

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz

ZÁKLADY HODNOCENÍ SPERMATU RYB

LINHART O., RODINA M., BORYSHPOLETS S.

Č.

Vodňany

2011

ISBN

VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO ZA FINANČNÍ PODPORY
PROJEKTU:

**Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb
(Mze ČR NAZV QH82119)**

**Reprodukce a genetika vybraných modelových druhů kostnatých a chrupavčitých ryb
(GAJU 046/2010/Z)**

**Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz (CENAKVA),
(OPVaVpI CZ.1.05/2.1.00/01.0024)**

ISBN

OBSAH

1. CÍL METODIKY

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Úvod

2.2. Odběr spermatu do nádobek

2.3. Krátkodobé uchování spermatu

2.4. Makroskopické hodnocení spermatu

2.5. Mikroskopické hodnocení spermatu

2.5.1. Posuzování pohyblivosti spermií

2.5.2. Zjišťování koncentrace spermií mikroskopicky

2.6. Charakteristika spermatu u některých druhů ryb

3. ZÁVĚR

4. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je předložit rybářské praxi jednoduchý a stručný návod jak hodnotit sperma ryb v praktických podmínkách rybích líhní, které nejsou vybaveny ideální mikroskopickou a počítačovou technikou.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodika poskytuje rybářské veřejnosti přístup k základním metodickým návodům jak hodnotit sperma ryb. Návodů jsou koncipovány tak, aby i přes svoji jednoduchost poskytl odpověď na otázku JAK JE SPERMA KVALITNÍ, případně JAK LZE SPERMA VHODNĚ POUŽÍT K OSEMENĚNÍ A OPLOZENÍ. Metodika nahrazuje metodiku vydanou Linhartem a Pokorným v roce 1984.

2.1. Úvod

Rozšíření metod řízení reprodukce ryb v provozní praxi do malých objektů se širokou škálou druhů ryb sebou přináší řadu problémů, včetně hodnocení kvality a kvantity spermatu. Oba ukazatele jak kvalitativní tak kvantitativní potřebujeme dobře znát při rozhodování jak strategicky provést vlastní osemnění a aktivaci, abychom dosáhli co nejlepší oplozenosti jiker. Dobrá oplozenost jiker je nezbytným předpokladem úspěšné inkubace i odchovu váčkového plůdku a tím ekonomické efektivnosti rybochovných objektů. Vysokou oplozenost je možné zajistit pouze dostatečným množstvím kvalitního spermatu a správnou technikou oplozovacího procesu.

U většiny ryb s vnějším osemněním probíhá spermatogeneze v cystách se Sertoliho buňkami, které vyplňují testes. Po přechodu do fáze spermiogeneze cysty praskají a spermie se uvolňují do jednotlivých kanálků testes, odkud spolu se spermiální plazmou se dostávají do chámovodu a výsledné sperma je vytlačováno na povrch urogenitální papily.

Sperma vedle spermií obsahuje spermiální plazmu, která však není totožná se semennou plazmou (ejakulátem) teplokrevných zvířat, protože u ryb nejsou přídatné pohlavní žlázy. Spermiální plazma nebo také semenná plazma je především produktem Sertoliho buněk a vedle spermií tvoří zhruba 50 – 90 % spermatu. Normálně utvářená spermie sladkovodních kostnatých ryb má bičikatý tvar a skládá se z hlavičky bez akrozomu, střední části a bičíku. U chrupavčitých ryb je hlavička spermie opatřena akrozomem a vyznačuje se delší dobou pohybu, oproti spermiím u sladkovodních kostnatých ryb.

Při veškeré práci se spermatem ryb je třeba akceptovat následující specifika:

- k aktivaci pohybu dochází až po styku s vodou (aktivačním médiem),
- doba pohybu spermie je velmi krátká (od 20 s po několik minut),
- pohyb spermií je limitován především vnějšími faktory a to především ionty,
- sperma vykazuje obrovské mezidruhové rozdíly.

2.2. Odběr spermatu do nádobek

Odběrem spermatu do nádobek rozumíme postup, jehož cílem je získat dostatečné množství nekontaminovaného spermatu, případně eliminovat účinek kontaminantů, hlavně moči, použitím imobilizačních roztoků. Na rozdíl od techniky výtěru spermatu přímo na jikry, jež se velmi často používá, nám tento postup umožňuje kontrolu kvality spermatu před jeho

použitím. Techniky odběru spermatu lze rozdělit na dvě základní skupiny: Odběr „vytřeného“ spermatu od živých ryb a odběr testikulárního spermatu z čerstvě usmrčených ryb.

2.2.1. Odběr „vytřeného“ spermatu od živých ryb

Technika odběru spermatu se liší podle jednotlivých druhů ryby, především velikosti generačních mlíčáků a předpokládaného objemů spermatu. Vždy platí, že je třeba mlíčka dokonale fixovat, následuje pečlivé osušení mlíčka, aby voda nekontaminovala sperma hned po odběru. U druhů choulolistivých na manipulaci je vhodné (u velkých generačních ryb nezbytné) použít anestezii.

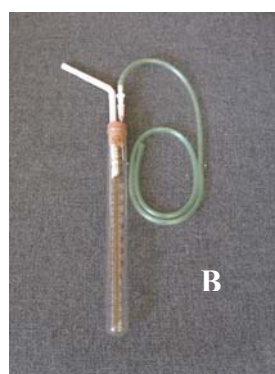
Odběr malých objemů spermatu či „univerzální“ odběr injekční stříkačkou

Malé objemy spermatu (v objemech v desetinách až jednotkách ml), které můžeme očekávat u druhů jako je např. okoun, štika, parma, obvykle odsáváme plastovou injekční stříkačkou přímo z povrchu urogenitální papily při současně lehké masáži břišní krajiny mlíčka. Stříkačky se obvykle plní do jedné poloviny spermatem. Další část se dosává vzduchem. Stříkačky se následně označí a ukládají v chladu (0-4°C) mimo přímé sluneční záření.

Odběry velkých objemů spermatu

Velké objemy spermatu například u kapra nebo býložravých ryb obvykle odsáváme tzv. odsávacími (obrázek 1), což jsou nádoby o objemu 50-200 ml s odsávací trubičkou pro sperma a kanylou pro připojení podtlaku. Podtlak vytváříme odsáváním vzduchu z nádoby ústy nebo vývěvou. Sperma je opět odsáváno z povrchu urogenitální papily při současně lehké masáži břišní krajiny mlíčka v poloze mlíčka břichem vzhůru (anesteze podmínkou, obrázek 2). Plastové nádoby o objemu 200 ml se plní objemem do 20 ml spermatu, označí se a ukládají v chladu (0-4°C) mimo přímé sluneční záření (obrázek 3).

U druhů s větším objemem spermatu je alternativou odběr spermatu výtěrem („odstříknutím“) spermatu přímo do kádinky či jiné vhodné skleněné či plastové nádoby, jak se používá např. u pstruhů. Uzavřené a ne zcela naplněné nádoby se opět ukládají v chladu (0-4°C) mimo přímé sluneční záření, nebo se sperma přelévá do PE sáčků, které se plní kyslíkem, uzavrou a opět uchovávají v chladu.



Obr.1: příklady provedení odsávací. A-používaná pro kapra, B-používaná pro sumce



Obr. 2 Odběr spermatu kapra pomocí odsávačky



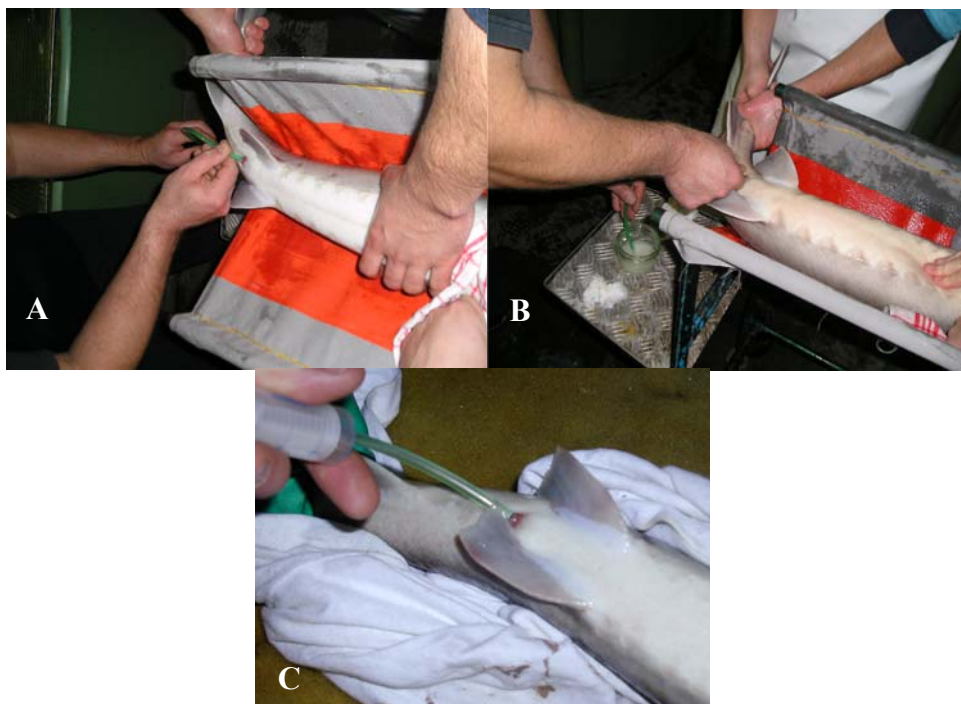
Obr. 3 Uchování spermatu v termoboxu

Odběr spermatu u jesetrovitých a veslonosovitých ryb

Sperma jeseterů se nejlépe odebírá pomocí katetru - šikmo seříznuté měkké hadičky odpovídajícího průměru (pro jesetera malého 4 mm, pro jesetera ruského a sibiřského 4-10 mm a délky 50 cm) zavedené do urogenitální papily v poloze mličkya břichem vzhůru (obrázek 4A,B). Sperma při mírném tlaku na břišní krajinu volně vytéká katetrem a je jímáno do odběrné plastové nádoby o objemu 50 nebo 200 ml. Plastové nádoby o objemu 200 ml se plní objemem do 20 ml spermatu a ihned po odběru se označí a ukládají v chladu (0-4°C) mimo přímé sluneční záření.

Při malých objemech spermatu lze použít injekční stříkačku nasazenou na katetr a sperma opatrně odsát (obrázek 4C)

I zde je alternativou odběr spermatu výtěrem („odstříknutím“) spermatu přímo do kádinky (obrázek 5) či jiné vhodné skleněné či plastové nádoby, je zde však větší riziko ztrát a možnosti kontaminace.



Obr. 4 Odběr spermatu jeseterů pomocí katetru



Obr. 5 Odběr spermatu jesetera do kádinky

Odběr spermatu kontaminovaných močí

U sumce velkého a lína obecného je sperma vždy kontaminováno močí a musí se odebrat přímo do imobilizačního roztoku (viz. metodiky Linhart a kol., 2000a,b). Imobilizační roztoky: sumec velký - 200 mM NaCl, 30 mM Trisu, pH 7-8; lín obecný - modifikovaný roztok Kurokura - 180 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl, 1,4 mmol $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,4 mmol NaHCO_3 . U obou druhů můžeme sperma maximálně ředit 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 nebo odsávačky o určitém objemu a k němu přisáváme sperma (obrázek 6). Sperma uchováváme v chladu ($0-4^\circ\text{C}$) mimo přímé sluneční záření.



Obr. 6 Detail odběru spermatu u sumce velkého

2.2.2. Získání testikulárního spermatu z čerstvě usmrčených ryb

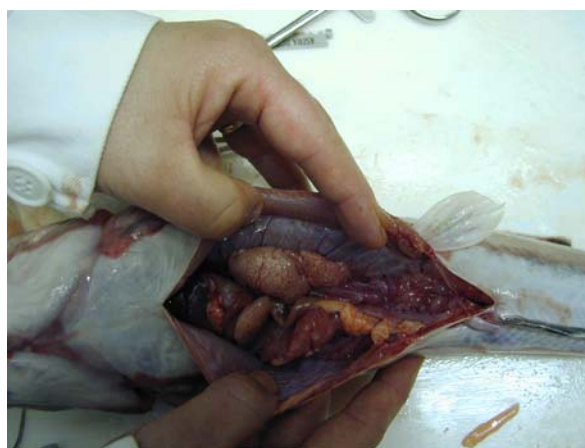
Testikulární sperma – sperma z vypreparovaných gonád usmrčených ryb se používá u druhů s velmi malým objemem spermatu (v kombinaci s kontaminací močí), u kterých není propracované použití imobilizačních roztoků a u kterých mličáci brzy pohlavně dospívají a je jich dostatek, jako jsou štika nebo klarias.

Mličáka usmrtíme úderem do hlavy a následným přetnutím žaberních oblouků, čímž dosáhneme i částečného vykrvení. Rybu osušíme, nůžkami otevřeme tělní dutinu, opatrně odstraníme trávicí trakt a uvolníme a vyjmeme testes tak, abychom je pokud možno nepoškodili (obrázek 7 a 8). Vypreparované gonády osušíme od krve a uchováváme v chladu (na ledu) podobně jako odebrané sperma. Sperma lze je použít obvykle do několika hodin, při delším uchování (24 hod) je vhodné zkontrolovat pohyblivost spermií.

Testikulární sperma získáme nastříháním tkáně testes kdy sperma volně vytéká z tkáně. Je možné propasírovat nastříhanou tkáň přes řídkou tkaninu. Získáme tím sice větší objem testikulárního spermatu, ovšem často s poškozenými bičíky spermií. Kontrola pohyblivosti testikulárního spermatu může být znesnadněna drtí tkáně.



Obr.7 Odběr testes u mličáka štiky



Obr. 8 Odběr testes u mličáky klariase

2.3. Krátkodobé uchování spermatu

Při krátkodobém uchování spermatu musíme dodržet následující zásady:

- zamezit aktivaci spermií vodou nebo jinými kontaminanty,
- zamezit vysychání, zmrznutí a přímému slunečnímu světlu,
- snížit metabolickou aktivitu (teplotou uchování 0-4°C, „na ledu“) a omezit rozvoj bakteriální mikroflóry,
- zajistit aerobní prostředí pro spermie (slabá vrstva spermatu, kyslíková atmosféra).

Sperma se tedy po celou dobu od odběru do osemenění uchovává v aerobním prostředí, což můžeme zajistit částečně naplněnými nádobkami, popř. uchováním v PE sáčkách naplněných kyslíkem při teplotě 0–4 °C. Zcela vyhovující je použití polystyrénových přepravních termoboxů (např. na akvariijní ryby) s vrstvou ledu na dně oddělenou od nádobek se spermatem tkaninou. Dbáme na to, aby sperma nezmrzlo nebo nádobka neležela přímo na přemrzlém ledu nebo těsně u výparníku chladničky.

2.4. Makroskopické hodnocení spermatu

U odebraného spermatu se makroskopicky posuzuje:

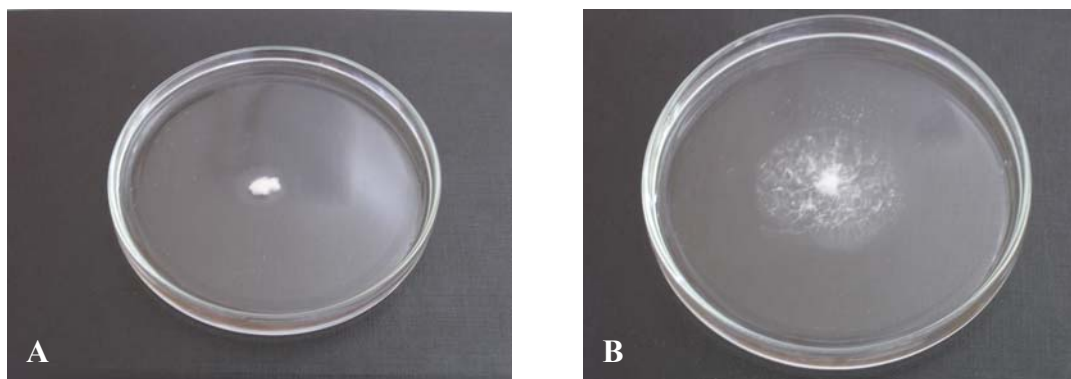
- a) objem spermatu
- b) hustota a konzistence
- c) barva a přímíseniny
- d) aktivita spermií

a) Objem spermatu uvádíme v ml. Zaznamenáváme jej spolu s identifikací ryby podle značení a její hmotností. Je dán druhem ryby, velikostí, stářím, zdravotním stavem, hormonální stimulací a fází výtěrové sezóny. Orientační objemy, které můžeme očekávat u některých našich hospodářsky významných druhů ryb uvádí tabulka 1.

b) Hustota a konzistence spermatu u jednotlivých druhů je uvedena v kapitole „Charakteristika spermatu u některých druhů ryb“. Zaznamenáme, zda je sperma obvykle řidší či hustší. Zajímají nás především odchylky od normálu. Hustota s konzistencí spermatu se člení do čtyřech stupňů: VH – velmi husté (smetanovité), H – husté (slabě smetanovité), Ř – řídké (mléčné), VŘ – velmi řídké (vodnaté se silným mléčným zakalením), O – oligospermní/aspermické (vodové proti světlu slabě opaleskující).

c) Barva a přímíseniny spermatu. Barva kvalitního čerstvě odebraného spermatu bývá v závislosti na druhu bělavá, bílá až lehce nažloutlá (barva slonoviny). Jiné barvy bývají známkou kontaminace spermatu: růžová barva kontaminace krví, žlutozelená či nahnědlá kontaminace výkaly. Kontaminace malým množstvím vody, moči či slizu se může projevit zgelovatěním spermatu nebo srážením spermatu. Kontaminované sperma není vhodné ke krátkodobému uchování nebo např. ke kryokonzervaci, přesto je možné jej po prověření pohyblivost spermií použít k oplození.

d) Makroskopicky lze odhadnout aktivitu spermií pomocí tzv. „kapkového testu“: Do Petriho misky na tmavé podložce (nebo podobné nádoby) nalijeme vodu používanou k aktivaci spermií (výška sloupce max 1 cm). Do ní kápneme pomocí kapátka, pipetky či injekční stříkačky kapku spermatu. Pokud sperma zůstane nahlučeno v kapce a nevytváří znatelný opaleskující až mléčný závoj, jde o sperma obsahující spermie se špatnou aktivitou (obrázek 9A). Pokud se vytváří okolo kapky spermatu mléčný závoj i když část spermatu zůstává nahlučena na místě (jde většinou o husté sperma), potom jde o sperma obsahující aktivní spermie (obrázek 9B). Tento způsob hodnocení je vhodný pro husté sperma, např. sperma kapra.



Obr. 9 Kapkový test se spermatem kapra:

A - spermie se špatnou aktivitou, B- spermie s dobrou aktivitou

2.5. Mikroskopické hodnocení spermatu

Uvedené metody jsou určeny pro praktické použití v provozních podmínkách, nejde o metody, které by měly být využívány v experimentálních studiích. Mikroskopické hodnocení nám umožní především posouzení pohyblivosti spermií a určit přesnou koncentraci spermií ve spermatu.

Pro mikroskopické hodnocení spermatu v provozních podmínkách postačuje školní či laboratorní mikroskop pro mikroskopování v průchozím světle a zvětšením 200-400x, tzn. s objektivy 20-40x při použití okulárů 10x. (Obvyklá sada objektivů bývá 5x, 10x, 20x, 40x v kombinaci s okuláry 10x či 15x). Nejvhodnější je mikroskop s vestavěným elektrickým osvětlením, osvětlení pomocí zrcátka či externí lampy je náročnější na nastavení. Pokud mikroskop umožňuje mikroskopování ve fázovém kontrastu nebo tmavém poli, použijeme jej, umožní nám komfortnější pozorování.

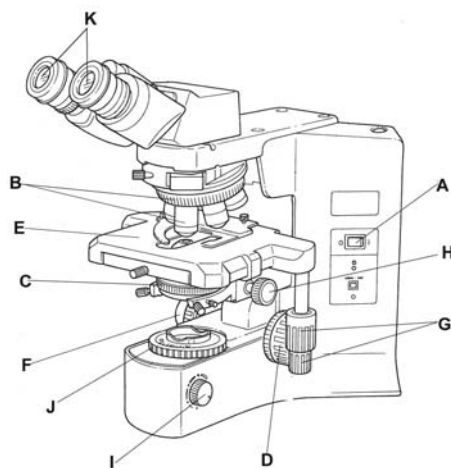
2.5.1. Posuzování pohyblivosti spermií

V provozních podmínkách rybích líhní je nejdůležitější odhad procenta pohyblivých spermií, který provádíme přímým pozorováním nativního preparátu aktivovaných spermií ve světelném mikroskopu.

Příprava mikroskopu:

Mikroskop (obrázek 10) umístíme na stabilní stůl v místnosti s možností alespoň částečného zastínění před přímým slunečním světlem. Zkontrolujeme kompletnost mikroskopu a zapneme elektrické osvětlení (obr. 10A). Nastavíme objektiv 10x (obr. 10B), kondenzor (obr. 10C) vysuneme do nejvyšší polohy, pomocí makrošroubu (obr. 10D) sjedeme se stolkem (obr. 10E) do dolní pozice. Na posuvný stolek mikroskopu položíme čisté podložní sklíčko a se stolkem vyjedeme nahoru tak, že pohledem ze strany kontrolujeme vzdálenost mezi objektivem a podložním sklíčkem, sklíčko se nesmí dotknout objektivu. Potom díváme se do mikroskopu, pomalu mikrošroubem (obr. 10F) sjíždíme se stolkem a snažíme se zaostřit povrch sklíčka, přičemž pohybujeme křížovým posuvem stolu (obr. 10G). Když zaostříme povrch sklíčka, nastavíme objektiv 20x a zkontrolujeme, popř. upravíme zaostření. Intenzitu světla můžeme korigovat jednak polohou kondenzoru (obr. 10H), regulačním prvkem světelného zdroje (obr. 10I) nebo tzv. polní clonou mikroskopu (obr. 10J). Pokud jsou po zaostření mikroskopu v zorném poli body, které se při pohybu stolku nepohybují, jedná se o nečistoty na okulárech (obr. 10K) v optické soustavě a je třeba je vyčistit, nejlépe čistícími ubrousky na optiku nebo lihem a vatovými tampóny.

Obr. 10 Mikroskop



Příprava preparátu a pozorování pohybu:

Pohyb spermií pozorujeme v otevřené kapce bez použití krycího skla. Na čisté podložní sklo na stolku mikroskopu kápneme pomocí 1 ml injekční stříkačky s jehlou přibližně 50 μ l (1/20 ml) vody z líhne nebo odstáté vodovodní vody či používaného aktivačního roztoku. Kapku na podložním skle roztáhneme na plochu 1-2 cm^2 , tak, aby byla co nejtenčí. Pokud kapka nejde „rozprostít“, použijeme nové podložní sklo vyleštěné suchým papírovým kapesníčkem. Další možností je, že do vody přidáme 0,1% BSA. Pokud všechny metody selžou, potom vyleštíme podložní sklíčko suchým papírovým kapesníčkem, nasliníme jej a opět přešléstíme papírovým kapesníčkem.

V takto rozprostřené kapce na podložním skle aktivujeme malé množství spermatu. Špičku preparační nebo injekční jehly namočíme do spermatu a lehkým ťuknutím jehlou přeneseme do kapky vzorek spermatu. Jehlu ihned oťžeme o suchý papír a opatrně s ní zamícháme sperma v kapce na podložním sklíčku. Preparát zasuneme pod objektiv připraveného mikroskopu a rychle doostříme mikrometrickým šroubem.

Jakmile zachytíme pohybující se spermie, obvykle vidíme pouze pohybující se body snažíme se proostřit celou hloubku kapky. Pohyblivé spermie se totiž zhruba do 10 s po aktivaci rozvrství s tím, že se pohybují na dně kapky či při povrchu kapky. Snažíme se vždy o pozorování pohybu spermií jak při povrchu kapky, tak na dně kapky, tedy blíže k povrchu podložního skla. V případě, že je sperma horší kvality, nepohyblivé spermie se vznášejí v celém sloupci kapky a pokud bychom pohyb pozorovali pouze na povrchu kapky nebo podložního skla, došlo by ke zkreslení odhadu. Zvláště pokud aktivujeme větší objem spermií.

Odhad pohyblivosti děláme vždy na začátku pozorování hned po zaostření, tedy okolo 10-15 s po aktivaci. Procento odhadujeme ve škále:

- 0 – nepohyblivé spermie, ojediněle pohyblivé (1-2%),
- 20 % - malé množství pohyblivých bodů,
- 40 % - větší množství pohyblivých bodů, ale nižší než polovina,
- 60 % - větší množství pohyblivých bodů, ale vyšší než polovina
- 80 % - takřka všechny spermie se pohybují, ale ne všechny,
- 100 % všechny body se pohybují.

Cílem odhadu procenta pohyblivosti je rozřadit jednotlivé vzorky do skupin vhodných ke konkrétnímu způsobu použití a vyřadit sperma nevyhovující. Např. pro potřeby zmrazování spermatu je vyžadováno sperma s pohyblivostí min. 80% a více. Pokud sperma používáme bezprostředně k oplozování, lze v případě potřeby použít sperma s pohyblivostí i 50%, pokud jsme schopni nahradit sníženou pohyblivost větším objemem spermatu. V nouzi, především u cennějších druhů ryb, např. jeseteří, lze použít i sperma s nižší pohyblivostí než 50% a to opět za předpokladu, že jsme schopni eliminovat sníženou motilitu množstvím použitého spermatu.

Pomocným parametrem pohybu spermií je celková doba jejich pohybu (při aktivaci vodou), která by měla více či méně kopírovat hodnoty uvedené v tabulce 1 pro jednotlivé druhy ryb. Celkovou dobu pohybu spermií měříme jednoduše stopkami od aktivace spermií v kapce na podložním skle až po zastavení dopředného pohybu hlaviček spermií.

Problémy při pozorování pohybu spermií:

- V případě, že doba pohybu je u většiny sledovaných vzorků výrazně kratší, nejprve vyloučíme nevhodné vlastnosti aktivační vody (především extrémní hodnoty pH či velmi nízký obsah rozpuštěných solí blízky destilované vodě), což můžeme provést kontrolou pH indikátorem a nahrazením vody 10x zředěným fyziologickým roztokem destilovanou vodou. Je-li aktivační voda v pořádku, bývá zkrácení doby pohybu známkou poklesu kvality spermatu, který je způsoben např. částečnou aktivací spermií v průběhu odběru nebo uchování.
- Pokud je naopak doba pohybu u většiny vzorků spermatu výrazně delší, nemusí to znamenat vysokou kvalitu spermatu. Může se jednat o artefakt – chybu způsobenou velkým množstvím spermatu v kapce, které není dostatečně aktivováno. K aktivaci totiž dochází postupně, což se jeví jako prodloužení doby pohyblivosti.
- S aglutinací spermatu neboli zhlukováním spermií se u rybích spermií setkáváme obvykle v případě nevhodného aktivačního roztoku či extrémního pH aktivační vody, nezřítka u spermatu, které je kontaminováno močí nebo výkaly. V případě dodjde k shlukování spermií tedy k aglutinaci, sperma vyřazujeme a nepoužíváme k oplození.
- Přichycování spermií na podložní sklo. Při pozorování pohybu v zorném poli zaostřeném na povrch sklíčka se někdy stává, že se pohybující hlavičky spermií prudce zastaví, nebo se začnou pohybovat jen kývavě na místě. To proto, že se „přilepí“ k podložnímu sklu, což je lépe viditelné, pokud pozorujeme spermie ve fázovém kontrastu nebo tmavém poli, kdy je částečně viditelný i bičík spermie. U jeseterovitých ryb vždy dochází k „přilepení“ spermií, pokud voda, kterou používáme má vysoké pH a vysokou úroveň vápníku. Dochází totiž k aktivaci akrozómu a spermie se „přilepí“ akrozinovým filamentem k podložnímu sklu. I u spermií kostnatých ryb, jako je kapr, okoun, lín atd. se někdy tento fenomen projeví, ačkoliv akrozóm nemají. Lepivost podporují i nečistoty na povrchu skla. Lepivost lze bezpečně zamezit přidáním 0,1% BSA (bovinní sérový albumín, bílkovina krevního séra skotu používaná v mikrobiologii) do aktivační vody nebo aktivačního roztoku. Provozní alternativou může být i již zmiňované naslinění a vyleštění podložního sklíčka.

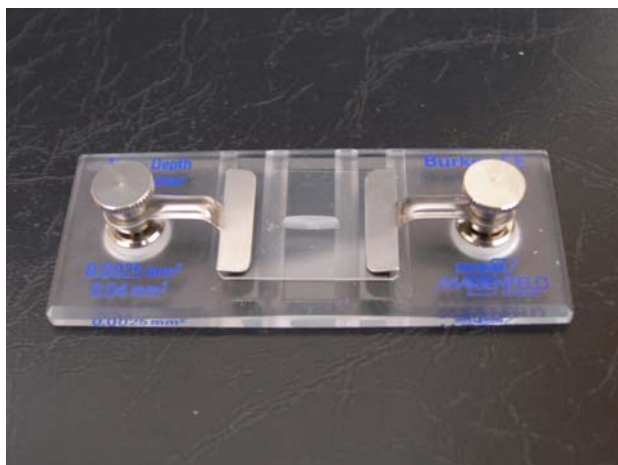
Metodické zásady při odhadu pohyblivosti spermií:

- 1) Při mikroskopickém hodnocení pohyblivosti vždy používáme stejné zvětšení mikroskopu, stejný druh preparační jehly, stejnou aktivační vodu či aktivační roztok a snažíme se o dávkování zhruba stejného množství spermatu (jedná se o film spermatu na preparační jehle).
- 2) Procento pohyblivých spermií odhadujeme ve stejném čase po aktivaci, každý vzorek minimálně 2x, lépe 3x.
- 3) Hodnocení vždy provádí stejný hodnotitel. Pro získání opory v rozhodnutí je možné přizvat dalšího hodnotitele.

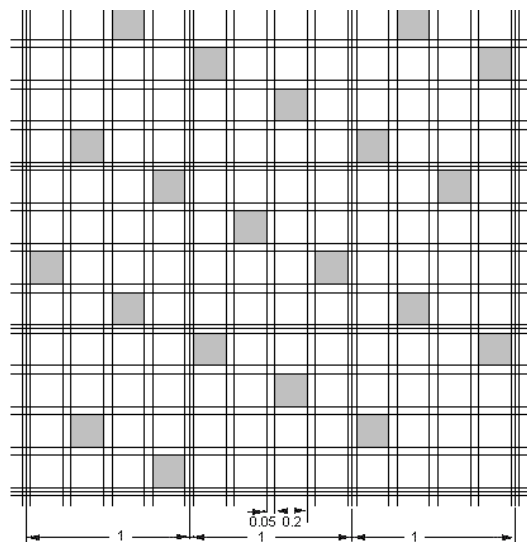
2.5.2. Zjišťování koncentrace spermií mikroskopicky

Koncentrace spermií ve spermatu je udávána v miliardách na mililitr (ml). Zjišťuje se počítáním naředěných spermií pod mikroskopem, v tzv. počítacích komůrkách různých typů a následným výpočtem podle použité počítací komůrky a stupně ředění.

V našich podmínkách se nejčastěji používá Bürkerova počítací komůrka používaná v hematologii. (obr. 11 a 12).



Obr.11 Bürkerova počítací komůrka



Obr.12 Rasrt Bürkerovy počítací komůrky s vyznačenými 20 čtverci pro počítání

Prvním krokem je naředění spermatu. K ředění je možné použít imobilizační roztok pro spermie daného druhu. Pro většinu našich druhů ryb je možné použít fyziologický roztok. U jeseterů přidáváme do fyziologického roztoku 10 mmol/l KCl. Poměr ředění volíme podle rozmezí pro jednotlivé druhy tak, abychom měli v jednom čtverci počítací komůrky 3-10 spermií. To znamená např. pro kapra, u kterého předpokládáme koncentraci $15-20 \times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$ zvolíme ředění 10000x, u druhů s koncentrací spermií do $10 \times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$ zvolíme ředění 5000x, u jeseterů ředění 500-1000x.

Pokud máme k dispozici mikropipety, ředíme poměr 10000x dvoustupňově: do 990 μl fyziologického roztoku napipetujeme 10 μl spermatu, protřepeme, z naředěného spermatu odebereme opět 10 μl a napipetujeme opět do 990 μl fyziologického roztoku a důkladně protřepeme.

Pokud nemáme k dispozici mikropipety, použijeme 1 ml stříkačky („inzulínky“) s jehlou. Poměr 10000x ředíme opět dvoustupňově, tzn. do zkumavky s 9,9 ml fyziologického roztoku přidáme inzulínkou 0,1 ml spermatu, zkumavku uzavřeme, důkladně protřepeme, novou inzulínkou odebereme 0,1 ml předředěného spermatu a přeneseme do 9,9 ml fyziologického roztoku, zkumavku uzavřeme a důkladně protřepeme.

Na vyčištěnou počítací komůrku přiložíme krycí sklíčko, upevníme ho pružnými raménky (obrázek 10) a položíme na stolek mikroskopu. Pomocí mikropipety popř. inzulínkou s jehlou přikápneme přibližně 10 μl naředěného spermatu k hraně krycího sklíčka na počítací komůrce tak, aby se vzorek k počítání kapilaritou nasál do komůrky. 5-10 minut necháme spermie sedimentovat a potom počítáme spermie v čtvercích komůrky (obrázek 12) a to tak, že započítáváme pouze spermie uvnitř čtverce, které se nedotýkají hranic čtverce a dále spermie, které se zevnitř dotýkají dvou hranic čtverce (např. levé a dolní strany čtverce). Tímto způsobem spočítáme 20 čtverců po celé ploše komůrky (viz. obrázek 12) a vypočteme

průměrný počet spermií v 1 čtverci, tzn. sečteme spermie, které jsme spočítali v 20 čtvercích a vydělíme 20.

Výslednou koncentraci následně vypočteme podle vzorce:

Průměrný počet spermií v 1 čtverci x ředění x 0,00025

Například pro ředění 10000x dosadíme do vzorce: průměrný počet spermií v 1 čtverci x 2,5.

Vypočtený počet spermií je vyjádřen v miliardách na mililitr ($\times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$) viz. tabulka 1.

Při znalosti objemu spermatu, hmotnosti mlíčka a koncentrace spermií je možné vypočítat:

- relativní objem spermatu na 1 kg hmotnosti mlíčka
- absolutní počet spermií od 1 mlíčka
- relativní počet spermií na 1 kg hmotnosti mlíčka.

Tyto ukazatele jsou důležité pro vyhodnocení reprodukční schopnosti mlíčáků a je nutno k nim přihlížet při komplexním posuzování plemenné hodnoty mlíčáků.

2.6. Charakteristika spermatu u některých druhů ryb

Tabulka 1: Charakteristika spermatu u některých druhů ryb (VH – velmi husté/smetanovité; H – husté/slabě smetanovité; Ř – řídké/mléčné; VŘ – velmi řídké/vodnaté se silným mléčným zákalem; O – oligospermní/vodové proti světlu slabě opaleskující; ne – obvykle se hormonálně nestimuluje)

Druh	štika	jeseter sibiřský	okoun	candát	lipan	kapr	lín	sumec	amur	tolstolob. bílý	síh maréna	síh peled'	pstruh obecný	pstruh duhový
Doba výtěru, měsíce	březen	prosinec/ březen	duben	duben	duben	květen	červen	červen	červen/ červenec	červen/ červenec	listopad	prosinec	říjen/ listopad	březen/ duben
Výtěrová hmotnost	0,5-2 kg	nad 5 kg	nad 50 g	nad 1,5 kg	nad 200 g	1-5 kg	250-500 g	4-8 kg	2-5 kg	2-5 kg	nad 300 g	nad 300 g	nad 200 g	nad 200 g
Pohlavní dospělost, roky	nad 1	nad 9	nad 1	nad 2	3	2	3-4	3-4	5-8	5-7	2	2	2-3	2
Výtěrová teplota °C	7-12	14-15	10-14	9-14	8-10	18-20	21-24	22-24	22-25	23-25	4-5	3	5-7	8-10
Objem spermií, ml	0,2-3	10-100	0,5-3	0,5-5	1-5	5-50	0,1-2	5-50	5-30	5-30	0,5-5	0,5-5	1-5	1-10
Koncentrace spermií, miliardy/ml	10-30	0,01-0,1	25-35	20	5-15	15-20	10-15	0,001-1	2-10	2-15	5-12	8-15	15-20	15-25
Doba motility spermií	1 min.	do 6 min.	15-20 sec.	35 sec.	30-40 sec.	1,5-2 min.	1,5 min.	do 2 min.	1 min.	1 min.	40 sec.	50 sec.	35 sec.	35 sec.
Makroskopické hodnocení tzn. hustota s konzistencí spermatu	Ř/VŘ	VŘ/O	VH	H	H/Ř	H	H/Ř	O	H/Ř	H/Ř	H/Ř	H	H/Ř	H/Ř
Dávky hypofýzy kapra mg/kg (spermiace v h)	3 (48)	4 (48)	ne	ne	ne	1 (24)	1 (24)	5 (24-48)	ne	ne	ne	ne	ne	ne

- **Okoun říční** – Velmi husté sperma. Doba pohybu je velmi krátká a někdy nedosahuje ani 15 s. Jde o rybu s močovým měchýřem, tudíž může dojít ke kontaminaci spermatu. Je lepší odebírat sperma u anestetizovaných jedinců. Spermie jsou jedny z nejmenších mezi spermii ryb.
- **Candát obecný** – Sperma je husté až velmi řídké a může dojít ke kontaminaci močí. Opět je vhodné mličky anestetizovat, kontaminace močí vzhledem k samovolnému vyprázdnění močového měchýře je lepší.
- **Lipan podhorní** – Sperma husté až řídké s velmi rozdílnou hustotou a procentem pohybu spermií.
- **Kapr obecný** – Sperma husté, kdy spermie vykazují velmi dobrou pohyblivost. Jeví se velký přebytek spermatu.
- **Lín obecný** – Většinou jde o husté až řídké sperma. Opět mličky anestetizujeme, čímž snížíme kontaminaci močí. Sperma vždy odebíráme do imobilizačního roztoku. Doba uchování je poměrně omezena, ideální je použít do 5 h po odběru. Sperma není vhodné ke krátkodobému uchování.
- **Sumec velký** – Sperma je většinou oligospermní. Mličky vždy anestetizujeme a při odběru nejprve odstříkneme moč. Odběr spermatu je poměrně dlouhý někdy až 10 minut. Sperma vždy odebíráme do imobilizačního roztoku. Sperma v imobilizačním roztoku můžeme uchovávat v ledničce až 3 dny.
- **Amur bílý a tolstolobik bílý** – Sperma husté až řídké s výrazně kratší dobou pohybu ve srovnání s kaprem.
- **Síh severní /maréna/** - Sperma husté až řídké s dobou pohybu spermie obdobnou lososovitým rybám. K závěru výtěrové sezony se významně snižuje procento pohybujících se spermií.
- **Síh peled'** – Sperma je husté. Doba pohybu spermií je mezi lososovitými rybami nejdelší.
- **Pstruh obecný potoční, pstruh americký duhový** – Sperma je většinou husté až řídké s velmi nestabilním procentem pohyblivých spermií.

3. ZÁVĚR

Uplatnění metod hodnocení spermatu má význam na všech líhních a objektech kde se provádí umělý výtěr ryb. Oproti metodice Linhart a Pokorný (1984) obsahuje nové pojetí jak makroskopického tak mikroskopického hodnocení spermatu, včetně parametrů kvantitativním a kvalitativním, kterým by se sperma ryb mělo blížit.

4. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Postupy, které zde uvádíme jsou na první pohled primitivní, ale právě ona jednoduchost v sobě skrývá tisíce experimentálních či rutinních hodnocení, které jsme v oblasti spermatologie ryb nashromáždili v průběhu posledních třiceti let. Právě ona dlouholetost pozorování nás dovedla k vytvoření praktických jednoduchých návodů, kdy i bez mikroskopu s použitím jednoduchých nádobek budete schopni kvalifikovaně odhadnout kvalitu spermatu. S obdobnou metodikou se v literatuře neseťkáte, v tom jej její novost.

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika najde uplatnění na všech rybích líhních v ČR, kterou by se měli řídit všichni líhňáři. Rozšíření metod řízené reprodukce ryb v provozní praxi sebou přináší řadu problémů při zabezpečování dobré oplozenosti a její správné diagnostiky. V současné době naše rybochovné objekty a líhně produkují ročně kolem 1000 mil. jiker a výsledky oplozenosti bezprostředně ovlivňují produkci váčkového plůdku.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Dobrá oplozenost jiker je nezbytným předpokladem úspěšné inkubace i odchovu váčkového plůdku a tím ekonomické efektivity rybochovných objektů. Ekonomický efekt lze demonstrovat na jednoduché modelové kalkulaci: důslednou kontrolou a výběrem používaného spermatu u kapra lze reálně zvýšit oplozenost až o 5%. Pro rybí líheň produkující ročně 50 miliónů váčkového plůdku kapra realizovaného za 20 Kč za 1000 ks představuje finanční efekt 50 tis Kč.

U druhů, kde se v podmínkách akvakulturních chovů častěji setkáváme s horší kvalitou spermatu, jako je tomu např. u jeseterovitých ryb, může vést použití neprověřeného spermatu (sperma se sníženou nebo nulovou motilitou) k poklesu oplozenosti a logicky i líhivosti v řádech nikoliv jednotek procent, ale desítek procent. Např: od jikernačky jesetera ruského hmotnosti 10 kg lze reálně získat 1 kg jiker, což představuje 40 tis ks jiker. V optimálních podmínkách lze dosáhnout oplozenosti 90%. (36 tis jiker). Při ceně 1 Kč za oplozenou jikru (0,03-0,04 EUR za ks) je to tedy 36 tis Kč. Pokles oplozenosti o 10% tedy představuje potenciální ztrátu 4000Kč na 1 kg jiker.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K., Rodina, M., 2008. Fish spermatology: Implication for aquaculture management. In: *Fish Spermatology*, Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, R. (Eds.). pp. 397-460. Alpha Science Ltd, Oxford, UK.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízené reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). *The artificial reproduction of common carp (Cyprinus carpio L.)* Edice Metodik (technologická řada), FROV JU Vodňany, 99, 1-43.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice Metodik VÚRH JU, Vodňany, 78, 1-24.
- Linhart O., Pokorný J., 1984. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik VÚRH, Vodňany, 14, 1-13.
- Linhart O., Gela D., Rodina M., 2001. Umělá reprodukce sumce velkého (*Silurus glanis* L.) s použitím enzymu k odlepkování jiker. Edice metodik VÚRH JU, Vodňany, 67, 1-15.
- Linhart O., Gela D., Flajšhans M., Rodina M., 2000. Umělý výtěr lína obecného s využitím enzymu při odlepkování jiker. Edice metodik VÚRH JU, Vodňany, 63, 1-14.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., 2000. Umělá reprodukce veslonosa amerického (*Polyodon spathula*). Edice Metodik VÚRH JU, Vodňany, 64, 1-15.

Oponent státní správy:

Odborný oponent

Ing. Radek Luhan - BaHa s.r.o. Osiková 1589/15 370 08 České Budějovice

Adresa autorského kolektivu

prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc. (linhart@vurh.jcu.cz), Mgr. Sergey Boryspolets, Ph.D., Ing. Marek Rodina, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

Anotace:

Základy hodnocení spermatu ryb

LINHART O., RODINA M., BORYSHPOLETS S.,

Rozšíření metod řízené reprodukce ryb v provozní praxi sebou přináší řadu problémů při zabezpečování dobré oplozenosti a její správné diagnostiky. V současné době naše rybochovné objekty a líhně produkují ročně kolem 1000 mil. jiker a výsledky oplozenosti bezprostředně ovlivňují produkci váčkového plůdku. Dobrá oplozenost jiker je nezbytným předpokladem úspěšné inkubace i odchovu váčkového plůdku a tím ekonomické efektivnosti rybochovných objektů. Vysokou oplozenost je možné zajistit pouze dostatečným množstvím kvalitního spermatu a správnou technikou oplozovacího procesu.