



Opakovaný odběr spermatu jesetera malého a jeho využití při řízené reprodukci

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



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Opakovaný odběr spermatu jesetera malého a jeho využití při řízené reprodukci

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

Vodňany

2012

**VYDÁNÍ METODIKY JE USKUTEČNĚNO ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:
OP RYBÁŘSTVÍ PŘÍPRAVA A VYDÁNÍ METODICKÝCH PUBLIKACÍ V ROCE 2012
(CZ.1.25/3.1.00/11.00381)**



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

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení projektů:

Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz (30 %)
(CZ.1.05/2.1.00/01.0024)

***Dozrávání a stárnutí spermií ryb: Komparativní studie mezi kostnatými a chrupavčitými
rybami, tedy taxonomicky vzdálenými modely (30 %)***
(GAČR P502/11/0090)

Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb (20 %)
(QH82119)

***Diverzita bioenergetických drah, funkce membrány, signálních mechanismů a proteomiky
zmrazeného spermatu evolučně rozdílných druhů ryb (20 %)***
(IAA608030801)



č. 128

ISBN 978-80-87437-67-4

1. CÍL METODIKY	6
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	6
2.1. Úvod	6
2.2. Výběr a příprava ryb	7
2.3. Hormonální stimulace	7
2.4. Spermie	7
2.5. Technika odběru spermatu	8
2.5.1. Vícekrát opakovaný odběr spermatu od počátku do konce spermie	8
2.5.2. Vícekrát opakovaný odběr spermatu v den jeho použití	10
2.6. Použití odebraného spermatu	11
2.7. Využití vícekrát opakovaného odběru spermií v technologii řízené reprodukce	13
2.8. Technologická poznámka	13
2.9. Shrnutí	13
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	13
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	14
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	14
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	15
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	16

1. CÍL METODIKY

Cílem této metodiky je poskytnout chovatelům návod na maximalizaci zisku spermatu u uměle vytíraných (odebíraných) samců jeseterovitých ryb, u kterých se nezřídka, především v obdobích mimo typickou výtěrovou sezónu, můžeme setkat s nedostatkem spermatu nebo dokonce s naprostým nezdařením při odběru spermatu.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Úvod

Chov jeseterů je specifickou oblastí akvakultury s rostoucím světovým trhem kaviáru a jeseteřího masa. Moderní intenzivní chov jeseterů v Evropě byl předpokládán Willotem a kol. (2001). Světová produkce chovaných jeseterů se zvýšila z 2 500 tun v roce 1999 na 25 600 tun v roce 2008 (FAO, 2008) a produkce kaviáru z akvakultury vzrostla z 1,69 t v roce 2003 na 27,32 tun v roce 2007 (Wuertz a kol., 2009). Dvacet pět z dvaceti sedmi druhů jeseterů je vedeno jako vyhynulý, kriticky ohrožený, ohrožený nebo zranitelný druh (Billard a Lecointre, 2001). Takže chov jeseterů zahrnuje i vzácné druhy a má potenciál pro výrazný rozvoj.

Ačkoliv má chov jeseterů více než stoletou historii, základy intenzivní řízené reprodukce a metod *in vitro* manipulace s gametami byly rozvinuty až v druhé polovině dvacátého století. Význam uchování spermatu pro efektivní chov zdůrazňoval např. Billard (2001). Pro jesetery bylo vyvinuto několik hypotermických a kryokonzervačních metod (Billard a kol., 2004), umožňujících použití spermatu po určité době od odběru. Efektivita využívání mlíčáků závisí na získání maximálního množství spermií s vysokou oplozovací schopností, které mohou být použity okamžitě k oplozování jiker, nebo mohou být krátkodobě uchovány *in vitro*, popř. zamraženy pro pozdější použití.

U jeseterů byla možnost opakovaného odběru spermatu po jednorázové hormonální stimulaci zmiňována Podushkou (2003). Objem spermatu získaného opakovaným odběrem v intervalu 2–3 hodin uvádí Podushka (2003) přibližně pětinasobný oproti jednorázovému odběru, ale žádné informace týkající se kvality či jiné charakteristiky nebyly uvedeny.

Na základě experimentů, jejichž výsledky byly uveřejněny v článku: „Dzyuba, B, Boryshpolets, S, Shaliutina, A, Rodina, M., Yamaner, G., Gela, D., Dzyuba, V., Linhart, O., 2012. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping. *Aquaculture* 356–357: 272–278” byl navržen postup, kterým můžeme získat několikanásobný objem spermatu.

2.2. Výběr a příprava ryb

Předpokladem úspěšného, kontrolovaného a načasovaného výtěru (odběru spermatu) mlíčáků jesetera malého je držet mlíčáky v období před hormonální stimulací a výtěrem na teplotě 10, (maximálně 12) °C bez výkyvů. Zvyšování teploty na 15 °C a doba expozice v této teplotě delší než 10 dnů a její další nárůst má za následek přirozenou stimulaci hypotalamo-hypofyzárních drah, uvolnění hypofyzárních gonadotropinů a tím spuštění spermiace, tedy produkce spermatu v nepotřebnou dobu. V případě následného použití hormonální stimulace nedochází již ke spermiaci, nebo je objem získaného spermatu velmi malý a kvalita nízká.

Mlíčáky připravujeme podle postupu doporučeného Gelou (2008): Mlíčáky přeneseme do bazénů, kde zajistíme postupnou temperaci na 14–15 °C (maximální denní nárůst teploty o 3 °C), kterou držíme 5 dní a poté následuje hormonální stimulace.

2.3. Hormonální stimulace

Jako nejdostupnější a v podmínkách ČR nejosvědčenější se jeví běžná kapří hypofýza v dávce 4 mg na 1 kg hmotnosti těla mlíčáka aplikovaná ve formě intramuskulární injekce suspenze ve fyziologickém roztoku.

2.4. Spermiace

Spermiaci rozumíme hormonálně kontrolovaný proces dozrávání spermií a jejich uvolňování z epitelu lalůčků varlat do vývodného systému gonád, a jejich následné uvolnění na povrch urogenitální papily při výtěru nebo odběru spermatu. U jeseterovitých ryb, jesetera malého nevyjímaje, nejsou vyvinuty samostatné vývody genitálního traktu mlíčáků, ale vývody varlat se spojují s ledvinami, přesněji řečeno s vývodným systémem ledvin. Zde se mísí s jeho obsahem – močí. Moč jeseterovitých je stejně jako u ostatních sladkovodních ryb hypotonická (kolem 30 mOsmoll), schopná aktivovat pohyb spermií, což se může logicky jevit jako jednoznačně negativní faktor. Současné studie však naznačují, že kontakt spermie s močí je u jeseterů nezbytný pro iniciaci schopnosti aktivace spermie.

Spermiace není jednorázový proces. Po hormonální stimulaci zaznamenáváme nástup, vrchol a útlum exkreční aktivity, a to v horizontu desítek hodin (3 dnů). Spermiaci vedoucí k produkci odebratelného množství spermatu u jesetera malého, hormonálně stimulovaného podle výše uvedeného postupu, je možné zaznamenat již 12 hodin po hypofyzaci. Vrchol produkce spermatu nastává 2. den po hypofyzaci, třetí den je již zaznamenatelný pokles produkce spermatu. Tento poměrně dlouhý časový interval nám umožňuje použít metodou opakovaného vícenásobného odběru a tak využít potenciál vyprodukovaného spermatu pro zvětšení množství spermatu (spermií) a tím řešit různé technologické problémy vznikající při řízené reprodukci.

2.5. Technika odběru spermatu

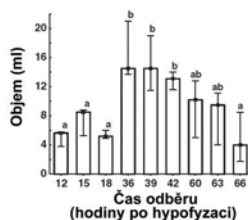
Sperma je odebíráno pomocí kanyly vhodného průměru (pro jesetera malého 4–5 mm), a to pouhým vycévkováním do sběrné nádoby, jak doporučuje Gela a kol. (2008), nebo odsátím spermatu pomocí kanyly nasazené na injekční stříkačce, jak doporučuje Linhart a kol. (2000) u veslonosa. Pro opakovaný odběr je právě technika odsátí vhodnější, protože spolehlivěji získáme i menší objemy spermatu v řádech mililitrů. Při odsávání kanylou je třeba věnovat pozornost šetrnému zavádění a vytváření podtlaku, aby nedocházelo k nadměrné traumatizaci pohlavní papily a vývodných cest.

Při odběru gamet u ryb je velmi často doporučována a používána anestezie pro ulehčení manipulace a vlastního odběru. V případě jeseterů, a zvláště menších druhů jako je jeseter malý, není její použití příliš vhodné. V počátečních fázích anestezie, kdy jsou ryby zvýšeně aktivní, dochází často při prudších pohybech mlíčáků k „ejakulaci“ do vody a tím ztrátě spermatu. Pokud je vzhledem k velikosti mlíčáků anestezie nutná, používáme 2-phenoxyetanol v dávce 0,6–0,7 ml na 1 litr lázně, nebo hřebíčkový olej v dávce 0,07 ml na 1 litr lázně (Kolářová a kol., 2007).

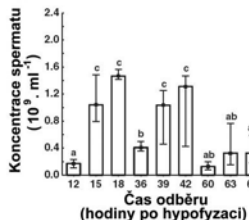
2.5.1. Vícekrát opakovaný odběr spermatu od počátku do konce spermiace

Tento postup představuje minimálně 9 odběrů od každého mlíčáka v průběhu 3 dnů. Jednotlivé odběry provádíme 12, 15, 18, 36, 39, 42, 60, 63 a 66 hodin po hypofyzaci (při teplotě vody udržované v rozmezí 15–16 °C). Kvantitativní i kvalitativní parametry získaného spermatu se mohou mezi jednotlivými odběry lišit, takže využití jednotlivých dávek může být různé. Při testování tohoto postupu bylo u jesetera malého dosaženo parametrů uvedených v následujících grafech:

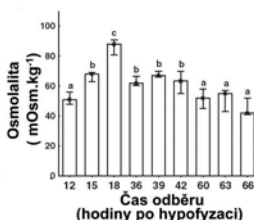
Graf 1



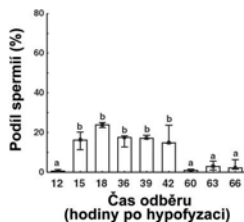
Graf 2



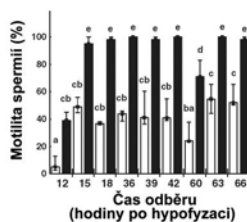
Graf 3



Graf 4



Graf 5



Grafy 1 – 5. Parametry spermatu jesetera malého (kusová hmotnost ryb 1 kg) v průběhu opakovaného vícenásobného odběru spermatu během 3 dní po hypofyzaci: 1 – objem spermatu, 2 – koncentrace spermatu, 3 – osmolalita semenné plazmy, 4 – procentický podíl spermií z celkového množství připadající na daný odběr, 5 – motilita spermií; černé sloupce platí pro nativní sperma, bílé sloupce pro zmrazené a rozmrazené sperma.

Hodnoty v grafech jsou mediány s 25% a 75% percentily, hodnoty s různým alfabetickým označením se liší statisticky průkazně ($P < 0,05$, Mann-Whitney U-test).

Objem odebraného spermatu v jednotlivých časech po hypofyzaci uvádí graf 1. Hodnoty odpovídají trendu: nástup spermiace první den, maximální produkce 2. den a 3. den po hypofyzaci postupné snižování produkce spermatu. Absolutní objemy spermatu odebraného při prověření postupu se u mlíčáků o jednotné hmotnosti 1 kg první den pohybovaly v jednotkách ml při jednom odběru, do 20 ml na jeden odběr druhý den a do 10–12 ml na jeden odběr třetí den.

Koncentrace spermatu zaznamenané v průběhu prověření postupu uvádí graf 2, ze kterého je zřejmý trend zvyšování koncentrace v průběhu dne, patrný především první a druhý den po hypofyzaci. Absolutní hodnoty z počáteční úrovně stovek milionů spermií na ml ($0,1 \times 10^9 \times \text{ml}^{-1}$) vzrostly na jednotky miliard ($1-2 \times 10^9 \times \text{ml}^{-1}$) a opět poklesly na úroveň stovek či desítek milionů v jednom mililitru. Důvodem denní cykličnosti je s nejvyšší pravděpodobností kontinuální činnost ledvin a tím i produkce moči, která „ředí“ spermie, čemuž nasvědčuje i průběh osmolality semenné plazmy (graf 3). Spolupůsobícím faktorem je i dynamika sekrečních buněk gonád a jejich vývodních cest v průběhu dne.

Procentický podíl spermií z celkového množství spermatu připadající na daný odběr v průběhu prověřování postupu uvádí graf 4. Z něho vyplývá, že naprostá většina spermií (více než 90%) je produkována v časovém horizontu 15–42 hodin po hypofyzaci.

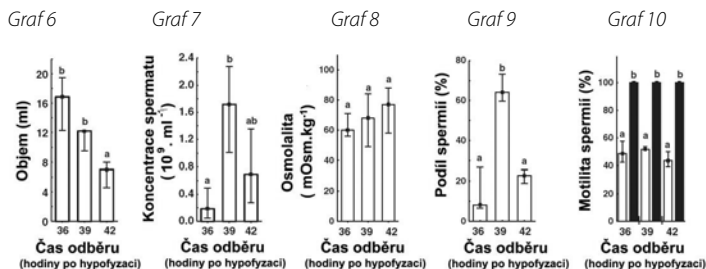
Motilitu spermatu zaznamenanou v průběhu ověřování postupu uvádí graf 5, z něhož je zřejmá statisticky průkazně nižší motilita spermií při prvním odběru spermatu,

24 hodin po hypofyzaci (40%), a následně také 60 hodin po hypofyzaci (70%) oproti běžným 90% v průběhu ostatních odběrů spermatu.

V porovnání s tradičním jedním odběrem realizovaným 36 hodin po hypofyzaci byl v průběhu ověřování postupu získán v 9 dávkách více než 12násobný počet spermií.

2.5.2. Vícekrát opakovaný odběr spermatu v den jeho použití

Tento postup představuje 3 (nebo více) odběrů od každého mlíčka v průběhu 36–42 hodin od hypofyzace, přičemž jednotlivé odběry byly realizovány 36, 39 a 42 hodin od hypofyzace (opět při teplotě vody udržované v rozmezí 15–16 °C). Kvantitativní i kvalitativní parametry získaného spermatu se stejně jako u předchozího případu mohou lišit. Při testování tohoto postupu bylo u jesetera malého dosaženo parametrů uvedených v následujících grafech:



Grafy 6 – 10. Parametry spermatu jesetera malého (o jednotné kusové hmotnosti 1 kg) v průběhu opakovaného vícenásobného odběru spermatu v průběhu období 36–42 hodin od hypofyzace: 6 – objem spermatu, 7 – koncentrace spermií ve spermatu, 8 – osmolalita semenné plazmy, 9 – procentický podíl spermií z celkového množství spermatu připadající na daný odběr, 10 – motilita spermií; černé sloupce platí pro nativní sperma a bílé sloupce pro zmrazené a rozmrazené sperma.

Hodnoty v grafech jsou mediány s 25% a 75% percentily, hodnoty s různým alfabetickým označením se liší statisticky průkazně ($P < 0,05$, Mann-Whitney U-test).

Objem odebraného spermatu v jednotlivých časech po hypofyzaci uvádí graf 6. Hodnoty mají v čase klesající tendenci, kterou bylo možné při ověřování postupu statisticky prokázat v období 36–42 hodin od hypofyzace. Objem odebraného spermatu klesal z úrovně 16 ml na méně než 8 ml na 1 odběr.

Koncentrace spermií ve spermatu zaznamenané v průběhu ověřování metodiky uvádí graf 7, z kterého je zřejmý prudký nárůst koncentrace spermií při druhém odběru (39 hodin od hypofyzace) z počátečních hodnot na úrovni stovek miliónů spermií

na ml ($0,2 \times 10^9 \times \text{ml}^{-1}$) na konečné hodnoty, které se pohybovaly na úrovni jednotek miliard spermií na jeden mililitr ($1-2 \times 10^9 \times \text{ml}^{-1}$). Následně byl zaznamenán pokles koncentrace spermií při třetím odběru spermatu (42 hodin od hypofyzace) na úroveň stovek miliónů v ml. Důvodem tohoto výkyvu je s nejvyšší pravděpodobností opět moč. Ta jednak „ředí“ spermie, čemuž nasvědčuje průběh osmolality semenné plazmy (graf 8) a klesající objem (graf 6), ale nabízí se i možnost, že plní vývodný systém a tím brzdí uvolňování spermií z gonád do vývodného systému.

Procentický podíl spermií z celkového množství připadající na daný odběr v průběhu prověřování postupu uvádí graf 9. Z něho vyplývá, že naprostá většina spermií je získána při druhém odběru, tj. 39 hodin po hypofyzaci.

Motilitu spermií zaznamenanou v průběhu prověření postupu uvádí graf 10, z něhož je zřejmá vysoká úroveň motility (nad 90 %), která se mezi jednotlivými odběry nelišila.

2.6. Použití odebraného spermatu

V kontextu řízení reprodukce je po odběru navazujícím krokem použití odebraného spermatu, čemuž předcházejí dva důležité kroky.

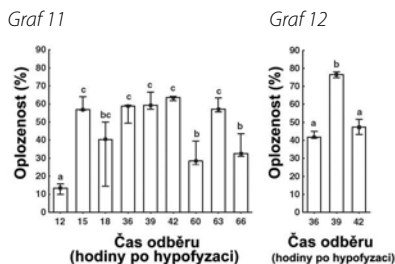
Kontrola kvality spermatu - provádíme ji jednak bezprostředně po odběru, u krátkodobě uchovávaného spermatu před použitím k oplození, u spermatu určeného ke zmrazování před vlastním mrazením. Postup je detailně popsán v publikaci Linhart a kol. (2011).

Krátkodobé uchování nativního spermatu je v případě opakovaného vícenásobného odběru nezbytností. Sperma jesetera malého je možné poměrně bez problémů uchovávat při zachování přijatelné úrovně pohyblivosti po dobu řádově několika desítek hodin (48–72 hodin) za podmínek uváděných Linhartem a kol. (2011), který doporučuje zamezit kontaminaci spermií, jejich vysychání a zmraznutí, dále potom působení přímého slunečního světla na sperma, snížení jeho metabolické aktivity a omezení rozvoje bakteriální mikroflóry. Těchto negativních vlivů na sperma je možné se vyvarovat, jestliže je sperma uchovávané při teplotě 0–4 °C, tzv. „na ledu“ v aerobním prostředí, kdy spermie jsou uchovávané ve slabé vrstvě v kyslíkové atmosféře. Těchto podmínek dosáhneme např. při použití kontejnerů pro tkáňové kultury skladovaných v chladničce nebo termoboxu s ledem (pro dobu uchování do 6 hodin), či v PE sáčcích plněných kyslíkovou atmosférou (pro dobu uchování až 72 hodin).

Vlastní použití spermatu k oplozování jiker jeseterovitých ryb je popsáno v publikaci Gela a kol. (2008). U jednotlivých porcí čerstvého či krátkodobě uchovávaného spermatu získaného opakovaným odběrem lze u některých odběrů (především u prvního odběru) očekávat zhoršenou motilitu spermií. Proto v případě, že je motilita nižší než

80 %, zvyšujeme proporcionálně dávku používaného spermatu doporučenou Gelou a kol. (2008).

Zmrazování spermatu získaného opakovaným odběrem je druhou z variant efektivního využití získaného spermatu. Tato problematika je detailně vysvětlena v publikaci Linhart a kol. (2010). V rámci ověřování postupu opakovaného odběru spermatu byla u jednotlivých odběrů testována i mrazitelnost spermatu, která byla vyhodnocována pomocí motility spermií po rozmrazení (grafy 5 a 10) a dále pomocí ukazatele oplozenosti jiker, zjišťovaného po umělém osemenění jiker rozmraženým spermatem (graf 11 a 12). Z dosažených výsledků je patrné, že pro účely kryokonzervace je nejvhodnější sperma odebírané v období od 36 do 42 hodin po hypofyzaci. Pokud bylo sperma odebíráno pouze druhý den po hypofyzaci, nejvhodnějším se ukázal být druhý odběr. Naproti tomu jednoznačně k mrazení nevhodné je sperma z prvního odběru (12 hodin po hypofyzaci).



Grafy 11–12. Oplozenost jiker dosažená použitím zmraženého a rozmraženého spermatu získaného při opakovaných odběrech. 11 – Oplozenost jiker po použití spermatu odebraného v období od 12–66 hodin po hypofyzaci; 12 – Oplozenost jiker po použití spermatu odebíraného v období od 36–42 hodin po hypofyzaci.

Hodnoty v grafech jsou mediány s 25% a 75% percentily, hodnoty s různými alfabetickým označením se liší statisticky průkazně ($P < 0,05$, Mann-Whitney U-test).

2.7. Využití vícekrát opakovaného odběru spermií v technologii řízené reprodukce

Opakovaný odběr spermatu nám může pomoci řešit tyto technologické situace:

- nedostatek mlíčáků, tj. nedostatečné množství spermatu pro oplození jiker
- úsporu části prostředků za hormonální preparáty snížením počtu použitých prověřených mlíčáků – jestliže použijeme několikanásobný odběr spermatu je možné použít nižší počet mlíčáků,
- zvýšení spolehlivosti výtěru především při mimosezónních výtěrech nebo na počátku či na konci výtěrové sezóny nebo při používání dosud neprověřených mlíčáků – především načasováním odběrů spermatu výrazně před výtěrem jikernaček, takže včas zaregistrujeme potenciální nedostatek spermatu

a jsme schopni hormonálně stimulovat další mlíčáky, nebo zajistit zmrazené sperma

- kontinuálně vytvářet kryobanku spermatu – tím, že při každém výtěru část spermatu zamrazíme a vytváříme tak technologickou rezervu.

2.8. Technologická poznámka

I přes šetrnou manipulaci s mlíčáky a ohleduplné zavádění katetru při vícekrát opakovaných odběrech spermatu dochází k traumatizaci pohlavní papily ryb, která může vést až k zánětu a úhynu mlíčáka, především po vysazení do organicky a bakteriálně zatížené rybníční vody. Proto se v případech, kdy se ryby po výtěru přesazují do vody horší kvality, osvědčilo preventivní injekční podání širokospektrálního antibiotika, stejně jako je tomu běžně u jikernaček po výtěru.

2.9. Shrnutí

- Využití vícekrát opakovaného odběru spermatu u jesetera malého můžeme získat až 12x větší počet spermií než při obvyklém jednorázovém odběru.
- Plné využití takto odebraného spermatu je podmíněno jeho krátkodobým uchováním nebo zmrazením.
- Kvalita spermatu může být vyšší než u jednorázového odběru spermatu, přičemž druhý a další odběry během dne bývají kvalitnější.
- Pro účely zmrazování spermií je nejlépe použít sperma odebírané 36–42 hodin po hypofyzaci od mlíčáků, od kterých bylo sperma již odebráno předchozí den.
- Vhodné načasování hypofyzace a následných odběrů může zvýšit úspěšnost a spolehlivost řízené reprodukce jesetera malého.
- Uváděné principy platí i pro ostatní druhy jeseterů, pouze načasování je třeba prověřit pro konkrétní druh a místní podmínky.

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Uvedený postup je novým přístupem k efektivnímu využití mlíčáků jeseterů v akvakulturních chovech, především v podmínkách České republiky a jim podobným. Pomáhá řešit lokálně specifické problémy, které se obvykle v přirozených lokalitách a podmínkách výskytu těchto ryb neobjevují a neřeší. Typickým příkladem je malý počet dostupných mlíčáků, přezrávání mlíčáků, výtěr mimo reprodukční sezónu.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena pro chovatele jeseterovitých ryb, s ohledem na jazyk publikace především v Čechách, popř. na Slovensku.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Ekonomický přínos či ztrátu konkrétního postupu nelze oddělit od místních podmínek a specifik, požadavků a zkušeností.

Při zjednodušené modelové kalkulaci lze u jesetera malého vycházet z ceny jedné oplozené jikry v rozmezí 0,5–1 Kč a počtu 75 000 ks jiker v 1 kg vytřených jiker. Potom v případě, že se v důsledku nedostatku spermatu sníží oplozenost jiker jen na 50 % oproti ideálnímu 90 %, činí potenciální ztráta na každý 1 kg vytřených jiker 15–30 tis Kč.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Billard, R., 2001. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Watson, P., Holt, W.V. (Eds), *Cryo-banking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 143–170.
- Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeons sperm. *Aquaculture* 236: 1–9.
- Billard, R., Lecointre, G., 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 355–392.
- Dzyuba, B, Boryshpolets, S, Shaliutina, A, Rodina, M., Yamaner, G., Gela, D., Dzyuba, V., Linhart, O., 2012. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping. *Aquaculture* 356–357: 272–278.
- FAO, 2008. World Aquaculture Production by Species Groups. ftp.fao.org/fi/stat/summary/default.htm.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 78, 24 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L., Novotný, L., 2007. Anestetika pro ryby. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 77, 19 s.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (*Polyodon spathula*). Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 64, 15 s.
- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S., 2011. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 114, 19 s.
- Podushka, S.B., 2003. The rational design of sterlet males exploitation. *Scientific Bulletin of INENCO Center: Laboratory of Ichthyology* 6: 29–31 (in Russian).
- Williot, P., Sabeau, L., Gessner, J., Arlati, G., Bronzi, P., Gulyas, T., Berni, P., 2001. Sturgeon farming in Western Europe: recent developments and perspectives. *Aquatic Living Resources* 14: 367–374.
- Wuertz, S., Gröper, B., Gessner, J., Krüger, T., Luckas, B., Krüger, A., 2009. Identification of caviar from increasing global aquaculture production – dietary capric acid as a labelling tool for CITES implementation in caviar trade. *Aquaculture* 298: 51–56.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Dzyuba, B, Boryshpolets, S, Shaliutina, A, Rodina, M., Yamaner, G., Gela, D., Dzyuba, V., Linhart, O., 2012. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping. *Aquaculture* 356–357: 272–278. (dedikace: IAA608030801; ME10015; QH82119; LC06073; CZ.1.05/2.1.00/01.0024; GACR P502/11/0090; GAJU 046/2010/Z)

Externí odborný oponent

Ing. Roman Němec
Rybníkářství Pohořelice
Václavská 717, 691 23 Pohořelice

Interní odborný oponent

doc. Ing. Tomáš Polícar, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,
Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz
a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany

Oponent za státní správu

Ing. Vladimír Gall
MZe Praha
Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství (16230)
Těšnov 17, 117 05 Praha 1

**Osvědčení o uplatnění certifikované metodice č. 128/225657/2012 – 16230/Nmet
certifikovaná metodika ze dne 12. 12. 2012**

Vydalo: Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního hospodářství, Odbor
státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 17, 117 05 Praha 1.

Adresa autorského kolektivu

Ing. Marek Rodina, Ph.D. (autorský podíl 30%)
Borys Dzyuba, MSc., Ph.D. (autorský podíl 30%)
Sergey Boryshpolets, MSc., Ph.D. (autorský podíl 30%)
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc. (autorský podíl 10%)

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné
centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický,
Zátiší 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.

Redakce: doc. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr., Ing. Blanka Vykusová, CSc., Zuzana Dvořáková

Náklad: 200 ks, vytištěno v roce 2012, 1. vydání
Grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



EVROPSKÁ UNIE

EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND

„Investování do udržitelného rybolovu“



ISBN 978-80-87437-67-4