



Zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) pro potřeby uchování genofondu v praktických podmínkách

M. Rodina, B. Dzyuba, S. Boryshpolets, O. Linhart



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) pro potřeby uchování genofondu v praktických podmínkách

M. Rodina, B. Dzyuba, S. Boryshpolets, O. Linhart

**VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU OP RYBÁŘSTVÍ:**

Příprava a vydání metodických publikací v roce 2010

(CZ.1.25/3.1.00/10.00303)



**EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
*„Investice do udržitelného rybolovu“***

**OBSAHOVÁ ČÁST PUBLIKACE BYLA ZPRACOVÁNA
ZA FINANČNÍ PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH PROJEKTŮ:**

Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb

(Mze ČR NAZV QH82119)

Biologické, environmentální a chovatelské aspekty v rybářství

(výzkumný záměr MSM6007665809)

Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz – CENAKVA

(CZ.1.05/2.1.00/01.0024)

Reprodukce a genetika vybraných modelových druhů kostnatých a chrupavčitých ryb

(GA JU 046/2010/Z)



ISBN 978-80-87437-07-0

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD DO PROBLÉMU | 6 |
| 1.1. Úvod do spermatologie sladkovodních druhů ryb | 6 |
| 1.2. Klíčové faktory aktivující a inhibující motilitu spermií ryb | 6 |
| 1.3. Teorie kryokonzervace | 8 |
| 1.4. Kritické body kryokonzervace | 8 |
| 1.5. Kryokonzervační technika v akvakultuře | 9 |
| 2. CÍL | 10 |
| 3. MÍSTO, KDE SE TECHNOLOGIE OVĚŘOVALA | 10 |
| 4. POPIS TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU A VÝSLEDKY | 10 |
| 4.1. Výběr a příprava vhodných generačních mlíčáků | 10 |
| 4.2. Odběr spermatu | 11 |
| 4.3. Kontrola kvality spermatu | 12 |
| 4.4. Příprava k vlastnímu mrazení spermatu | 13 |
| 4.4.1. Příprava roztoků | 13 |
| 4.4.2. Ředění spermatu kryoprotektivem a plnění do pejet | 14 |
| 4.5. Vlastní mrazení spermatu | 14 |
| 4.6. Uložení zmrazených dávek | 15 |
| 4.7. Evidence zmrazených dávek | 16 |
| 4.8. Rozmrazení zmrazených dávek | 16 |
| 4.9. Použití rozmrazeného spermatu k oplození | 18 |
| 4.10. Materiál, pomůcky, chemikálie | 18 |
| 5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU PRO PODNIKATELSKÝ SUBJEKT | 20 |
| 6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU VE VÝROBĚ PODNIKATELSKÉHO SUBJEKTU | 20 |
| 7. SEZNAM LITERATURY | 21 |
| PŘÍLOHA | 24 |

1. ÚVOD DO PROBLÉMU

1.1. Úvod do spermatologie sladkovodních druhů ryb

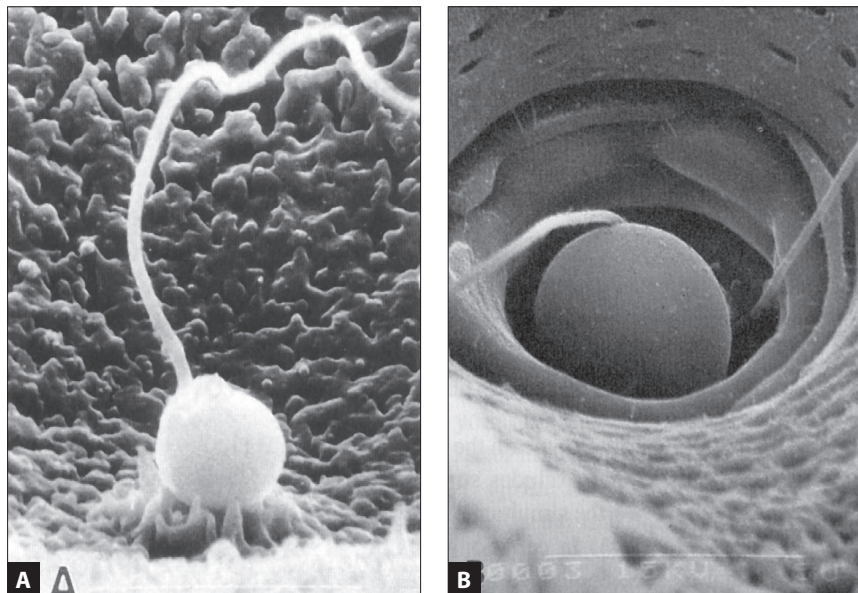
Sperma ryb je tvořeno jednak buněčnou frakcí – spermiiemi a jednak nebuněčnou částí, tzv. spermiální plazmou. Spermiální nebo též semenná plazma ryb tvoří obvykle 50–80 % objemu spermatu (Linhart, 1984). Je produktem především Sertoliho buněk, není tedy totožná se semennou plazmou teplotokrevných. Svým složením poskytuje spermiiím ochranné a výživné látky. Z anorganických látek obsahuje především ionty Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , a Cl^- ; z organických látek glycidy, proteiny, lipidy a metabolity glykolýzy a Krebsova cyklu. (Linhart a kol., 1991).

Spermie kostnatých ryb, mezi které patří i kapr obecný, mají fylogeneticky primitivní stavbu, tzn. kulatou hlavičku bez akrozomu s velmi tenkým bičíkem (Pšenička a kol., 2006). Vyvíjejí se v lalúčcích varlat, odkud jsou dozrálé spermie spolu se spermiální plazmou v průběhu přirozeného rozmnožovacího aktu – „tření“ vypuzeny do vnějšího prostředí.

Převážná většina znalostí o struktuře spermií ryb a fyziologii pohybu spermií byla zdokumentována na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) (Billard, 1970; Morisawa a Suzuki, 1985; Boitano a Omoto, 1992; Cosson a kol., 1999; Alavi a kol., 2008), používaném často jako specifický model sladkovodních druhů ryb.

1.2. Klíčové faktory aktivující a inhibující motilitu spermií ryb

Spermie převážně většiny sladkovodních druhů ryb s vnějším oplozením nejsou pohyblivé ve varlatech a genitálním traktu. K aktivaci pohybu dochází až jejich uvolněním do vnějšího prostředí, tedy do sladké vody. Ta však představuje pro individuální „nechráněné“ buňky extrémně nepříznivé prostředí, takže perioda pohybu spermií ryb je velice krátká (Cosson a kol., 1999) a pohybuje se v rozmezí 10–60 s u kostnatých sladkovodních ryb, několika minut (3–9) u chrupavčitých ryb a zhruba 30 minut u mořských druhů ryb (Ginsburg, 1968; Billard a kol., 2004; Cosson a kol., 1999), vždy v závislosti na faktorech vnějšího prostředí.



Obr. 1. Spermie kapra obecného (A) na dně mikropylárního otvoru v místě speciálního dosedu vytvořené pouze pro jednu spermii. B – spermie kapra obecného zachycená v mikropylárním otvoru. Snímky pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem z publikací Linhart a kol., 1993 a Kudo a kol., 1991, 1998.

Faktory prostředí, jako jsou ionty, pH nebo osmolalita, způsobují depolarizaci buněčných membrán a stimulují motilitu spermií. Scheuring (1925) byl první, kdo poprvé podal informace o skutečnosti, že ionty Na^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} redukují inhibiční účinnost K^+ iontu u spermií pstruha obecného (*Salmo trutta*) s principem vyšší účinnosti bivalentních kationtů oproti Na^+ iontům. Synergický efekt mezi ionty vedl k vytvoření demonstrační studie sledující kontrolu motility změnou membránového potenciálu kombinacím různých iontů (Gatti a kol., 1990; Boitano a Omoto, 1991). Osmotický tlak, koncentrace K^+ spolu se sacharózou a pH semenné plasmu nižším než 7,0 jsou hlavní inhibiční faktory motility spermií u lososovitých ryb (Morisawa a kol., 1983). U kaprovitých ryb a mořských druhů ryb je hlavním kontrolním faktorem motility spermií osmotický tlak (Linhart a kol., 1991; Redondo-Müller a kol., 1991; Billard a kol., 1995; Perchec a kol., 1997; Morisawa a Suzuki, 1980). Motilita spermií u chrupavčitých ryb a některých kostnatých je z části kontrolována osmotickým tlakem a z části iontovým efektem (Linhart a kol., 1995, 2002; Billard a kol., 1999). Motilita spermií veslonosa amerického je inhibována zvýšenou úrovní velmi malé koncentrace K^+ při pH 7,0, bez doprovodného kumulativního efektu Ca^{2+} , jak dříve ukázal u lososovitých ryb Scheuring (1925), Cosson a kol. (1986, 1989), Christen a kol. (1987). Baynes a kol. (1981)

zdokumentoval, že roztoky K^+ (nebo K^+ a Na^+), které běžně neindukují motilitu spermií u pstruha duhového, slouží jako součást aktivačních roztoků po přidání malého množství Ca^{2+} . Spermie pstruha duhového vykazují okamžitě po aktivaci a po celou dobu pohybu spermií cirkulární trajektorii. Bylo prokázáno, že Ca^{2+} ionty v průběhu periody krátkého pohybu jsou odpovědné za cirkulární dráhu spermií pstruha duhového (Cosson a kol., 1989; Boitano a Omoto, 1992) a slouží rovněž k eliminaci inhibičního efektu K^+ na motilitu spermií. Rozdílný efekt Ca^{2+} iontů byl pozorován u intaktních a demembranovaných spermií mnoha kostnatých ryb (Alavi a kol., 2008).

1.3. Teorie kryokonzervace

Kryokonzervace nebo také „mrazení či zmrazování“ – je metoda uchování živých buněk a tkání při velmi nízkých teplotách (dosahovaných obvykle pomocí tekutého dusíku nebo suchého ledu) při použití ochranných látek – tzv. kryoprotektantů. Úspěšnost kryokonzervace spermií je dána: zachováním integrity buňky, zachováním pohyblivosti či schopnosti aktivace pohybu buňky a zachováním oplození schopnosti buňky.

Při kryokonzervaci dochází ke tvorbě intra a extracelulárních krystalů vody (přičemž je důležitá velikost krystalů a jejich uspořádání), dále ke změnám iontové koncentrace (intracelulární i extracelulární) (vedoucím k lokálnímu zvýšení koncentrace elektrolytů) a ke změnám struktury buněčné membrány.

Pro eliminaci uvedených vlivů na buněčnou membránu a pohybový aparát spermií jsou používány ochranné látky – KRYOPROTEKTORY (kryoprotektiva, kryoprotektanty). Nejčastěji používanými kryoprotektory jsou GLYCEROL, DMSO, METANOL, PROPANDIOL, ETYLENGLYKOL, ale i další látky. Kryoprotektanty tedy omezují tvorbu, velikost a polarizaci (uspořádání) krystalů ledu (extracelulárně i intracelulárně), chrání membránu před lokálním působením zvýšené koncentrace iontů a před strukturálními změnami.

1.4. Kritické body kryokonzervace

Kryokonzervace spermií ryb je metoda, jejíž úspěch závisí na velkém množství proměnných, které ve výsledku ovlivňují schopnost spermií oplodnit vajíčko. Jde jednak o kvalitu odebraného spermatu a dále o faktory, které působí v průběhu přípravy a vlastního mrazení spermatu (vnější faktory) (Ciereszko a kol., 2000; Brown a Mims, 1999; Leibo a Bradley, 1999; Linhart a kol., 1993, 2000, 2005, 2006; Rodina a kol., 2007):

Vhodný extendor a ředění spermií. Extendor, tedy ředící roztok, je roztok obsahující spermiální plasmě podobné organické a anorganické látky a pH. Extendor

umožňuje naředění hustého spermatu (koncentrace spermií je běžná u kaprovitých ryb na úrovni 10^9 spermií) a krátkodobé uchování při $+4$ °C. Chemické složení extendorů používaných pro zmrazování je velmi široké. Před zmrazováním se sperma ředí extenderem na úrovni od 1 : 1 do 1 : 20 v závislosti na koncentraci spermatu a specifitě druhu.

Kryoprotektiva a jeho koncentrace. Kryoprotektiva jsou přidávána ke spermatu spolu s extendery z důvodu zvýšení přežití spermií v průběhu zmrazování. Hlavní vlastnost kryoprotektiv spočívá ve vyvázání vody s redukcí formování krystalů v průběhu zmrazování nebo v strukturování uniformních krystalů. Další vlastnost spočívá ve vázání elektrolytů, čímž dochází k zamezení tvorby koncentrovaných residuálních nezmrazených roztoků, a tím i snížení bodu tuhnutí v průběhu zmrazování. Kryoprotektivní vlastnosti byly identifikovány u velkého množství látek, jako jsou např. dimethylsulfoxid (DMSO), ethylenglykol (EG), glycerol, methanol a propandiol. Koncentrace kryoprotektiv v kryoprotektivních mediích nebo po finálním naředění spermatu je odlišná druh od druhu s obvyklým rozhraním od 5 do 15 %.

Rychlost zmrazování je hodnocena jako velmi kritická proměnná ovlivňující úspěch zmrazování. Nejpoužívanější technikou je u spermií a ostatních buněk využití pomalého zmrazování (od $+4$ °C do -70 °C rychlostí $1-10$ °C za minutu). V průběhu zmrazování jsou krystaly ledu formovány v extracelulárním roztoku, voda se uvolňuje z buněk s vyrovnáváním osmotických úrovní až po dosažení tzv. osmotické ekvibrace. Při tom dochází ke krystalizaci i uvnitř spermií. Po dosažení nízké vnitřní intracelulární teploty na -70 °C je možné buňky bezpečně uchovávat v kapalném dusíku při -196 °C. Optimální zmrazovací rychlost je druhově specifická, musí být vždy ověřena pro určitý druh a kombinaci extenderu, kryoprotektiva, objem a formu (pejeta, peleta, kryozkumavka) zmrazované dávky.

Rychlost rozmrazování je stejně důležitá jako rychlost zmrazování. Zde platí čím rychlejší rozmrazení, tím lépe. Při pomalém rozmrazování hrozí především rekrystalizace vody a mechanické poškození rozmrazovaných buněk.

1.5. Kryokonzervační technika v akvakultuře

Technika zmrazování, tj. hluboké zmrazování spermií a jejich uchování v kapalném dusíku (-196 °C) je jedna z biotechnických metod aplikovaných v akvakultuře (Stoss, 1983; Rana, 1995; Gwo, 2000). Zmrazené sperma může být v akvakultuře následně využito:

- 1) pro produkci referenční chovatelské zásoby,
- 2) pro produkci hybridů (s reprodukci v různém období),
- 3) v případě rozdílného období reprodukce mlíčáků a jikernaček,
- 4) při snížení ekonomické náročnosti spojené s udržováním generačních mlíčáků,

- 5) pro genetické zlepšení v selekčně šlechtitelských programech,
- 6) při opakovaní výtěru s využitím specifických mlíčáků,
- 7) pro uchovávání genetických rezerv u kulturních druhů a
- 8) pro mezinárodní výměnu spermatu.

Velké množství studií bylo publikováno o zmrazování spermií u odlišných kostnatých ryb (Stoss, 1983; Rana, 1995; Gwo, 2000). V oblasti zmrazování spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) existuje celá řada publikací, které popisují zmrazování spermií kapra (Linhart a kol., 2000; Lahnsteiner a kol., 2000; Kopeika, 1986; Moczarski, 1977; Lubzens a kol., 1993, 1997; Magyary a kol., 1996 atd.). Přesto není používání zmrazeného spermatu u ryb v produkčním rybářství obvyklé v obdobném rozsahu jako např. u skotu či drůbeže.

2. CÍL

Cílem této technologie je na základě dosavadních poznatků poskytnout chovatelům postup k praktickému provedení zmrazování spermatu naší nejdůležitější hospodářské ryby – kapra obecného v praktických podmínkách českého rybářství bez potřeby speciálních přístrojů, pouze za pomoci základních laboratorních pomůcek.

3. MÍSTO, KDE SE TECHNOLOGIE OVĚŘOVALA

Vlastní proces ověření technologie probíhal v období 2008–2010 v rámci realizace několika provozních sledování a experimentů spojených s ověřením technologického postupu zmrazování spermatu kapra pro potřeby programu uchování genových zdrojů v provozních podmínkách rybářských podniků sdružených v Rybářském sdružení České republiky, konkrétně na rybochovných objektech Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity. Ověřování technologického postupu zmrazování spermií kapra v praxi byla financována projektem NAZV "Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb" (MZe ČR, NAZV QH82119).

4. POPIS TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU A VÝSLEDKY

4.1. Výběr a příprava vhodných generačních mlíčáků

Hlediskem výběru byl jednak známý původ – plemeno, chovná skupina (zákon o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat č. 154/2000 Sb. Vyhl. 357/2001), dále aktuální zdravotní stav a kondice ryb.

Pro mrazení spermatu kapra pro potřeby uchování genofondu bylo používáno pouze sperma od ryb individuálně značených a evidovaných v plemenářské evidenci. Z praktického hlediska jsou vhodnější mlíčáci stáří 4–8 let, především z důvodu lepší manipulace. Z výběru byly vyřazeny ryby viditelně nemocné, ve špatném výživném stavu, případně ryby viditelně neodpovídající exteriérem danému plemeni. Pro potřeby kryokonzervace je vhodnější sperma odebírané v první polovině reprodukční sezóny.

Předvýtěrová příprava generačních mlíčáků spočívala především v úpravě teplotního režimu a hormonální stimulaci mlíčáků stejně jako pro potřebu umělého výtěru: mlíčáci byli v první polovině května temperováni na 20 °C, k hormonální stimulaci byla použita kapří hypofýza 0,5–1 mg.kg⁻¹.



Obr. 2. Odběr spermatu kapra vývěvou do odběrných nádobek.

4.2. Odběr spermatu

Odběr spermatu ryb je obecně specifický podle druhu, vždy je však cílem získat nekontaminované sperma, popř. eliminovat účinek kontaminantů, hlavně moče, použitím vhodných postupů a prostředků.

Sperma kapra bylo odebíráno 12–24 h po hormonální stimulaci odsáváním z povrchu pohlavní papily za současné abdominální masáže břišní krajiny. K odsátí byla použita odsávačka napojená na vývěvu (obrázek 2), nebo bylo sperma jen odstříknuto do suché a čisté kádinky. Sperma se do dalšího zpracování uchovávalo v částečně naplněných nádobkách (kontejnery na tkáňové kultury o objemu 50 – 200 ml), v aerobních podmínkách, v tenké vrstvě, v chladničce či v termoboxu při teplotách 0–2 °C (obrázek 3). Při tomto uchování bylo dbáno na to, aby sperma nezmrzlo, ani nebylo v přímém kontaktu s přechlazeným ledem nebo výparníkem chladničky a zároveň bylo chráně-

no před kontaminací vodou, protože uvedené negativní vlivy mohou vést ke znehodnocení spermatu, které se navenek projeví „zrosolovatěním“ spermatu.



Obr. 3. Uchovávání spermatu kapra v plastových nádobkách na ledu, tedy při teplotě 0–2 °C.

4.3. Kontrola kvality spermatu

Kontrola kvality spermatu zahrnovala makroskopickou kontrolu (barva, konzistence a přítomnost přímisenin) a mikroskopickou kontrolu (koncentrace spermatu a stanovení či odhad motility – podílu pohyblivých buněk).

Sperma kapra se jevílo jako tekutina bělavé barvy, mléčné až smetanovité konzistence, koncentrace 10–25 x 10⁹ spermií v 1 ml. Byla zaznamenána kontaminace krví (zbarvení do růžova), výkaly (zbarvení do žlutozelená) nebo vodou či slizem ryby (vede k „zrosolovatění“). Sperma lehce kontaminované krví bylo používáno, sperma kontaminované výkaly, slizem nebo vodou bylo vyřazeno.

K mikroskopickému posouzení spermatu byl použit mikroskop zvětšující 100–200x (objektiv 10–20x při okuláru 10x), s tmavým polem nebo s průchozím světlem. Na podložní sklo mikroskopu byla pomocí kapátka nebo skleněné tyčinky kápnuta kapka (50–100 µl) odstáté vodovodní vody nebo destilované vody. Špičkou suché a čisté preparační nebo injekční jehly namočené do spermatu bylo lehkým ťuknutím přeneseno sperma do kapky na podložním skle a pomocí jehly okamžitě rozmícháno, byl zaostřen mikroskop a odhadován procentický podíl pohyblivých buněk. Pokud nebylo možné pozorovat samostatně se pohybující body, bylo pozorování opakováno s menším množstvím spermatu. Pro další práci bylo použito pouze sperma s minimálním podílem pohybujících se buněk 80 %.

Před zmrazením byla dále zjišťována koncentrace spermií počítáním spermií v počítací komůrce následujícím postupem: sperma se naředí 10 000x (dvoustupňově, tj.

990 μ l fyziologického roztoku se smíchá s 10 μ l spermatu, dokonale se protřepe a z tohoto naředěného spermatu se opět vezme 10 μ l a rozředí se v 990 μ l fyziologického roztoku). Kapka 10 μ l naředěného spermatu se kápne na okraj krycího skla počítací komůrky. Spermie se nechají 5–10 minut sedimentovat a následuje počítání spermií pod mikroskopem, a to v 16 čtvercích komůrky. Pokud použijeme Bürkerovu komůrku, potom koncentraci spermií vypočítáme podle vzorce: $0,15625 \times$ celkový počet spermií v 16 čtvercích, výsledek je v 10^9 spermií v 1 ml.

4.4. Příprava k vlastnímu mrazení spermatu

Příprava k vlastnímu mrazení spočívala ve vytemperování spermatu (veškerá manipulace probíhá na ledu při teplotě do +2 °C), ředění roztoků s kryoprotektivy a distribuce do pejet (slámek) o objemu 0,5 ml.

Pro sperma kapra je v literatuře uváděna řada roztoků a kryoprotektiv, které byly více či méně úspěšně použity. Z opakovaných testů různých roztoků a jejich kombinací s kryoprotektivy vyplynulo, že jednotlivé doporučované kombinace nejsou vždy a všude úspěšné. Proto byl pro praktické použití navržen následující systém: U části (nebo všech) mlíčáků se nejprve provede test použitelnosti jednoho ze dvou nejčastěji doporučovaných postupů (kombinací ředících roztoků s kryoprotektivy), sperma se níže popsáním způsobem zamrazí, následně rozmrazí a zkontroluje se motilita rozmrazeného spermatu. Na základě tohoto testu se zvolí příslušná kombinace ředícího roztoku a kryoprotektiva.

4.4.1. Příprava roztoků

Pro přípravu potřebných roztoků byly použity následující postupy:

A) Roztok podle Kopejky (Kopejka, 1986; nebo roztok „KOP“)

V 60 ml destilované vody rozpustíme:

- 1 429 mg TRISu;
- 47 mg KCl;
- 1 257 mg manitolu;
- 43 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$;
- 10 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$;
- 227 mg $NaHCO_3$;
- 116 mg sacharózy.

pH roztoku upravíme HCl na 8,0 a přidáme 16 ml ethylenglykolu (EG) a 10 ml vaječného žloutku a destilovanou vodou doplníme na 100 ml.

B) Roztok modifikovaný Kurokura 2 (Kurokura a kol., 1984; dále jen „MK2“)

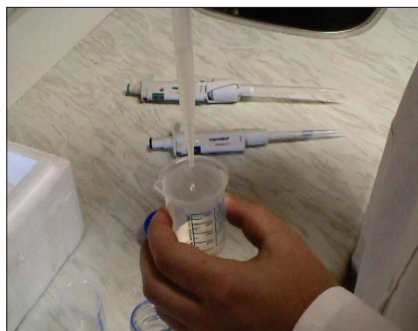
V 60 ml destilované vody rozpustíme:

- 362 mg NaCl;
- 999 mg KCl;
- 22 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 8 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Přidáme 10 ml DMSO a doplníme destilovanou vodou na 100 ml.

4.4.2. Ředění spermatu kryoprotektivem a plnění do pejet

Ředící roztok s kryoprotektivem o teplotě 0–2 °C byl postupně a velmi pomalu “po kapkách” napipetován do spermatu o téže teplotě (obrázek 4). Důvodem „postupného přikapávání“ byla snaha měnit postupně osmotickou úroveň suspenze buněk a vyvarovat se tak osmotickému šoku. Naředěné sperma bylo okamžitě plněno za pomoci pipety (1ml) do připravených a označených pejet o objemu 0,5 ml (obrázek 5). Každá pejeta nesla označení druhu ryby, č. ryby a datem zmrazování.



Obr. 4. Postupné přikapávání ředícího roztoku s kryoprotektivem do spermatu.



Obr. 5. Nasávání naředěného spermatu mikropipetou do označených pejet.

4.5. Vlastní mrazení spermatu

Vlastní mrazení dávek spermatu bylo realizováno v parách nad hladinou tekutého dusíku v „termoboxu“. Použitým termoboxem byl přepravní polystyrénový box na akvarijní ryby rozměrů 60 x 40 x 35 cm s víkem a tloušťkou stěny 4 cm. Pejety naplněné naředěným spermatem byly ukládány na předem připravený polystyrénový rámeček (tloušťka 3 cm) (obrázek 6) – fungující jako plovák, který se po naplnění přenesl do

ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU KAPRA OBECNÉHO (*Cyprinus carpio* L.)
PRO POTŘEBY UCHOVÁNÍ GENOFONDU V PRAKTICKÝCH PODMÍNKÁCH

boxu na hladinu kapalného dusíku a box byl okamžitě na 20 minut uzavřen (obrázek 7). Bylo dbáno na to, aby celý proces plnění všech pejet netrval déle než 5 minut. Teplota v oblasti pejet na rámečku po uzavření boxu se pohybovala na úrovni $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ (měřeno termočláňkovým teploměrem). Po 20 minutách byl box otevřen a pejety byly překloupeny do kapalného dusíku, tedy teploty $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 6. Rámeček s označenými a naplněnými pejetami na ledu ($0\text{--}2\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Obr. 7. Polystyrénový box o hloubce 35 cm, s výškou hladiny kapalného dusíku 7–10 cm.

4.6. Uložení zmrazených dávek

Pejety byly pinzetou ukládány do předem označených gobletů (plastových nebo papírových tubusů pro uložení pejet) (obrázek 8), které usnadňují manipulaci s pejetami. S goblety se pracovalo pod hladinou kapalného dusíku o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ tak, aby nedošlo ke znehodnocení dávek jejich „zahřátím“ na více než $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Goblety s pejetami byly uloženy do kanystrů v kontejnerech s kapalným dusíkem (obrázek 9).



Obr. 8. Ukládání pejet do gobletů pod hladinou kapalného dusíku.



Obr. 9. Umístění gobletů s pejetami do kanystru v kontejneru.

4.7. Evidence zmrazených dávek

Zmrazené dávky byly evidovány v protokolu, viz Příloha 1. V protokolu jsou uvedeny veškeré detaily o původu mlíčka, metodě zmrazování až po koncentraci spermií a úrovni oplozenosti dosažené po rozmrazení dávky.

4.8. Rozmrazení zmrazených dávek

Zmrazené dávky byly vyjímány v gobletu (gobletech) z kanystru kontejneru a přemístěny do manipulační polystyrenové nádoby s kapalným dusíkem. Následně byly pomocí pinzety (stále ještě v kapalném dusíku) vyjmuty příslušné pejety z gobletu a vloženy do vodní lázně o teplotě 40 °C a rozmrazovány za mírného pohybu v teplé lázni po dobu 6 s (obrázek 10).

Po 6 sekundách byla každá pejeta vyjmuta z teplé lázně, osušena a nůžkami byl odstřížen konec pejety, který není opatřen zátkou (z důvodu kontaminace vodou) (obrázek 11). Po odstřížení kontaminovaného konce byla pejeta odstříženou částí vložena do zkumavky a odstříhla se zátkou na pejetě, viz obrázek 12. Obsah pejety se nechal samovolně vytéct do zkumavky a okamžitě se použil k oplození či k testu pohyblivosti spermií.

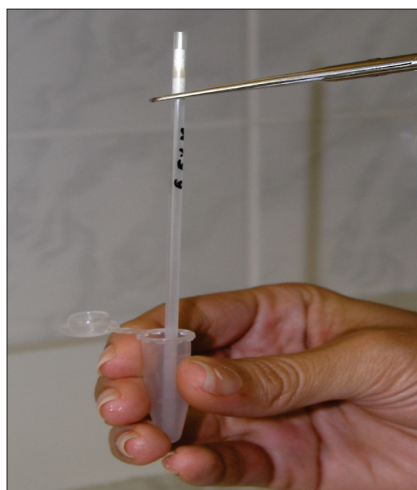
ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU KAPRA OBECNÉHO (*Cyprinus carpio* L.)
PRO POTŘEBY UCHOVÁNÍ GENOFONDU V PRAKTICKÝCH PODMÍNKÁCH



Obr. 10. Lázeň o teplotě 40 °C připravená pro rozmrazování.



Obr. 11. Odstrížení vodou ontaminovaného konce pejety.



Obr. 12. Umístění pejety do zkumavky s odstrížením zátky na pejetě.

4.9. Použití rozmrazeného spermatu k oplození

U kapra obecného se řídíme při reprodukci metodikou Gela a kol. (2009). Při osemnění dbáme na to, aby k smísení rozmrazeného spermatu s jikrami a vodou došlo současně, a to z důvodu toxicity DMSO vůči jikrám. Při osemnění dbáme na to, aby množství spermií na jednu jikru bylo vyšší než při použití čerstvého, tedy nezmrazeného spermatu. Jestliže při použití čerstvého spermatu nám stačí v řádu 10 000–30 000 spermií na jednu jikru, v případě použití rozmrazeného spermatu používáme deseti-násobek, tzn. 100 000–300 000 spermií na jednu jikru.

4.10. Materiál, pomůcky, chemikálie

Při jednotlivých krocích byl použit následující materiál, chemikálie a pomůcky:

A) Pro výběr ryb:

- gumotextilní plachetky,
- přelovovací rukáv nebo hluboký keser,
- manipulační stůl krytý molitanem.

B) Pro předvýtěrovou přípravu:

- hormonální preparát (kapří hypofýza nebo Ovopel),
- třecí miska, fyziologický roztok, injekční stříkačky, injekční jehly,
- teploměr.

C) Pro odběr spermatu:

- anestetikum (fenoxyetanol nebo hřebíčkový olej),
- nádoba na lázeň anestetika (kád'),
- utěrky na fixaci a osušení ryby,
- vakuová odsávačka nebo větší injekční stříkačky,
- nádobky na odebrané sperma, např. kontejnery na tkáňové kultury objemu 200 ml,
- termobox (izolovaný přepravní obal) s ledem nebo chladícími vložkami,
- voděodolný popisovač,
- čtečka RFID čipů na individuální identifikaci ryb,
- formuláře protokolu o odběru spermatu.

D) Pro posouzení kvality spermatu:

- světelný mikroskop zvětšující 100–200x,
- mikroskopická skla, preparační nebo injekční jehla,

ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU KAPRA OBECNÉHO (*Cyprinus carpio* L.)
PRO POTŘEBY UCHOVÁNÍ GENOFONDU V PRAKTICKÝCH PODMÍNKÁCH

- pipety (1000 a 10 µl),
- Bürkerova počítací komůrka (nebo jiná počítací komůrka),
- zkumavky na předředění spermatu,
- fyziologický roztok.

E) Pro přípravu spermatu k mrazení:

Chemikálie:

- chlorid sodný (NaCl),
- chlorid draselný (KCl),
- hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃),
- TRIS,
- kyselina chlorovodíková (HCl),
- chlorid vápenatý (CaCl₂ · 2H₂O),
- síran hořečnatý (MgCl₂ · 6H₂O),
- sacharóza,
- etylenglykol (EG),
- dimethylsulfoxid (DMSO),
- destilovaná voda,
- čerstvý vaječný žloutek.

Chemické sklo nebo plast:

- kádinky,
- odměrné válce,
- pipety.

Přístroje:

- pH metr,
- teploměr.

F) Pro vlastní mrazení:

- pejety 0,5 nebo 1ml,
- popisovač na pejety,
- pipeta na plnění pejet (nebo trubička s balónkem),
- polystyrenový box (krabice o objemu 60–80 litů) s víkem,
- polystyrenový rámeček (plovák z desky 3 cm),
- plastová nebo papírová pouzdra na pejety – tzv. goblety,
- Dewarovy nádoby na uchování pejet a zásobní tekutý dusík,
- tekutý dusík (N₂),
- pinzety,
- kožené rukavice.

G) Pro rozmrazení:

- vodní lázeň teploty 40 °C,
- teploměr,
- nůžky,
- zkumavky nebo jiné vhodné nádoby na rozmrazené sperma.

5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU PRO PODNIKATELSKÝ SUBJEKT

Ekonomický přínos uváděné technologie lze nalézt ve dvou základních rovinách:

Přímé úspory: zvolená technika využívající jen základních laboratorních pomůcek bez potřeby speciálních přístrojů (tzv. zmrazovacích automatů) ušetří prostředky nutné k pořízení těchto speciálních přístrojů v řádech stovek tisíc Kč.

Nepřímé: Využívání zamrazování spermatu uvedenou technologií pro potřeby uchování genofondu kapra jako naší komerčně nejdůležitější ryby, pojišťuje produkční potenciál našich unikátních a pro naše podmínky osvědčených plemen kapra, jež mají penězi těžko vyčíslitelnou hodnotu.

6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU VE VÝROBĚ PODNIKATELSKÉHO SUBJEKTU

Rybářské sdružení České republiky je uznané chovatelské sdružení pro plemenářskou práci u ryb dle zák. č. 154/2000 Sb., ve znění pozdějších předpisů. K zabezpečení zvyšování a zkvalitňování produkce má chovatelské sdružení šlechtitelský program v rozsahu, který používá čistokrevné plemenitby, selekce, inbredizace včetně metod genomových manipulací a tvorby meziplemenných hybridů. Současně se udržují genetické zdroje ryb v rozsahu daném Národním programem konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat podle § 14, odst. 1, zákona č. 154/2000 Sb., ve znění zákona č. 130/2006 Sb. A právě zde dojde k uplatnění technologie v praxi, především umožní zamrazovat i na lokalitách chovatelů vzdálenějších od kryobanky, kde nejsou k dispozici složitější technické prostředky.

7. SEZNAM LITERATURY

- Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K., Rodina, M., 2008. Fish spermatology: Implication for aquaculture management. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, R. (Eds), Fish Spermatology. Alpha Science Ltd, Oxford, UK. pp. 397–460.
- Baynes, S.M., Scott, A.P., Dawson, A.P., 1981. Rainbow trout *Salmo gairdneri*. Richardson, spermatozoa: Effects of cations and pH on motility. Journal of Fish Biology 19: 259–267.
- Billard, R., 1970. Ultrastructure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons téléostéens. In: Baccetti, B. (Ed.), Spermatologia comparata. Quaderno 137: 71–80.
- Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture 129: 95–112.
- Billard, R., Cosson, J., Fierville, F., Brun, R., Rouault, T., Williot, P., 1999. Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa. Journal of Applied Ichthyology 15: 199–203.
- Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture 236 (1–4): 1–9.
- Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Li, P., Hulák, M., Linhart, O., 2009. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Cryobiology 59: 291–296.
- Christen, R., Gatti, J.L., Billard, R., 1987. Trout sperm motility: the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. European Journal of Biochemistry 166: 667–671.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Mims, S.D., Glogowski, J., 2000. Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* W.). Comparative Biochemistry Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology 125: 197–203.
- Cosson, M.P., Billard, R., Carré, D., Letellier, L., Christen, R., Cosson, J., Gatti, J.L., 1986. Control of flagellar movement in “9+2” spermatozoa: calcium and cyclic AMP dependence, chemotactic behavior. Cell Motility and the Cytoskeleton 6: 237.
- Cosson, M.P., Billard, R., Letellier, L., 1989. Rise of internal Ca²⁺ accompanies the initiation of trout sperm motility. Cell Motility and the Cytoskeleton 14: 424–434.
- Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dréanno, C., Suquet, M., 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon, C. (Ed.), From Basic Science the Male Gamete to Clinical Application. Cache River Press Vienna IL USA. pp. 161–186.
- Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízené reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 99, 43 s.
- Ginsburg, A.S., 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Moscow: Nauka, (in Russian). 354 pp.
- Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of aquatic vertebrates semen, review. Aquaculture Research 31: 259–271.

- Kopejka, E.F., 1986. Instrukcija po nízkotemperaturnoj konzervaciji spermy karpa (The information in cryopreservation of carp of sperm). VNIPRCH, Moskva. 9 pp. (in Russian only)
- Kudo, S., 1991. Fertilization, cortical reaction, polyspermy-preventing and anti-microbial mechanisms in fish eggs. Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica, Monograph 16: 313–340.
- Kudo, S., 1998. Role of sperm head syndecan at fertilization in fish. Journal of Experimental Zoology 281: 620–625.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., Iwahashi, M., 1984. Cryopreservation of carp sperm. Aquaculture 37: 267–273.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., Weismann, T., 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. Theriogenology 54: 1477–1498.
- Leibo, S.P., Bradley, L., 1999. Comparative cryobiology on mammalian spermatozoa. In: Gagnon, C. (Ed.), The male gamete: From basic science to clinical applications. Cache River Press, Vienna, IL, USA, pp. 501–516.
- Linhart, O., Pokorný, J., 1984. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik VÚRH JU, Vodňany, č. 14, 1–13.
- Linhart, O., Šlechta, V., Slavík, T., 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica 16: 285–311.
- Linhart, O., Billard, R., Proteau, J.P., 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture 115: 347–359.
- Linhart, O., Kudo, S., Billard, R., Šlechta, V., Mikodina, Y.V., 1995. Morphology composition and fertilization of carp eggs: a review. Aquaculture 129: 75–93.
- Linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L., 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus* R.) and paddlefish (*Polyodon spathula* W.). Journal of Fish Biology 47: 902–909.
- Linhart, O., Rodina, M., Cosson, J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: Sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiology 41: 241–250.
- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S.D., Shelton, W.L., Rodina, M., 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. Journal of Reproduction 124: 713–719.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajšhans, M., Gela, D., Kocour, M., 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability and hatching success of embryos. Cryobiology 51: 250–261.
- Linhart, O., Mims, S.D., Gomelsky, B., Cvetkova, L.I., Cosson, J., Rodina, M., Horvath, A., Urbanyi, B., 2006. Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. Journal of Applied Ichthyology 22 (Suppl. 1): 384–388.
- Lubzens, E., Rothbard, S., Hadani, A., 1993. Cryopreservation and viability of spermatozoa

ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU KAPRA OBECNÉHO (*Cyprinus carpio* L.)
PRO POTŘEBY UCHOVÁNÍ GENOFONDU V PRAKTICKÝCH PODMÍNKÁCH

- from the ornamental Japanese carp (Nishikigoi). *Bamidgeh* 45: 169–174.
- Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F. and Feigin, P., 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks – strategies. In: Mims, S.D., 1991. Evaluation of activator solutions, motility duration and short-term storage of paddlefish spermatozoa. *Journal World Aquaculture Society* 22: 224–229.
- Magyary, I., Urbányi, B. Horváth, L., 1996. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *Journal of Applied Ichthyology* 12: 117–119.
- Moczarki, M., 1977. Deep-freezing of carp *Cyprinus carpio* L. sperm. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences Serie des Sciences Biologiques* 25 (3): 187–190.
- Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 210: 1145–1147.
- Morisawa, M., Susuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from fresh water cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology* 107: 95–103.
- Perhec-Poupard, G., Gatti, J.L., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., Billard, R., 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 110: 315–327.
- Pšenička, M., Rodina, M., Nebesářová, J., Linhart, O., 2006. Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. *Theriogenology* 66: 1355–1363.
- Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi, S.M.H., Hulák, M., Linhart, O., 2007. Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, Sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. *Theriogenology* 67: 931–940.
- Rana, J.K., 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Day, J.G., Lellan, M.R. (Eds), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 151–166.
- Redondo-Müller, C., Cosson, M.P., Cosson, J., Billard, R., 1991. *In vitro* maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. *Molecular Reproduction Development* 29: 259–270.
- Scheuring, L., 1925. Biologische und physiologische untersuchungen an forellensperma. *Archiv für Hydrobiologie (Suppl. 4)*: 181–318.
- Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds), *Fish Physiology*. New York, London, Academic Press. pp. 305–350.

Příloha 1.

PROTOKOL O KRYOKONZERVACI č.

DRUH: _____ **DATUM:** _____ **CHOVATEL:** _____
DATUM ODBĚRU: _____ **ČAS ODBĚRU:** _____ **ODBĚROVÉ MÉDIUM:** _____ **ZPŮSOB ODBĚRU:** _____
ŘEDÍCÍ MÉDIUM: _____ **POMĚR ŘEDĚNÍ:** _____ **KRYOPROTEKTIVUM:** _____ **KONCENTRACE:** _____
ZPŮSOB MRAZENÍ: _____ **ČAS MRAZENÍ:** _____ **MRAZÍCÍ PROGRAM:** _____ **ZAMRAZIL:** _____

ZNAČENÍ DÁVEK:

| CHOVNÁ SKUPINA | INDIVIDUÁLNÍ IDENTIFIKÁTOR | ODHAD POHYBLIVOSTI NATIVNÍHO SPERMATU % | KONCENTRACE | | OBJEM DÁVKY (ml) | POČET DÁVEK | | ULOŽENÍ DÁVEK | | TEST OPLOZENOSTI | | |
|----------------|----------------------------|---|--------------------------------------|---|------------------|-------------|-----------|---------------|---------|------------------|-------|----------------|
| | | | NATIVNÍHO SPERMATU ($\times 10^6$) | KONCENTRACE DÁVKY ($\times 10^6$ v ml) | | PRO ULOŽENÍ | PRO TESTY | DRŽÁKY | KANISTR | KONTEJNER | DATUM | OPLOZENOST (%) |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |

ODBORNÝ OPONENT

doc. RNDr. Dalibor Štys, CSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Ústav fyzikální biologie

Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

**Ověření a uplatnění technologie 2010, Rybářské sdružení České republiky,
Pražská 495/58, 371 38 České Budějovice**

Adresa autorského kolektivu:

Ing. Marek Rodina, Ph.D. (rodina@vurh.jcu.cz),

M.Sc. Boris Dzyuba, Ph.D., M.Sc. Sergey Boryshpolets, prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,

Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz

a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

www.frov.jcu.cz

V edici Metodik (Technologická řada)

vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,

redaktorka Zuzana Dvořáková

Náklad: 200 ks, předáno do tisku 2010

Grafický design a technická realizace: Lukáš Páral



EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
INVESTICE DO UDRŽITELNÉHO RYBOLOVU

VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU OP RYBÁŘSTVÍ:
PŘÍPRAVA A VYDÁNÍ METODICKÝCH PUBLIKACÍ V ROCE 2010

reg. č. CZ.1.25/3.1.00/10.00303



ISBN 978-80-87437-07-0