



Metodika zmrazování spermatu lína obecného

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



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Metodika zmrazování spermatu lína obecného

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

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:

Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb
50 % – (MZe ČR NAZV QH82119)

Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, CENAKVA
50 % – (CZ.1.05/2.1.00/01.0024)



č. 134

ISBN 978-80-87437-69-8

1. ÚVOD	6
1.1. Cíl metodiky	6
1.2. Vlastní popis metodiky	6
1.3. Srovnání „novosti metodiky“	6
1.4. Popis uplatnění certifikované metodiky	6
1.5. Ekonomické aspekty	6
2. DŮLEŽITÉ ZNALOSTI Z OBLASTI BIOLOGIE SPERMII A JEJICH ZMRAZOVÁNÍ	7
2.1. Úvod do spermatologie lina obecného	7
2.2. Klíčové faktory aktivující a inhibující motilitu spermií lina	8
2.3. Imobilizační roztok, odběr spermatu a krátkodobé uchování spermatu u lina	8
2.4. Úvod do kryokonzervace spermií lina	8
3. TECHNIKA KRYOKONZERVACE SPERMATU	11
3.1. Výběr a příprava vhodných mlíčáků lina	11
3.2. Odběr spermatu	11
3.3. Kontrola kvality spermatu	13
3.4. Příprava k vlastnímu mrazení spermatu lina	14
3.4.1. Ředění spermatu s imobilizačním roztokem, kryoprotektivem a plněním do pejet	14
3.5. Mrazení spermatu	16
3.6. Uložení zmrazených dávek spermatu do velkokapacitních kontejnerů pro dlouhodobé uchování	16
3.7. Evidence zmrazeného spermatu	18
3.8. Rozmrazení dávek spermatu	18
3.9. Použití rozmrazeného spermatu k oplození	20
4. MATERIÁL, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	21
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	23
6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	24

1. ÚVOD

1.1. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je poskytnout chovatelům jednoduchý návod ke zmrazování spermatu naší důležité hospodářské ryby – lína obecného v praktických podmínkách bez potřeby speciálních přístrojů.

1.2. Vlastní popis metodiky

Metodika poskytuje postup jak zmrazit sperma lína obecného rybářským pracovištěm, veterinárním ústavům a VaV uživatelům, kteří zmrazují sperma pro účely dlouhodobého uchování.

1.3. Srovnání „novosti metodiky“

Metodika zmrazování spermatu lína obecného v podmínkách konzervativního českého rybářství představuje jednu z možných alternativ uplatnění nové metody s využitím zmrazeného spermatu. Podobná metodika prozatím nebyla v ČR publikována.

1.4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika najde uplatnění zejména na pracovištích odpovědných za zmrazování spermatu ryb, dále tam kde chovají ve větším měřítku generační hejno lína obecného a část genofondu chtějí uchovat ve zmrazeném stavu. Rovněž metodika najde uplatnění v rámci Národního programu uchování a využití genetických zdrojů.

1.5. Ekonomické aspekty

Metodika najde uplatnění všude tam, kde existuje plemenný chov lína obecného a kde je založena banka spermatu. Prvním ekonomickým dopadem je uchování genetické variability plemen lína, která se vlivem chovu neustále zužuje. Zhruba po pěti až deseti generacích je obvykle nutné provést osvěžení krve jednotlivých plemen a to jejich prapra... rodiči nebo provést hybridizaci s jinými plemeny. Tato skutečnost může nastat, pokud je v chovaných plemenech zastoupeno méně než 50 jedinců. V případě hybridizace fakticky dojde k zániku plemene. Zmrazením spermatu jsme schopni oddálit zánik plemene, jehož cenu lze odhadnout v řádu 2–4 miliónů Kč. V případě úhynu většího množství generačních ryb je možné využít zmrazené sperma k rekonstrukcím plemen.

2. DŮLEŽITÉ ZNALOSTI Z OBLASTI BIOLOGIE SPERMII A JEJICH ZMRAZOVÁNÍ

2.1. Úvod do spermatologie lína obecného

Spermie lína obecného jako všechny spermie kostnatých ryb mají primitivní stavbu, sestávají z kulaté hlavičky bez akrozomu a velmi tenkého bičíku (Pšenička a kol., 2006). Vyvíjejí se v cystách varlat, odkud se po dozrání a prasknutí dostávají do chámovodů a v průběhu reprodukce jsou vypuzeny do vnějšího prostředí (Alavi a kol., 2008). Sperma lína obecného je konzistence a barvy mléčné, hustoty řídké až husté. Sperma je tvořeno spermii a spermiiální plazmou, která je zejména produktem Sertoliiho buněk. Svým složením poskytuje spermii ochranné a výživné látky a obvykle se v něm spermie nepohybují. Bohužel při výtěru je sperma lína vždy naředěno močí. Moč se automaticky dostává do spermatu nebo naopak při masáži břišní partie a tím i masáži varlat a močového měchýře. Lín má velmi malý močový měchýř s objemem moči od 0,5 do 2 ml u dospělých ryb v hmotnosti od 400 do 700 g (obr. 1) v oblasti vyústění chámovodů (Linhart a kol., 2000b, 2003, 2006). V čeledi kaprovitých je zřejmě lín jediným druhem, který má močový měchýř.



Obr. 1. Šipka ukazuje, kde je močový měchýř v břišní dutině u lína obecného (Linhart a kol., 2003).

Objem spermatu u lína se pohybuje na úrovni 0,1–2 ml s relativním objemem spermatu od 1,6 do 2,6 ml na kg hmotnosti mlíčka (Caille a kol., 2006). Průměrná koncentrace spermii v 1 ml spermatu je ve srovnání s kaprem nižší a to v rozmezí $11\text{--}24 \times 10^9$ spermii s celkovým počtem spermii na mlíčka od 9 do 21×10^9 spermii a relativním počtem spermii na kg hmotnosti mlíčka od 18 do 48×10^9 spermii (Linhart a kol., 2000a).

2.2. Klíčové faktory aktivující a inhibující motilitu spermií lína

Spermie lína stejně tak jako spermie převážně většiny sladkovodních druhů ryb s vnějším oplozením nejsou pohyblivé ve varlatech a genitálním traktu. Oproti kaprovi je ovšem sperma lína při výtěru vždy kontaminováno močí, která aktivuje pohyb spermií. Moč má nízkou osmotickou úroveň (50–60 mOsmol.kg⁻¹), proto je hlavním iniciátorem aktivace spermií lína. Sperma neředěné močí má osmotickou koncentraci na úrovni 300 mOsmol.kg⁻¹. Po dalším naředění spermatu vodou je doba pohybu spermií lína na úrovni dvou minut, přičemž první minutu jsou spermie velmi aktivní (Linhart a kol., 2003).

2.3. Imobilizační roztok, odběr spermatu a krátkodobé uchování spermatu u lína

Mlíčáky lína vždy anestetizujeme hřebíčkovým olejem v koncentracích 3–4 ml na 100 l vody (Kolářová a kol., 2012). Sperma vždy odebíráme přímo do imobilizačního roztoku, tedy roztoku, který zastaví pohyb spermií (viz metodiky Linhart a kol., 2000a,b), čímž snížíme kontaminaci močí. Imobilizační roztok pro lína obecného je tzv. modifikovaný roztok Kurokura (Rodina a kol., 2004). Sperma můžeme ředit maximálně do poměru 1 : 0,9, tedy například 10 ml imobilizačního roztoku a 9 ml spermatu. Při odběru spermatu nejprve nasajeme imobilizační roztok do injekční stříkačky objemu 20 ml a k němu přisáváme kontaminované sperma.

Sperma lína se uchovává po celou dobu od odběru do osemenění v imobilizačním roztoku v aerobním prostředí při teplotě 0 až +2 °C. Aerobní prostředí můžeme zajistit částečným naplněním stříkaček vzduchem. Maximální doba takového uchování je do 5 h, delší uchování není vhodné. Zcela vyhovující je použití polystyrénových přepravních termoboxů (např. na akvarijní ryby) s vrstvou ledu na dně. Led musí být oddělen od stříkaček se spermatem vrstvou tkaniny či papíru. Dbáme na to, aby sperma nezmrzlo nebo stříkačky neležely přímo na přemrzlém ledu. Pokud stříkačky se spermatem uchováváme v lednici, nesmí ležet těsně u výparníku (Rodina a kol., 2010).

2.4. Úvod do kryokonzervace spermií lína

a) Teorie kryokonzervace

Kryokonzervace, nebo také „mrazení či zmrazování“ je metoda uchování živých buněk a tkání při velmi nízkých teplotách, dosahovaných obvykle v tekutém dusíku při použití ochranných látek, tzv. kryoprotektiv. Teoretický popis doporučujeme prostudovat v metodice zaměřené na zmrazování spermií kapra (Rodina a kol., 2010).

Při kryokonzervaci dochází ke tvorbě krystalů vody, dále ke změnám iontové koncentrace a ke změnám struktury buněčné membrány. Pro eliminaci tvorby krystalů

v buněčné membráně a pohybovém aparátu spermie jsou používány ochranné látky, nazývané kryoprotektiva. U lína používáme kombinaci dimetylsulfoxid (DMSO) a propandiol, které optimálně omezují tvorbu, velikost a polarizaci krystalů ledu (Rodina a kol., 2007).

b) Kritické body kryokonzervace u lína

Kryokonzervace spermií lína je jednoduchá metoda, jejíž úspěch závisí na dodržení jednotlivých postupů, které ve výsledku ovlivňují schopnost spermií oplodnit vajíčko. U lína jde vždy specificky o kvalitu odběru spermatu a následujících kroků (podle Linharta a kol., 2000a, 2003; Rodiny a kol., 2007):

- **Vhodný imobilizační roztok a ředění spermií.** Imobilizační roztok, extender, tedy ředící roztok, je roztok obsahující spermiální plasmě podobné anorganické látky a mající obdobné pH. Konkrétně u lína umožňuje okamžitě zastavit pohyb spermií a velmi krátce jej uchovat při +2 °C ideálně do 5 hodin po odběru. Chemické složení imobilizačního roztoku pro lína je velmi specifické a nelze použít roztok jiných druhů ryb. Vlastní ředění nesmí být vyšší než do poměru 1 : 0,9. Do 10 dílů imobilizačního roztoku odebíráme maximálně 9 dílů spermatu. Platí pravidlo, že čím méně naředíme imobilizační roztok spermatem, tím méně narušíme osmotickou úroveň imobilizačního roztoku a lépe tak uchováme fertilitu spermií.
- **Specifická kryoprotektiva a jejich koncentrace.** Kryoprotektiva DMSO a propandiol jsou přidávána ke spermatu lína odebranému do imobilizačního roztoku, abychom zvýšili přežití spermií v průběhu zmrazování. Hlavní vlastnost kryoprotektiv spočívá ve vyvážení 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 reziduálních nezmrazených roztoků, a tím i ke snížení bodu tuhnutí v průběhu zmrazování (Rodina a kol., 2010). Koncentrace DMSO a propandiolu je na celkové úrovni 10 % s podílem 5 % DMSO a 5 % propandiolu z celkového objemu imobilizačního roztoku se spermatem a kryoprotektivy.
- **Rychlost zmrazování vždy ovlivňuje úspěch zmrazování.** V průběhu zmrazování jsou krystaly ledu formovány v extracelulárním roztoku, voda se uvolňuje z buněk s vyrovnáváním osmotických úrovní až do dosažení osmotické ekvibrace. Přitom dochází ke krystalizaci i uvnitř spermií. Po dosažení vnitřní (intracelulární) teploty -80 °C je možné buňky bezpečně uchovávat v kapalném dusíku při -196 °C (Rodina a kol., 2010). U lína lze využít jak pomalé zmrazování v zmrazovacím automatu a kryptobách (Rodina a kol. 2007), tak i v pejetách nad parami kapalného dusíku.

- **Rychlost rozmrazování u spermií lína** je stejně důležitá jako rychlost zmrazování. Platí, že čím rychlejší rozmrazení, tím lépe. Při pomalém rozmrazování hrozí rekrystalizace vody a mechanické poškození rozmrazovaných buněk. Obecně lze pro pejetý o objemu 0,5 ml použít vodu 38 °C teplou, v níž rozmrazujeme sperma po dobu do 6 s.

c) Kryokonzervační technika u lína

Technika zmrazování, tj. hluboké zmrazování spermií lína a jejich uchování v kapalném dusíku (-196 °C), je jednou z metod aplikovatelných v chovu lína (Rodina a kol., 2007) a je možné ji využít:

- 1) pro produkci referenční chovatelské zásoby ve zmrazeném stavu, kdy hlavní zásoby jsou v živém stavu (Flajshans a kol., 2009),
- 2) pro produkci hybridů v případě reprodukce mezi populacemi či plemeny z různých regionů (Lajbner a kol., 2010),
- 3) ke snížení ekonomické náročnosti spojené s udržováním generačních mlíčáků lína (Linhart a kol., 2000),
- 4) pro genetické zlepšení v selekčně šlechtitelských programech lína (Kocour a kol., 2011),
- 5) k opakování výtěru s využitím specifických mlíčáků, například maskulinizovaných jikernaček produkujících sperma (Hulák a kol., 2010),
- 6) pro mezinárodní výměnu spermatu, vzhledem k unikátnosti populací lína v Euroasii (Lajbner a kol., 2010).

Do současnosti byly zveřejněny pouze dvě práce zabývající se zmrazováním spermatu lína obecného, a to publikace Moczarského a Koldras (1982) a Rodiny a kol. (2007). Při psaní této metodiky jsme vycházeli z publikace Rodiny a kol. (2007) a zejména z dalších, dosud nepublikovaných výsledků Laboratoře fyziologie reprodukce VÚRH ve Vodňanech (FROV JU), dosažených během let 2009–2012.

3. TECHNIKA KRYOKONZERVACE SPERMATU

3.1. Výběr a příprava vhodných mlíčáků lína

Pro účely zmrazování musíme přesně znát charakteristiku spermatu co do příslušnosti k plemeni a chovné skupině (zák. č. 154/2000 Sb. ve znění pozdějších předpisů). Generační ryby musí být v dobrém zdravotním stavu a optimální kondici. Předvýtěrová příprava spočívá v úpravě teplotního režimu a hormonální stimulaci mlíčáků.

Pro potřeby uchování genofondu, tedy mrazení spermatu lína, používáme pouze sperma individuálně značených mlíčáků evidovaných v plemenářské evidenci. Nejvhodnější jsou mladší mlíčáci do 500 g celkové hmotnosti a stáří 4–6 let (obr. 2). Nepoužíváme mlíčáky viditelně nemocné, ve špatné kondici, neodpovídající exteriérem danému plemeni a rovněž ani triploidní mlíčáky. Pro potřeby kryokonzervace je nejvhodnější sperma v druhé polovině reprodukčního sezóny, kdy mlíčáci maximálně spermiují.

Mlíčáky v předvýtěrové přípravě chováme v obvyklém teplotním režimu a hormonálně stimulujeme stejně jako pro potřebu běžného umělého výtěru. Postupně mlíčákům temperujeme vodu na 22 °C. K hormonální stimulaci používáme suspenzi rozetřené kapří hypofýzy ve fyziologickém roztoku v dávce 1 mg na 1 kg hmotnosti mlíčáka. Sperma odebíráme při umělém výtěru do imobilizačního roztoku 24 h po hypofyzaci.



Obr. 2. Mlíčák lína obecného po osušení břišní partie, připravený k odběru spermatu (foto M. Rodina).

3.2. Odběr spermatu

Odběr spermatu lína je specifický vzhledem ke kontaminaci spermatu močí. Sperma lína se odebrá 24 hod po hormonální stimulaci odsáváním z povrchu pohlavní papily za současně masáže břišní partie. K odsátí se vždy používá injekční stříkačka o objemu 5–15 ml. Stříkačky nejprve označíme datem a zkratkou plemene. Pokud jde o individuální výtěr, potom přímo individuálním identifikátorem ryby, kódem mikročipu, číslem přívěsné značky nebo individuální a skupinovou značkou vypálenou na trup vymraženou maticí. Stříkačky předem naplníme imobilizačním roztokem pro lína, tzn. modifikovaným roztokem Kurokura, který obsahuje 180 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,4 mM NaHCO_3 , tedy 10,52 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl_2 a 0,2 g NaHCO_3 na 1 litr roztoku. Stříkačky 5, 10 a 15 ml plníme vždy 2, 4 a 6 ml na 0–2 °C vychlazeného imobilizačního roztoku pro každý z objemů. Při výtěru mlíčáků se snažíme rybu nejdříve zbavit moči masáží břišní partie od břišních ploutví směrem k ocasu. Moč je bezbarvá a při výtěru se uvolňuje proudem. Sperma bývá močí kontaminováno a přítomnost spermatu poznáme podle bělavého nebo opalizujícího zbarvení tekutiny. V tom případě již tekutinu odsáváme. Sperma obvykle od několika mlíčáků plníme do maximálního poměru 1 ml imobilizačního roztoku a 0,9 ml spermatu. Sperma se do dalšího zpracování uchovává v částečně naplněných injekčních stříkačkách s přísátým vzduchem, položených na tkanině či papíru na vrstvě ledu v termoboxu nebo v ledničce při teplotách 0 až +2 °C (obr. 3). Sperma nesmí zmrznout, ani nesmí být v přímém kontaktu s přechlazeným ledem nebo výparníkem chladničky. Musí být chráněno před přímou kontaminací vodou. Uvedené negativní vlivy mohou vést ke znehodnocení spermatu, které se projeví „zrosolováním či koagulací“ spermatu.



Obr. 3. Sperma lína s imobilizačním roztokem v injekčních stříkačkách o objemu 5–10 ml uchovávaných po dobu max do 5 h na ledu při teplotě 0 až +2 °C (foto M. Rodina).

3.3. Kontrola kvality spermatu

Barvu a konzistenci spermatu lína odhadneme makroskopicky a motilitu spermií odhadneme subjektivně mikroskopicky před zmrazením. Sperma by mělo i po odběru do imobilizačního roztoku vykazovat bělavou barvu s procentem pohybu spermií na úrovni 80 %. Odhadu motility věnujeme velkou pozornost, protože sperma lína vykazuje značnou variabilitu v motilitě spermií (Linhart a kol., 2011). Pokud je procento pohyblivých spermií nižší, sperma nezmrazujeme.

Kontrola kvality spermatu tedy zahrnuje makroskopickou kontrolu (barva, konzistence a přítomnost přímisenin) a mikroskopickou kontrolu (koncentrace spermatu a odhad motility pohyblivých spermií).

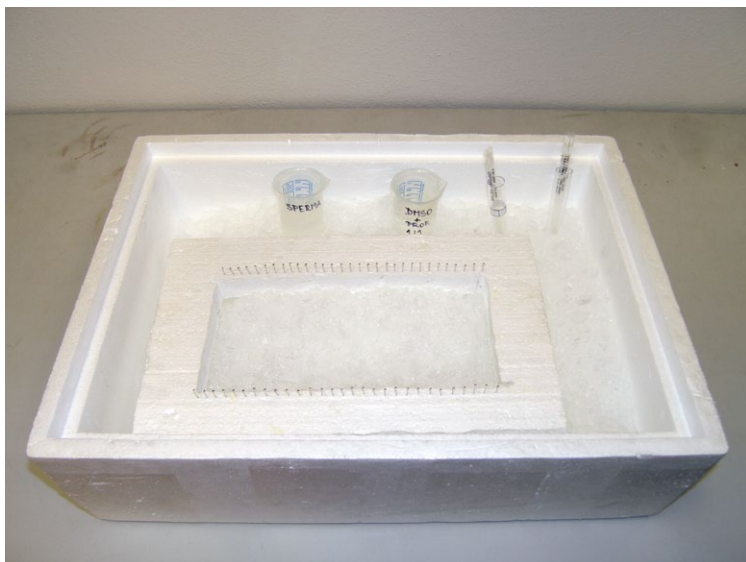
Sperma lína po odběru do imobilizačního roztoku je naředěno obvykle na úroveň 1 : 5 až 10. Znamená to, že koncentrace spermií po odběru je na úrovni $1-2 \times 10^9$ spermií v 1 ml. Sperma může být kontaminováno krví (zbarvení do růžova), výkaly (zbarvení do žlutozelená), nebo vodou či slizem ryby (vede k „zrosolování“ či koagulaci). Sperma mírně kontaminované krví můžeme použít k zmrazování, sperma kontaminované výkaly, slizem nebo vodou vždy vyřadíme.

Mikroskopicky posuzujeme sperma podle metodiky Linharta a kol. (2011). Nejvhodnější je použít mikroskopii v tmavém poli, s celkovým zvětšením 100–200x (objektiv 10–20x; okuláry 10x). Lze použít i běžný laboratorní či studentský mikroskop s procházejícím světlem. Na podložní sklo umístěné na stolku mikroskopu kápneme kapku (50–100 μ l) vody z líhne nebo jen odstáté vodovodní, popřípadě destilované vody. Špičku suché a čisté preparační nebo injekční jehly namočíme do spermatu a lehkým ťuknutím přeneseme sperma do kapky na podložním skle. Pomocí jehly okamžitě rozmícháme sperma v kapce. Roztáhneme kapku co nejvíce do plochy, zaostříme mikroskop a snažíme se odhadnout procentický podíl pohyblivých spermií. Pro zmrazování použijeme pouze sperma s 80–100 % pohybujících se spermií.

Před zmrazením vždy zjistíme koncentraci spermií počítáním spermií v počítací komůrce (Linhart a kol., 2011). Sperma se naředí 1000x a to dvou stupňově, tj. 990 μ l fyziologického roztoku se smíchá s 10 μ l spermatu, dokonale se protřepe. Z naředěného spermatu odebereme 10 μ l a napipetujeme do 90 μ l fyziologického roztoku a důkladně protřepeme. 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: $0,15625 \times \text{počet spermií v 16 čtvercích}$, výsledek je v 10^9 spermií v 1 ml (Linhart a kol., 2011).

3.4. Příprava k vlastnímu mrazení spermatu lína

Příprava k vlastnímu mrazení začíná již při odběru spermatu, kdy odebíráme sperma do vychlazeného imobilizačního roztoku. Dále sperma temperujeme v kádince na ledu při teplotě do +2 °C. Rovněž roztoky s kryoprotektivy a veškerá distribuce do pejet (slámek) probíhá na ledě při teplotě do +2 °C (obr. 4).



Obr. 4. Příprava k vlastnímu zmrazování: sperma s imobilizačním roztokem, DMSO s propandiolem v poměru 1 : 1, označené pejety o objemu 0,5 ml a polystyrénový rámeček (foto M. Rodina).

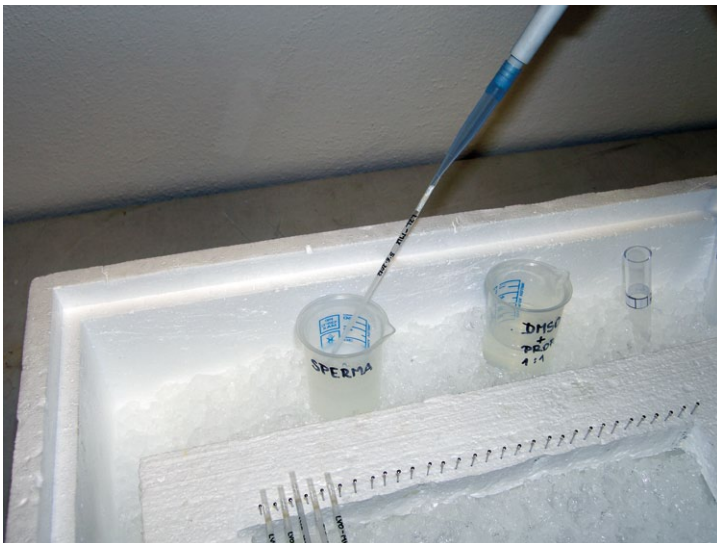
3.4.1. Ředění spermatu s imobilizačním roztokem, kryoprotektivem a plněním do pejet

Kryoprotektivum, tedy směs DMSO a propandiolu, o teplotě 0–2 °C v poměru 1 : 1 se postupně velmi pomalu po kapkách napipetuje do spermatu s imobilizačním roztokem o téže teplotě (obr. 5). Přidává se vždy 10 % směsného kryoprotektiva z celkového objemu imobilizačního roztoku se spermatem a kryoprotektivy.

POZOR: DMSO a propandiol jsou toxické!! Důvodem pomalého přikapávání kryoprotektiva je snaha zvyšovat velmi zvolna osmotickou úroveň suspenze spermií a vyvarovat se tak osmotického šoku. Sperma naředěné kryoprotektivem se okamžitě plní pipetou o objemu 1 ml do připravených a označených pejet o objemu 0,5 ml (obr. 6). Každá pejeta nese označení druhu ryby, čísla ryby a dne zmrazování. Pejety se pokládají na polystyrénový rámeček.



Obr. 5. Osmotickému šoku zamezí postupně velmi pomalé přikapávání kryoprotektiva (DMSO a propan-
diolu) do spermatu s imobilizačním roztokem (foto M. Rodina).



Obr. 6. Nasávání naředěného spermatu mikropipetou do označených pejet a ukládání na polystyrénový
rámeček (0 až +2 °C) (foto M. Rodina).

3.5. Mrazení spermatu

Vlastní mrazení dávek spermatu se provádí v parách nad hladinou kapalného dusíku v „termoboxu“. Objem dusíku je dostatečný s výškou hladiny okolo 10 cm. Využívá se polystyrénový box na akvarijní ryby, o rozměrech 60 x 40 x 35 cm, s víkem a tloušťkou stěny 4 cm. Pejety naplněné naředěným spermatem jsou uloženy na předem připravený polystyrénový rámeček (tloušťka 3 cm, obr. 6), který po přenesení do polystyrénového boxu na hladinu dusíku funguje jako plovák. Po umístění plováku s pejetami se box na 20 minut uzavře (obr. 7). Celý proces plnění všech pejet nesmí trvat déle než 5 minut. Teplota v oblasti pejet na rámečku po uzavření boxu se pohybuje na úrovni $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 20 minutách se pejety prudce překlopí do kapalného dusíku, který má teplotu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 7. Polystyrénový box s plovoucím rámečkem a pejetami v parách kapalného dusíku (teplota po uzavření boxu v místě pejet $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$) (foto M. Rodina).

3.6. Uložení zmrazených dávek spermatu do velkokapacitních kontejnerů pro dlouhodobé uchování

Pejety zmrazené na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ se přenesou pinzetou pod hladinou kapalného dusíku do předem označených plastových nebo papírových gobletů (obr. 8), které usnadňují manipulaci s pejetami. S goblety manipulujeme pinzetou pod hladinou kapalného du-

síku o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud toto pravidlo nedodržíme, dojde k znehodnocení dávek jejich „zahřátím“ na více než $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Goblety s pejetami se ukládají do kanystrů v kontejnerech s kapalným dusíkem (obr. 9). Při práci s kapalným dusíkem vždy používáme rukavice a ochranný štít.



Obr. 8. Ukládání pejet do plastového gobletu pod hladinou kapalného dusíku (foto M. Rodina).



Obr. 9. Umístění plastových a papírových gobletů s pejetami do kanystru v kontejneru (foto M. Rodina).

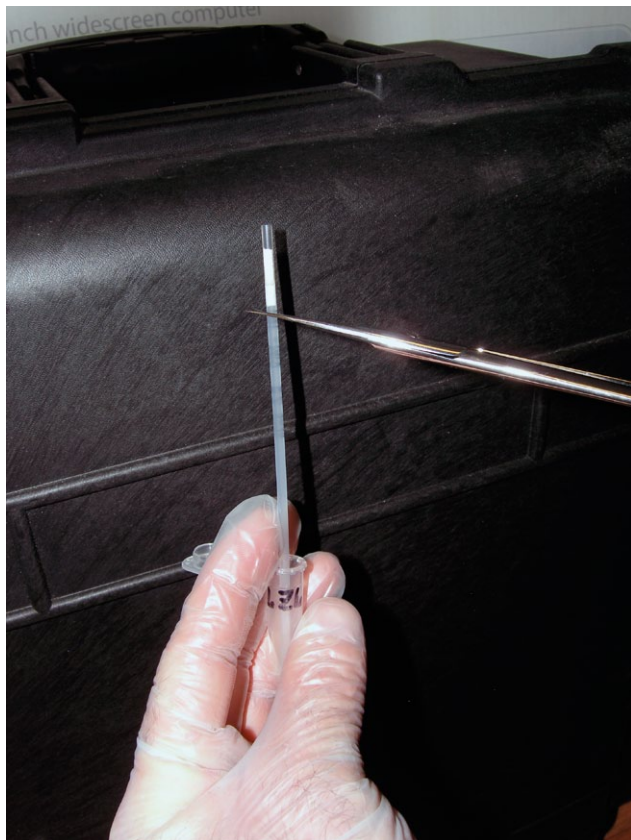
METODIKA ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU LÍNA OBECNÉHO



Obr. 11. Lázeň o teplotě 38 °C připravená pro rozmrazování spermatu (foto M. Rodina).



Obr. 12. Odstřížení konce pejetý kontaminovaného vodou (foto M. Rodina).



Obr. 13. Umístění pejety do zkumavky a odstrížení zátky na pejetě (foto M. Rodina).

3.9. Použití rozmrazeného spermatu k oplazení

U lína obecného se řídíme při reprodukci metodikou Linhart a kol. (2000). Ke smísení rozmrazeného spermatu s jikrami a vodou při osemenění musí dojít současně, a to z důvodu toxicity DMSO a propandiolu vůči jikrám. Množství spermií na jednu jikru musí být vyšší než při použití čerstvého nezamraženého spermatu. Obdobně jako u kapra obecného (Rodina a kol., 2010), musíme k zabezpečení dobré oplazenosti použít vysokou dávku spermií v rozsahu 100 000 – 300 000 spermií na jednu jikru.

4. MATERIÁL, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

Používáme obdobný materiál, pomůcky a chemikálie jako v případě zmrazování spermatu kapra (Rodina a kol., 2010).

- **Pro výběr ryb**
 - gumotextilní plachetky,
 - sak na ryby
 - manipulační stůl krytý molitanem
- **Pro předvýtěrovou přípravu**
 - hormonální preparát (kapří hypofýza)
 - třecí miska, fyziologický roztok, injekční stříkačky, injekční jehly
 - teploměr
- **Pro odběr spermatu**
 - anestetikum (fenoxyetanol nebo hřebíčkový olej)
 - nádoba na lázeň anestetika (vanička)
 - utěrky na fixaci a osušení ryby
 - větší množství injekčních stříkaček od 5 do 15 ml
 - termobox (izolovaný přepravní obal) s ledem nebo chladícími vložkami
 - voděodolný popisovač
 - čtečka RFID čipů pro individuální identifikaci ryb
 - formuláře protokolu o odběru spermatu
 - gumové rukavice
- **Pro posouzení kvality spermatu:**
 - světelný mikroskop zvětšující 100–200x
 - mikroskopická skla, preparační nebo injekční jehla
 - pipety (1 000 a 10 μ l)
 - Bürkerova počítací komůrka (nebo jiná počítací komůrka)
 - zkumavky na předředění spermatu
 - fyziologický roztok
- **Pro odběr spermatu a přípravu k mrazení**

Chemikálie:

- chlorid sodný (NaCl)
- chlorid draselný (KCl)
- hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3)
- chlorid vápenatý ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- propandiol
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- destilovaná voda

Chemické sklo nebo plasty:

- kádinky,
- odměrné válce
- pipety
- přístroje
- teploměr

- **Pro vlastní mrazení**

- pejety 0,5 ml
- popisovač na pejety
- pipeta na plnění pejet (nebo trubička s balónkem)
- polystyrenový box (krabice o objemu 60–80 litrů) s víkem
- polystyrenový rámeček (plovák z desky o tloušťce 3 cm)
- plastové nebo papírové goblety na pejety
- Dewarovy nádoby na uchování pejet a na zásobní tekutý dusík
- tekutý dusík (N_2)
- pinzety
- kožené rukavice
- ochranný štít

- **Pro rozmrazení**

- vodní lázeň o teplotě 38 °C
- teploměr
- nůžky
- zkumavky nebo jiné vhodné nádoby na rozmražené sperma

5. SEZNAM POUŽITÉ 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.
- 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.
- Flajšhans, M., Hulák, M., Kašpar, V., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2009. Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 91, 23 s.
- Hulak, M., Psenicka, M., Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Morphological sex change upon treatments by endocrine modulators in meiogynogenetic tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture Research* 41: 233–239.
- Kocour, M., Gela, D., Rodina, M., Flajšhans, M., 2010. Performance of different tench, *Tinca tinca* (L.), groups under semi-intensive pond conditions: it is worth establishing a coordinated breeding program. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20: 345–355.
- Lajbner, Z., Kohlmann, K., Linhart, O., Kotlík, P., 2010. Lack of reproductive isolation between the Western and Eastern phylogroups of the tench. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20: 289–300.
- Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Rodina, M., 2000a. Umělý výtěr lína obecného s využitím enzymu při odlepkování jiker. *Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany*, č. 63, 14 s.
- Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Duda, P., Rodina, M., Novak, V., 2000b. Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture* 191: 303–308.
- Linhart, O., Rodina, M., Bastl, J., Cosson, J., 2003. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). *Journal of Applied Ichthyology* 19: 177–181.
- Linhart, O., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2006. Insemination, fertilization and gamete management in tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture International* 14: 61–73.
- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S., 2011. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 114, 19 s.
- Moczarski, M., Koldras, M., 1982. Properties of tench (*Tinca tinca* L.) and experiments with freezing it at -196 °C. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria* 12: 41–49.
- Psenicka, M., Rodina, M., Nebesarova, 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., Cosson, J., Gela, D., Linhart, O., 2004. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture International* 12: 119–131.
- Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi, S.M.H, Hulak, M., Linhart, O., 2007. Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. *Theor. Appl. Genet.* 67: 931–940.
- Rodina, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Linhart, O., 2010. Zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) pro potřeby uchování genofondu v praktických podmínkách. Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 102, 25 s.

6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Flajšhans, M., Hulák, M., Kašpar, V., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2009. Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 91, 23 s. (dedikace: QH92308; MSM6007665809)
- Linhart, O., Gela, D., Flajšhans, M., Rodina, M., 2000a. Umělý výtěr lína obecného s využitím enzymu při odlepkování jiker. Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 63, 14 s. (bez dedikace)
- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S., 2011. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 114, 19 s. (dedikace: ED2.1.00/01.0024; QH82119)
- Rodina, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Linhart, O., 2010. Zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) pro potřeby uchování genofondu v praktických podmínkách. Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 102, 25 s. (dedikace: ED2.1.00/01.0024; QH82119; MSM6007665809)

Odborní externí opONENTI

doc. MVDr. Miloslava Lopatářová, CSc.
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství,
Klinika chorob přežvýkavců (oddělení reprodukce)
Palackého 1/3, 612 42 Brno

Ing. Richard Vachta
Rybářské, hydrobiologické a vodohospodářské služby
P. Chelčického 371
389 01 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 uplatněné certifikované metodice č. 134/2012 – 16230/Nmet
certifikovaná metodika ze dne 21. 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

prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc. (linhart@frov.jcu.cz) (25 %)
Ing. Marek Rodina, Ph.D. (25 %),
Boris Dzyuba MSc., Ph.D. (25 %)
Sergey Boryshpolets MSc., Ph.D. (25 %)
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné
centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz
Zátiší 728/II, 38925 Vodňany

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

Vydáno 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 978-80-87437-69-8