Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod

DIPLOMOVÁ PRÁCE

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ CHARAKTERISTIKA SPERMATU POLYPLOIDNÍCH JESETERŮ(*ACIPENSERIDAE*)

Autor magisterské práce: **Bc. Jan Kašpar**
Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr**.
Odborný konzultant diplomové práce: **Ing. Martin Pšenička PhD**
České Budějovice, 2010

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích **Zemědělská fakulta**

Katedra: rybářství a myslivosti Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: Jan Kašpar

Studijní program: Z01129

Studijní obor: Rybářství

Název tématu: Kvalitativní a kvantitativní charakteristika spermatu polyploidních jeseterů (*Acipenseridae*).

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem práce bude zjištění kvalitativní a kvantitativní charakteristiky spermatu polyploidních jeseterů (*Acipenseridae*) jako jednoho z nástrojů udržení diverzity těchto světově ohrožených druhů ryb, se zvláštním zřetelem k možnostem jejich spontánní polyploidizace a hybridizace.

Diplomant si osvojí základy odběru, uchovávání a vyšetřování spermatu podle prováděcí vyhlášky MZe ČR č. 471/2000 Sb. k plemenářskému zákonu. Naučí se stanovit koncentraci spermií, osmotickou koncentraci spermatu, pohyblivost spermií a jejich cytometrické charakteristiky. Naučí se používat techniky fluorescenčního barvení, metodu počítačové analýzy mikroskopického obrazu k hodnocení spermií a metodu hodnocení akrosomové reakce. K vyhodnocení výsledků bude diplomant používat odpovídající statistický software. Diplomant si dále osvojí studium odborných anglických textů.

Qualitative and quantitative characteristics of polyploid sturgeon sperm (*Acipenseridae*)

This thesis is aimed to compare 4n sterlet (*Acipenser ruthenus*) and 8n and 12n siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) sperm. Relative quantitative values and % of live spermatozoa as a qualitative factor have been compared between species. At the same time influences of four different types of substances (CPE, Ovopel, GnRHa25 and GnRHa75) on sperm quality were compared.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění je elektronickou formou v databázi STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

18.4. 2010

Jan Kašpar

Je mi ctí na tomto místě poděkovat svému vedoucímu práce doc. Ing. Martinovi Flajšhansovi, Dr.rer.agr. za odborné vedení a především za poustevnickou trpělivost během naší spolupráce. Stejně tak bych rád poděkoval Ing. Martinovi Pšeničkovi PhD. za cenné rady a připomínky při práci. Za pomoc při práci se vzorky v laboratoři oddělení genetiky bych také rád poděkoval Ing. Markovi Rodinovi PhD., Ing. Vojtěchu Kašparovi, paní Marii Pečené a paní Ivě Samkové.

Děkuji

OBSAH

1. Úvod.....1
2. Cíl práce.....1
3. Literární přehled.....2
3.1 Základní biologické a reprodukční charakteristiky jeseterovitých *(Acipenseridae)*.....2
3.1.1 Systematické zařazení jeseterovitých.....2
3.1.1.1 Čeleď *Acipenseridae*.....3
3.1.1.2 Rod Acipenser.....3
3.1.1.2.1 *Acipenser rhutenus*.....4
3.1.1.2.1 *Acipenser baerii*.....4
3.1.2 Polyploidie u jeseterů.....5
3.1.3 Obecná reprodukční biologie jeseterů.....5
3.1.4 Charakteristika spermatu jeseterů.....6
3.1.4.1 Semenná plasma.....6
3.1.4.2 Koncentrace spermií.....7
3.1.4.3 Aktivace a pohyblivost spermií.....8
3.1.4.4 Základní rozdíly mezi spermiemi chrupavčitých a kostnatých ryb...9
3.1.5 Struktura spermií jeseterů.....10
3.1.5.1 Akrosom.....11
3.1.5.2 Hlavička.....11
3.1.5.3 Endonukleární kanálky.....12
3.1.5.4 Střední oddíl.....12
3.1.5.5 Bičík.....13
4. Materiál a metodika.....14
4.1 Fixace vzorku spermií pro počítání koncentrace a následná ředění.....16
4.2 Určení věku ryb.....17
4.3 Fluorescenční stanovení ž/m spermií metodou dvojího barvení.....17
4.3.1 Postup stanovení ž/m spermií.....17
4.3.2 Vyhodnocování poměru ž/m spermií.....19

5. Vlastní výsledky a vyhodnocení.....20
6. Diskuze.....37
7. Souhrn 40
8. Literární seznam……..….42

1.ÚVOD

Čeleď jeseteři (Acipenseridae) je významnou především svou obrovskou variabilitou ploidních úrovní jednotlivých druhů a možností jejich vzájemných kombinací, přičemž se ne vždy potvrzují známá pravidla o plodnosti či neplodnosti jednotlivých hybridů. Je nasnadě, že málokterá rybí čeleď (rod) se může holedbat svou existencí na Zemi již od jury (druhohory), což je zhruba 200 milionu let. Za tak dlouhou dobu měli jeseteři dostatek času, aby přizpůsobili své genetické založení měnícím se podmínkám a zjištěná přítomnost mikrochromosomů v jejich genetické struktuře nám dává veliký prostor k diskuzím ohledně jejich významu a vlivu na jednotlivé druhy jako takové. Je zajímavá hypotéza, že primitivní druhy mají větší objem DNA než druhy mladé a více specializované. Navíc, životaschopnost a oplození schopnost jeseteřích spermií je do značné míry ovlivňována přítomností akrosomu, fungujícího jako jakási „kotva“. Poškození nebo nefunkčnost akrosomu ovlivňuje kvalitu spermatu jako takového.

Vzhledem k růstovým schopnostem jeseterů, vzrůstající oblibě chovu, zvyšující se poptávce po jejich mase, kvalitním kaviáru, a v neposlední řadě také možnosti využití dosažených znalostí k záchraně druhů již takřka vymřelých např. vyzy velké (*Huso huso L. 1758*), je dokonalá znalost charakteristik pohlavních produktů těchto ryb základním předpokladem pro vítězné tažení na poli výzkumu a následnou úspěšnou aplikací znalostí do praxe.

2.CÍL PRÁCE

Cílem práce je zjištění kvalitativní a kvantitativní charakteristiky spermatu polyploidních jeseterů (*Acipenseridae*) jako jednoho z nástrojů udržení diverzity těchto světově ohrožených druhů ryb, se zvláštním zřetelem k možnostem jejich spontánní polyploidizace a hybridizace.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 ZÁKLADNÍ BIOLOGICKÉ A REPRODUKČNÍ CHARAKTERISTIKY JESETEROVITÝCH (*ACIPENSERIDAE*)

3.1.1 SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ JESETEROVITÝCH

Taxonomické zařazení:

- Kmen : Strunatci (*Chordata*)
- Podkmen : Obratlovci (*Vertebrata*)
- Třída : Ryby (*Osteichthyes*)
- Nadřád : Chrupavčití (*Chondrostei*)
- Řád : Jeseteři (*Acipenseriformes*)

Řád se vyznačuje protáhlým, vřetenovitým tvarem těla, v zadní části zploštělým, pokrytým 5 řadami kostěných štítků. Horní lalok ocasní ploutve je pokryt zvláštním typem ganoidních šupin (*fulcrae*), které mají tvar obráceného v. Pod nimi po stranách vzhůru ohnuté distální části ocasního násadce jsou ganoidní kosočtverečné šupiny. Ocasní ploutev je heterocerkní, ale u některých druhů je mohutně vyvinut dolní lalok a vzbuzuje dojem ploutve homocerní. Chorda je zachována a není zaškrcována. Primordiální lebka je chrupavčitá, obsahuje jen několik zkostnatělých částí, nikdy není zkostnatělá souvisle. Těla obratlů chybí, žebra jsou spodní, podpůrná kostra hřbetní a řitní ploutve je chrupavčitá, na každé z radiálií těchto ploutví sedí několik těsně spojených paprsků. Jedná se převážně o diadromní, ale i sladkovodní ryby Eurasie a Severní Ameriky (Baruš et al., 1995).

Dělí se na tři čeledí: 1) *Chondrosteidae* - vyhynulá, známa od spodního triasu po svrchní křídu

2) *Polyodontidae* - žijící v Severní Americe

3) *Acipenseridae* - žijící v Euroasii a Severní Americe

3.1.1.1 ČELEĎ *ACIPENSERIDAE (BERG, 1911: 129)*

Vřetenovité tělo nese 5 řad kostěných štítků – jednu hřbetní, dvě boční a dvě břišní (u starších jedinců chybějí). Mezi nimi jsou obvykle malé kostěné struktury v podobě zrnek nebo destiček.Ganoinový povlak exoskeletonu během fylogenetického vývoje u jeseterovitých vymizel a je nahrazen pojivem kostěným. Ocasní ploutev je heterocerkní, se zvláštní typem šupin (*fulcrae*) na jejím horním laloku. Zadní konec ocasního násadce pokrývají kosočtverečné šupiny. Rypec je kuželovitý až lopatkovitý se 4 vousky na spodní straně v příčně stojící řadě. Spodní ústa mají tvar štěrbiny (popř. obloukovitá) s masitými pysky, které mohou vybíhat až na boky hlavy. Čelisti jsou vysunovatelné, bezzubé. Víčková kost a paprsky žaberní blány chybí. Hřbetní ploutev je posunuta do poslední třetiny těla, za insercí břišních ploutví. První paprsek prsních ploutví je přeměněn v tvrdý trn.

Jsou známé 4 rody, které se dělí do 2 podčeledí : 1) *Acipenserinae*

2) *Scaphirhynchinae*

Charakteristickou zvláštností diadromních druhů je vytváření sezónních ras. Jarní rasa je velikostně menší, vstupuje z moře do řek na jaře a tře se na jaře a v létě téhož roku. Trdliště jsou rozložena poblíž ústí řek. Podzimní rasa je větší, do řek vstupuje na podzim, přezimuje zde a na jaře pokračuje v tahu.Vytírá se ve větších vzdálenostech od ústí (Baruš et al., 1995).

3.1.1.2 ROD ACIPENSER (LINNAEUS, 1758)

Žaberní blána je přirostlá ke spodní části hlavy a mezi jejími okraji je mezera bez záhybu. Ústa ve tvaru příčné štěrbiny, malá, vysunovaná. Rypec kuželovitý až mečovitý.Vousky jsou na průřezu kruhové. Je známo 16 sladkovodních a diadromních druhů rozšířených v Evropě, severní Asii a Severní Americe (Baruš et al., 1995). V této studii se budeme zabývat jeseterem malým *(Acipenser ruthenus)* a jeseterem sibiřským (*Acipenser baerii).*

3.1.1.2.1 ACIPENSER RUTHENUS (Linnaeus 1758)

Nejmenší příslušník podčeledi Acipenserinae, obvykle nedosahuje větší délky než 700mm a hmotnosti 6 - 6,5 kg. Byly však zaznamenáni jedinci o délce až 1250mm a hmotnosti 17kg (Baruš et al., 1995). Tělo jesetera malého je protáhlé, relativně nízké, dolní ret je rozpolcený, vousky na průřezu okrouhlé, krátké, na vnitřní straně zpravidla obrvené. Natažené dosahují až k přednímu okraji úst. Profil hřbetu a hlavy je konkávní, štítky mají dlouhý, dozadu obrácený hrot, přesahující základnu štítku. Boční štítky mají kosočtvercový tvar a vzájemně se překrývají. Hřbetní strana je šedohnědá nebo zelenohnědá, břišní strana je žlutavá nebo špinavě šedá, někdy narůžovělá. Hřbetní a řitní ploutev je rezavě červená, ostatní popelavě šedé. Boční a břišní štítky jsou bělavé, hřbetní žlutavé (Baruš et al., 1995) Ploutevní vzorec je D 32-48, A 16-30, hřbetních štítků je 10-17, bočních 56-71, břišních 11-18, počet žaberních tyčinek 14 – 26, počet fulker 25-45.

Karyotyp uvádí Fontana a kol., (1975) 2n=116±4; 66 m+sm, 40 a+mc, 172 FN. K podobným závěrům došel i Ráb a kol., (1996) 2n=118±4; 58 m+sm, 4a, 52-60 mc

3.1.1.2.2 ACIPENSER BAERII (Brandt 1869)

Maximální velikost tohoto zástupce jeseterovitých je uváděna 2 m o hmotnosti 210kg, nicméně v praxi většinou nepřesahuje 65kg, v ruském veletoku Lena běžně nepřesahuje 16kg. Rypec a ocasní násadec je téměř kuželovitý. Ústa ve tvaru příčné štěrbiny, opatřena hladkými, občas řasnatými vousky. Délka rypce je velmi variabilní, dosahuje 33,3 – 61% délky hlavy. Ploutevní vzorec je D:30-56. A:17-33, hřbetních štítků je 10-12, bočních 32-62 a 7-16(20) břišních. Mezi jednotlivými řadami štítků, je roztroušeno poměrně hodně malých kostěných destiček. Zbarvení může být velmi variabilní. Od světle šedé po tmavě hnědou na hřbetě a bocích a od bílé po žlutavou na břišní straně. Pohlavní dospělosti většinou nedosahuje dříve než v 9-10 letech.

Karyoptyp je 2n=246±8; 98 m+sm, 150 a+mc, 346 FN (Fontana, 1994)

3.1.2 POLYPLOIDIE U JESETERŮ

Většina mnohobuněčných organismů je diploidních, tj. jejich genetická informace obsahuje 2 sady chromozómů. Během gametogeneze dochází k meiotickému buněčnému dělení, zahrnující dvě následná jaderná dělení, přičemž však dochází pouze k jedné replikaci DNA, což umožňuje segregaci jedné kopie každého homologního chromozómu do každé nové gamety. Každá pohlavní buňka je tedy haploidní a nový organismus, vzniklý splynutím 2 pohlavních buněk, je opět diploidní. Během procesu gametogeneze však může dojít k různým poruchám, které způsobí zmnožení celé chromozómové sady, ať už uměle vyvolaných , za účelnou produkcí např. triploidních jedinců, nebo vzniklých přirozenou cestou. Jeseteři patří do skupiny evolučních polyploidů, tedy jedinců, u nichž došlo k polyploidizaci (u některých druhů i opakovaně) během evoluce druhů (Pšenička a kol., 2009). První údaje o množství DNA v jádře buněk jeseterů pocházejí z 50. let 20. století. Bylo pozorováno, že množství DNA u jesetera malého je 3,2 pg v buněčném jádře, což je mnohem více než bylo předchozími pokusy zjištěno u kostnatých ryb. Toto zjištěná vedlo k hypotéze, že primitivnější druhy mají větší obsah DNA než druhy více specializované (Fontana at al., 2007). Během dalších let mnoho autorů (Ohno et al., 1969 a další) počítalo chromozómy a jak se zvyšovala kvalita přístrojů a technik preparace, upřesňoval se i počet zjištěných chromozómů, včetně důležitého faktu, kterým bylo objevení vysokého počtu mikrochromozómů (Fontana at al., 2007). Následovala měření, která směřovala k hypotéze, že jeseteři disponují někdy až několikráte zmnoženými sadami chromosómů, přičemž se logicky zvyšovala i velikost pohlavních produktů (Flajšhans a kol., 2009).

Jeseter malý je popisován jako evoluční tetraploid (4n), respektive funkční diploid (2n) a jeseter sibiřský jako evoluční oktaploid (8n), resp. funkční tetraploid (4n). U tohoto druhu byl zjištěn dokonce i jedinec disponující úrovní 12n podle evoluční polyploidie, resp. 6n podle funkční polyploidie (Pšenička a kol., 2009).

3.1.3.OBECNÁ REPRODUKČNÍ BIOLOGIE JESETERŮ

V našich podmínkách nebylo studováno. Pokud není uvedeno jinak, jsou informace čerpány z internetových stránek FAO Fisheries & Aquaculture – Species fact sheets dostupné z http://www.fao.org/fishery/species/2879/en pro jesetera sibiřského a z http://www.fao.org/fishery/species/2070/en pro jesetera malého.

Jeseteři jsou obecně poměrně dlouhověké ryby, což se částečně odráží i na věku pohlavní dospělosti. Jeseter malý je svou délkou života v porovnání s ostatními druhy jeseterů poměrně krátkověký. Jeho průměrný maximální věk se pohybuje okolo 22 – 24 let, přičemž samice se obyčejně dožívají vyššího věku než samci. Ti dosahují pohlavní dospělosti ve věku 3-6 let, o rok až dva dříve než samice. Ve srovnání s jeseterem sibiřským, dospívajícím až kolem 10 roku, se jedná o pohlavně velmi ranný druh. Pro oba druhy je typická předvýtěrová migrace proti proudu řek v období velkých jarních záplav během dubna, května, června. Samci dosahují místa výtěru o něco dříve než samice. Jeseter malý se vytírá při teplotách 12°C – 17 °C, jeseter sibiřský má poněkud větší teplotní toleranci a tře se v rozmezí 9°C – 18°C. Akt reprodukce trvá až 45 dní a je přerušováno jen pokud dojde během výtěru k náhlému zvýšení vodních stavů nebo ke zvýšení teploty vody na 20°C. (Baruš et al., 1995). Tito autoři dále uvádí, že reprodukce probíhá v proudnici řeky a v místě reprodukce není proudění nižší než 1,9 – 2 $m.s^{-1}$.

Mladší ročníky jesetera malého se rozmnožují každoročně. U samic starších 7 let však dochází k pauzám a k reprodukci dochází jednou za dva až tři roky. U jesetera sibiřského jsou tyto intervaly delší. U samic představuje pauza minimálně tři až pět let, u samců dva až tři roky než jsou opět připraveni ke reprodukci.

3.1.4. CHARAKTERISTIKA SPERMATU JESETERŮ

Sperma jako takové se skládá z tekuté složky - semenné plasmy, plnící především funkci ochrannou a spermií jakožto nositelek poloviční genetické informace. Všechny vlastnosti spermatu jsou druhově velmi specifické a jejich dokonalé poznání nám umožňuje manipulovat se spermatem více méně dle momentálních potřeb.

3.1.4.1 SEMENNÁ PLASMA

Spermie ryb jsou v prostředí semenné plasmy neaktivní (Alavi et al., 2007). Tato důležitá inhibiční funkce je ještě navíc doplněna o funkci ochrannou a vyživovací. Procentuální zastoupení jednotlivých složek je druhově specifické. Hlavními sledovanými prvky jsou ionty sodíku (Na^+), draslíku (K^+), hořčíku (Mg^{2+}) a vápníku (Ca^{2+}) u některých druhů, především lososovitých, má větší význam i

koncentrace chloridových iontů (Cl^-). (Linhart, Šlechta, Slavík, 1991). Koncentrace těchto prvků je potom jedním z činitelů ovlivňujících rychlost a dobu pohyblivosti spermií. Pšenička a kol., (2008) se ve své studii zabýval porovnáním spermatu jesetera malého a jesetera sibiřského, přičemž vycházeli z následujících hodnot pro Ca^{2+}, Na^+, K^+ Cl^- : 8.16 ± 0.18, 77.20 ± 52.28, 0.24 ± 0.06, 31.39 ± 10.21, 3.51 ± 1.10, 14.00 ± 4.30 pro jesetera sibiřského a 0.41 ± 0.32 · 109, 8.13 ± 0.19, 50.74 ± 6.27, 0.16 ± 0.11, 20.11 ± 3.78,1.26 ± 0.54, 6.11 ± 0.60 pro jesetera malého. Výsledkem studie bylo zjištění, že se dané hodnoty znatelně rozcházejí v případě sodných, draselných a chloridových iontů a následně i v rychlosti pohybu. Procento pohyblivosti bylo u obou druhů srovnatelné, bez větších odchylek. Alavi a Cosson (2006) zjistili, že klíčovým prvkem je obsah draselných iontů a jejich kombinace s výší osmotického tlaku. Přesněji řečeno, draselné ionty působí na spermie jako inhibitor.

3.1.4.2 KONCENTRACE SPERMIÍ

Koncentrace spermií v semenné plasmě je klíčovým faktorem ovlivňujícím hustotu spermatu. Koncentrace spermií jesetera malého a sibiřského se lehce různí a dosahuje hodnot 2.42 ± 0.78 x $\times 10^9$ ml^{-1} pro jesetera sibiřského a 0.55 ± 0.14 x $\times 10^9$ ml^{-1} pro jesetera malého (Piros a kol., 2002). Na opačném konci druhové specifické koncentrační řady by mohlo být např. sperma okouna říčního o koncentraci spermií 65, 625 x $\times 10^9$ ml^{-1} (Kašpar, 2007). Manipulace s takto hustým spermatem je v praxi velmi obtížná a před vlastním použitím se doporučuje jej zředit. Nejběžnějším postupem je tzv. dvou kroková metoda ředění. V první fázi se sperma naředí v poměru 1 : 50 neaktivačním roztokem a poté se dále ředí dle potřeby (Alavi et al., 2007). U spermatu jeseterů potřeba ředění prakticky odpadá, popř. se zkracuje pouze na jeden krok. Koncentrace spermií u některých dalších druhů ryb zmiňuje Alavi a kol., (2007) např. mořčák evropský *(Dicentrarchus labrax)* má hustotu spermií až 50 x $10^9 ml^{-1}$. Z našich ryb je třeba uvést alespoň kapra obecného (*Cyprinus carpio*) s jeho 14 až 35 x $10^9 ml^{-1}$ (Kašpar, 2007).

3.1.4.3 AKTIVACE A POHYBLIVOST SPERMIÍ

K aktivaci spermií dochází v okamžiku změny osmotického tlaku a změny koncentrace iontů. Pšenička a kol. (2010) uvádí optimální složení v roztoku pro aktivaci spermií jesetera sibiřského 2.5 mM $CaCl_2$, pH 10, 15 mM Tris. Nejvyšší sledovaná pohyblivost u jesetera perského *(Acipenser persicus)* byla zaznamenána při následujícím složení aktivačního roztoku: 25mM NaCl, 0.2mM KCl, 3mM $CaSO_4$, 10mM $MgSO_4$ (Alavi a kol., 2004). Dále uvádí, že koncentrace větší než 50mM Na^+, 1mM K^+ , 3mM Ca^{2+} a 10mM Mg^{2+} má negativní efekt na pohyblivost. Pro prodloužení doby pohyblivosti a zvýšení % spermií, které jsou schopny aktivovat akrosom je doporučeno použít roztok s přídavkem $MgSO_4$ (Lahnesteiner a kol., 2004).

Billard a kol., (1999) provedli studii spermatu jesetera sibiřského a došli k závěru, že několik vteřin po aktivaci je zhruba 90% spermií aktivních a po 2 minutách se počet pohybujících se buněk sníží na 10-20%. Přičemž se zároveň rapidně sníží obsah ATP z 7.58 ± 1.85 na 4.05 ±1.51 nmol.10^{-8} spermií během 5 vteřin. Zároveň bylo zjištěno, že pokud byly spermie ponechány 24 hodin v genitálním traktu samců, došlo k prakticky nulovému poklesu pohyblivosti. Pokud ovšem byly spermie uchovány po stejnou dobu při 4°C, došlo k vysokému snížení procenta pohyblivých spermií z 82 ± 14 to 59 ± 30 a snížení obsahu ATP z 6.15 ± 2.4 to 1.95 ± 1.37 nmol.10^{-8} spermií (Billard a kol., 1999).

Doba pohyblivosti jak ryb kostnatých tak chrupavčitých je považována za druhově specifickou záležitost a pohybuje se od několika desítek vteřin např. okoun říční *(Perca fluviatilis)* má pohyblivost spermií ve velmi kvalitních vzorcích cca 35 vteřin (Alavi et al., 2007). Rurangwa a kol., (2004) naproti tomu uvádí u tresky obecné *(Gadus morhua)* pohyblivost až 60 minut. Detlaff a kol., (1993) dokonce popisují, že spermie některých druhů ryb(jeseterů) jsou schopny si zachovat pohyblivost až po dobu několika hodin. U našich původních druhů se doba pohyblivosti pohybuje řádově ve vteřinách až minutách. Jak uvádí Kašpar (2007) např. u pstruha potočního (*Salmo trutta* m. *fario*) se spermie po přidání vody začne pohybovat nejprve rychlostí 130µm.s^{-1}. Po uplynutí 15 vteřin se jejich rychlost snižuje na 44µm.s^{-1} a po uplynutí dalších 15 – 20 s pohyb ustává úplně (Baruš et al., 1995). Pro orientaci a srovnání je uvedeno ještě několik dalších příkladů: hlavatka podunajská (*Hucho hucho*) 45s, parma obecná *(Barbus barbus*)1-2 minuty, kapr obecný (*Cyprinus carpio L.*) až 5 minut (Baruš et al., 1995).

3.1.4.4 ZÁKLADNÍ ROZDÍLY MEZI SPERMIEMI CHRUPAVČITÝCH A KOSTNATÝCH RYB

Proti většině kostnatých ryb mají chrupavčité ryby spermii strukturovanější a s akrosomem. Akrosom je váček v anteriorní části hlavičky sloužící k průniku přes vaječné obaly. Paradoxně, jikry chrupavčitých ryb se vyznačují vyšším množstvím mikropylárních otvorů, což jsou otvory ve vajíčku sloužící k průniku spermie (Ginsburg, 1968). U jeseterů je počet mikropylí nejen vyšší, ale také velmi variabilní jak v rámci jedince, tak i druhu j. malý 5-13, j. sibiřský 2-10, j. hvězdnatý(*Acipenser stellatus*) 1-13 mikropylí, j. ruský (*Acipenser gueldenstaedti*) až 52 (Dettlaff a kol., 1993, Pšenička a kol., 2010). Jeseterovité ryby tudíž akrosom teoreticky k vlastnímu průniku nepotřebují. Průměr mikropyle u j. sibiřského (Pšenička, nepublikovaná data) i kapra obecného (Kudo, 1980) umožňuje průnik pouze jedné spermie, čímž se do značné míry redukuje možnost polyspermie. V akrosomálním váčku chrupavčitých ryb jsou také přítomny hydrolytické enzymy, zejména pak serinové proteinasy akrosinového typu, jejichž význam v oplození u ryb nebyl zatím zcela objasněn (Psenicka et al., 2007)

Naproti tomu kostnaté ryby se vyznačují jednoduchou stavbou spermie tzv. „aqua sperm“ (Jamieson, 1991), postrádající akrosom. Absence akrosomu je u kostnatých ryb vynahrazena mikropylí.

Velikost spermií je velmi rozmanitá a zvláště velikost hlavičky je závislá především na druhu a ploidní úrovni, resp. množství genetického materiálu, kterým disponuje (Linhart a kol., 2006; Flajšhans a kol., 2009; Pšenička a kol., 2009). Flajšhans a kol. (2009) a Pšenička a kol. (2009) popisují závislost velikosti hlavičky spermií jesetera sibiřského na ploidní úrovni.

	6n			4n		
	N	průměr	SD	N	průměr	SD
Délka akrosomu (μm)	30	1.84	1.50	220	1.28	0.15
Šířka akrosomu (μm)	30	1.34	0.11	223	0.93	0.13
Délka hlavičky bez akrosomu a střední části (μm)	30	8.32	3.89	226	6.11	0.83
Šířka přední části hlavičky (μm)	30	1.53	0.75	223	1.05	0.12
Šířka střední části hlavičky (μm)	30	2.00	1.24	223	1.37	0.12

	6n			4n		
	N	průměr	SD	N	průměr	SD
Šířka koncové části hlavičky (μm)	30	2.05	1.02	221	1.42	0.16
Délka střední části (μm)	30	1.87	1.30	216	1.80	0.42
Šířka přední části střední části (μm)	30	1.57	0.82	214	0.93	0.25
Šířka střední části střední části (μm)	30	0.95	0.80	215	0.66	0.19
Délka bičíku (μm)	30	50.54	4.18	171	46.46	6.22
Množství mitochondrií (% střední části)	49	51.23	5.58	109	43.67	3.49

N – počet měření

SD – směrodatná odchylka .

Jeseter ostrorypý (*Acipenser oxyrhynchus)* má ze spermií všech jeseterů nejmenší známou délku hlavičky 3,02 μm (DiLauro a kol., 1998). Největší popsanou hlavičku z jeseterovitých má spermie jesetera bílého, 10,52 μm (Cherr a Clark, 1985). Hlavička spermie jesetera sibiřského byla 7,01 ± 0,83 μm dlouhá a tvarově podobná jako spermie ostatních chrupavčitých druhů (Pšenička a kol., 2007a), tedy protáhlá, se třemi endonukleárními kanálky a zakončena akrosomem.

Naproti tomu u kostnatých ryb má například. hlavička spermie lína obecného (*Tinca tinca)* téměř kulatý tvar hlavičky a 1,71 μm v průměru. Tímto rozměrem a s délkou bičíku 25.41 μm patří k nejmenším popsaným spermiím ryb (Pšenička a kol., 2006). Hlavička spermie kapra obecného (*Cyprinus carpio*) má velikost 2 – 2,5 x 3 μm (Billard, 1970), oukleje obecné (*Alburnus alburnus)* 2 μm, parmy obecné (*Barbus bambus)* a tlouště obecného (*Leuciscus cephalus)* 1,8 μm (Baccetti a kol., 1984; Alavi a kol., 2007).

3.1.5 STRUKTURA SPERMIÍ JESETERŮ

Spermie jeseterů se obecně skládají ze tří hlavních částí. Protáhlé hlavičky s akrosomem, na níž jsou jasně patrné většinou 3 spirálovitě uspořádané endonukleární kanálky, cylindrické střední části a dlouhého bičíku složeného z 9+2 mikrotubulů s laterálními lemy (Dettlaff a kol., 1993; Pšenička a kol., 2007a).

3.1.5.1 AKROSOM

Akrosom vzniká během spermateliosy z Golgiho aparátu. Skládá se ze subakrosomální části, která nasedá na jadernou membránu, a vlastního akrosomu. Ten překrývá subakrosom a jeho posteriorní část přechází v tzv. posterolaterální výběžky (PLV) (Psenicka et al., 2007)

Tito autoři se domnívají, že slouží jako jakási „kotva“ a v okamžiku průchodu mikropylárním otvorem se tyto výběžky začnou roztahovat a zabrání tak zpětnému pohybu spermie. Průkazný je tento jev např. u j. sibiřského, kdy u neaktivních spermií byla naměřena vzdálenost PLV 0,14±0,04 µm a u spermií procházejících mikropylárním otvorem 0,20±0,16 µm (Pšenička a kol., 2007). Velikost akrosomu zahrnuje poměrně veliký rozptyl v závislosti na druhu, např. u jesetera sibiřského 0.93 ± 0.12 µm až 0.95 ± 0.17 µm (Psenicka et al., 2007), u jesetera bílého (Acipenser *transmonatus)* 1.31 µm až 1.34 µm (Cherr a Clark, 1984), u jesetera čínského (*Acipenser sinensis)* 0.54 (0.15) µm až 0.68 (0.06) µm (Wei et al. (2007). Současně se liší i počet PVL u jednotlivých druhů. Pšenička a kol. (2008a) uvádí u jesetera malého 9-10, u j. sibiřského potom 10 pravotočivých PLV při délce 600 nm.

3.1.5.2 HLAVIČKA

U jeseterů se hlavičky jednotlivých druhů liší zvláště počtem PVL, počtem endonukleárních kanálků, jejichž počet může být různý, nejčastěji 3 (Pšenička a kol., 2009) a morfometrickými vlastnostmi. Velikost je velmi variabilní a zatímco jeseter bílý se může holedbat hlavičkou o délce 10,52 µm (Cherr a Clark, 1985), jeseter ostrorypý se musí smířit s pouhými 3,02 µm. Délka hlavičky u jesetera sibiřského je uváděna Pšeničkou a kol. (2007a) 7,01 ± 0,83 µm (včetně akrosomu a středního dílu), délka stejných částí spermie jesetera malého je 5.14±0.42µm (Pšenička a kol., 2008a).

Převážná část hlavičky spermie obsahuje jádro, jehož objem se s rostoucí ploidní úrovní zvyšuje (Pšenička a kol., 2009)..

3.1.5.3 ENDONUKLEÁRNÍ KANÁLKY

Jak popisuje Pšenička a kol. (2007a), endonukleární kanálky procházejí středem jádra od implantační jamky hlavičky po akrosom. Většina chrupavčitých ryb má 3 endonukleární kanálky (Pšenička a kol., 2007a), nicméně např. jeseter ostrorypý má endonukleární kanálky pouze 2 (Pšenička, 2007) a u některých jedinců jesetera sibiřského byly naopak nalezeny kanálky 4 (Pšenička a kol. 2008a). Funkci spojení endonukleárních kanálků s centriolou ve středním oddílu plní implantační jamka, což je dutinka v centrální poloze posteriorní části jádra (Pšenička a kol., 2007, Wei a kol., 2007a). Pšenička a kol. (2007b), prokázali přítomnost akrosinu pomocí značení pro TEM na obou koncích vyústění endonukleárních kanálků – jak do akrosomu, tak do implantační jamky. Lze tedy říci, že implantační jamka komunikuje s akrosomem pomocí endonukleárních kanálků a může se tak podílet na formování tzv. fertilizačního filamentu, což je kopí připomínající látka bílkovinného charakteru sloužící jako harpuna při penetraci do jikry a zrychlující impuls pro vytvoření perivitelinního prostoru, bránícímu proniknutí dalších spermií (Pšenička, 2007).

3.1.5.4 STŘEDNÍ ODDÍL

Centriolární komplex, složený z proximální a distální centrioly, svírá úhel 90° a napojení bičíku na hlavičku je u chrupavčitých ryb symetrické (Pšenička a kol., 2007a), na rozdíl např. od kaprovitých ryb, kdy je napojení asymetrické a úhel svíraný centriolárním komplexem se značně u jednotlivých druhů liší. U lína obecného *(Tinca tinca)* svírá úhel 140°(Pšenička a kol., 2006), u karase stříbřitého *(Carassius auratus)* je to potom 125°(Baccetti a kol., 1984). Stejně tak jsou potom patrné rozdíly v počtu a způsobu rozmístění mitochondrií. Počet mitochondrií je značně variabilní. Např. podoustev říční *(Chondrostoma nasus)* má většinou 5-6 mitochondrií (Furbock a kol., 2008), karas stříbřitý pouze jednou mitochondrií (Baccetti a kol., 1984). U chrupavčitých ryb je počet mitochondrií 3 -8 a jsou rovnoměrně rozloženy po obvodu bičíku. (Pšenička a kol., 2007a). Fakt, že např. u kaprovitých ryb jsou často přiloženy jen z jedné strany, jak je tomu např. u lína, což dokládá ve své práci Pšenička a kol.(2006), nám ještě více podtrhuje symetrické uspořádání u chrupavčitých a asymetrické u kaprovitých ryb.

3.1.5.5 BIČÍK

Většina spermií má bičík tvořený axonémou (fibrilární část) s 9+2 mikrotubuly (devět periferních dublet a jeden centrální pár mikrotubulů).Výjimku tvoří A*nguilliformes,* u kterých je axonéma tvořena pouze periferními mikrotubuly (bez centrálních) (Billard a Ginsburg, 1973; Mattei a Mattei, 1975). Tyto spermie jsou pohyblivé, přestože vnější dyneínová raménka chybí (Baccetti a kol., 1979) Typickým zástupcem tohoto zvláštního typu uspořádání je úhoř říční (*Anquilla anquilla*) (Todd, 1976) a úhořovec hvězdnatý *(Conger myriaster)*(Okamura a Motonobu, 1999).

U spermií chrupavčitých ryb stejně jako u kostnatých byly nalezeny statistické rozdíly u šířky periferních a distálních mikrotubulů (Pšenička a kol., 2006, 2007a). Ty vychází ze systému spojení, neboť periferní mikrotubuly mají společnou stěnu. Skládají se ze dvou subjednotek A a B. Subjednotka A je kompletní mikrotubul a subjednotka B pouze část ve tvaru písmene C. Centrální pár mikrotubulů má kompletní subjednotky, které jsou spojeny můstky a obaleny spirálou centrální pochvy (Amelar a kol., 1980).

Dalším specifikem je tvorba jednoho nebo dvou lemů, přítomných u některých čeledí např. *Poeciliidae* (Nicander, 1970; Lanhsteiner, a kol., 1997) Podle Lowmana (1953) jsou tyto lemy formovány do spirály, která na bičíku tvoří 12 – 15 otáček. Takovéto lemy byly pozorovány rovněž u spermií chrupavčitých, ale bez otáček. Pšenička a kol. (2008a) prokázal, že když vezmeme v úvahu, že jsou tyto lemy vždy vodorovné s osou centrálních mikrotubulů a tedy i tyto mikrotubuly jsou v jedné rovině, nejsou lemy chrupavčitých ryb stočeny do spirály jako u jiných druhů. Jeseter malý má tento lem široký průměrně 568 nm a j. sibiřský 706 nm. Tyto lemy se napojují k bičíku postupně. První se u j. sibiřského napojoval průměrně 3,4 μm za středním oddílem a druhý 5,1 μm. Ukončování těchto lemů bylo plynulé (Pšenička a kol., 2008a).

4. MATERIÁL A METODIKA

Všechny odebírané druhy ryb jsou chovány na líhni FROV JU ve Vodňanech. V rámci této práce se jednalo o jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) jako zástupce evolučně tetraploidních jeseterů (4n) a o jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) jako zástupce evolučně oktaploidních jeseterů (8n). Část ryb původně pocházela z chovu Rybářství Hluboká cz. s.r.o. v Mydlovarech, část byla zakoupena od německé firmy Fischzucht Gross a 2 ks pocházejí z odchovu FROV JU. Věk ryb se pohybuje mezi 6 a 14 lety. K pokusu bylo použito čerstvé sperma 51 ks jeseterů: 42 ks samců jesetera malého a 9 ks samců jesetera sibiřského. Práce byla rozdělena do 3 částí.

1) Odběr spermatu
2) Práce v laboratoři – počítání koncentrace, stanovení poměru ž/m spermií,
3) Statistické vyhodnocení

Odběr spermatu probíhal v období březen-květen 2009 na líhni FROV JU ve Vodňanech. Přehled odběrů shrnuje následující tabulka.

Tab. č. 1 Přehled odběrů

Datum odběru	Druh	ks
25.3.	Jeseter malý	16
26.3.	Jeseter malý	20
27.3.	Jeseter malý	20
16.4.	Jeseter malý + jeseter sibiřský	7 + 6
13.5.	Jeseter malý + jeseter sibiřský	8 + 7

Tab. č. 2 Seznam vzorkovaných ryb

Chip	Druh	Kód	Stáří (roky)
2108	*A. baerii*	JSIB-VO-95/ 1-411A33583A	14
2107	*A. baerii*	JSIB-VO-95/ 1-411A2D4D2D	14
2112	*A. baerii*	JSIB-VO-95/ 1-411A20764E	14
2115	*A. baerii*	JSIB-VO-04/ 1-42672C7C30	5
2118	*A. baerii*	JSIB-HL-03/ 1-968000003816513	6
2119	*A. baerii*	JSIB-HL-03/ 1-968000003813440	6
2120	*A. baerii*	JSIB-HL-03/ 1-968000003823999	6
2125	*A. baerii*	JSIB-HL-03/ 1-968000003823942	6
2131	*A. baerii*	JSIB-VO-04/ 1-4266700F11	5
4002	*A. ruthenus*	JMAL-VO-98/ 1-42664E4769	11
4004	*A. ruthenus*	JMAL-HL-02/ 1-968000002240861	7
4010	*A. ruthenus*	JMAL-HL-02/ 1-968000002256356	7
4012	*A. ruthenus*	JMAL-HL-02/ 1-968000002253235	7
4024	*A. ruthenus*	JMAL-HL-02/ 1-968000003816877	7
4025	*A. ruthenus*	JMAL-HL-02/ 1-968000003822986	7
4039	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001692448	6

4044	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001691565	6
4047	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001690504	6
4051	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001690263	6
4052	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001691650	6
4054	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001694734	6
4057	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001686390	6
4060	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001688360	6
4067	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001692543	6
4070	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001694173	6
4081	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001691821	6
4092	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001685504	6
4095	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001687606	6
4098	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001693056	6
4101	*A. ruthenus*	JMAL-HL-02/ 1-968000003821925	7
4102	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001687126	6
4105	*A. ruthenus*	JMAL-HL-02/ 1-968000002257846	7
4107	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001692069	6
4116	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005336541	6
4126	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005341192	6
4131	*A. ruthenus*	JMAL-HL-02/ 1-968000003824112	7
4134	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001687089	6
4135	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000001692089	6
4145	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005163949	6
4148	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005336470	6
4152	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005156150	6
4160	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005162963	6
4164	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005156840	6
4170	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005342634	6
4172	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005337267	6
4178	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005152479	6
4181	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005339988	6
4183	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005338451	6
4185	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005156707	6
4186	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005341074	6
4194	*A. ruthenus*	JMAL-HL-03/ 1-968000005166306	6

Tab. č. 3 Klíč k určení původu ryb

Klíčová část kódu	Původ
JSIB-VO-95/ 1	dovoz Německo do Vodňan
JSIB-VO-04/ 1	odchov Vodňany
JSIB-HL-03/ 1	odchov Hluboká
JMAL-HL-02/ 1	odchov Hluboká
JMAL-HL-03/ 1	odchov Hluboká

U ryb vzorkovaných 25.-27.3 byly použity tyto látky stimulující spermiaci : Ovopel, CPE, GnRHa 25, GnRHa 75. Jednalo se o simultánní pokus testující účinek různých preparátů na spermiaci samců. Částí této práce je i porovnání účinků preparátů v porovnání s hypofyzací a jejich dopad na poměr ž/m spermií. Před vlastním odběrem byly ryby nejprve stimulovány teplotou a posléze byla u vybraných ryb provedena stimulace hypofýzou dle metodiky vydané FROV JU ve Vodňanech (Gela a kol., 2008).

Počítala se koncentrace spermií a poměr živých a mrtvých spermií (ž/m; v %) stanovených metodou dvojího barvení dle protokolu Flajšhanse a kol. (2004). Tato metoda využívá dvojího barvení, přičemž barvivo SYBR 14 proniká membránou živé buňky a váže se na DNA. Tyto buňky se jeví pod fluorescenčním mikroskopem jako zelené body. Naproti tomu druhé barvivo – propidium iodid (PI) neproniká přes membránu živé buňky, ale pouze porušenou membránou mrtvých nebo odumírajících buněk a váže se na jejich DNA. Tyto buňky jsou potom při pozorování zabarveny červeně. Analýzou obrazu (Olympus MicroImage v. 4.0) je vyhodnoceno % ž/m spermií. Tato metoda byla úspěšně použita při stanovování ž/m spermií býků, včel, králíků, myší aj. Z ryb byla využita u lína obecného (*Tinca tinca*), jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a sumce velkého (*Silurus glanis*) (Flajšhans a kol., 2004).

4.1 FIXACE VZORKU SPERMIÍ PRO POČÍTÁNÍ KONCENTRACE A NÁSLEDNÉ ŘEDĚNÍ

Do zkumavky Eppendorf bylo napipetováno 100 µl spermatu a 1400 µl fyziologického roztoku. Vzorek se protřepal a přidal se 1ml formaldehydu. Z takto fixovaného vzorku se následně odebralo potřebné množství pro další ředění a počítání v Bürkerově komůrce. Dořeďovací poměr byl závislý na hustotě spermatu.

Pohyboval se v hodnotách 0 (vzorek byl vhodný pro počítání koncentrace bez nutnosti dalšího ředění), 10:990, 50:950 a 100:900.

4.2 URČENÍ VĚKU RYB

Ryby pocházející z vlastního chovu FROV JU jsou ve věku 5 let. Zbytek ryb byl nakoupen a stáří bylo určeno prodejcem.

4.3 FLUORESCENČNÍ STANOVENÍ Ž/M SPERMIÍ METODOU DVOJÍHO BARVENÍ

Příprava vzorku spermatu k fluorescenčnímu stanovení: Do zkumavky Eppendorf bylo napipetováno 480µl fyziologického roztoku s 20µl spermatu a následně dobře protřepáno. Z této zkumavky byl posléze odebírán vzorek na stanovení.

4.3.1 POSTUP STANOVENÍ Ž/M SPERMIÍ:

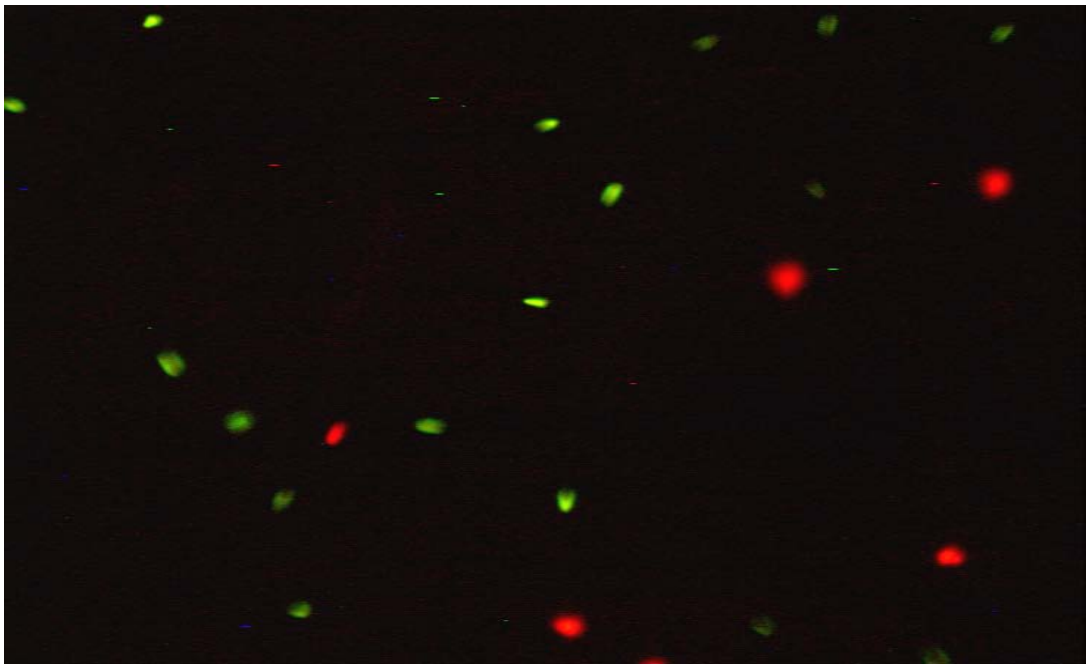
Jeden mililitr dříve připraveného vzorku spermatu (viz. výše) byl přemístěn do 1,5 ml zkumavky Eppendorf a uložen k ledu (t = 0 – 4 °C). Metoda dvojího barvení byla provedena za použití soupravy pro stanovení živých a mrtvých spermií (Molecular Probes Inc., USA), obsahující zásobní roztok zeleného fluorescenčního barviva SYBR 14 (100 µl 1mM roztoku v DMSO), které prochází neporušenou membránou buněk a roztok červeného fluorescenčního barviva propidium iodidu (5ml 2,4 mM vodného roztoku), které prochází pouze porušenou membránou odumírajících nebo mrtvých buněk. Postup stanovení byl následující. 1µl zásobního roztoku SYBRu byl naředěn 49 µl fyziologického roztoku a uložen k ledu do tmy.

5 µl předředěného SYBRu 14 bylo pipetováno do 1ml vzorku spermatu spolu s 5 µl PI. Vzorek byl opatrně zamíchán. 20 bylo bezprostředně napipetováno na čisté podložní, mikroskopické sklíčko. Krouživým pohybem konusu pipety po povrchu sklíčka byl užitý objem rozprostřen do podoby široké ploché kapky (Flajšhans a kol., 2004). Aby nemohlo dojít ke zkreslení výsledků Brownovým pohybem buněk, nebylo použito žádného krycího sklíčka.

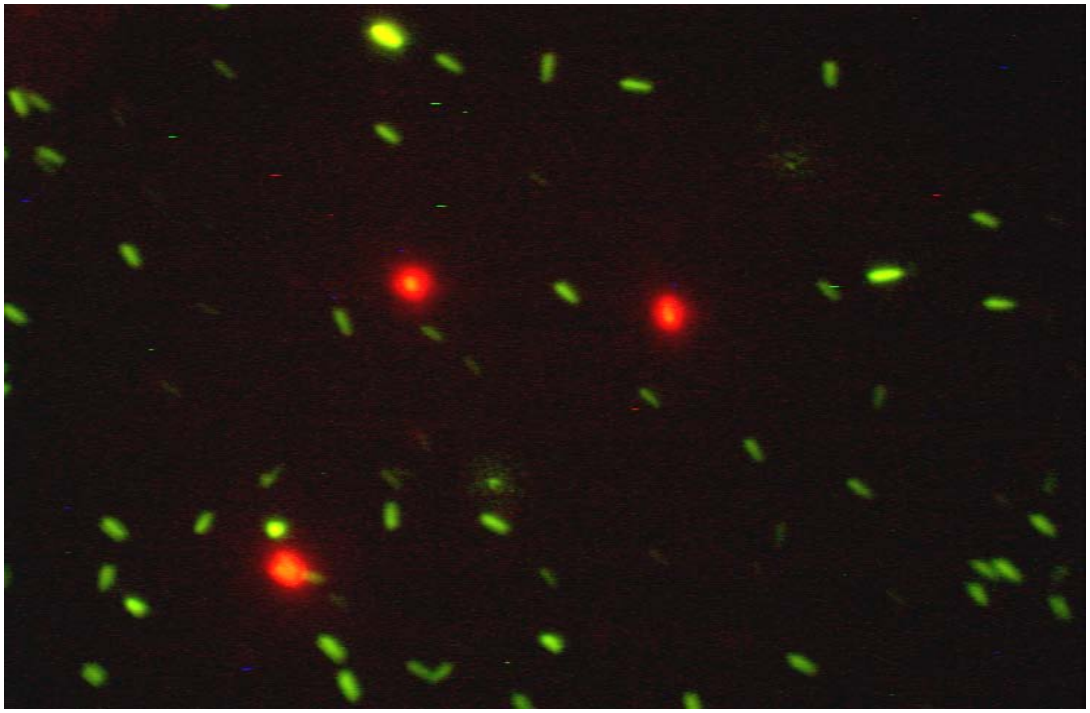
Sledovaný vzorek byl umístěn pod fluorescenční mikroskop Olympus BX 60, který byl předzaostřen na povrch sklíčka. Epifluorescenční mikroskopie využívá 100 W Ushio rtuťovou lampu, MWB filtrovou kostku (širokopásmová, modrá excitace 450 – 480 nm, emise nad 515nm) a objektivy Olympus Plan 20x nebo UPlan 40x.

Vzorek byl ponechán 8 minut od nanesení sedimentovat při pokojové teplotě v temnu, aby došlo k usazení spermií na povrch skla a zároveň byl ukončen veškerý samovolný pohyb buněk ve vzorku (Kašpar, 2007). Fázový kontrast i fluorescenční obrázky byly zaznamenávány barevnou kamerou 3CCD Sony DXC-9100P a uloženy pomocí softwaru Olympus MicroImage v. 4.0. Z každého vzorku bylo zaznamenáno 10-20 různých zorných polí, která byla následovně vyhodnocena. Vzhledem k rychlému blednutí fluorescenčních barviv nebylo možno zaznamenávat pole déle než 1,2 minuty. Aby došlo k zvýšení jasnosti fluorescenčního obrazového signálu, byla clona CCD kamery upravena na 0,16s namísto původních 0,04s (Flajšhans a kol., 2004) Od každého vzorku bylo pořízeno tolik snímků, aby se výsledný počet obarvených a zaznamenaných spermií ve vzorku byl alespoň 1000. Nicméně vzhledem k velmi řídkým vzorkům se ne vždy podařilo tomuto číslu přiblížit.

Obr. 1 Obarvený vzorek spermatu jesetera malého



Obr. 2 Obarvený vzorek spermií jesetera sibiřského



4.3.2 VYHODNOCOVÁNÍ POMĚRU Ž/M SPERMIÍ:

Poměr živých a mrtvých spermií byl vyhodnocován za použití softwaru Olympus MicroImage v. 4.0. K rozlišení ž/m spermií bylo použito dvojího prahování. Živé spermie (zeleně zabarvené body) byly pro vyhodnocení označeny žlutou barvou (třída 1). Mrtvé byly označeny modře (třída 2.). Ručním nastavením citlivosti pro každou barvu a označením jednotlivých bodů se docílilo co nejdokonalejšího spočítání bodů (spermií) (Kašpar, 2007). Body ležící na hranici snímku nebyly do celkového počtu započítány (Flajšhans a kol., 2004). Pomocí funkce „Ranges Statistics“ byl spočítán celkový počet bodů (spermií) a zároveň jejich počet v 1. a 2. třídě. Vyhodnocení bylo znázorněno v tabulce jak počtem bodů(spermií) tak jejich procentuálním vyjádřením (Flajšhans a kol., 2004). Získaná data byla následně uložena v programu Microsoft Office Excel 2003 kde byly posléze vytvořeny příslušné grafy. Pro další zpracování byla data importována do programu Statistika CZ v.6.0, kde byly srovnány jednotlivé skupiny ryb.

5. VLASTNÍ VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

Byly odebrány vzorky 51 ks jeseterů. Z toho 9 vzorků jesetera sibiřského a 42 vzorků jesetera malého. 2 ks pocházejí přímo z chovu FROV JU Vodňany, 3ks byly zakoupeny od německé firmy Fischzucht Gross a 46 ks bylo získáno z chovu v Mydlovarech. Podle jednotlivých datumů odběrů (Tab. č. 1) jsou ryby rozděleny do 5 tabulek, v tabulce 4 je zapsána skupina jesetera sibiřského a malého, která byla po teplotní a hormonální stimulaci uměle vytřena. Podařilo se poměrně zdařile stanovit poměr ž/m spermií, včetně unikátního 12n samce jesetera sibiřského (výtěr 16.4. 2009). Vzhledem ke vzácnosti výskytu takovéhoto jedince bylo rozhodnuto stanovit statistické výstupy i přesto, že se počet jedinců v souboru rovná jedné. V dalších 3 tabulkách (5, 6, 7) lze přehledně vyčíst průběh pokusu s různými typy hormonální stimulace jesetera malého, včetně stanovených relativních plodností a % ž/m spermií. Grafické vyjádření je vypracováno na grafech 2 až 12. V tabulce 8 jsou shrnuty údaje z posledního výtěru (13.5. 2009) a jsou opět srovnávány vlastnosti spz jesetera malého a sibiřského. Hodnoty jsou vyneseny na grafech 13 až 15. Sloupce označené stejným abecedním indexem se od sebe statisticky neliší, tabulky s příslušným Fischerovým LSD testem jsou umístěné vždy pod příslušným grafem.

Tab. č. 4 Výsledky z výtěru jesetera malého a sibiřského ze dne 16.4.2009

Číslo čipu	Kód	Druh	Věk (roky)	Ploidní úroveň	Počet spermií na vzorek	% živých spz	Hmotnost [kg]
2107	JSIB-VO-95/ 1-411A2D4D2D	*A. baerii*	14	12n	1075	93,93	9,3
2112	JSIB-VO-95/ 1-411A20764E	*A. baerii*	14	8n	1589	90,73	7,1
2131	JSIB-VO-04/ 1-4266700F11	*A. baerii*	5	8n	1134	82,71	3,5
2108	JSIB-VO-95/ 1-411A33583A	*A. baerii*	14	8n	1161	98,1	8,3
2125	JSIB-HL-03/ 1-968000003823942	*A. baerii*	6	8n	1174	99,35	3,9
4131	JMAL-HL-02/ 1-968000003824112	*A. ruthenus*	7	4n	1384	80,1	1,3
4039	JMAL-HL-03/ 1-968000001692448	*A. ruthenus*	6	4n	1392	99,33	1
4044	JMAL-HL-03/ 1-968000001691565	*A. ruthenus*	6	4n	1321	99,75	0,9
4057	JMAL-HL-03/ 1-968000001686390	*A. ruthenus*	6	4n	1202	97,84	0,7
4152	JMAL-HL-03/ 1-968000005156150	*A. ruthenus*	6	4n	1206	98,84	0,8
4164	JMAL-HL-03/ 1-968000005156840	*A. ruthenus*	6	4n	289	93,9	0,6
4186	JMAL-HL-03/ 1-968000005341074	*A. ruthenus*	6	4n	1272	96,43	0,7

Tab. č. 5
Výsledky z výtěru jesetera malého ze dne 25.3. 2009

Preparát	Dávkování	Číslo čipu	Kód	Druh	Věk (roky)	Ploidní úroveň	Počet spermií na vzorek	% živých spz	Hmotnost [kg]	0bjem spz [ml]	Koncentrace spz [$10^9 ml^{-1}$]	Relativní objem spz [$mlxkg^{-1}$]	Relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}]
CPE	4mg /kg	4178	JMAL-HL-03/ 1-968000005152479	*A. ruthenus*	6	4n	1041	97,08	0,5	2,71	4,06	5,42	22,02
CPE	4mg /kg	4051	JMAL-HL-03/ 1-968000001690263	*A. ruthenus*	6	4n	1015	99,02	0,7	18,15	2,73	25,93	70,89
CPE	4mg /kg	4095	JMAL-HL-03/ 1-968000001687606	*A. ruthenus*	6	4n	1196	97,4	0,8	11,01	7,03	13,76	96,76
CPE	4mg /kg	4107	JMAL-HL-03/ 1-968000001692069	*A. ruthenus*	6	4n	1158	97,8	1	17,11	5,00	17,11	85,55
CPE	4mg /kg	4081	JMAL-HL-03/ 1-968000005339988	*A. ruthenus*	6	4n	1217	97,7	1,1	19,57	5,00	17,79	88,95
CPE	4mg /kg	4105	JMAL-HL-02/ 1-968000002257846	*A. ruthenus*	5	4n	1070	95,77	1,3	31,36	2,58	24,12	62,19
CPE	4mg /kg	4145	JMAL-HL-03/ 1-968000005163949	*A. ruthenus*	6	4n	1487	98,98	0,6	7,82	2,73	13,03	35,63
CPE	4mg /kg	4060	JMAL-HL-03/ 1-968000005162963	*A. ruthenus*	6	4n	599	98,14	1	5,91	0,18	5,91	1,07
Ovopel	3 kuličky /kg	4092	JMAL-HL-03/ 1-968000001685504	*A. ruthenus*	6	4n	669	96,79	0,6	10,24	2,58	17,07	44,00
Ovopel	3 kuličky /kg	4067	JMAL-HL-03/ 1-968000001692543	*A. ruthenus*	6	4n	742	98,64	0,7	8,30	2,50	11,86	29,64
Ovopel	3 kuličky /kg	4160	JMAL-HL-03/ 1-968000005162963	*A. ruthenus*	6	4n	1175	92,38	0,8	7,68	2,89	9,60	27,74
Ovopel	3 kuličky /kg	4135	JMAL-HL-03/ 1-968000001692089	*A. ruthenus*	6	4n	1005	99,41	1	7,82	1,48	7,82	11,60
Ovopel	3 kuličky /kg	4024	JMAL-HL-02/ 1-968000003816877	*A. ruthenus*	5	4n	723	99,59	1,1	19,24	2,42	17,49	42,35
Ovopel	3 kuličky /kg	4102	JMAL-HL-03/ 1-968000001687126	*A. ruthenus*	6	4n	1115	98,75	1,4	20,64	3,13	14,74	46,07
Ovopel	3 kuličky /kg	4047	JMAL-HL-03/ 1-968000001690504	*A. ruthenus*	6	4n	1078	99,47	0,6	16,79	3,36	27,98	94,00
Ovopel	3 kuličky /kg	4098	JMAL-HL-03/ 1-968000001693056	*A. ruthenus*	6	4n	1057	98,87	1,2	7,56	2,89	6,30	18,21

Tab. č. 6

Výsledky z výtěru jesetera malého ze dne 26.3. 2009

Preparát	Dávkování	Číslo čipu	Kód	Druh	Věk (roky)	Ploidní úroveň	Počet spermií na vzorek	% živých spz	Hmotnost [kg]	0bjem spz [ml]	Koncentrace spz [$10^9 ml^{-1}$]	Relativní objem spz [$mlxkg^{-1}$]	Relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}]
CPE	4mg /kg	4051	JMAL-HL-03/ 1-968000001690263	*A. ruthenus*	6	4n	1211	96,76	0,7	17,09	0,73	24,41	17,80
CPE	4mg /kg	4095	JMAL-HL-03/ 1-968000001687606	*A. ruthenus*	6	4n	1227	96,94	0,8	9,4	3,33	11,75	39,16
CPE	4mg /kg	4107	JMAL-HL-03/ 1-968000001692069	*A. ruthenus*	6	4n	1011	99,64	1	11,36	1,56	11,36	17,74
CPE	4mg /kg	4081	JMAL-HL-03/ 1-968000005339988	*A. ruthenus*	6	4n	1081	99,09	1,1	22,8	1,98	20,73	41,02
CPE	4mg /kg	4105	JMAL-HL-02/ 1-968000002257846	*A. ruthenus*	5	4n	1354	89,98	1,3	24,47	2,76	18,82	51,95
CPE	4mg /kg	4145	JMAL-HL-03/ 1-968000005163949	*A. ruthenus*	6	4n	1056	99,46	0,6	4,08	1,46	6,80	9,91
Ovopel	3 kuličky /kg	4060	JMAL-HL-03/ 1-968000005162963	*A. ruthenus*	6	4n	158	91,12	1	10,46	0,38	10,46	4,02
Ovopel	3 kuličky /kg	4092	JMAL-HL-03/ 1-968000001685504	*A. ruthenus*	6	4n	1167	99,26	0,6	11,51	2,97	19,18	56,94
Ovopel	3 kuličky /kg	4160	JMAL-HL-03/ 1-968000005162963	*A. ruthenus*	6	4n	540	98,34	0,8	8,85	3,80	11,06	42,06
Ovopel	3 kuličky /kg	4024	JMAL-HL-02/ 1-968000003816877	*A. ruthenus*	5	4n	419	94,57	1,1	16,21	4,61	14,74	67,93
Ovopel	3 kuličky /kg	4102	JMAL-HL-03/ 1-968000001687126	*A. ruthenus*	6	4n	1060	98,57	1,4	27,06	5,55	19,33	107,21
Ovopel	3 kuličky /kg	4047	JMAL-HL-03/ 1-968000001690504	*A. ruthenus*	6	4n	1891	99,37	0,6	18,63	3,91	31,05	121,28
Ovopel	3 kuličky /kg	4098	JMAL-HL-03/ 1-968000001693056	*A. ruthenus*	6	4n	1199	98,91	1,2	28,25	4,84	23,54	114,01

Pokračování tabulky 6

Preparát	Dávkování	Číslo čipu	Kód	Druh	Věk (roky)	Ploidní úroveň	Počet spermií na vzorek	% živých spz	Hmotnost [kg]	0bjem spz [ml]	Koncentrace spz [$10^9 ml^{-1}$]	Relativní objem spz [$mlxkg^{-1}$]	Relativní plodnost [ks x 10^9 xkg^{-1}]
GnRHa25		4054	JMAL-HL-03/ 1-968000001694734	*A. ruthenus*	6	4n	375	96,93	0,7	11,84	0,41	16,91	6,87
GnRHa25		4148	JMAL-HL-03/ 1-968000005336470	*A. ruthenus*	6	4n	225	83,3	0,8	0,96	0,09	1,20	0,10
GnRHa25		4025	JMAL-HL-02/ 1-968000003822986	*A. ruthenus*	7	4n	206	96,23	1,3	2,1	0,01	1,62	0,01
GnRHa25		4101	JMAL-HL-02/ 1-968000003821925	*A. ruthenus*	7	4n	362	64,99	1,2	8,45	0,02	7,04	0,11
GnRHa75		4052	JMAL-HL-03/ 1-968000001691650	*A. ruthenus*	6	4n	496	92,88	0,7	11,99	1,51	17,13	25,86
GnRHa75		4070	JMAL-HL-03/ 1-968000001694173	*A. ruthenus*	6	4n	570	72,97	1,1	21,2	1,51	19,27	29,10
GnRHa75		4134	JMAL-HL-03/ 1-968000001687089	*A. ruthenus*	6	4n	281	84,57	1,3	12,64	0,52	9,72	5,06

Tab. č. 7
Výsledky z výtěru jesetera malého ze dne 27.3. 2009

Preparát	Dávkování	Číslo čipu	Kód	Druh	Věk (roky)	Ploidní úroveň	Počet spermií na vzorek	% živých spz	Hmotnost [kg]	0bjem spz [ml]	Koncentrace spz [$10^9 ml^{-1}$]	Relativní objem spz [$mlxkg^{-1}$]	Relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}]
CPE	4mg /kg	4051	JMAL-HL-03/ 1-968000001690263	*A. ruthenus*	6	4n	189	69,61	0,7	4	0,17	5,71	0,98
CPE	4mg /kg	4095	JMAL-HL-03/ 1-968000001687606	*A. ruthenus*	6	4n	1169	68,55	0,8	7,71	2,69	9,64	25,90
CPE	4mg /kg	4107	JMAL-HL-03/ 1-968000001692069	*A. ruthenus*	6	4n	1140	88,99	1	1,82	0,99	1,82	1,80
CPE	4mg /kg	4081	JMAL-HL-03/ 1-968000005339988	*A. ruthenus*	6	4n	674	93,36	1,1	15,88	0,47	14,44	6,76

Pokračování tabulky 7

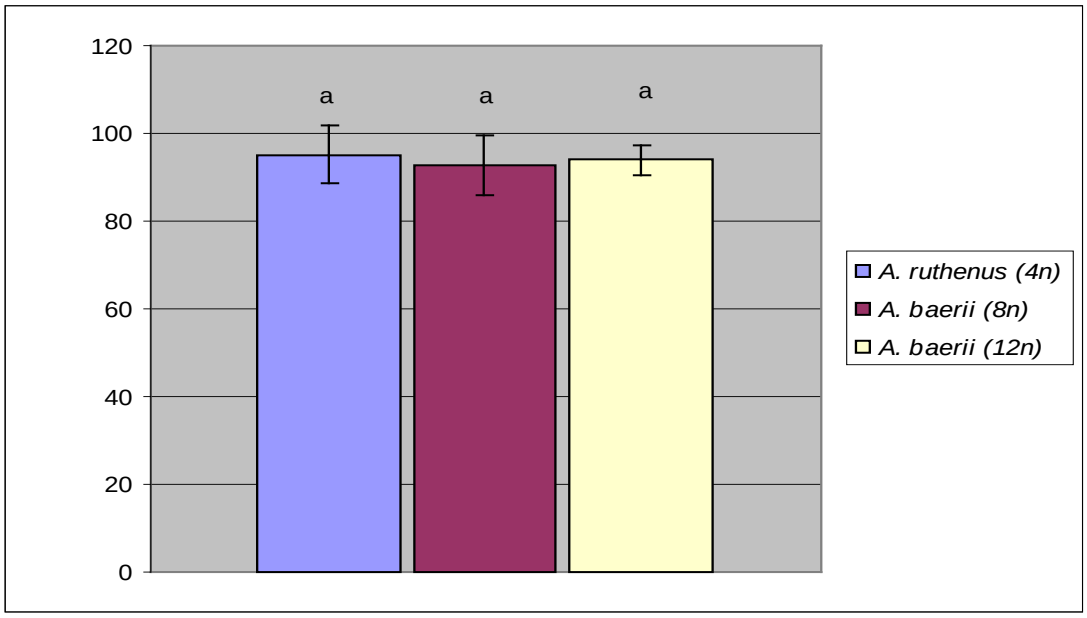
Preparát	Dávkování	Číslo čipu	Kód	Druh	Věk (roky)	Ploidní úroveň	Počet spermií na vzorek	% živých spz	Hmotnost [kg]	0bjem spz [ml]	Koncentrace spz [$10^9 ml^{-1}$]	Relativní objem spz [$mlxkg^{-1}$]	Relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}]
CPE	4mg /kg	4105	JMAL-HL-02/ 1-968000002257846	*A. ruthenus*	5	4n	1241	81,23	1,3	7,5	Prakticky bez buněk	5,77	Prakticky bez buněk
CPE	4mg /kg	4145	JMAL-HL-03/ 1-968000005163949	*A. ruthenus*	6	4n	467	65,31	0,6	1,22	0,63	2,03	1,27
CPE	4mg /kg	4060	JMAL-HL-03/ 1-968000005162963	*A. ruthenus*	6	4n	399	81,34	1	0,54	0,19	0,54	0,10
Ovopel	3 kuličky /kg	4067	JMAL-HL-03/ 1-968000001692543	*A. ruthenus*	6	4n	1176	98,38	0,7	9,91	1,03	14,16	14,60
Ovopel	3 kuličky /kg	4160	JMAL-HL-03/ 1-968000005162963	*A. ruthenus*	6	4n	1121	99,83	0,8	4,96	0,58	6,20	3,60
Ovopel	3 kuličky /kg	4135	JMAL-HL-03/ 1-968000001692089	*A. ruthenus*	6	4n	1062	98,4	1	5,73	0,76	5,73	4,34
Ovopel	3 kuličky /kg	4024	JMAL-HL-02/ 1-968000003816877	*A. ruthenus*	5	4n	1056	100	1,1	14,33	2,60	13,03	33,92
Ovopel	3 kuličky /kg	4102	JMAL-HL-03/ 1-968000001687126	*A. ruthenus*	6	4n	1165	90,34	1,4	7,44	2,50	5,31	13,29
Ovopel	3 kuličky /kg	4047	JMAL-HL-03/ 1-968000001690504	*A. ruthenus*	6	4n	306	93,16	0,6	13,42	0,17	22,37	3,74
Ovopel	3 kuličky /kg	4098	JMAL-HL-03/ 1-968000001693056	*A. ruthenus*	6	4n	1147	97,97	1,2	22,95	2,86	19,13	54,77
GnRHa25		4054	JMAL-HL-03/ 1-968000001694734	*A. ruthenus*	6	4n	268	95,85	0,7	5,92	0,08	8,46	0,65
GnRHa25		4148	JMAL-HL-03/ 1-968000005336470	*A. ruthenus*	6	4n	306	89,04	0,8	0,49	0,04	0,61	0,02
GnRHa25		4170	JMAL-HL-03/ 1-968000001694173	*A. ruthenus*	6	4n	85	33,05	0,7	0,41	0,01	0,59	0,01
GnRHa75		4052	JMAL-HL-03/ 1-968000001691650	*A. ruthenus*	6	4n	1673	92,55	0,7	8,43	0,75	12,04	9,03
GnRHa75		4070	JMAL-HL-03/ 1-968000001694173	*A. ruthenus*	6	4n	911	85,9	1,1	7,73	0,58	7,03	4,08
GnRHa75		4134	JMAL-HL-03/ 1-968000001687089	*A. ruthenus*	6	4n	234	87,28	1,3	4,19	0,01	3,22	0,03

Tab. č. 8

Výsledky z výtěru jesetera malého a jesetera sibiřského ze 13.5. 2009

Číslo čipu	Kód	Druh	Věk (roky)	Ploidní úroveň	Počet spermií na vzorek	% živých spz	Hmotnost [kg]	0bjem spz [ml]	Koncentrace spz [$10^9 ml^{-1}$]	Relativní objem spz [$mlxkg^{-1}$]	Relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}]
2108	JSIB-VO-95/ 1-411A33583A	*A. baerii*	14	8n	1373	97,68	7,7	178	0,0330	23,12	0,76
2115	JSIB-VO-04/ 1-42672C7C30	*A. baerii*	5	8n	1202	95,67	4,4	80	0,1945	18,18	3,54
2119	JSIB-HL-03/ 1-968000003813440	*A. baerii*	6	8n	1142	96,64	4	115	0,7172	28,75	20,62
2125	JSIB-HL-03/ 1-968000003823942	*A. baerii*	6	8n	1095	85,45	3,4	1	0,0263	0,29	0,01
2112	JSIB-VO-95/ 1-411A20764E	*A. baerii*	14	8n	300	95,39	6,3	150	0,0204	23,81	0,49
2118	JSIB-HL-03/ 1-968000003816513	*A. baerii*	6	8n	1244	95,92	3,8	100	1,0828	26,32	28,50
2131	JSIB-VO-04/ 1-4266700F11	*A. baerii*	5	8n	165	76,65	3,2	5	0,0056	1,56	0,01
2120	JSIB-HL-03/ 1-968000003823999	*A. baerii*	6	8n	1100	99,44	3,8	125	0,5578	32,89	18,35
4002	JMAL-VO-98/ 1-42664E4769	*A. ruthenus*	11	4n	1158	98,73	1,5	18	0,7781	12,00	9,34
4012	JMAL-HL-02/ 1-968000002253235	*A. ruthenus*	7	4n	1265	96,64	2,3	1	0,0157	0,43	0,01
4126	JMAL-HL-03/ 1-968000005341192	*A. ruthenus*	6	4n	1223	99,16	0,4	14	0,5344	35,00	18,70
4185	JMAL-HL-03/ 1-968000005156707	*A. ruthenus*	6	4n	1609	97,46	1	22	0,7875	22,00	17,33
4010	JMAL-HL-02/ 1-968000002256356	*A. ruthenus*	7	4n	1320	99,09	0,8	25	1,0734	31,25	33,54
4116	JMAL-HL-03/ 1-968000005336541	*A. ruthenus*	6	4n	1412	98,65	0,7	10	0,2781	14,29	3,97
4172	JMAL-HL-03/ 1-968000005337267	*A. ruthenus*	6	4n	1451	98,62	0,8	16	0,825	20,00	16,50
4194	JMAL-HL-03/ 1-968000005166306	*A. ruthenus*	6	4n	1295	99,02	0,7	15	2,1094	21,43	45,20

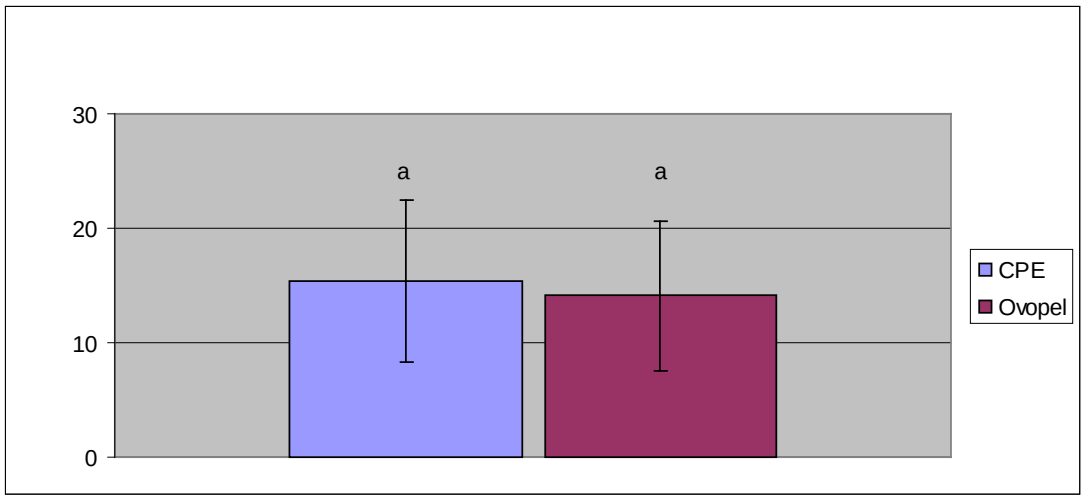
Graf 1
% živých spz u různých ploidních úrovní (odběr 16.4. 2009)



Tab. č. 9
Statisticky významné rozdíly v % živých spz v závislosti na ploidní úrovni (odběr 16.4. 2009)

	LSD test; proměnná % živých spz (Tabulka1) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 46,740, sv = 10,000			
Č. buňky	ploidie	{1} 95,172	{2} 92,962	{3} 93,930
1	4n		0,592897	0,868402
2	8n	0,592897		0,899688
3	12n	0,868402	0,899688	

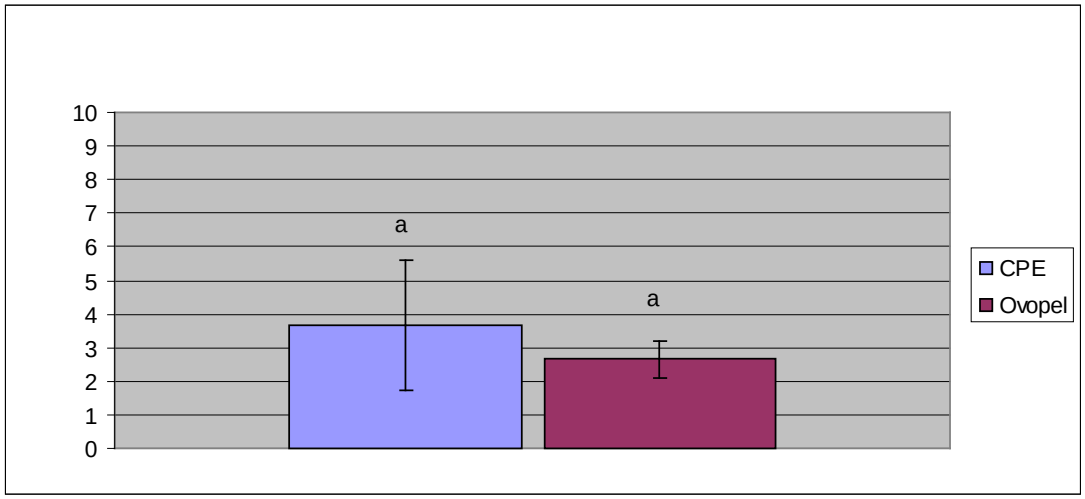
Graf 2
Relativní objem spermatu po aplikaci preparátů CPE a Ovopel [ml x kg^{-1}] (odběr 25.3. 2009)



Tab. č. 10
Statisticky významné rozdíly v relativních objemech spermatu v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 25.3. 2009)

	LSD test; proměnná Relativní objem (Tabulka1) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 52,317, sv = 14,000		
Č. buňky	Prepará	{1} 15,384	{2} 14,108
1	CPE		0,729425
2	Ovopel	0,729425	

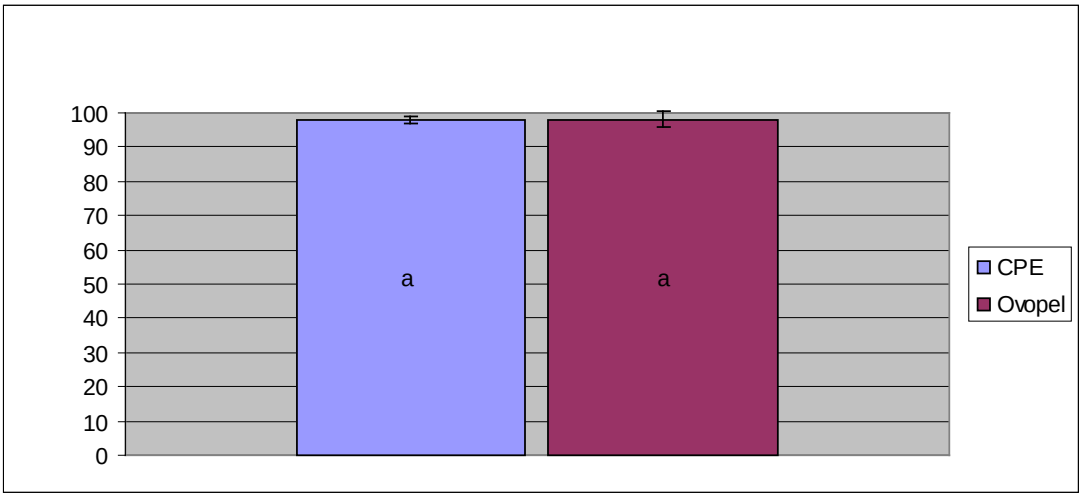
Graf 3
Relativní plodnost po aplikaci preparátů CPE a Ovopel [ks x 10^9 x kg^{-1}] (odběr 25.3. 2009)



Tab. č.11
Statisticky významné rozdíly v relativních plodnostech v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 25.3. 2009)

	LSD test; proměnná Relativní koncentrace (Tabulka1) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 924,79, sv = 14,000		
Č. buňky	Prepará	{1} 57,882	{2} 39,201
1	CPE		0,239472
2	Ovopel	0,239472	

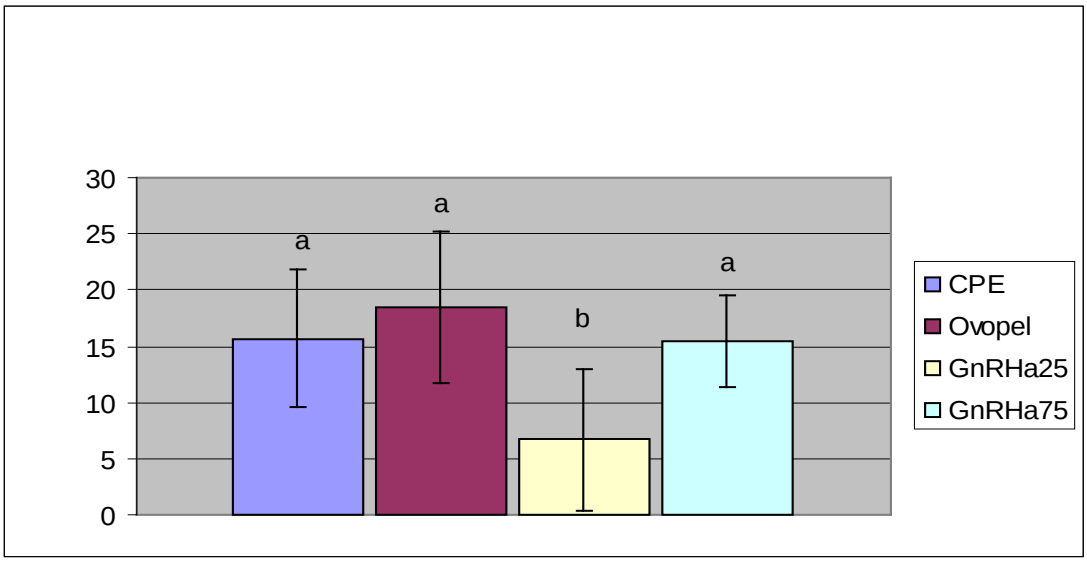
Graf 4
% živých spz po aplikaci preparátů CPE a Ovopel (odběr 25.3. 2009)



Tab. č. 12
Statisticky významné rozdíly v % živých spz v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 25.3. 2009)

	LSD test; proměnná % živých spz (Tabulka1) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 3,5162, sv = 14,000		
Č. buňky	Prepará	{1} 97,736	{2} 97,988
1	CPE		0,792624
2	Ovopel	0,792624	

Graf 5
Relativní objem spermatu po aplikaci preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 [ml x kg^{-1}] (odběr 26.3. 2009)



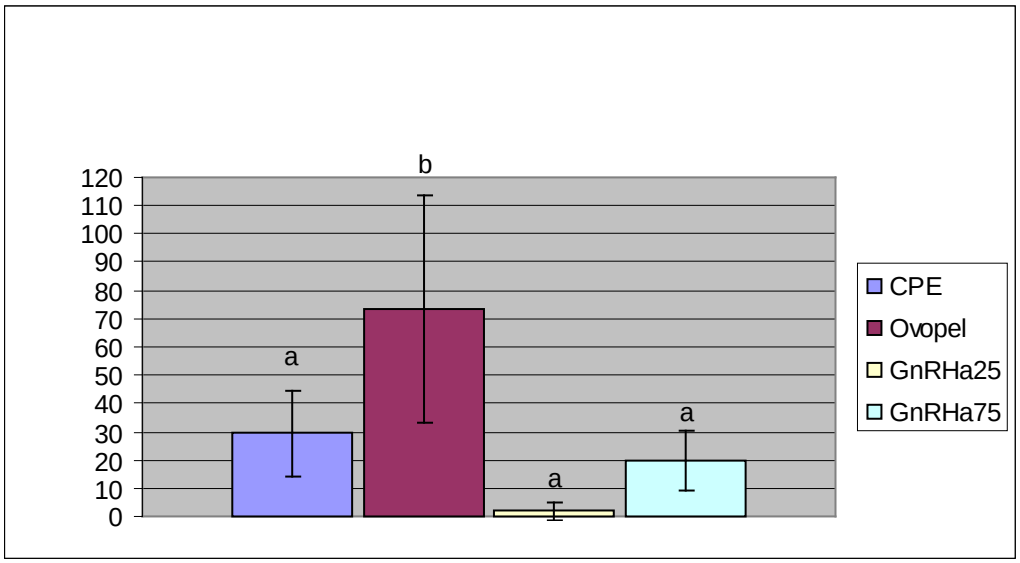
Tab. č. 13

Statisticky významné rozdíly v relativních objemech spermatu v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 26.3. 2009)

	LSD test; proměnná Relativní objem (Tabulka3) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 47,085, sv = 16,000				
Č. buňky	Preparát	{1} 15,645	{2} 18,480	{3} 6,6925	{4} 15,373
1	CPE		0,468477	0,060318	0,956043
2	Ovopel	0,468477		0,014508	0,521091
3	GnRHa25	0,060318	0,014508		0,117120
4	GnRHa75	0,956043	0,521091	0,117120	

Graf 6

Relativní plodnost po aplikaci preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 [ks x 10^9 x kg^{-1}] (odběr 26.3. 2009)

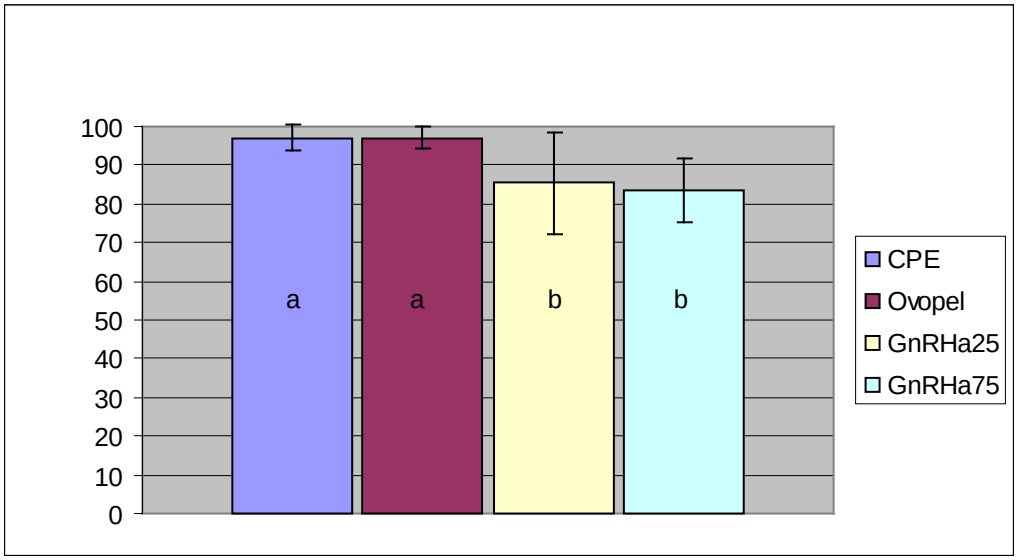


Tab. č. 14

Statisticky významné rozdíly v relativních plodnostech v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 26.3. 2009)

	LSD test; proměnná Relativní koncentrace (Tabulka3) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 809,08, sv = 16,000				
Č. buňky	Preparát	{1} 29,597	{2} 73,350	{3} 1,7725	{4} 20,007
1	CPE		0,013807	0,149173	0,639951
2	Ovopel	0,013807		0,001000	0,015212
3	GnRHa25	0,149173	0,001000		0,413652
4	GnRHa75	0,639951	0,015212	0,413652	

Graf 7
% živých spz po aplikaci preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 (odběr 26.3. 2009)

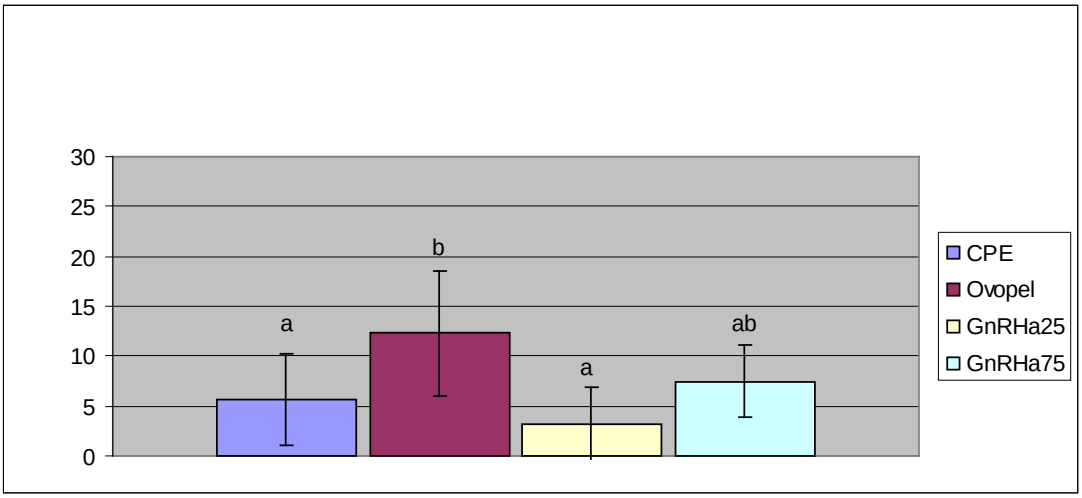


Tab. č. 15
Statisticky významné rozdíly v % živých spz v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 26.3. 2009)

LSD test; proměnná % živých spz (Tabulka3)
Pravděpodobnosti pro post-hoc testy
Chyba: meziskup. PČ = 62,304, sv = 16,000

Č. buňky	Preparát	{1} 96,978	{2} 97,163	{3} 85,362	{4} 83,473
1	CPE		0,967003	0,036671	0,027809
2	Ovopel	0,967003		0,029785	0,023050
3	GnRHa25	0,036671	0,029785		0,758050
4	GnRHa75	0,027809	0,023050	0,758050	

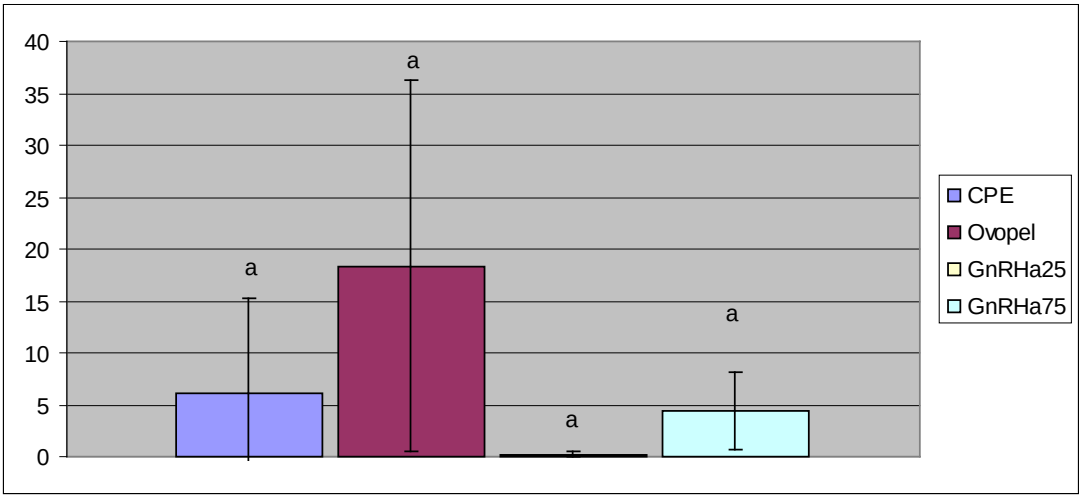
Graf 8
Relativní objem spermatu po aplikaci preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 [ml x kg^{-1}] (odběr 27.3. 2009)



Tab. č. 16
Statisticky významné rozdíly v relativních objemech spermatu v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 27.3. 2009)

Č. buňky	LSD test; proměnná Relativní objem (Tabulka8) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 31,792, sv = 16,000				
	Preparát	{1} 5,7071	{2} 12,276	{3} 3,2200	{4} 7,4300
1	CPE		0,044585	0,531722	0,663842
2	Ovopel	0,044585		0,033392	0,230913
3	GnRHa25	0,531722	0,033392		0,374043
4	GnRHa75	0,663842	0,230913	0,374043	

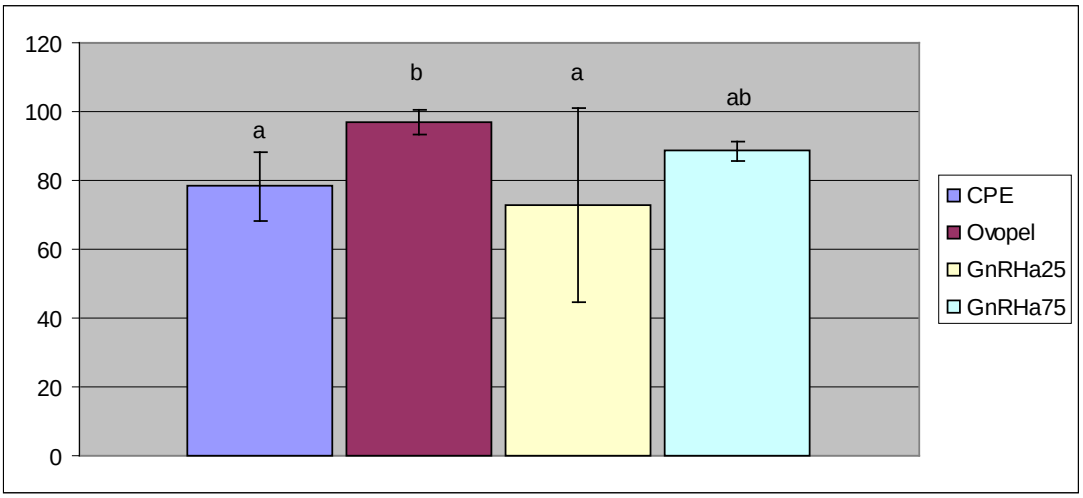
Graf 9
Relativní plodnost po aplikaci preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 [ks x 10^9 x kg^{-1}] (odběr 27.3. 2009)



Tab. č. 17
Statisticky významné rozdíly v relativních plodnostech v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 27.3. 2009)

Č. buňky	LSD test; proměnná Relativní koncentrace (Tabulka8) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 184,88, sv = 15,000				
	Preparát	{1} 6,1350	{2} 18,323	{3} ,22667	{4} 4,3800
1	CPE		0,127985	0,548082	0,857607
2	Ovopel	0,127985		0,072920	0,157995
3	GnRHa25	0,548082	0,072920		0,713559
4	GnRHa75	0,857607	0,157995	0,713559	

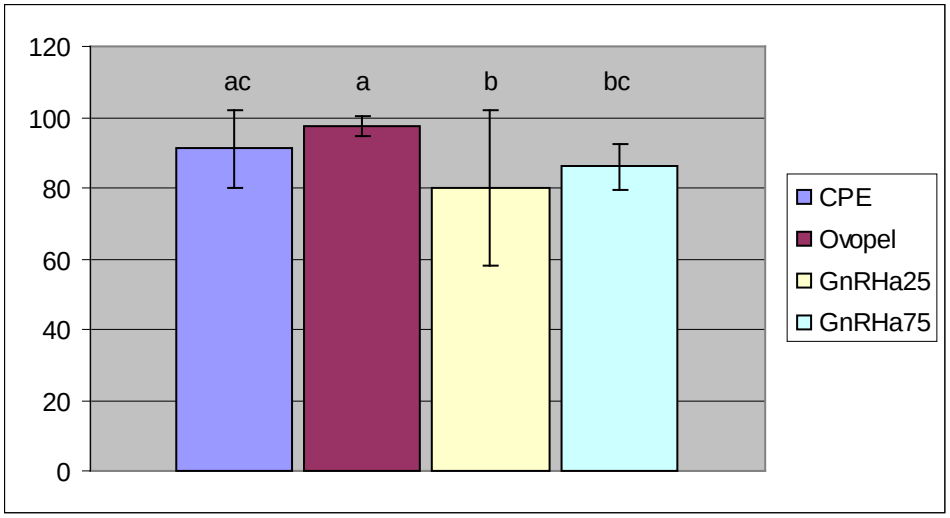
Graf 10
% živých spz po aplikaci preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 (odběr 27.3. 2009)



Tab. č. 18
Statisticky významné rozdíly v % živých spz v závislosti na druhu použitého preparátu (odběr 27.3. 2009)

	LSD test; proměnná %živých spz (Tabulka8) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 198,67, sv = 16,000				
Č. buňky	Preparát	{1} 78,341	{2} 96,869	{3} 72,647	{4} 88,577
1	CPE		0,025699	0,566383	0,308290
2	Ovopel	0,025699		0,024140	0,406510
3	GnRHa25	0,566383	0,024140		0,185302
4	GnRHa75	0,308290	0,406510	0,185302	

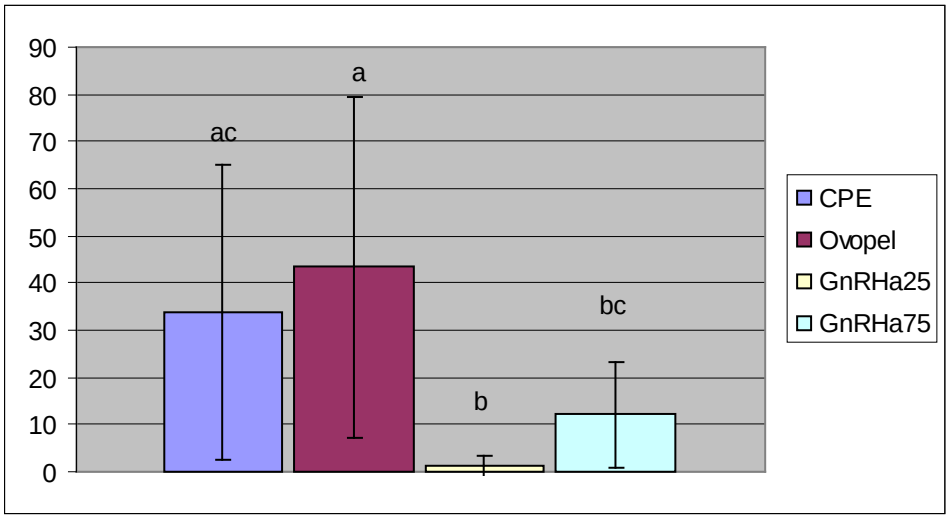
Graf 11
Průměrné % živých spz za všechny odběry po aplikaci preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 (25. – 27.3. 2009)



Tab. č. 19
Statisticky významné rozdíly v % živých spz za všechny odběry v závislosti na druhu použitého preparátu (25. – 27.3. 2009)

Č. buňky	Preparát	{1} 91,055	{2} 97,369	{3} 79,913	{4} 86,025
LSD test; proměnná % živých (Tabulka1) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 120,10, sv = 52,000					
1	CPE		0,064528	0,023750	0,326048
2	Ovopel	0,064528		0,000571	0,028874
3	GnRHa25	0,023750	0,000571		0,320755
4	GnRHa75	0,326048	0,028874	0,320755	

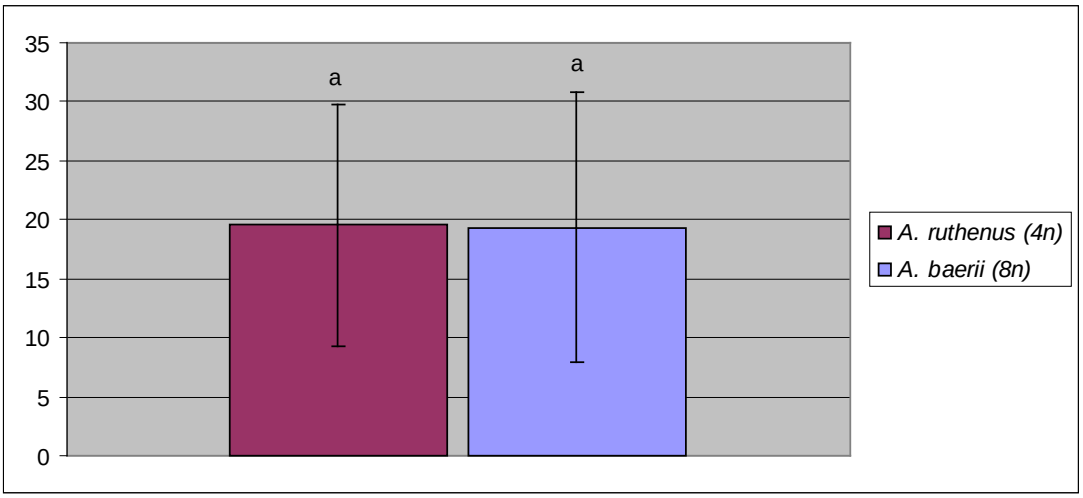
Graf 12
Průměrné hodnoty relativních plodností za všechny odběry po aplikaci preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 (25. – 27.3. 2009)



Tab. č. 20
Statisticky významné rozdíly v relativních plodnostechza všechny odběry v závislosti na druhu použitého preparátu (25. – 27.3. 2009)

Č. buňky	Preparát	{1} 33,873	{2} 43,424	{3} 1,1099	{4} 12,193
LSD test; proměnná Relativní koncentrace (Tabulka1) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 964,66, sv = 51,000					
1	CPE		0,324310	0,019983	0,139880
2	Ovopel	0,324310		0,002814	0,033646
3	GnRHa25	0,019983	0,002814		0,524133
4	GnRHa75	0,139880	0,033646	0,524133	

Graf 13
Relativní objem spermatu *A. ruthenus* a *A. baerii* po hypofyzaci [ml x kg^{-1}] (odběr 13.5. 2009)

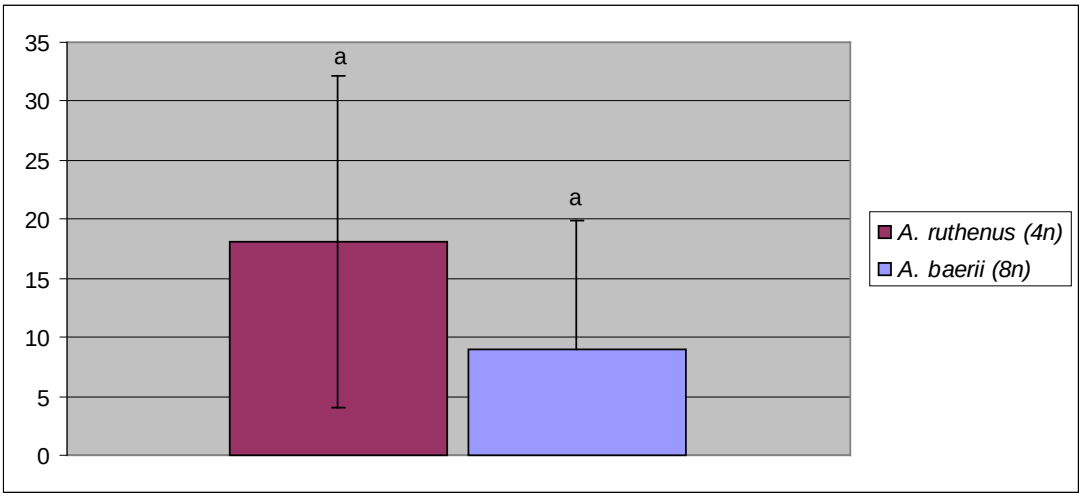


Tab. č. 21
Statisticky významné rozdíly v relativních objemech spermatu v závislosti na ploidní úrovni resp. druhu (odběr 13.5. 2009)

LSD test; proměnná Relativní objem (Tabulka16)
Pravděpodobnosti pro post-hoc testy
Chyba: meziskup. PČ = 133,62, sv = 14,000

Č. buňky	Ploidní úroveň	{1} 19,366	{2} 19,550
1	8n		0,975024
2	4n	0,975024	

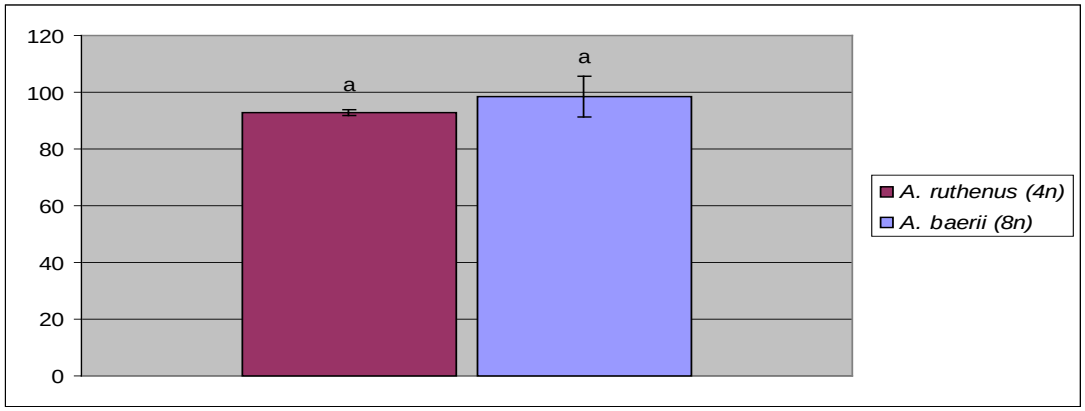
Graf 14
Relativní plodnost *A. ruthenus* a *A. baerii* po hypofyzaci [ks x 10^{9} x kg^{-1}] (odběr 13.5. 2009)



Tab. č. 22
Statisticky významné rozdíly v relativních plodnostech spermatu v závislosti na ploidní úrovni resp. druhu (odběr 13.5. 2009)

	LSD test; proměnná Relativní koncentrace (Tabulka16) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 179,61, sv = 14,000		
Č. buňky	Ploidní úroveň	{1} 9,0330	{2} 18,074
1	8n		0,198697
2	4n	0,198697	

Graf 15
% živých spz *A. ruthenus* a *A. baerii* po hypofyzaci (odběr 13.5.2009)



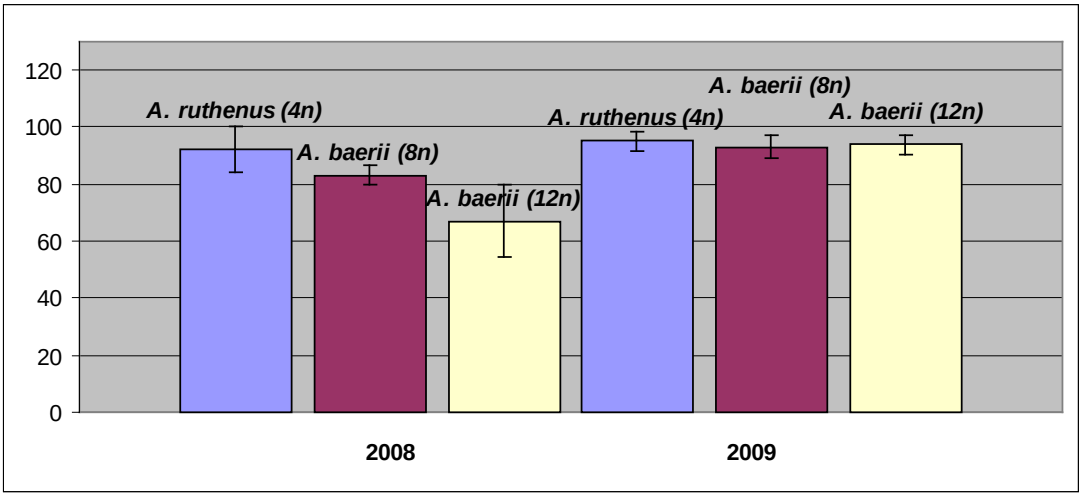
Tab. č. 23
Statisticky významné rozdíly v % živých spz v závislosti na ploidní úrovni resp. druhu (odběr 13.5. 2009)

	LSD test; proměnná % živých spz (Tabulka16) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 30,563, sv = 14,000		
Č. buňky	Ploidní úroveň	{1} 92,855	{2} 98,421
1	8n		0,063660
2	4n	0,063660	

Tab. č. 24 a graf 16
Hodnoty % živých spz různých ploidních úrovní za rok 2008 a 2009

	2008			2009		
	%živých spz	Počet spz (celkový počet)	Smodch	%živých spz	Počet spz (celkový počet)	Smodch
A. ruthenus (4n)	92,24	1874	8,18	95,17	8066	3,50
A. baerii (8n)	83,24	11021	3,65	92,96	4737	3,95
A. baerii (12n)	67,16	1291	12,54	93,93	1075	3,29

Graf 16


120
100
80
60
40
20
0
A. ruthenus (4n)
A. baerii (8n)
A. baerii (12n)
A. ruthenus (4n)
A. baerii (8n)
A. baerii (12n)
2008
2009

6. Diskuze

Porovnávacími a popisnými pokusy se spermatem jednotlivých druhů jeseterů resp. jejich různých ploidních úrovní se zabývalo hned několik autorů např. Wei a kol (2007a), který se zabýval studiem jesetera čínského nebo Alavi a kol. (2004), popisující samčí pohlavní buňky jesetera perského. Tématem porovnávání ploidních úrovní jeseterů malého a sibiřského a jejich spermatu jako takového se v různých studiích zabývá především Pšenička (2006, 2009, 2010) a Flajšhans (2009), po stránce molekulární genetiky se zmíněnému tématu věnuje Fontana (1975, 1994, 2007 a další). Procento živých spermií (spz) ve vzorku je spolu s koncentrací spermií jedním ze základních ukazatelů kvality spermatu. Hodnoty % živých spz se mohou u vzorků jednotlivých ryb, i v rámci druhu, velmi zásadně lišit. Hlavním faktorem bývá správná volba hormonální stimulace. Například při odběru 26.3. byla ve vzorku po aplikaci GnRHa25 naměřena hodnota živých spermií 64,99 ± 15,25 %. Naproti tomu byla u ryby chované ve stejných podmínkách a stimulované totožným způsobem zjištěna hodnota 96,93 ± 2,62%. Dalším činitelem je precizní naplánování spermiace a dodržení všech metodických pokynů pro umělý odběr spermatu (teplota vody, pH, obsah O_2). Z pokusů je patrné, že špatné načasování odběru může vést nejen ke zbytečnému stresování ryb (a tím ke snížení kvality pohlavních produktů), ale na příklad i k naprostému selhání principu stimulace viz. odběry 25.-27.3., kdy u žádné z ryb stimulovaných GnRH hormonem nedošlo ke spermiaci. Není výjimkou, že se odebrané vzorky liší v řádu ne %, ale desítek %. Jedná se tedy o silně individuální kvalitativní vlastnost, která nám usnadňuje selekci ryb do generačního hejna.

Ze vzorků odebraných 16.4. vyplynulo, že ploidní úroveň nemá vliv na % živých spermií ($p=0,05$). Hodnoty zjištěné metodou dvojího barvení (Flajšhans a kol., 2004) byly následující: 95,17 ± 6,43 % pro jesetera malého (4n), 92,72 ± 6,65 % pro jesetera sibiřského (8n) a 93,93 ± 3,29% pro jesetera sibiřského, jediného zástupce 12n. U stejných ploidních úrovní získal Flajšhans (2008, nepublikovaná data) hodnoty 92,24 ± 8,18 % ; 83,24 ± 3,65 % a 67,16 ± 2,54 %. Statisticky se % živých spz mezi sebou neliší, vyjma srovnání 12n za rok 2008 a 2009. Rozdíl více než 25% u tohoto jedince lze vzhledem k jediné rybě disponující takto vysokou úrovní ploidie jen těžko zdůvodnit. Zvláště, když víme, že ryba pochází ze stejných podmínek a stimulace i výtěr v roce 2009 probíhal podle stejné metodiky jako v roce

2008. Mezi možné příčiny by patřila např. manipulace se vzorkem po odběru, nedostatečně dozrálé pohlavní buňky, nadměrný stres nebo neočekávané výkyvy teplot v roce 2008.

Aplikace preparátů CPE, Ovopel, dvou různých dávek GnRH hormonu a následné tři po sobě jdoucí odběry poskytli dostatečné množství dat pro jednoznačné stanovení nejlepšího preparátu, kterým se na základě statistických vyhodnocení Fischerova LSD testu (p=0,05) stal Ovopel s nejvyšším procentem živých spermií 97,37 ± 2,91 a zároveň nejvyšší relativní plodností 43,42 ± 36,15 [ks x 10^9 x kg^{-1}]. Ostatní preparáty bylo možné seřadit podle stejných kriterií následovně (% živých spz ; relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}]) : CPE (91,05 ± 10,85 ; 33,87 ± 31,36), GnRHa75 (86,03 ± 6,63 ; 12,19 ± 11,16), GnRHa25 (79,91 ± 21,79 ; 1,11 ± 2,36). Výsledky spolu vždy korelovaly a preparát s nejnižším % živých spermií měl současně i nejnižším počtem spz na kg živé hmotnosti. Přepočet relativních hodnot je nezbytný pro odstranění věkové a hmotnostní kategorizace jednotlivých ryb, jejichž původ ani věk nejsou totožné.

Porovnáním hypofyzované skupiny jesetera malého a jesetera sibiřského se dospělo k závěru, že se kvalita a kvantita odebraných vzorků statisticky neliší ani v jednom ze sledovaných ukazatelů tj. % živých spermií, relativním objemu spermií [$ml x kg^{-1}$] a relativní plodností [ks x 10^9 x kg^{-1}]. Výsledné průměrné hodnoty byly 92,85 ± 0,84 ; 19,55 ± 10,22 ; 18,07 ± 14,05 pro jesetera malého a 98,42 ± 7,27 ; 19,37 ± 11,38 ; 9,03 ± 10,81 pro jesetera sibiřského. Ke stejnému závěru dospěl i Pšenička a kol. (2008), který po vyhodnocení získal koncentraci spermií [$10^9 ml^{-1}$] 0,41 ± 0,32 pro jesetera malého a 0,61 ± 0,37 pro jesetera sibiřského. Je zřejmé, že koncentrace spermií je výrazně nižší než u kostnatých ryb. Nejvyšší námi zjištěná hodnota patřila jeseteru malému po aplikaci preparátu Ovopel a to 5,55[$10^9 ml^{-1}$]. U kapra obecného dosahuje koncentrace spermií hodnot 14 až 35 [$10^9 ml^{-1}$], u lína obecného 5 – 34 [$10^9 ml^{-1}$] a u štiky obecné 10 – 30 [$10^9 ml^{-1}$], výrazně vyšší je potom u okouna říčního, kde bylo naměřeno 95 [$10^9 ml^{-1}$] (Kašpar 2007).

Porovnáním jednotlivých druhů jsem dospěl k závěru, že kvalita a kvantita samčích pohlavních buněk sledovaných druhů se neliší. Jednofaktorová ANOVA tento závěr jednoznačně podporuje (p=0,05). Ke stejnému výsledku dospěl i Pšenička a kol. (2008).

Pohlédneme-li na dosažené výsledky, musíme konstatovat, že veliká podobnost druhů jeseterů nechává prostor pro mezidruhové křížení, které popisuje ve

své studii Ludwig a kol. (2009). Výskyt těchto kříženců, jejich odolnost a především reprodukční schopnosti budou klíčové pro udržitelnost původních druhů jeseterů ať už z pohledu světové ichtyofauny nebo z pohledu produkčních systémů chovu. Podrobné studie charakteristik jednotlivých druhů jsou prvním krokem pro poznání a záchranu jednotlivých unikátních druhů této čeledi a mohou významně pomoci v záchranných programech ohrožených druhů např. vyzy velké, stejně jako pomohou zdokonalit intenzivní chovy jeseterovitých ryb, zmírnit tlak ze strany odlovů jeseterů z volných vod a umožnit tak těmto dlouho dospívajícím rybám reprodukci v přirozeném prostředí.

7. Souhrn

V provedeném sledování spermatu 2 druhů jeseterů (j. malého, *Acipenser ruthenus* a j. sibiřského, *A. baerii*) a porovnání 4 různých stimulačních preparátů byly odebrány vzorky 51 ks jeseterů. Z toho 9 vzorků jesetera sibiřského a 42 vzorků jesetera malého ve věku 5 až 14 let a hmotnosti 0,5 až 9,3 kg původem ze 3 různých chovů. Kromě % živých spermií bylo pracováno s relativními hodnotami, přepočtených na kg živé hmotnosti ryb. Všechny pokusy a sledování byly porovnávány v programu Statistika v.6 pomocí analýzy variance (ANOVA) Fischerovým LSD testem na hladině významnosti P = 0,05.

U vzorků určených k porovnání vlivu ploidní úrovně na % živých spermií byly stanoveny následující hodnoty: 95,17 ± 6,43 % pro jesetera malého (4n), 92,72 ± 6,65 % pro jesetera sibiřského (8n) a 93,93 ± 3,29% pro jesetera sibiřského, jediného zástupce 12n. Nebyl prokázán vliv ploidní úrovně na % živých spermií (hodnoty testu 0,59 ; 0,87 ; 0,90).

Pokus sledující vliv stimulačních preparátů CPE, Ovopel, GnRHa25 a GnRHa75 probíhal ve 3 dnech, kdy v prvním dni odběru (25.3.2009) došlo ke spermiaci pouze u ryb stimulovaných pomocí CPE a Ovopelem. U žádných ze sledovaných charakteristik nebyl prokázán rozdíl v závislosti na použitém typu preparátu. Druhý den (26.3.2009) proběhla spermiace i u ryb stimulovaných GnRHa25 a GnRHa75. Jednoznačně nejvyšší relativní plodnost vykazovaly vzorky odebrané po aplikaci Ovopelu (% živých spz ; relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}] : 97,16 ± 2,9 ; 73,35 ± 39,97) . U ostatních vzorků nebyla prokázána statistická odlišnost. V relativním objemu spermatu se odlišoval pouze vzorek po aplikaci GnRHa25, který měl nižší hodnoty (6,69 ± 6,34 [ml x kg^{-1}]) . V porovnání % živých spermií se odlišovaly hodnoty po aplikaci CPE a Ovopelu od GnRHa25 a GnRHa75. Třetí den odběru (27.3. 2009) spermiovaly opět ryby stimulované všemi preparáty. Jako v předešlých dnech nejlépe vyšly hodnoty po aplikaci Ovopelu (% živých spz ; relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}] : 97,37 ± 2,91 ; 43,42 ± 36,15) . Po porovnání všech 3 dní, po které probíhaly odběry, vyšlo najevo konečné pořadí preparátů podle úspěšnosti, seřazené dle stejných kriterií následovně % živých spz ; relativní plodnost [ks x 10^9 x kg^{-1}] : Ovopel (97,37 ± 2,91 ; 43,42 ± 36,15 CPE

(91,05 ± 10,85 ; 33,87 ± 31,36), GnRHa75 (86,03 ± 6,63 ; 12,19 ± 11,16), GnRHa25 (79,91 ± 21,79 ; 1,11 ± 2,36).

Porovnání spermatu jesetera malého a sibiřského ze dne 13.5. 2009 neprokázalo ve sledovaných vlastnostech žádné rozdíly. Hodnoty Fischerova LSD pro p = 0,05 činily 0,975 pro relativní objem spermatu, 0,199 pro relativní plodnost a 0,064 pro % živých spermií.. Srovnání výsledků z roku 2008 a 2009 potvrdilo očekávání a nevykázalo rozdíl mezi jednotlivými roky. Vysoký rozdíl v % živých spz u jesetera sibiřského (12n) za rok 2008 a 2009 (67,16 ± 12,54 ; 93,93 ± 3,29) je vzhledem k výjimečnosti výskytu této ploidní úrovně velmi diskutabilní.

8. Literární seznam

Alavi, S. M. H., Cosson, J.J., Karami, M., Amiri, B., M., Akhoundzadeh, M., A., (2004). Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. Reproduction 128, 819–828.

Alavi, S. M. H., Cosson, J.J., Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biology International 30 (2006) 1 - 14

Alavi, S. M. H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G., (2007). Fish Spermatology, Alpha Science International Ltd., Oxford, 465s

Alavi, S.M.H., Pšenička, M., Policar, T., Rodina, M., Hamáčková, J., Linhart, O., (2007). Ultrastructure, biochemical characteristics and motility of *Barbus barbus* spermatozoa1st International Workshop on Biology if Fish Sperm 29-31 August, the Czech Republic, Vodnany

Amelar, R. D., Dubin, L. and Schoenfeld, C., (1980). Sperm motility. Fertility and Sterility 34, 197-214.

Baccetti, B., Burini, A.G., Maver, A., Pallini, V., Remier, T., (1979). 9+2 immotile spermatozoa in an infertile. Man andrologia. 11, 6-437.

Baccetti, B., Burrini, A. G., Callaini, G., Gibertini, G., Mazzini, M. & Zerunian, S., (1984). Fish germinal cell. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. Gamete Research 10, 373-396.

Baruš, V., & Oliva, O., (1995). Mihulovci a ryby (1) . Academia., Praha, p.

Billard, R., (1970). Ultrastructure comparée de spermatozoides de quelquest poissons téléostéens. In: Comparative spermatology. (B. Baccetti ed.). Academic Press, New York. pp. 71-79.

Billard, R. and Ginsburg, A. S., (1973). La spermiogenese et le spermatozoide d´*Anguilla anguilla* L. Etude ultrastructurale. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 13, 523-534.

Billard, R., Cosson, J.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

Cherr, G.N., Clark, W.N., (1984). An acrosome reactions in sperm from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. J. Exp. Zool. 232, 129-139.

Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., (1993). Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture Berlin, Springer-Verlag.

DiLauro, M. N., Kaboord, W. and Walsh, R. A., (1998) Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. I. The Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrhynchus*). Can. J. Zool. 76, 1822-1836

Flajshans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O., The application of image citometry to viability assesment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa, Cell biology international, 2004,s.955-959.

Flajšhans, M., Ráb, P., Rodina, M., Gela, D., Rábová, M., Pšenička, M., Kašpar, V., Hulák, M., (2009). Spawning of fertile hexaploid sturgeons may jeopardize the conservation effort. In: Rosenthal, H., Bronzi, P., Wei, Q., Shi, Y., Qian, H. (Eds.) Book of Abstracts, Oral Presentations, 6th. International Symposium on Sturgeon, Wuhan, China. Chinese Academy of Fisheries Sciences, Wuhan: pp. 155-157.

Fontana, F., Jankovic, D., Zivkovic, S., (1975) Somatic chromosome of *Acipenser ruthenus* L.. Arch. biol. nauka, Beograd 27: 33-35

Fontana, F., (1994). Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in *Acipenseriformes (Pisces)*. Genome 37: 888-892

Fontana, F., Zane, L., Pepe, A., (2007). Congiu L. Polyploidy in *Acipenseriformes*: cytogenetic and molecular approaches. In Fish Cytogenetics. Eds: E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti & B.G. Kapoor. Science Publisher, Inc. New Hampshire, USA. pp. 385-403

Furbock, S., Patzner, R.A. and Lahnsteiner, F., (2008). Fine structure of spermatozoa of *Chondrostoma nasus* and *Rutilus meidingerii (Teleostei, Cyprinidae)*, as revealed by scanning and transmission electron microscopy. - Acta Zoologica (Stockholm) 91: 88-95

Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (Acipenser). *Edice metodik VÚRH JU*, Vodňany, 78, 1-24.

Ginsburg, A.S., (1968). Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Moskva, Izdatelnaya Nauka, pp. 354.

Jamieson, B.G.M., (1991). Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge Univ Press. Cambridge, pp. 230-295.

Kašpar, J., (2007). Kvalitativní a kvantitativní charakteristika spermatu okouna říčního (*Perca fluviatilis*) jako perspektivního druhu pro sladkovodní akvakulturu. Bakalářská práce, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta (2007)

Kudo, S. (1980). Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. Development Growth and Differentiation 22, 403-414.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Hortvath, A., Urbanyi, B., (2004). Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. Aquaculture Research, 35, 519^528

Lahnsteiner, F. & Patzner, R. A., (1997). Fine structure of spermatozoa of four littoral teleosts *Symphodus ocellatus, Coris julis, Thalassoma pavo and Chromis chromis*. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology 29, 477-485.

Linhart, O., Šlechta, V., Slavík, T., Fish sperm composition and biochemistry, Bulletin of the Institut of Zoology, Academia Sinica, Monograph 16. 288 – 311 1991

Lowman, F.G., (1953). Electron microscope studies of silver salmon spermatozoa (*Oncorhynchus kisutch* W.). Experimental Cell Research 5, 335-360.

Ludwig, A., Lippold, S., Debus, L.,Reinartz, R.,(2009) First evidence of hybridization between endangered sterlets (Acipenser ruthenus) and exotic Siberian sturgeons (Acipenser baerii) in the Danube River. Biol Invasions (2009) 11:753–760.

Nicander, L., (1970). Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa. In Comparative Spermatology (Baccetti, B., ed,), pp. 47-56. Rome: Academia Nazionale Dei Lincei.

Mattei, C. & Mattei, X., (1975). Spermiogenesis and spermatozoa of the *Eiopomorpha* (teleost fish). In The Functional Anatomy of the Spermatozoon (Afzelius, B. A., ed.), pp. 211-221. Pergamon Press: Oxford

Ohno S, Muramoto J, Stenius C, Christian L, Kittrel WA, Atkin NB. 1969. Microchromosomes in holocephalian, chondrostean and holostean fishes. *Chromosoma* 26:35–40.

Okamura, A. and Motonobu, T., (1999). Spermatozoa of *Conger myriaster* observed by electron microscopy. Zoological Science 16, 927-933

Piros, B., Glogowski, J., Kolman, R., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Horvath, A., Urbanyi, B., Ciereszko, A., (2002). Biochemicalcharacterization of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* and sterlet,*Acipenser ruthenus*, milt plasma and spermatozoa. Fish Physiol. Biochem. 26, 289–295

Pšenička, M., Rodina, M., Nebesářová, J., Linhart, O., (2006). Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. Theriogenology 66, 1355-1363.

Pšenička, M., (2007). Ultrastructure of chondrostean spermatozoa (*brief review*). *Bulletin VÚRH Vodňany,* vol. 43(4) s. 3-12.

Pšenička, M., Alavi, S. M. H., Rodina, M., Gela, D., Nebesářová, J., Linhart, O., (2007a). Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. Biology of the Cell, 99 (2) 103-115.

Pšenička, M., Alavi, S. M. H., Rodina, M., Nebesářová, J. and Linhart, O. (2007b). Studies on ultrastructure of spermatozoon and eggs upon fertilization in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). 1st International Workshop on Biology if Fish Sperm 29-31 August, the Czech Republic, Vodnany

Pšenička, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Cizova, Z., Gela, D., Cosson, J., Nebesarova, J., Linhart, O., (2008) Morphology, chemical contents and physiology of chondrostean fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) J. Appl. Ichthyol. 24 (2008), 371–377.

Pšenička, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Cosson, J., Nebesářová, J., Gela, D. and Linhart, O. (2008a). Morphology, biochemistry, and physiology of chondrostean fish sperm: A comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and Sterlet (*A. ruthenus*). Journal of Applied Ichthyology.

Pšenička, M., Alavi, S.M.H., Vancová, M., Koubek, P., Linhart, O., (2008b). Fine structure and morphology of sterlet (*Acipenser ruthenus* L. 1758) spermatozoa and acrosin localization. Animal Reproduction Science. In press

Pšenička, M., Flajšhans, M., Rodina, M., Gela, D., Kašpar, V., Hulák, M., (2009). Comparative study on ultrastructure and motility parameters of spermatozoa of tetraploid and hexaploid Siberian sturgeon, Acipenser baerii. In: Rosenthal, H., Bronzi, P., Wei, Q., Shi, Y., Qian, H. (Eds.) Book of Abstracts, Posters, 6th. International Symposium on Sturgeon, Wuhan, China. Chinese Academy of Fisheries Sciences, Wuhan: pp. 61-62.

Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., (2010). Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. Animal Reproduction Science 117 (2010) 147–154.

Ráb P. Arefjev VA. Rábova M., (1996). C-banded karyotype of the sterlet, *Acipenser ruthenus*, from the Danube River. Sturg. Quart., 4(4): 10-12

Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F., Nash J.P., (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture, 234 (1-4), pp. 1-28.

Todd, P.R., (1976). Ultrastructure of the spermatozoa and spermiogenesis in New Zealand freshwater eels (*Anguillidae*). Cell and Tissue Research 171, 221-232.

Wei, Q., Li, P., Pšenička, M., Alavi, S.M.H., Shen, L., Liu J., Peknicova, J., Linhart, O., (2007a). Ultrastructure and morphology of spermatozoa in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray 1835) using scanning and transmission electron microscopy. Theriogenology 67, 1269–1278.