

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH,
FAKULTY RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD,
VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ

ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU JESETERA MALÉHO

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

Č.

Vodňany

2010

ISBN

Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:

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

**Biologické, environmentální a chovatelské aspekty v rybářství
(výzkumný záměr MSM 6007665809)**

Obsah

1. ÚVOD

- 1.1. Cíl technologie
- 1.2. Vlastní popis technologie
- 1.3. Srovnání „novosti technologie“
- 1.4. Popis uplatnění technologie

2. ZÁKLADNÍ ZNALOSTI Z OBLASTI SPERMATOLOGIE A ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU

- 2.1. Úvod do spermatologie sladkovodních druhů ryb
- 2.2. Klíčové faktory aktivující a inhibující motilitu spermií jeseterů a akrozoa
- 2.3. Úvod do kryokonzervace - zmrazování spermií ryb

3. VLASTNÍ TECHNOLOGIE

- 3.1. Odběr spermatu
- 3.2. Kontrola kvality spermatu
- 3.3. Ředění spermatu kryoprotektivem a plnění do pejet
- 3.4. Vlastní mrazení spermatu
- 3.5. Uložení zmrazených dávek
- 3.6. Evidence zmrazených dávek
- 3.7. Rozmrazení zmrazených dávek
- 3.8. Použití rozmrazeného spermatu k oplození

4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ÚVOD

1.1. Cíl technologie

Cílem je jednoduše popsat technologii zmrazování spermatu jesetera malého pro účely uchování genofondu tohoto druhu.

1.2. Vlastní popis technologie

Technologie poskytuje VaV uživatelům, veterinárním ústavům a pracovištím, které zmrazují sperma pro účely dlouhodobého uchování postup jak zmrazit sperma jestera malého.

1.3. Srovnání „novosti technologie“

Technologie zmrazování spermatu je v ČR a EU zcela nová propracovaná do detailu pro uživatele výsledků, která při dodržení celého postupu garantuje dosažení oplozenosti jiker a líhnivosti plůdku.

1.4. Popis uplatnění technologie

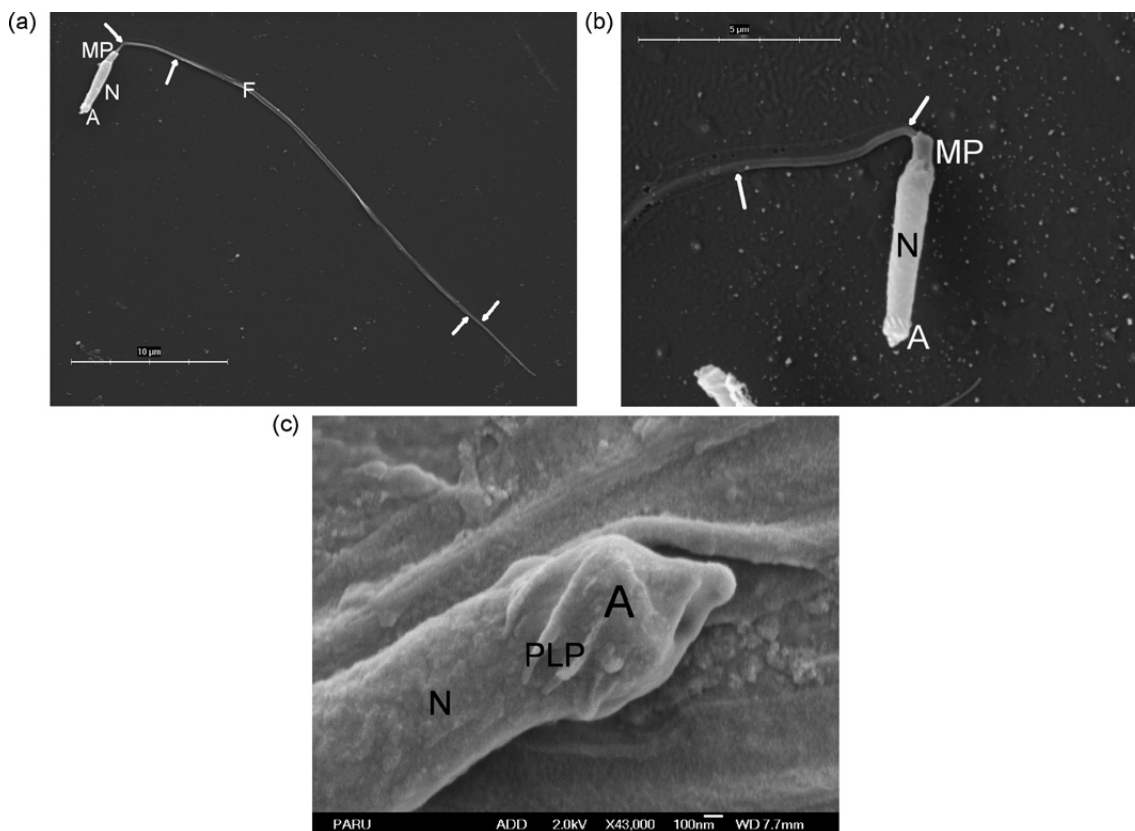
Technologie najde uplatnění především na pracovištích odpovědných za zmrazování spermatu ryb, ale rovněž na pracovištích, které chovají ve větším měřítku generační hejno jesetrů a část genofondu chtějí uchovat ve zmrazeném stavu.

2. ZÁKLADNÍ ZNALOSTI Z OBLASTI SPERMATOLOGIE A ZMRAZOVÁNÍ SPERMATU

2.1. Úvod do spermatologie sladkovodních druhů ryb

Spermie patří mezi specializované buňky, které u druhů s vnějším osemeněním jsou obvykle vypuzeny do vnějšího prostředí, tedy do sladké vody. Spermie jsou nuceny se vyrovnat s extrémně odlišným prostředím v podobě sladké vody, přičemž jejich ochrana proti vnějšímu prostředí je na daleko horší úrovni než u jiker.

Převážná většina znalostí o struktuře spermií ryb a fyziologii pohybu spermií byla zdokumentována na pstruhu duhovém (Billard 1970; Morisawa and Suzuki 1985; Boitano and Omoto 1992; Cosson et al. 1999; Alavi et al. 2008). V kontrastu s výsledky u pstruha duhového, mnohem méně informací je známo o charakterizaci spermií chrupavčitých druhů tedy u veslonosa amerického nebo jeseterovitých ryb, které nejsou fylogeneticky příliš vzdáleny spermiím savčích druhů (Pšenička et al. 2009, obrázek. 1). Naproti tomu spermie kostnatých ryb mají fylogeneticky primitivní spermie, tzn. kulatou hlavičku bez akrozomu s velmi tenkým bičíkem (Pšenička et al. 2006).



Obrázek 1. Ultrastruktura spermie jesetra malého pořízena skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) ukazuje na obrázku a) celou spermii (měřítko 10µm), šipky vyznačují začátek a konec lemu na bičíku, na obrázku b) větší detail hlavičky spermie, střední části s částí bičíku (měřítko 5µm) a na obrázku c) s detailem akrozomu na hlavičce spermie (měřítko 100 nm). Akrosom (A), jádro - nukleus (N), střední část (MP), bičík (F), Pšenička et al. 2009).

2.2. Klíčové faktory aktivující a inhibující motilitu spermií jeseterů a akrozom

Spermie převážné většiny druhů ryb nejsou pohyblivé ve varlatech a v celém genitálním traktu s koncentrací spermií 10^{10} . Vyznačují se krátkou periodou pohybu ve vnějším prostředí, tedy sladké vodě, (Cosson et al. 1999) s dobou pohybu 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 et al. 2004; Cosson et al. 1999). Spermie pstruha duhového byly používány jako specifický model sladkovodních druhů ryb. 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 efektem různých iontů (Gatti et al. 1990; Boitano and Omoto, 1991). Osmotický tlak, koncentrace K^+ spolu se sacharózou a pH semenné plasmu nižším než 7 jsou hlavní inhibiční faktory motility spermií u lososovitých ryb (Morisawa et al.

1983). U kaprovitých ryb a mořských druhů ryb je hlavním kontrolním faktorem motility spermií osmotický tlak (Linhart et al. 1991, Redondo-Müller et al. 1991, Billard et al. 1995, Perchec et al. 1997; Morisawa and Suzuki 1980). Motilita spermií u chrupavčitých ryb a některých kostnatých je z části kontrolována osmotickým tlakem a z části iontovým efektem (Linhart et al. 1995, 2002; Billard et al. 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 ukázali u lososovitých ryb Scheuring (1925), Cosson et al. (1986, 1989), Christen et al. (1987). Baynes et al. (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+} . Spermiie 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 spermiie pstruha duhového (Cosson et al. 1989; Boitano and Omoto 1992) a slouží rovněž k eliminaci inhibičního efektu K^+ na motilitu spermií. Rozdílný efekt Ca^{2+} iontů byly pozorovány u intaktních a demembranovaných spermií mnoha kostnatých ryb Alavi et al. 2008.

2.3. Úvod do kryokonzervace - zmrazování spermií ryb

Technika zmrazování, tj. hluboké zmrazování spermií a jejich uchování v kapalném dusíku ($-196^{\circ}C$) je jedna z biotechnických metod aplikovaných v akvakultuře (Stoss 1983; Rana 1995; Gwo 2000). Sperma zmrazené v akvakultuře může být následně využito: 1) pro produkci referenční chovatelské zásoby, 2) pro produkci hybridů (s reprodukcí v různém období), 3) v případě rozdílného období reprodukce mličáků a jikernaček, 4) snížení ekonomické náročnosti spojené s udržováním generačních mličáků, 5) genetické zlepšení v selekčně šlechtitelských programech, 6) opakování výtěru s využitím specifických mličáků, 7) uchovávání genetických rezerv u kulturních druhů a 8) pro mezinárodní výměnu spermatu (Gwo 2000).

Hluboké zmrazování 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). Těmito faktory jsou především (Ciereszko et al. 2000; Brown and Mims 1999; Leibo and Bradley 1999; Linhart et al. 1993, 2000, 2005, 2006; Rodina et al. 2007):

1. **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 $+4^{\circ}C$. Chemické složení extendorů používaných pro zmrazování je velmi široké. Před zmrazováním se sperma ředí extendorem na úrovni od 1:1 do 1:20 v závislosti na koncentraci spermatu a specifitě druhu.
2. **Kryoprotektiva a jeho koncentrace.** Kryoprotektiva jsou přidávány k spermatu 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 bod tuhnutí v průběhu zmrazování. U velkého

množství látek byly identifikovány schopnosti kvalitních kryoprotektiv. Např. dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glykol (EG), glycerol, methanol a propandiol. Koncentrace kryoprotektiv v kryoprotektivních médiích nebo po finálním naředění spermatu je odlišná druh od druhu s obvyklým rozhraním od 5 do 15%.

3. **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, objemu a formy (pejeta, peleta, kryozkumavka) zmrazované dávky
4. **Rychlost rozmrazování je** stejně důležitá jako rychlost rozmrazování. Zde platí čím rychlejší rozmrazení, tím lépe. Při pomalém rozmrazování hrozí především rekystalizace vody a mechanické poškození rozmrazovaných buněk.

Optimalizací vnějších faktorů během kryokonzervace sledujeme zachování integrity a funkce buňky a buněčných organel, která je dána především zachováním buněčných membrán a filamentů. U chrupavčitých ryb (jeseterů) je kritické uchování akrosomu v průběhu zmrazování a rozmrazování. Porušení akrosomu v průběhu zmrazování je možné kontrolovat elektronovou mikroskopií nebo fluorescenčním zvýrazněním. Tyto metody jsou ovšem poměrně zdlouhavé. Jako vhodné a experimentálně dostačující se jeví kontrola akrosomové reakce viditelné v podobě filamentu mezi hlavičkou spermie a podložním sklem (Dzyuba a kol., nepublikováno).

Velké množství studií bylo publikováno o zmrazování spermií u odlišných kostnatých ryb (Stoss 1983; Rana 1995; Gwo 2000). V oblasti zmrazování chrupavčitých ryb tzn. jesterovitých a veslonosa existuje pouze několik publikací (Tsvetkova et al. 1996; Ciereszko et al. 1996a,b; Brown and Mims 1999).

3. VLASTNÍ TECHNOLOGIE

3.1. Odběr spermatu

Mlíčáci jesetera malého jsou připravováni k spermiaci v nádržích při teplotě 14-15 °C po dobu 6-7 dnů. Vlastní odběr spermatu se obvykle provádí 48 h po injekci mlíčáků kapří acetonovanou hypofýzou v dávce 3-4 mg/l (Gela a kol., 2008).

Sperma jestera je odebíráno po zasunutí hadičky (kónicky seříznuté o průměru 4 mm, délce 50 cm) do urogenitální papily (obrázek 2) a jímáno do odběrné plastové nádoby o objemu 50 nebo 200 ml. Plastové nádoby se plní objemem do 20 ml spermatu a ihned po odběru se vkládají do polystyrénové krabice s ledem (obrázek 3). Sperma se po celou dobu po odběru do zmrazení uchovává v aerobním prostředí při teplotě 0-2°C, přičemž dbáme na to, aby sperma nezmrzlo nebo nádobka neležela přímo na přemrzlém ledu.



Obrázek 2: Odběr spermatu jesetra malého.

Při odběru se musí postupovat rychle a opatrně, jinak dojde k „vystříkání” spermatu. Tzn. po odlovení mlíčáka z nádrže se prstem „ucpe” urogenitální papila, osuší se místo kolem papily a okamžitě zasune katetr (hadička do papily) a odebírá sperma. Masáží v blízkosti papily se pomáhá odběru spermatu. Zhruba za 3 h je možné opakovat odběr spermatu. Objem spermatu, který získáme od mlíčáka hmotnosti 1 kg je na úrovni do 20 ml.



*Obrázek 3: Uchovávání spermatu jestera malého v plastových nádobkách na ledu, tedy při teplotě 0-2°C.
Pohled do otevřeného přepravního boxu*

3.2. Kontrola kvality spermatu

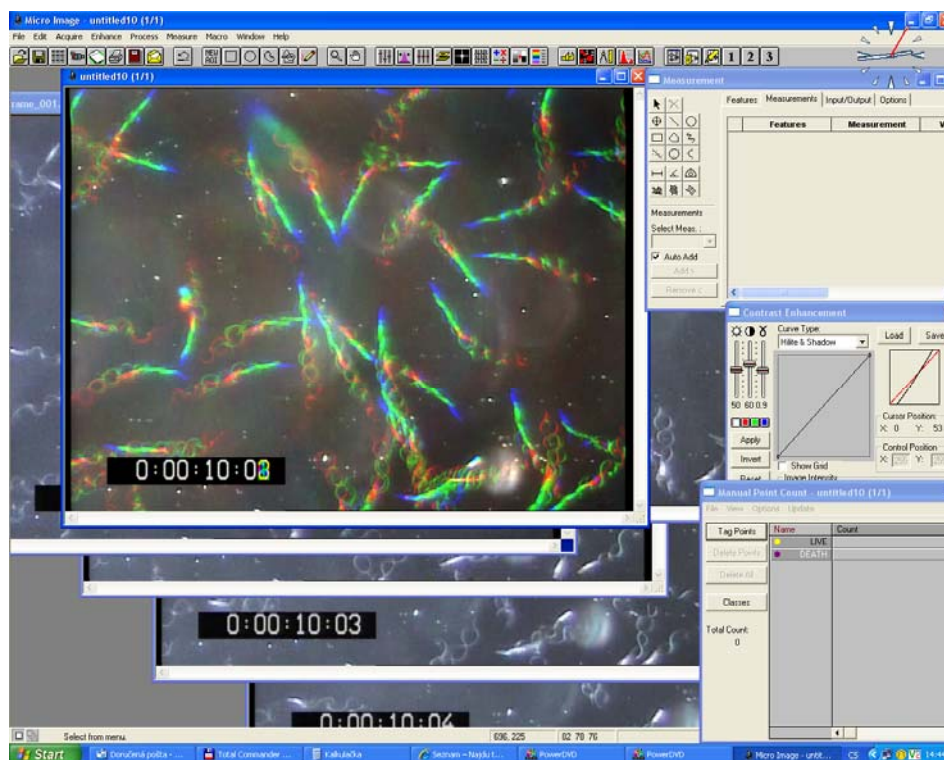
Sperma jestera malého je bělavá až mléčně bílá tekutina vodnaté konzistence. Koncentrace spermií se obvykle pohybuje v rozmezí $0,1-1 \times 10^9$ spermií v 1 ml. Kontrola kvality zahrnuje odhad motility spermií (podílu pohyblivých spermií) a určení koncentrace.

Motilita spermií se odhaduje subjektivně mikroskopicky před zmrazením, přičemž procento pohyblivých spermií musí být vyšší než 80 % (Linhart a Pokorný, 1984). Pokud je procento pohyblivých spermií nižší, sperma se nehodí k zmrazování.

K lepšímu odhadu procenta pohyblivých spermií je vhodné použít mikroskop s tmavým polem, stroboskopickou lampu, objektiv 20x s vhodnou CCD kamerou a monitorem jak detailně popsal Linhart a kol. (2002) ve své publikaci. Procento pohyblivých spermií se odhaduje zhruba při zvětšení 200x, přičemž na podložní sklo se dá 49,5 μ l aktivačního media (AM), (AM = 10 mmol.l⁻¹ NaCl + 1mM CaCl₂ + 10 mmol.l⁻¹ TRIS-HCl, pH 8.5, s 0.1 % pluronicu) a vmísí 0,5 μ l spermatu. Finální ředění představuje poměr 1:100. Pluronic se přidává z důvodu zamezení adheze mezi spermií či akrozomem a podložním sklem, které může zkreslit výsledek. Výsledek pohybu spermií musíme odhadnout do 10 s po aktivaci spermií.

V případě, že jsme vybaveni záznamovou technikou tzn. videm, DVD či počítačem s dostatečnou kapacitou, můžeme pohyb spermií zaznamenat a následně poměrně velmi objektivně vyhodnotit. K vyhodnocení se používá různého software, které ve své

podstatě určí procento pohyblivých spermií a jejich rychlost s dalšími zhruba dvacíti parametry (viz. obrázek 4).



Obrázek 4: Ukázka vyhodnocování spermatu jestera malého analýzou obrazu firmy Olympus.

Koncentrace spermatu se určuje počítáním v počítači komůrce, nejčastěji Bürkerově, po předchozím naředění 400x v neaktivujícím roztoku (např. fyziologický roztok s 10 mM KCl).

3.3. Ředění spermatu kryoprotektivem a plnění do pejet

Sperma jestera malého se musí před zmrazením naředit ředícím roztokem obsahující kryoprotektivní látky. Ředící roztok obsahuje 30 mM cukrózy, 1mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8.5 a 10% kryoprotektiva - metanolu.

POZOR: metanol je toxický !!

Ředící roztok s kryoprotektivem o teplotě 0-2 °C se postupně velmi pomalu “po kapkách” napipetuje do spermatu o téže teplotě (obrázek 5). Naředěné sperma se okamžitě nasaje za pomoci pipety (1ml) do připravených a označených pejet o objemu 0,5 ml. Každá pejeta nese označení druhu ryby, č. ryby, a dne zmrazování.



Obrázek 5: Postupné přikapávání ředícího roztoku s kryoprotektivem do spermatu.



Obrázek 6: Nasávání naředěného spermatu mikropipetou do označených vjeit.

3.4. Vlastní mrazení spermatu

Vlastní mrazení dávek spermatu se provádí v parách nad hladinou tekutého dusíku v „termoboxu“. Příkladem použitelného termoboxu je přepravní polystyrénový box na akvariijní ryby rozměrů 60x40x35 cm s víkem a tloušťkou stěny 4 cm. Pejety naplněné naředěným spermatem se ukládají na předem připravený polystyrénový rámeček (tloušťka 3cm) – fungující jako plovák který se po naplnění přenesse do boxu na hladinu kapalného dusíku a box se na 20 minut uzavře (obrázek 8). 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°C . Po 20 minutách se box otevře a pejety se překloupí do kapalného dusíku tedy teploty -196°C .



Obrázek 7: Rámeček s označenými a naplněnými pejetami na ledu ($0-2^{\circ}\text{C}$)



Obrázek 8: Polystyrénový box o hloubce 35 cm s výškou hladiny kapalného dusíku 7-10 cm

3.5. Uložení zmrazených dávek

Pejety se přenesou pinzetou do předem označených gobletů (plastových nebo papírových tubusů pro uložení pejet) (obrázek 9), které usnadňují manipulaci s pejetami. S goblety se pracuje pod hladinou kapalného dusíku o teplotě -196°C tak, aby nedošlo ke znehodnocení dávek jejich „zahřátím“ na více než -80°C . Goblety s pejetami se ukládají do kanistrů v kontejnerech s kapalným dusíkem (obrázek 10). Dlohodobost uchování dávek představuje několik let, či desítek - stovek let.

Při práci v kapalném dusíku dodržujeme bezpečnostní předpisy !!



Obrázek 9: Ukládání pejet do gobletů pod hladinou kapalného dusíku

3.7. Rozmrazení zmrazených dávek

Zmrazené dávky se vyjmou v gobletu z kanistru kontejneru a vloží do manipulační polystyrenové nádoby s kapalným dusíkem. Pomocí pinzety se v kapalném dusíku vyjme příslušná pejeta (pejety) z gobletu a vloží do lázně o teplotě 40 °C. Pejeta se rozmrazuje za mírného pohybu v teplé lázni po dobu 6 s (obrázek 12).

Po 6s se pejeta vyjme z teplé lázně, osuší a odstříhne nůžkami konec pejety, který není opatřen zátkou. Konec se odstříhne z důvod kontaminace vodou (obrázek 13).

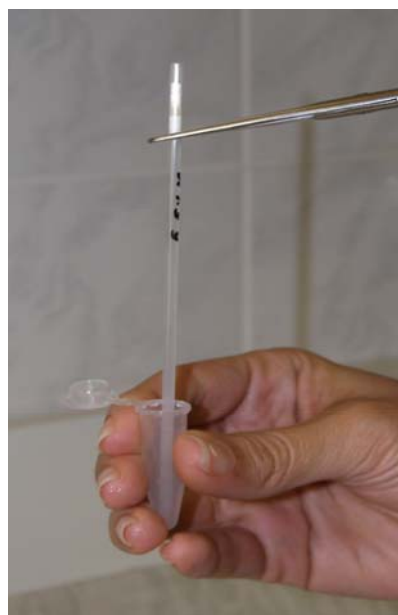


Obrázek 12: Lázeň o teplotě 40°C připravená pro rozmrazování



Obrázek 13: Odstřížení kontaminovaného konce pejety vodou

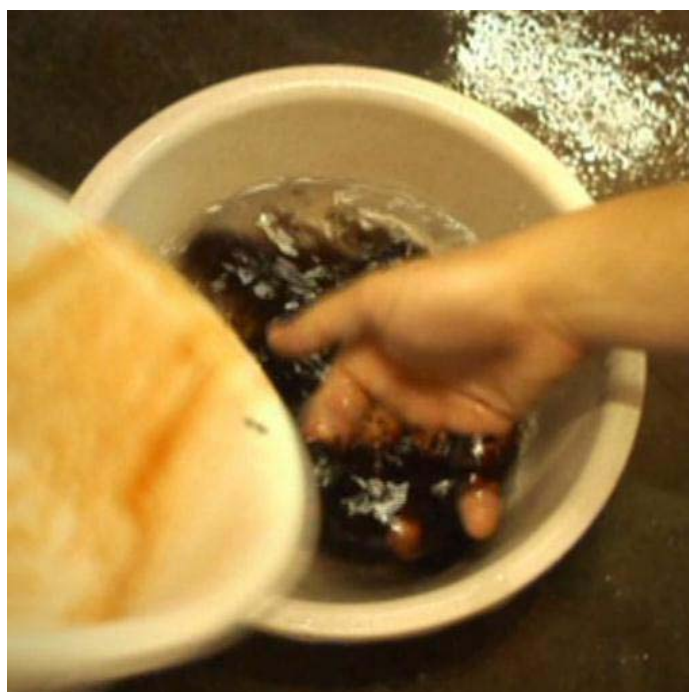
Po odstřížení kontaminovaného konce se pejeta odstřiženou částí vloží do zkumavky a odstříhne se zátká na pejetě viz. obrázek 14. Obsah pejety se nechá samovolně vytéct do zkumavky. Zkumavky s rozmrazeným spermatem se okamžitě používají k oplození či k testu pohyblivosti spermií. U jesterá malého bychom měli vždy dosáhnout minimální pohyblivosti na úrovni 20 %. Dosažitelná úroveň při optimální kvalitě spermatu je až 80 %.



Obrázek 14: Umístění pejety do zkumavky a následné odstřížení zátky na pejetě.

3.8. Použití rozmrazeného spermatu k oplození

U jesetera malého jako u dalších jesetrovitých se používá tzv. „mokrý metoda” osemenění. Jinými slovy, rozmrazené sperma se nejprve aktivuje smísením s vodou a okamžitě se smísí s jikrami (obrázek 15; Gela a kol., 2008). Při osemenění dbáme na to, aby množství spermií na jednu jikru bylo vyšší než při použití čerstvého tedy nezmrazeného spermatu. Jestliže se při použití čerstvého spermatu běžně používá 160000-320000 spermií na 1 jikru, je třeba počítat s potřebou 320000-640000 rozmrazených spermií na 1 jikru, což např. v případě spermatu po rozmrazení (o nativní koncentraci 1×10^9 na ml) činí 24 – 48 ml spermatu na 1 kg jiker.



Obrázek 15: Míchání jiker s předem aktivovaným spermatem či současně aktivovaným spermatem s přidáním jiker.

4. 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.
- Baynes SM, Scott AP, Dawson AP, 1981. Rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa: Effects of cations and pH on motility. *J.Fish Biol.* 19, 259-267.
- Billard R. 1970. Ultrastructure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons téléostéens. In: Baccetti, (Ed.), *Spermatologia comparata*. Quaderno 137: 71-80.
- Billard R, Cosson J, Perche G and 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 and Williot P, 1999. Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 199-203.
- Billard R., Cosson J., Noveiri SB. and 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., Hulak, M., Linhart, O., 2009. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Kryobiology*, 59: 291-296.
- Brown GG. and Mims SD. 1999. Cryopreservation of paddlefish *Polyodon spathula* milt. *Journal of World Aquaculture Society* 30: 245-249.
- Christen R, Gatti JL and 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. *Eur. J. Biochem.* 166, 667-671.
- Ciereszko A., Dabrowski K. and Ochkur SI. 1996a. Characterization of acrosin-like activity of lake sturgeon (*A. fluviatilis*) spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 45: 72-77.
- Ciereszko A., Toth GP., Christ SA. and Dabrowski K 1996b. Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*A. fluviatilis*) spermatozoa. *Theriogenology* 45: 665-672.
- Ciereszko A., Dabrowski K, Mims SD. and 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 MP, Billard R, Carré D, Letellier L, Christen R, Cosson J and Gatti JL, 1986. Control of flagellar movement in "9+2" spermatozoa: calcium and cyclic AMP dependence, chemotactic behavior. *Cell. Motil. Cytosk.* 6, 237.
- Cosson MP, Billard R and Letellier L, 1989. Rise of internal Ca^{+2} accompanies the initiation of trout sperm motility *Cell Motil. Cytoskel.* 14, 424-434.
- Cosson J., Billard R., Cibert C., Dréanno C. and 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., Rodina, M, Linhart, O. 2008. Řízená reprodukce jeseterů. *Edice metodik VÚRH JU*, Vodňany, 78, 1-24.
- Ginsburg AS. 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Moscow: Nauka, (in Russian).

- Gwo JC. 2000. Cryopreservation of aquatic vertebrates semen, review. *Aquaculture Res.* 31: 259-271.
- Leibo SP. and Bradley L. 1999. Comparative cryobiology on mamalian 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. a Pokorný J. 1984. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. *Edice metodik VÚRH JU*, Vodňany, 14, 1-13.
- Linhart O., Slechta V. and Slavík T. 1991. Fish sperm composition and biochemistry. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica* 16: 285-311.
- Linhart O., Billard R. and Proteau JP. 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. *Aquaculture* 115: 347-359.
- Linhart O., Mims SD. and Shelton WL. 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. and 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 SD., Shelton WL. and 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., Flajshans, M., Gela, D. and 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. and Urbanyi, B., 2006. Effects of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilizabilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 22 (Supl. 1), 384-388.
- Mims SD. 1991. Evaluation of activator solutions, motility duration and short-term storage of paddlefish spermatozoa. *Journal World Aquaculture Society* 22: 224-229.
- Morisawa M. and 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 and Yasuda K, 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from fresh water cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 95-103.
- Percec-Poupard G, Gatti JL, Cosson J, Jeulin C, Fierville F and Billard R, 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 110, 315-327.
- 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
- Psenicka, M., Vancova, M., Koubek, P., Tesitel, J., Linhart, O., 2009. Fine structure and morphology of sterlet (*A. ruthenus*) spermatozoa and acrosin localization. *Animal Repro. Science*, 111: 3-16.
- 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. *Theriogenology*, 67, 931-940.

- Rana JK. 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Day JG., Lelland MR., (Eds.), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 151-166.
- Redondo-Müller C., Cosson MP., Cosson J. and 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. Arch. Hydrobiol. Suppl. 4, 181-318.
- Stoss J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar WS., Randall DJ., Donaldson EM., (Eds.), Fish Physiology New York, London. Academic Press pp. 305-350.
- Tsvetkova LI., Cosson J., Linhart O. and Billard R. 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons (*Acipenser baeri* A. *Ruthenus*). Journal of Applied Ichthyology 12: 107-112.

Oponent za státní správu

Odborný oponent:

Ing. Jan Poul
LINEQ s.r.o.
V Horce 178
252 28 Černošice
E-mail: lineq@lineq.cz

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky

Adresa autorského kolektivu

prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc. (linhart@vurh.jcu.cz), mgr. Boris Dzuba, PhD., mgr. Sergey Boryspolets, Ing. Marek Rodina, PhD., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Zátíší 728/II, 38925 Vodňany