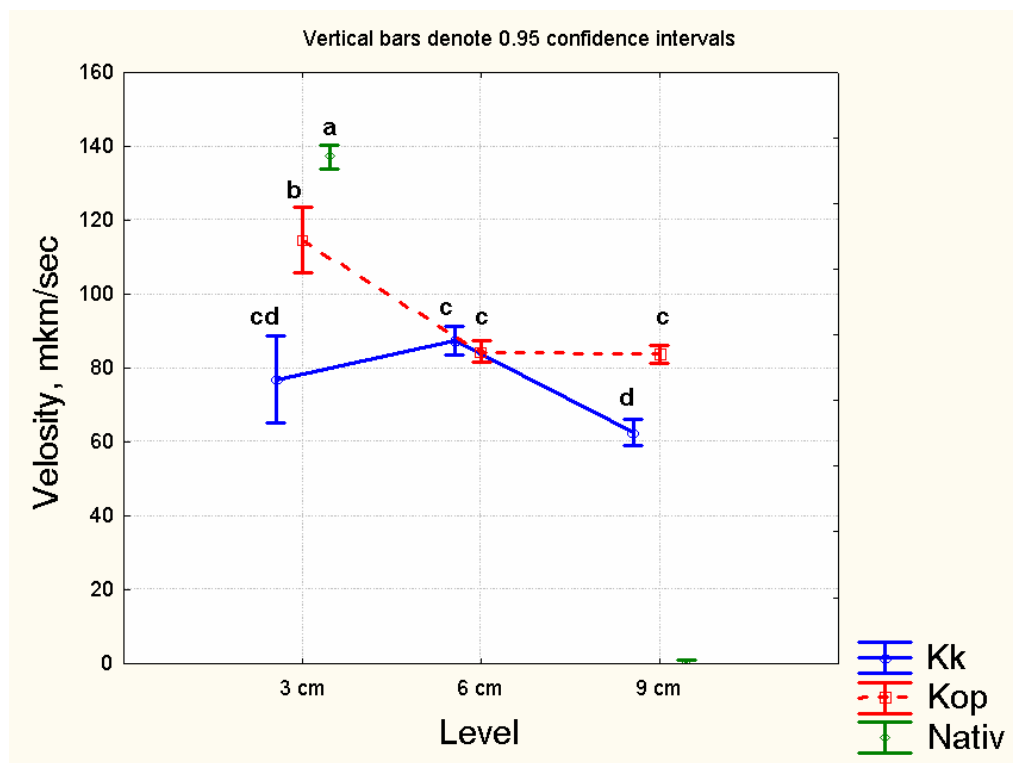


Nejvyšší pohyblivost spermií byla dosažena s kryoprotektivním médiem Kop ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku.

3.2.4 Rychlost pohybu spermií

Hodnoty rychlosti pohybu ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) nativních a rozmrazených spermií 15 s po aktivaci jsou patrné z grafu na Obr. 4. Statisticky průkazně nejvyšší rychlost ($118 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) po zmrazení byla naměřena ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku za použití kryoprotektivního média Kop. Nativní sperma mělo nejvyšší rychlost ($138 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$).

Obr. 4. Rychlost spermií ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) od 7 mlíčku zmrazených ve 3, 6, 9 cm, nad tekutým dusíkem. Hodnoty se stejným písmenem se průkazně statisticky neliší.



3.2.5 Doba pohyblivosti spermií

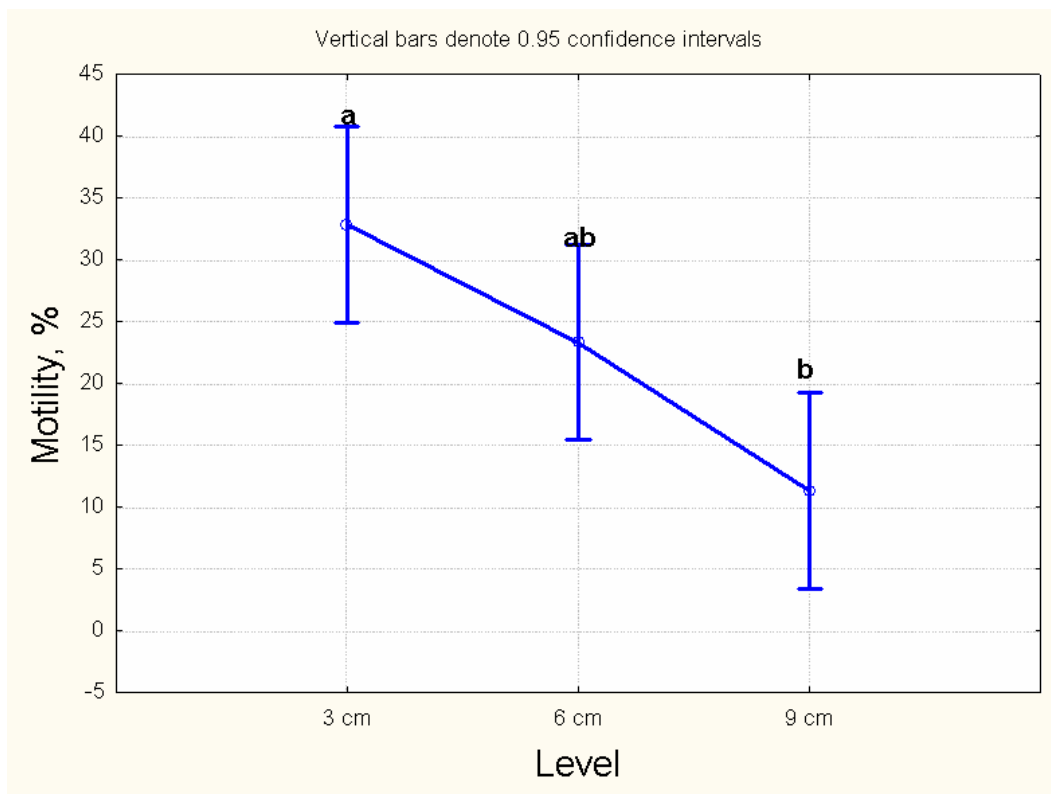
Po rozmrazení spermatu mrazeného na třech hladinách nad povrchem tekutého dusíku (3, 6, 9 cm) byla sledována doba pohyblivosti spermií (s) po jejich aktivaci pohybu (po smíchání s aktivačním roztokem nebo vodou). Doba pohyblivosti u rozmrazeného spermatu se statisticky průkazně nelišila mezi jednotlivými hladinami ani použitými roztoky. Ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku byla průměrná doba pohybu 53 s, v 6 cm nad povrchem tekutého dusíku 50 s a v 9 cm nad povrchem tekutého dusíku 48 s. Nativní sperma vykazovalo pohyb spermií ve stejných podmínkách 68 s a statisticky průkazně se tak lišilo od rozmrazeného spermatu.

3.3 Diskuze

Snížení motility, rychlosti i zkrácení doby pohybu spermií po rozmrazení pozorované v našich experimentech, je známý jev způsobený procesem zmrazení a rozmrazení a je popisován různými autory (např. Lahnsteiner a kol., 2000, Rodina a kol., 2008). Tento jev je dán nejen kryopoškozením části buněk, ale i kryoaktivací nepoškozených a aktivací schopných buněk, jak uvádí Boryshpolets a kol., 2009. Vliv kryopoškození a kryoaktive se projevuje nejen na snížení přeživších buněk či pozorovatelné motility, ale je patrný i na ostatních sledovaných parametrech, jako byla rychlost a doba pohybu.

Obecně lze říci, že se doporučované metodiky kryokonzervace spermií ryb liší nejen podle druhů, mnohdy příbuzných, ale i v rámci jednoho druhu v různých podmínkách (Lahnsteiner, 1995) (geografických, ekologických, chovných). Proto jsou různými autory doporučována různá média, která jsou v různých podmínkách různě úspěšná. Dvě kryomédia použitá v naší práci sledují tento fakt. V našich podmínkách kryoroztok Kopeika vykazoval lepší výsledky motility i rychlosti v téměř všech hladinách zmrazování (statisticky průkazné pouze u motility ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku).

Sumarizované výsledky motility spermií mrazených v roztoku Kop v experimentech 2009 a 2010 uvádí graf na Obr. 5, ze kterého je patrný pokles motility se zvětšující hladinou nad povrchem dusíku, resp. se snižující se rychlostí mrazení.



Obr. 5. Pohyblivost spermií (%) zmrazených ve třech hladinách nad tekutým dusíkem ve 3, 6, 9 cm, u 13 mlíčáků. Hodnoty se stejným písmenem se průkazně statisticky neliší.

3.4 Závěr

- Nejlepších výsledků bylo dosaženo ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku.
- Ze dvou porovnávaných kryoprotektivních médií (Kop x Kk) se jako úspěšnější v našich podmínkách jevil roztok Kopeika (Kop).
- Kombinace první hladiny s kryomédiem Kopeika vykázala větší rychlosti a přežití spermií po rozmrazení.
- Výsledek potvrdil v literatuře doporučené mrazení pejet ve výšce 3 cm nad povrchem tekutého dusíku, které se ukázalo jako nejefektivnější pro většinu mlíčáků s daným kryomédiem a objemem pejety i v našich experimentech.
- Získané termogramy mohou být použity k dalšímu výzkumu na programovatelných přístrojích a pro vypracovávání dalších metod zmrazení spermatu jiných druhů ryb.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci projektu Letní rybářské školy a současně podpory projektů NAZV QH82119, CZ.1.05/2.1.00/01.0024 a GAJU 046/2010/Z.

Tyto experimenty byly publikovány v samostatném článku uveřejněném v Bulletinu VÚRH (2011).

4. Používaná literatura

Baccetti, B., Burrini, A. G., Callaini, G., Gibertini, G., Mazzini, M. & Zerunian, S. (1984): Fish germinal cell. I, Comparative spermatology of seven cyprinid species, *Gamete Research* 10, 373-396.

Baccetti, B., (1986): Evolutionary trends in sperm structure. *Comp. Biochem. Phys. A* 85 (1), 29–36.

Ballon E., K., The common carp, *Cyprinus carpio* (1995): its wild origin, domestication in aquaculture, and selection as colored nishikigoi, *Guelph ichthyology reviews*, 3, 1-55.

Barus, V. & Oliva, O. (1995). *Mihulovci (Petromyzontes) a ryby (Osteichthyes)*.
Academia Praha.

Billard, R. and Fléchon, J. (1969): Particularité de la pièce intermédiaire de quelques Poissons Téléostéens. *J Microscopie* 8:36a.

Billard, R., Ultrastructure of trout spermatozoa (1983): changes after dilution and deep-freezing. *Cell Tissue Res.* 288: 205-218.

Billard, R. (1986). Biology of the gametes of some teleost species. *Fish Physiology and Biochemistry* 2, 115-120.

Billard, R., Cosson, M.P., The energetics of fish sperm motility In *Controls of sperm motility* (1990): Biological and Clinical Aspect (S.Randall.Ed.) CRC Pŕes, Boston, 153-173.

Beobachtungen zum Einsatz bei praktischen und wissenschaftlichen Arbeiten. *Fischw.*, 29 (7), 49-51.

Blaxter, J.H.S. (1953): Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172, 1189-1190.

Bochard, von, B., Schmidt, G. W., (1979): Versuche mit Regenbogenforellensperma. IV

- Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Li, P., Hulak, M., Gela D., Linhart O., (2009): Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.), 59 (3), 291–296.
- Caille, N., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., Flajšhans, M., Linhart, O., (2006): Quantity, motility and fertility of tench *Tinca tinca* (L.) sperm in relation to LHRH analogue and carp pituitary treatments, *Aquaculture International* 14, 75-87.
- Cosson J., Perchec G., Cosson M. P., Jeulin C., Billard R., (1996): Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 35 (2), 113–120.
- Cryo bios systém: dostupné z <http://www.cryobiosystem-imv.com/Portals/3/PDF/Monograph.pdf>, 2. 4. 2012.
- FAO, „Aquaculture Production (1995): FAO EIFAC, Roma 80, 713.
- WORLD REVIEW OF FISHERIES AND AQUACULTURE, dostupné z <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e01.pdf>, 5. 4. 2012.
- Gamčík, P. (1976): Umělá insminácia a andrológia hospodárskych zvierat, *Príroda Bratislava*, 152-211.
- Global Programmes for Management of Genetic Resources; 2009, dostupné z www.vuzv.cz, 1.3.2012.
- Horton, H. F., Ott, A. G., (1976): Cryopreservation of fish spermatozoa and ova, *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 33 (4), 995-1000.
- Koldras M., Moczarski M., (1983): Properties of pike *Esox lucius* L. milt and its cryopreservation, *Polskie Archiwum Hydrobiologii Polish Archives of Hydrobiology POLARCHHYDROBIOLPOLARCHHYDROBIOL*, 30 (1), 69-78.
- Kopeika, E., F., (1968): Instrukcija po nizkotemperatnomu konservirovaniju spermy kapra; *Akademia nauk USSR; Moskva*, 9.
- Kurokura H., Hirano R., Tomita M., Iwahashi M., (1984): Cryopreservation of carp sperm, *Aquaculture* 37 (3), 267–273.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. & Patzner, R. (1995). Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. *Journal of fish biology* 47, 492-508.

- Lahnsteiner, F. Berger, B., Horvath, A., Urbanyi B., Weismann, T., (2000): Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes, *Theriogenology*, 54 (9), 1477-1498.
- Legendre, M.; Billard, R. (1980): Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing, *Reproduction, Nutrition, Developpement*, 20 (6), 1859-1868.
- Linhart, O., Pokorný, J., (1984): Hodnocení čerstvého spermatu ryb *Metodika VÚRH Vodňany* č. 14, 3-13 stran.
- Linhart, O., (1984): Dlouhodobé uchování spermatu některých druhů ryb, I zamrazování, *Buletin VÚRH Vodňany* č. 2, 34-43.
- Linhart, O., (1984): Dlouhodobé uchování spermatu některých druhů ryb, II Rozmrazování, *Buletin VÚRH Vodňany*, č. 3, 22-30.
- Linhart, O., Šlechta, V., Slavík, T., (1991): Fish sperm composition and biochemistry, *Bulletin of the Institut of Zoology, Academia Sinica, Monograph* 16, 288-311.
- Linhart O., Mims S.D., Gomelsky B., Hiott A.E., Shelton W.L., Cosson J., Rodina M., Gela D., Bastl J., (2003): Ionic and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula* A.).
- Linhart O., Spermie struktura a životnost, elektronický učební text Řízená reprodukce ryb pro ZF/VÚRH, 2011
- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S., (2011): Hodnocení čerstvého spermatu ryb, *Edice Metodik (Technologická řada), FROV JU, Vodňany*, 114, 26.
- Mattei, X., Siau, Y. and Seret, B. (1988). Etude ultrastructurale du spermatozoide du coelacanth: *Latimeria chalumnae*. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 101, 243-251.
- Mazur P., (1980): Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities, *ORIGINS OF LIFE AND EVOLUTION OF BIOSPHERES*, 10 (2), 137-159.
- Moczarski M.,(1977): Deep freezing of carp *Cyprinus carpio* L. sperm, *Bull Acad Pol Sci Biol.* 25 (3), 187-90.
- Nicander, L. (1970). Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa. In *Comparative Spermatology* (Baccetti, B., ed.), pp. 47-56. Rome: Academia Nazionale Dei Lincei.
- Odbor státní správy ve vodním hospodářství a správy povodí Ministerstvo zemědělství

- Odbor ochrany vod Ministerstvo životního prostředí, 2011: dostupné z http://eagri.cz/public/web/file/134470/Modra_zprava_2010_small.pdf, 3. 4. 2012.
- Pšenička M., Alavi S. M. H., Rodina M., Nebesářová J., Linhart O., (2006): Porovnání morfologie a ultrastruktury spermií zástupců kostnatých a chrupavčitých ryb; lína obecného Tinca tinca a jesetera sibiřského Acipenser baerii. In: Vykusová B., IX. Česká ichtyologická konference, Vodňany, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 124-130.
- Pšenička M., Flajšhans M., Hulák M., Kašpar V., Rodina M., Boryshpolets S., Linhart O., The influence of ploidy level on ultrastructure and motility of tench Tinca tinca (L.) spermatozoa, Rev Fish Biol Fisheries (2010) 20, 331–338.
- Pšenička M., Rodina M., Linhart O., (2010): Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy, Animal Reproduction Science 117, 147–154.
- Pšenička M., V. Kašpar, M. Rodina, D. Gela, M. Hulák and M. Flajšhans., (2011): Comparative study on ultrastructure and motility parameters of spermatozoa of tetraploid and hexaploid Siberian sturgeon Acipenser baerii, Journal of Applied Ichthyology 27, 683-686.
- Pšenička M., Kašpar V., Alavi S. M. H., Rodina M., Gela D., Li P., Boryshpolets S., Cosson J., Linhart O., Ciereszko A., (2011): Potential role of the acrosome of sturgeon spermatozoa in the fertilization process, Journal of Applied Ichthyology 27, 678–682.
- Rall, W. F., Reid, D. S., Farrant, J., (1980): Inocuous biological freezing during warming. Nature, 286, 511-514.
- Rodina M., Policar T., Linhart O., Rougeot C., (2008): Sperm motility and fertilizing ability of frozen spermatozoa of males (XY) and neomales (XX) of perch (*Perca fluviatilis*), Journal of Applied Ichthyology 24 (4), 438 - 442.
- Smíšek, J., (1969): Umělý výtěr kapra Rybářství, 24 (12), 278-280.
- Sochorová, D., Boryshpolets, S., (2011): Kryokonzervace spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) při různých teplotách zmrazování, 47, 15-25.
- Stein, H., (1979): Zur Frage der Gefriekonservierung von Regenbogenforellensperma, Fischwirt 29 (11), 74-76.

- Stein, H., (1981): Licht- und electronenoneptische Untersuchungen an den Spermatozoen verschniedener Süßwasserknochenfische (Teleostei). *Z Angew zool.* 68, 183-198.
- Stoss, J., (1979): Spermatokonservierung bei der Regenbogenforelle (*Salmo gaidneri*)
Disertation, Univ. Gottingen, 120.
- Stoss, J., Holtz, W., (1981) : Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gaidneri*) sperm.
II. Efect of pH and presence of a buffer in the diluent. *Aquaculture* 25 (2-3), 217-222.
- Stoss, J., Holtz, W., (1981): Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gaidneri*) sperm.
I. Efect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture* 22 (1-2), 97-104.
- Suquet, M., Dorange, G., Omnes, MH., Normant, Y., Le Roux, A. & Fauvel, C. (1993):
Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot
(*Scophthalmus maximus*). *Journal of Fish Biology* 42, 509-516.
- Truscott, B., (1968): Sub-zero preservation of atlantic salmon sperm. *J. Fish. Res. Board Can*, 25, 2, 365-372.
- Tyler medical clinic (2001): dostupné z
<http://www.tylermedicalclinic.com/Semen%20Cryopres.%20History.htm>, 18. 3. 2012.
- Virtual Medical Centre (2002): dostupné z
<http://www.virtualmedicalcentre.com/treatment/cryopreservation/157>