

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Úroveň spermiace mlíčáků lína obecného (*Tinca tinca L.*)  
s použitím komerčního hormonálního preparátu**

Akademická knihovna JU



3291025504

Autor:

Jindřich Hušek

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Otomar Linhart, DrSc.

Konzultant:

Ing. David Gela

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Jindřich Hušek**

Studijní program: M 4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rybářství

Název tématu: **Úroveň spermiace mlíčáků lína obecného (*Tinca tinca* L.) s použitím komerčního hormonálního preparátu**

### Zásady pro vypracování:

(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

Cílem práce je zjištění úrovně spermiace mlíčáků lína obecného při využití komerčních hormonálních preparátů.

V souvislosti se vstupem ČR do EU bude nutné přirozené hormonální látky k synchronizaci spermiace nahradit syntetickými preparáty. Studium u samců lína obecného se proto soustředí na monitorování endokrinní odezvy úrovně 17- $\alpha$  ketotestosteronu a testosteronu s úrovní spermiace a fertility v závislosti na specifitě a dávce syntetického hormonu. K stimulaci spermiace bude použito komerčních preparátů jako je OVOPEL, KOBARELIN, Spawn Carp, nebo přípravky od firmy ARGENT, které jsou založeny na bázi GnRH/LHRH analogů. Metodika práce bude postavena na analytických metodách Schulze a Miura (2002), Linharta et al. (2000) při využití výsledků dosažených v roce 1995 (Linhart et al., 1995). Veškeré zjištěné hodnoty o objemu a množství spermatu v závislosti na hmotnosti mlíčáků budou v závislosti na dávce analogu analyzovány ANOVou (Linhart et al., 2000).



Rozsah grafických prací: 10 - 20 tabulek a grafů

Rozsah průvodní zprávy: 40 - 60 stran

Seznam odborné literatury:

- Schulz R.W., Miura T., 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 43-56.
- Linhart, O., Peter, R.E., Rothbard, S., Zohar, Y. and Kvasnička, P., 1995. Spermiation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH Analogues and injection of carp pituitary extract. *Aquaculture*, 129: 119-121.
- Linhart, O., Mims S.D., Gomelsky B., Hiott, A.E., Shelton W.L., Cosson J., Rodina, M. and Gela, D., 2000. Spermiation of paddlefish (*Polyodon spathula*) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary extract. *Aquatic. Liv.Res.*, 13(6), 1-6.
- Linhart, O. and Billard, R., 1995. Biology of gametes and artificial reproduction in common tench (*Tinca tinca* L.). A review. *Pol.Arch.Hydrobiol.*, 42(1-2): 37-56.
- Linhart, O., Rodina, M., Bastl, J., Cosson J., 2003. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). *Journal of Appl. Ichtyol.*, 19, 177-181. (IF 0.51)

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Otomar Linhart, DrSc.

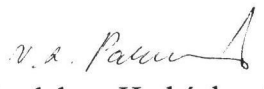
Konzultant: Ing. David Gela

Datum zadání diplomové práce: únor 2004

Termín odevzdání diplomové práce: 30. 4. 2006


JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

  
doc. Ing. Petr Hartvich, CSc.  
Vedoucí katedry

  
doc. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.  
Děkan

V Českých Budějovicích dne 10. 3. 2004

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně za pomoci odborné literatury a metodických pokynů vedoucího a konzultanta diplomové práce.



.....

podpis

Děkuji doc. Ing. Otomaru Linhartovi, DrSc. za odborné vedení a poskytnutí odborné literatury, Ing. Davidu Gelovi za poskytnutí cenných rad.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Marku Rodinovi a celému kolektivu oddělení genetiky a šlechtění ryb VÚRH ve Vodňanech za ochotu, kamarádský přístup a pomoc při odběrech, měření a zpracování vzorků.

# OBSAH

<b>1.</b>	<b>Úvod</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Literární přehled</b>	<b>4</b>
2. 1.	Obecný popis reprodukce ryb	4
2.1.1.	Diferenciace pohlaví a zrání pohlavních buněk	4
2. 2.	Řízená reprodukce lína s ukazateli spermiace	7
2.2.1.	Charakteristika druhu	7
2.2.2.	Histologická charakteristika gonád	10
2.2.2.1.	Ovária	10
2.2.2.2.	Testes	11
2.2.2.2.1.	Charakteristika spermií	12
2.2.2.2.1.1.	Morfologická charakteristika spermií	14
2.2.2.2.2.	Semenná plazma	15
2.2.3.	Výtěr	16
2.2.3.1.	Plodnost	16
2.2.3.2.	Umělý výtěr lína obecného	17
2.2.3.3.	Příprava generačních ryb	17
2.2.3.4.	Hormonální stimulace	18
2.2.3.5.	Příprava imobilizačního roztoku	21
2.2.3.6.	Osemenění a aktivace jiker	21
2.2.4.	Inkubace, líhnutí a odchov	22
<b>3.</b>	<b>Materiál a metodika</b>	<b>24</b>
3.1.	Charakteristika pokusných ryb	24
3.2.	Vyhodnocení ploidity sameců a spermií	24
3.3.	Stimulace a vyhodnocení spermiace	25
3.4.	Pozorování pohyblivosti a rychlosti spermií	26
3.5.	Vyhodnocení rychlosti a motility	27
3.6.	Fertilizace a líhnutí	28
3.7.	Analýza dat	29
<b>4.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>30</b>
4.1.	Objem a počet spermií	30
4.1.1.	Objem spermatu	30

4.1.2.	Počet spermií	32
4.2.	Rychlost a motilita spermií	34
4.2.1.	Rychlost pohybu spermií	34
4.2.2.	Motilita spermií	36
4.3.	Oplodnění a líhnutí	37
<b>5.</b>	<b>Diskuze</b>	<b>38</b>
5.1.	Objem a počet spermií	38
5.2.	Motilita a rychlost	38
5.3.	Oplození a líhnutí	39
<b>6.</b>	<b>Závěr</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>Přílohy</b>	<b>48</b>

# 1. ÚVOD

Lín obecný je významným vedlejším druhem v rybničním hospodářství, kde je ve společné obsádce s kaprem chován už od počátku 18. století (Šusta, 1884). Je důležitým druhem i v našem sportovním rybářství při obhospodařování volných vod. Díky jeho adaptabilitě k různým existenčním podmínkám je možné lína označit za ideální doplňkovou rybu vícedruhových obsádek s početní převahou kapra. Lín obecný má velmi chutné, bíle zbarvené maso, ceněné více v zahraničí než u nás. Z tohoto důvodu je od konce minulého století výhodným exportním artiklem. V pořadí exportovaných druhů je lín na třetím místě (za kaprem a pstruhem duhovým) a na zahraničních trzích je o něj z našich vedlejších sladkovodních ryb největší zájem. Jeho produkce je však z nejrůznějších důvodů nedostačující a poptávku vnitřního a zahraničního obchodu se nedaří uspokojovat. Jedním z mnoha faktorů omezující jeho rozvoj je dostupnost plůdku lína. Z tohoto důvodu je důležité osvojit si ovulaci a spermiaci ve výrobním cyklu. Chovatelé si tuto skutečnost uvědomují a postupem času se začala línovi věnovat větší pozornost. Celková produkce lína obecného byla v roce 1990 - 2430 t a pozvolna vzrostla na 3880 t v roce 2001 (FAO, 2002).

Cílem této práce je zjištění úrovně spermiace mlíčáků lína obecného při využití komerčních hormonálních preparátů. Díky vstupu ČR do EU bude nutné přirozené hormonální látky k synchronizaci spermiace nahradit syntetickými preparáty. Jedná se především o zjištění úrovně spermiace a fertility v závislosti na specifitě a dávce syntetického hormonu. Metodika práce bude postavena na analytických metodách Schulze a Miura (2002), Linharta et al. (2000) při využití starých výsledků dosažených v roce 1995 (Linhart et al., 1995). Veškeré zjištěné hodnoty o objemu a množství spermatu v závislosti na hmotnosti mlíčáků budou v závislosti na dávce analogu analyzovány ANOVou (Linhart et al., 2000).

## 2. Literární přehled

### 2.1. Obecný popis reprodukce ryb

#### 2.1.1. Diferenciace pohlaví a zrání pohlavních buněk

V těle každého nového jedince jsou „osídleny“ gonády tzv. primordiálními gonocyty, neboli PGC buňkami (primordial germ cells) = prapohlavní buňky, z nichž vznikají buňky pohlavní. Jak shrnuje Linhart a Billard (1995), zárodečné buňky u kostnatých ryb vznikají mimo pohlavní orgány již během embryonálního vývoje ve stadiu morulace a následně migrují do místa gonád. Gonády jsou tvořeny somatickými buňkami s kolonizací PGC.

Diferenciace ovaria začíná mitotickým dělením kmenových (zárodečných) buněk, ale rovněž i somatických buněk, na které navazuje produkce buněk pro produkci steroidů a meiotická profáze u zárodečných buněk.

Diferenciace varlat začíná u normálních gonochoristů mitózou spermatogonií, tvorbou buněk produkujících steroidy a následnou meiózou sekundárních spermatogonií s přechodem na spermatocyty.

Iniciátorem diferenciace jsou s největší pravděpodobností endogenní hormony. U lina nastává diferenciace gonád mezi 40 – 70 dny po oplození s identifikací primordiálních zárodečných buněk a oogonií 43 dní po vykulení (Dlugosz a kol., 1983; Dlugosz, 1986). Primární pro diferenciaci samičího pohlaví jsou folikulární buňky se steroidním hormonem kolem PGC v zakládajících se ováriích. U samců ve varlatech jsou to Leydigovy buňky pro produkci steroidů se signálem z adenohipofýzy. V další fázi je dominantní FSH gonadotropin s produkcí steroidů v Sertoliho buňkách.

Hormonální řízení zrání pohlavních buněk u mličáků : Řízena je aktivita kmenových buněk v gonádě, proliferace spermatogonií se vstupem do meiozy, ztráta pohlavních buněk v průběhu zrání v cystách s následnou apoptózou a množení Sertoliho buněk.

Nejvyšším řídicím centrem s kontrolou nad gonádami je hypotalamus s produkcí GnRH I a II (Linhart, 2004). To jsou hormony, které stimulují vylučování GTH I (FSH) a GTH II (LH) z adenohipofýzy. FSH působí na spermatogenezi a na Sertoliho buňky a jejich rozmnožování. Má vliv na produkci růstového hormonu (komplexní funkce) a steroidního hormonu 11-keto testosteronu. LH působí na Leydigovy buňky (nachází se v gonádě mezi cystami) s produkcí steroidů (11-keto testosteron) použitelných pro spermiogenezi. GTH

stimulují steroidní hormony, tzn. především testosterony, jejichž hlavní součástí je 11-keto testosteron v Sertoliho buňkách. 11-keto testosteron pak stimuluje růstový faktor produkovaný Sertoliho buňkami.

Steroidní hormony tvoří komplex androgeních (testosteron, 11-keta testosteron), estrogeních a progestiních hormonů. 11-keta testosteron stimuluje spermatogenezi a spermiogenezi prostřednictvím insulinových růstových faktorů a activinu. Komplex estrogenů (E2) reguluje spermatogoniální funkci kmenových buněk.

Výsledkem je nepřímá regulace spermatogeneze s testosteronem, kde je dominujícím androgenem 11-keta testosteron, prostřednictvím stimulace růstu se syntézou steroidních hormonů, tzn. androgenů, estrogenů a progestinů. Steroidní hormony ovlivňují znovu obnovu spermatogoniálních kmenových buněk a iniciaci spermatogoniálního rozmnožování, mitózy, meiózy a apoptózy (Linhart, 2004).

Hormonální řízení zrání pohlavních buněk u jikernaček: Řízena je produkce vitelogeninu, růst ovocytů v průběhu zadržení meiózy, dozrávání ovocytů, ovulace, folikulogeneze, tedy celá ovogeneze.

Nejvyšším řídicím centrem je hypotalamus s produkcí GnRH I a II (Linhart, 2004). Vícečetné faktory, jako jsou GnRH, serotonin, activin a neuropeptid, stimuluji vylučování FSH. Dopamin má inhibiční účinky na sekreci FSH, ten je kontrolován vzrůstající sekrecí GnRH a steroidy s regulací GABA (GABA reguluje a stimuluje rovněž GnRH). Faktory prostředí a externí faktory působí přímo nebo nepřímo přes GnRH-FSH, především přes úroveň melatoninu (hormon z epifyzy). Sexuální steroidy ovládají pozitivně i negativně jak sekreci GnRH, tak následně FSH (Linhart, 2004).

Vitelogeneze je způsobena pomocí LH. Růst ovocytů v průběhu zadržení meiózy je kontrolován produkcí 17-beta estradiolu v granulózních buňkách za účasti aromatázy. 17-beta estradiol vzniká z testosteronu za podpory aromatázy, která difunduje z granulózních buněk z théky. Vytváření vitelinní membrány je regulováno komplexem hormonů E2. Za dozrávání ovocytů je odpovědný LH. V době dokončení folikulu s ovocylem se LH naváže na receptor v théce, který spustí tvorbu tzv. indukčně dozrávacího hormonu (MIH) v závislosti na meióze. LH je též odpovědný za opětovné nastartování meiózy. Schopnost ovocytu dozrát kontroluje především GTH v návaznosti na activin A a B. Produkce MIH je důležitá pro ovulaci a je ovládaná nMIHR (jaderný dozrávací indukční receptor). Výsledkem stimulace je produkce prostaglandinu PGF (Linhart, 2004).



Dozrávání samčích pohlavních buněk: Primární spermatogonie, což je permanentní zárodečná buňka uzavřená do lůžka ze Sertoliho buňky, se mitoticky dělí. Z nich se vytvoří v době nástupu spermatogeneze spermatogonie sekundární. Výsledkem tohoto dělení je skupina pohlavních buněk, většinou obklopených obalem, která je nazývána cystou (Sakun a Buckaja, 1968). Sertoliho buňky hrají dominantní roli v rozvoji testes a jejich funkci. V cystách nastupuje meiotické dělení u spermatogonií sekundárních s produkcí spermatocytu a nakonec haploidní spermatidy (pohlavní buňky). Dále následuje spermiogeneze se změnou spermatid na spermie, což je doprovázeno eliminací plasmy (ztráta 80-90%), kondenzací chromatinu a vytvořením bičíku. Spermie se uvolňují z cyst a zaplňují kanálek lobulu. Později se dostávají do odvodných kanálků, dochází ke koncentraci spermatu v odvodných kanálcích (kapacitace) (Linhart, 2004).

Dozrávání samičích pohlavních buněk: Primární ovogonie se mitoticky množí a jsou obaleny primárním folikulem. Ty se mění v sekundární ovogonie s rostoucím folikulem (vícevrstevný epitel, théka) s dutinou, ve které se ovogonie sekundární mění na ovocyt I.řádu. Ovocyt I.řádu roste ve folikulu obklopen coronou radiata. Zralý folikul s vajíčkem je tzv. Graafův folikul.

Růst ovocytů probíhá při zadržení meiózy. Při *předvitelogenním růstu* (protoplasmatický růst) dochází k produkci ribosomální RNA a mRNA. Glycoproteiny se syntetizují a později formují v období vnějšího růstu do kortikálních granulí. V ovocytu se začínají vyvíjet ovocytární lipidy. Vlastní folikul a jeho struktura se vyvíjí do formy mikrovýrůstků korespondující s výrůstkou v oblasti zony radiata (vitelinní obálky ovocytu a budoucího vajíčka). Vlastní prorůstání mikrovýrůstků (klků) obálky ovocytu do obalu folikulu je umožněno tvorbou tzv. VE proteinu (vitelinního proteinu), kontrolovaného estrogeny.

V místech výrůstků se vytvářejí tzv. vnější kanálky pro transport především vitelogeninu (*vitelogenní růst*), což je glyko-fosfolipo-protein syntetizovaný v játrech s transportem přes cévní systém. Transportují se též strukturální lipidy a esenciální tuky. Vitelogenin se dostává přes jednotlivé vnější a vnitřní vrstvy folikulu a vnější vrstvy ovocytu (kanálky) až k ovolemě, naváže se na specifický receptor (s dekódovaným genem) v oblasti ovolemy, vytvoří váček procházející ovolemou do ovocytu a fúzuje s lysozomem. Následuje v lysozomu vznik žloutkového proteinu (Linhart, 2004).

Z vitelogeninu se vytváří dva hlavní žloutkové proteiny - lipovitelin (Lv) a fosvitin (Pv). Lv je důležitý pro embryogenezi a Pv důležitý pro transport iontů, pro tvorbu skeletu a metabolické funkce.

Nastává tvorba *vitelinní membrány* (obálky, zona radiata). Obal tvoří théka, folikulární epitel, rosolovitá vrstva budoucího ovocytu a vajíčka, zona radiata ovocytu (chorion) a kortikální vrstva ovocytu. Zpočátku je vitelinní membrána budovaná jako vnější a vnitřní vrstva s další strukturací.

Dochází k *cytoplasmatickému dozrávání*, tedy hydrataci, dokončení proteolýzy a přípravě ovocytu k výtěru do jiného osmotického prostředí na kterém se podílejí některé aminokyseliny.

Ovulace se skládá z procesů degradace s prasknutím Graafova folikulu a procesu vypuzení zralého vajíčka do vejcovodu a dále do vnějšího prostředí. Ovulace je asociována s degradací zbylého folikulu za účasti progesteronu a prostaglandinu s aktivací proteolytických enzymů. Po výtěru jsou pohlavní orgány nejmenší z celého vývojového cyklu (Pimpicka, 1990).

## **2.2. Řízená reprodukce lína s ukazateli spermiace**

### **2.2.1. Charakteristika druhu**

Lín obecný patří do čeledi ryb kaprovitých (*Cyprinidae*), která je nejbohatší čeledí sladkovodních ryb zahrnující podle Nelsona (1985, ex. Baruš, Oliva a kol., 1995) 2070 druhů ve 194 rodech. Je původem europskosibiřské zoogeografické podoblasti. Lín je rozšířen téměř po celé Evropě, přičemž areál jeho rozšíření nezahrnuje severní Norsko, Švédsko, Finsko a chybí ve střední Asii. V České republice je rozšířen po celém území ve středních a dolních tocích řek, rybnících, tůních, údolních nádržích a dalších vhodných lokalitách.

Ve společné obsádce s kaprem je chován od počátku 18. století. V 19. století byla v některých českých rybníkářstvích již vysoká produkce. Velké rozšíření lína nastalo koncem minulého století, kdy již byl velmi rozvinut vývoz do zahraničí, především do Saska.

O produkci lina z akvakultur i volných vod (celkem) v tunách živé hmotnosti podle největších evropských producentů dle Froese a Pauly (2003) vypovídá následující tabulka:

Stát / roky	1996	1997	1998	1999	2000
Rusko	936	1 647	990	1 071	1 307
Francie	700	1 400	1 200	1 560	1 200
Česká republika	340	414	371	362	275
Španělsko	160	215	168	161	162
Polsko	97	101	91	102	160

Lín obecný má válcovité tělo, které dosahuje délky 30 - 63,5 cm, hmotnosti do 1,2 - 6 kg, 7,5 kg vážící lín byl chycen v roce 1857 u Kyjeva (Berg, 1948). Tělo je poměrně krátké, dosti vysoké, pokryté drobnými šupinami, které velmi pevně tkví v kůži a mají podélně protáhlý eliptický tvar. Počet šupin v postranní čáře zjištěný u línů z jižních Čech Matěnovou et Pivničkou (1980) činil 89 až 111 (průměr 102,4), počet žaberních tyčinek na 1. žaberním oblouku 12 až 19 (průměr 15). Podle Dyka (1956) se vzácně vyskytují i líni s náběhem k lysosti. Všechny ploutve jsou zaoblené, ocasní ploutev je jen slabě vykrojena. Ústa jsou koncová, v koutcích po jednom vousku. Převažující barvou je temně zelená. Hřbetní strana těla je tmavě zelená, boky zelenohnědé až zelenošedé se žlutavým až zlatavým leskem. Ploutve jsou tmavé, šedočerné až hnědozelené. Jedinci z hlubokých zarostlých rybníků a tůní jsou velmi tmaví, zatímco exempláři z prosvětlených mělkých lokalit a mladí jedinci jsou světle zbarvení (Šimek, 1959; Penjaz et al., 1973). Je známo i několik barevných mutací. Zajímavé jsou na oranžově červeném podkladě tmavě skvrnitě aberace línů (aberr. *Aurata* Bloch, 1783-1785), o kterých se zmiňují Frič (1908), Dyk (1956), Oliva et al. (1968) a Sabanejev (1980), který výslovně upozorňuje, že tato aberace je známa z Čech a Slezka. Zlaté a modré zbarvení bylo poprvé podrobněji popsáno Kluppem (1985) a Geldhauserem (1988) v německých chovech. Dědičnost zlatého a modrého zbarvení u lina, jejich genotypy a jejich fenotypový projev popsali Kvasnička a kol. (1998). V rámci zlatého zbarvení byly při analýze štěpných poměrů zjištěny různé barevné variety (sytě oranžová, citrónová a bělobřichá).

Pohlavní dvojtvárnost je u lina výrazná. U samců břišní ploutve dosahují k řitnímu otvoru nebo jej přesahují. U samic břišní ploutve nedosahují k řitnímu otvoru a tvarem se podobají ploutvím prsním (Heckel et Kner, 1858; Oliva, 1952; Matěnová et Pivnička, 1980). Pohlaví lze podle těchto znaků bezpečně rozlišovat již od stáří 15 měsíců. U samců se rovněž v druhém roce života ztlušťuje nápadně druhý tvrdý (nerozvětvený) paprsek

břišních ploutvích a zakřivuje se. V době tření se navíc na hlavě a hřbetní straně těla objevují u samců rohovité třecí bradavky (Dyk, 1944; Oliva, 1963a).

Lín patří k našim nejodolnějším rybám. Nároky na obsah kyslíku rozpuštěného ve vodě má přibližně stejné jako karas obecný. Snáší vody kyselejší nebo s kolísajícími hodnotami pH od 5 do 9. Zdravotnímu stavu lína je však třeba věnovat mimořádnou pozornost. Příbuznost ke kapru a často chov ve společném prostředí ovlivňují možnost vzájemného přenosu infekčních a invazních chorob. Dyk (1944) např. upozornil, že líni mohou být hlavním ohniskem krevních bičíkoviců, kteří jsou chobotnatkami přenášeni na ostatní ryby, včetně kapra. Při pokusných odlovech v rybnících s polokulturami se snažíme, abychom mohli veterinárně vyšetřit i prisazené druhy ryb. Lín je rybou stálou, stanovištní. Je typickou rybou dna. Živí se především larvami hmyzu, červy a některými korýši měkkýši (Pekař et Krupauer, 1968). Součástí potravy, zejména u starších jedinců, bývají i rostliny, u mladších jedinců pak fytoplankton. Na některých lokalitách bývají významnou složkou potravy línů i měkkýši.

Lín patří do skupiny fytofilních ryb. Přirozeně se rozmnožuje na vodním nebo zatopeném suchozemském rostlinstvu, zpravidla od konce května až do začátku srpna. Tato rozvleklost je vyvolána nejen vlivem rozdílného životního prostředí, ale i zvláštním režimem jeho reprodukčního cyklu. Vyznačuje se tzv. porcovým výtěrem. Začátek tření je podmíněn minimální teplotou vody + 18 °C. Pohlavní dospělosti dosahují samci i samice nejdříve ve třetím, obvykle však až ve čtvrtém roce života. Ojedinele se udává pohlavní dospělost samců již ve druhém roce života (Reiser et al., 1983). Údaje o plodnosti lína se liší v závislosti na stáří samic a odlišnosti životního prostředí. Většina autorů udává plodnost línů do 300 000 jiker (např. Dyk, 1956). Podle Olivy et al. (1968) dosahuje téměř 1 000 000 jiker. Inkubační doba jiker činí u lína 60 D°, která při teplotě 20 - 22 °C představuje tři dny. Před výtěrem se shromažďují líni do početných hejn, ve kterých probíhá mezi generačními rybami určitý výběr. Jeho výsledkem je vytvoření 2-3 členných skupin, které se trou v hloubce od 0,5 do 1 m na vodní porosty. Podle Dyka (1956) pozbývají líni v předvítěrovém období svou příslovečnou plachost, takže je možné se k nim bezprostředně přiblížit. Umělý výtěr lína popsali Kouřil a Chábera (1976). Sledováním jeho vývoje v embryonální a larvální periodě života se zabývali Peňáz et al. (1981, 1982). Lín je diploidní druh s častým výskytem triploidů. Výskytem spontánních triploidů u lína se poprvé zabýval Kvasnička a kol. (1992) ve spojení s vyšším růstem a reprodukční sterilitou jedinců v umělých chovech. Větší konečné velikosti, ani rychlejšího růstu není dosahováno v závislosti na velikosti buněk, ale v důsledku závislosti na odchylce od

normálního vývoje gonád predisponováním energie získané výživou z reprodukce do somatického růstu. Kvasnička a Flajšhans (1993) vyvinuli metodiku morfologické identifikace triploidních jedinců v remontních hejnech lína. U starších ryb byly zjištěny u obou pohlaví zakrnělé gonády. První prací v indukci triploidie lína byla studie Linharta a kol. (1989), kteří použili chladového šoku. Flajšhans a kol. (1993b) poprvé srovnal účinnost použití chladového a teplého šoku, a šoku hydrostatickým tlakem, k indukci triploidie a tetraploidie u lína.

## **2.2.2 Histologická charakteristika gonád**

### **2.2.2.1. Ovária**

Histologický obraz a velikost reprodukčních buněk viditelných v příčných řezech během roku popisuje Pimpicka (1989, 1990) a shrnuli Linhart a Billard (1995). Ovaria lína obsahují oocyty ve všech stádiích vývoje, tzn., že jde o asynchronní typ zrání oocytů. Morawska (1982) uvádí, že příčinou asynchronního růstu může být teplota vody. U pohlavně dospělých ryb s dávkovým výtěrem probíhá vývoj reprodukčních buněk kontinuálně. Velikost oocytů je charakteristická pro jednotlivá stadia buněčného vývoje a relativně stálá po celý rok. To ukazuje, že přechod oocytů do dalšího stadia je dán nejen změnami v jádře, cytoplazmě a folikulech, ale také velikostí oocytů (Pimpicka, 1990). Pimpicka (1989, 1990) se rovněž zabývala průběhem a vývojem stadií zralosti ovárií. Ovária byly rozděleny do šesti stadií zralosti. První stádium zralosti končí při zrání oocytů trofoplazmatického růstu, kdy ovarium přechází ve druhé stadium zralosti (Pimpicka, 1998). V tomto stádiu se ovária nachází pouze na počátku pohlavní dospělosti, kdy ještě nejsou přítomny oocyty ve vakuolizaci a atretické oocyty. Třetí stádium zralosti představuje nejdelší období z celého reprodukčního cyklu, neboť ovaria setrvávají v tomto stádiu zhruba od září do dubna následujícího roku. Ovária přechází do této fáze klidu po dlouhé reprodukční sezoně. Nástup čtvrtého stadia zralosti (vitelogeneze) nastává při zvýšení průměrné denní teploty na konci dubna o během května. Délka vitelogeneze zjištěná v přirozených podmínkách Pimpickou (1989) byla od 21 do 32 dní. Páté stádium zralosti je velmi krátké a předchází vlastnímu výtěru. V této fázi je nejvyšší zastoupení trofoplazmatických oocytů z celého roku. Po dokončení vývoje první dávky jiker a vhodných podmínkách prostředí dochází k výtěru. Povýtěrové stadium neboli šesté

stadium je členěno na několik podstadií v závislosti na zralosti oocytů převažujících v ovariu.

Ovárium jako takové je párový válcovitý orgán v dorsální, mediální a spíš oválnější části břišní dutiny, zakončený v kaudální části vejcovodem s vývodem do tzv. pohlavní papily mezi řitním otvorem a močovou trubicí. Vejcovody odvádějí vajíčka z gonády, sekreci obstarávají sekreční buňky ovária. Většinou dochází ke společnému vývodu močových a pohlavních cest, do tzv. pohlavní papily.

#### 2.2.2.2. Testes

Testes (varlata) jsou samčí pohlavní žlázy. Dozrálá varlata jsou bělavě zbarvená, protažená do délky a na průřezu oválná. Zprvu tvoří zárodečné buňky pruhy, v nichž opakovaným dělením vznikají kulovité shluky buněk. Mezi jednotlivé shluky proniká pojivo, které je vzájemně odděluje. Uvnitř do délky se protahujících váčků vzniká dutina, obklopená několika vrstvami spermatogonií. Vzájemné spojení trubiček a váčků s odvodným vývodem se děje zpravidla až v dospělosti.

Stadii zralosti se zabývali Sakun a Buckaja (1968) a Linhart a Billard (1995). V prvním stádiu zralosti je pohlaví často nerozlišitelné. Gonády jsou v důsledku slabého rozvoje krevních cév bezbarvé nebo našedivělé. Pro druhé stadium je typická přítomnost pohlavních buněk v prvním stádiu spermatogeneze. Barva gonád přechází mezi šedavou a slabě růžovou. Třetí stadium zralosti je charakterizováno intenzivním průběhem všech stadií spermatogeneze. Objem testes se v důsledku intenzivních procesů silně zvětšuje. Ve čtvrtém stádiu zralosti jsou již přítomny zralé spermie v kanálcích, uvolněných z cyst. Testes, v důsledku velkých množství spermií, získávají mléčnou barvu. Při pátém stádiu zralosti dosahuje výtěrové chování mlíčáků vrcholu. Semeníky jsou barvy mléčné, na omak měkké. Šesté stadium zralosti charakterizuje povýtěrový stav pohlavních orgánů. Gonády jsou barvy růžové nebo šedavé.

U lina jsou testes párové, prodloužené orgány, ležící v dorzální části břišní dutiny. Chámovod spojuje každé testes s urogenitální papilou. U mnoha kostnatých ryb je varle složeno z mnoha lobulů, které jsou od sebe odděleny vazivovými septy (Billard, 1986). V lobulech probíhá spermatogeneze v oddělených cystách, které se postupně zvětšují a nakonec praskají, čímž se uvolní sperma do lumenu lobulu, jenž je spojen s chámovodem.



Uvnitř semenných kanáklů se nacházejí, mimo pohlavních buněk, Sertoliho buňky, které plní opornou a výživnou funkci (Sakun a Buckaja, 1968). Testes lína lze zařadit mezi cyprinoidní typ samčích pohlavních orgánů. Vývojová stádia samčích pohlavních buněk shrnuli Linhart a Billard (1995).

#### 2.2.2.2.1. Charakteristika spermií

Charakteristikou spermií se zabývalo několik autorů. Spermie u karasa stříbřitého (*Carassius auratus*) hodnotil Fribourgh a kol. (1970). Stein (1981) srovnával ultrastrukturu spermií štiky obecné (*Esox lucius L.*), pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a kapra obecného. U lína se charakteristikou jednotlivých částí spermií zabývala studie Geldhausera (1989).

Sperma lína obecného je konzistence a barvy mléčné, hustoty řídké až velmi řídké. Používají se různá kritéria k odhadu jakosti mlíči: je to barva a konzistence, obsah první nebo následné ejakulace, koncentrace spermií a jejich celkový počet, motilita spermií, rychlost pohybu, počet aktivních spermií, procento mrtvých spermií, procento morfologicky nezměněných spermií (Terlecki a Kempinska, 1956; Wieniawski, 1965; Rudnicki et al., 1971; James, 1966; Ginzburg, 1968; Turdakov, 1972; Turdakov a Aminova, 1973; Hochman et al. 1974; Goryczko a Tomasik, 1975; Moczarski, 1976; Opuszynski, 1979).

Sperma lína je vždy naředěno močí. Moč se automaticky dostává do spermatu nebo naopak při masáži břišní partie a tím i masáži varlat a močového měchýře. Linhart et al. (2003) zkoumal močový měchýř u lína (*Tinca tinca*), kde se nachází jako malý bělavý váček přiléhající těsně k semennému kanálku. Obsahoval od 0,5 - 2ml moči, což je podobný objem jako u tilapie (*Oreochromis mossambicus*) (Linhart et al., 1999), ale menší než u sumce velkého (*Silurus glanis*) (Legendre et al., 1996). Močový měchýř hraje u sladkovodních ryb významnou roli, protože zadržuje v těle důležité ionty (Curties et Wood, 1991). Tekutina z měchýře je čirá bez přítomnosti spermií s osmotickou koncentrací na úrovni od 82 do 123 mOsmol/kg. Obsahuje vysoké koncentrace iontů: 30.9mM Na<sup>+</sup>, 4.3mM K<sup>+</sup>, 0.9mM Ca<sup>2+</sup> a 0.6mM Mg<sup>2+</sup>. Testikulární sperma vykazuje osmolalitu na úrovni od 244 do 299 mOsmol/kg (Linhart a kol., 2000b). Sperma neředěné močí má osmotickou koncentraci na úrovni 300 mOsmol/kg a je tedy logické, že spermie jsou močí aktivovány. Sperma lína tudíž nemůže být ani krátkodobě uchováváno bez použití imobilizačního roztoku kvůli rozsáhlé kontaminaci močí (Linhart et al., 1985;

Linhart et al., 2003). Imobilizující roztok umožňuje zastavit pohyb spermíí, což je vyvoláno vysokým osmotickým tlakem roztoku a poměrem sodných a draselných kationtů, které působí na omezení prosté difuze a aktivní transport iontů. Spermie se zpětně aktivují po přilítí vody, která změní osmotickou koncentraci, aktivuje metabolismus a tím i pohyb spermíí. Je nutné dodržovat určitý poměr mezi spermatem a imobilizačním roztokem. U sumce je to např. 1:1 a roztok se skládá z 200mmol NaCl, 30mmol trisu, pH 7, tzn. 11,8g NaCl a 3,6g trisu, u lína též 1:1 se složením 180mmol NaCl, 2,7mmol KCl, 1,4mmol CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O a 2,4mmol NaHCO<sub>3</sub> (Linhart, 2004). Výsledky získané z experimentů prováděných na kinetiku spermíí, pohybové schopnosti, oplodňovací schopnosti a následné líhnutí (Rodina et al., 2004) ukázaly, že pouze sperma odebrané do různých imobilizačních roztoků může být úspěšně použito pro umělou inseminaci s dobrou motilitou a fertilitou spermíí při době skladování nad 10h při 0 – 4 °C (Linhart and Billard, 1995; Rodina et al., 2004).

Při zmrazování spermatu platí, že čím je menší objem zmrazované látky, tím je lepší výsledek. Nejčastěji se zmrazují objemy spermatu 1 – 4 ml. Zmrazování může být postupné, či rychlé, takřka bez krystalizace, tzv. vitrifikace. Zmrazuje se nejčastěji na teplotu kapalného dusíku, tzn. -196 °C. Při zmrazování se používá rovněž kryoprotektivum, které velmi rychle pronikne do buňky a vytlačí z ní vodu. Funkcí kryoprotektiva je usměrnění krystalů při krystalizaci s jednotnou strukturou a orientací, čímž se snižuje roztrhání buněk.

V testes jsou spermie nepohyblivé a u mnoha druhů též v semenné plasmě. Okolní faktory, jako jsou ionty, pH nebo osmolalita, mohou způsobit depolarizaci buněčné membrány spermíí a stimulovat pohyb spermíí (Linhart, 1991). Scheuring (1925) zjistil, že ionty Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> a Ca<sup>2+</sup> snižují inhibiční účinek K<sup>+</sup> s tím, že bivalentní kationty jsou účinnější. Gatti et al. (1990) uvádí, že v roztoku s vysokou koncentrací K<sup>+</sup> a nízkým pH dojde při zvýšení externí koncentrace Ca<sup>2+</sup> k překrytí inhibičního účinku H<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> na motilitu spermíí.

Doba hromadného pohybu spermíí činí 36-52 s, přičemž pohyb spermíí končí po 161 až 188s. Objem spermatu se pohybuje na úrovni 0,7 - 0,8 ml, zatím co relativní objem spermatu na kg hmotnosti mlíčka se pohybuje od 1,6 do 2,6 ml (Linhart, 1995). Průměrná koncentrace spermíí v ml spermatu se pohybuje na úrovni 11,23 - 24,35.10<sup>9</sup> s celkovým počtem spermíí od 8,9 do 20,77.10<sup>9</sup> a relativní počet spermíí na 1 kg hmotnosti mlíčka činí od 18,50 do 48,16.10<sup>9</sup> (Linhart a kol., 1986, Linhart a Kvasnička, 1992).



Pro pohyb spermií je zapotřebí energie ve formě ATP pocházející z glykolýzy a oxidačních reakcí. Množstvím ATP ve spermiích se zabývali např. (Felix et al., 1956; Tibbs, 1962; Burnashova, 1960; Mohri, 1964; Christien et al., 1987). Burnashova (1960, 1982) uvádí, že po inhibici glykolýzy či oxidačních procesů u spermií ryb nastává snížení hladiny ATP a pohyb je pomalejší.

#### **2.2.2.2.1.1. Morfologická charakteristika spermií**

Rybí spermie jsou tvořeny hlavičkou, střední a koncovou částí. Ukazatele délky a šířky spermií měřil Geldhauser (1989), který určil průměrné hodnoty jako 3,1  $\mu\text{m}$  a 4,0  $\mu\text{m}$ .

Základní úlohou hlavičky spermií je zadržení a přenos genetického materiálu, lokalizovaného v nukleoplazmě. Nezbytným předpokladem pro zdárný průnik spermie do vajíčka je správný tvar a velikost hlavičky (Ginsburg, 1968). Tvar hlavičky je pro jednotlivé druhy specifický, např. kulatá hlavička spermií u štiky či oválná až srdčitá u kapra a amura bílého. U chrupavčitých a kostnatých ryb s vnějším oplozením se vyvinuly rozdílné tvary hlaviček (Linhart et al., 1991). Kulovitý tvar zjištěný u lína Geldhauserem (1989) odpovídá ostatním druhům kaprovitých ryb. Pozorování v elektronovém mikroskopu prokázala, že hlavička spermií lína je obklopena plazmatickou membránou, k níž bezprostředně přiléhá membrána jaderná. Cytoplazma hlavičky spermií lína je tvořena jemnými granulemi chromatinu, v němž je obsažena DNA s haploidní sadou chromosomů (Linhart, 1991), stejně jako u ostatních kaprovitých a lososovitých (Geldhauser, 1989).

Střední část je pevně spojena s hlavičkou. Obsahuje centriolární a mitochondriální segment. Mitochondriální segment je rozpoznatelný jak u chrupavčitých tak u kostnatých ryb, zatím co centriolární segment je ukryt v tzv. vnitrojaderném kanálku a je nerozeznatelný (Ginsburg, 1968). Mitochondriální segment je tvořen podle druhové příslušnosti různým počtem mitochondrií. U lína zjistil Geldhauser (1989) 3 mitochondrie, což odpovídá obecnému počtu 2 – 10 u kaprovitých ryb. Centriolární segment je tvořen proximální a distální centriolou. Distální centriola je útvar s devíti vnějšími dvojitými filamenti bez centrální dvojice filament (Geldhauser, 1989). Proximální centriola je útvar s vnějším uspořádáním vnějších trojitých filament (9x3) v konfiguraci (9+0) (Geldhauser, 1989; Stein, 1981). Obě centrioly jsou navzájem kolmé a jsou součástí ukotvení bičíku. Centrioly mají za úkol upevňovat bičík, který prochází skrz mitochondriální část

(Ginsburg, 1968). Střední část se jeví být asymetrická, takže bičík nikdy neprochází jejím středem (André, 1982).

Bičík spermie můžeme rozdělit na proximální, centrální a terminální část. U ryb je rozpoznatelná především centrální a terminální část. Bičík je složen z dvou centrálních a devíti periferních filament tzv. "9+2 komplex" (Mattei et al., 1972; Billard, 1969b). Centrální tubuly jsou obaleny centrální pochvou. Mezi periferními tubuly se nacházejí tzv. Dyneinova ramena a mezi centrálními a periferními tzv. radiální spojky. Základní princip pohybu bičíku je založen na střídání klouzání a fixace tubulů. Dyneinova ramena zabezpečují ohyb tubulů, jehož výsledkem je hadovitý pohyb. Radiální spojky koordinují na principu hvězdicovitého motoru postupné spouštění ohybu periferních tubulů, jehož výsledkem je třírozměrný rotační pohyb. U lína je průměr bičíku po celé jeho délce konstantní a je stejně jako hlavička kryt cytoplazmatickou membránou (Geldhauser, 1989).

#### 2.2.2.2.2. Semenná plazma

Na chemickém složení semenné plasmy a spermií zatím probíhalo jen málo výzkumů, a to zejména u kaprovitých a lososovitých ryb. Koncentrace iontů v semenné plasmě a spermií lína obecného je dle Linharta et. al (2003) 18,4 mmol/l  $\text{Na}^+$ , 1,9 mmol/l  $\text{K}^+$ , 0,5 mmol/l  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,6 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ . Scheuring (1925) poprvé poukázal na schopnost  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  redukovat inhibiční vlastnosti  $\text{K}^+$ . Schleng a Kahman (1938) pozorovali pohyblivost spermií v prostředí v závislosti na  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ . Někteří autoři zjistili, že inhibiční vlastnosti na motilitu spermií způsobené milimolárními koncentracemi ionty  $\text{K}^+$  jsou tlumeny zvýšenou koncentrací externího  $\text{Ca}^{2+}$  (Bayens et al., 1981; Cosson et al., 1986; Tamino a Morisawa, 1988), a předběžné výsledky signalizovaly, že koncentrace intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  se zvyšuje při zahájení pohybu spermií (Cosson, 1986; Cosson et al., 1989). Osmolalita semenné plasmy u lína je zhruba  $230 \pm 82$  mosmol/kg (Linhart et al., 2003). V semenné plasmě jsou přítomny metabolity glykolýzy a Krebsova cyklu. Množství metabolitů zkoumané u kaprovitých ryb bylo velmi proměnlivé v závislosti na délce uschování spermatu (Gosh, 1985). U kaprovitých ryb byly sledovány koncentrace koenzymů (nmol/l) po krátkém uchování (24h) spermatu v teplotě 4 – 5 °C (Gosh, 1985). Koncentrace proteinů a lipidů v semenné plasmě kaprovitých ryb po a bez hormonálního ošetření zkoumala Belova (1982). Rovněž byla ze semenné plasmy izolována fosfatáza, LDH a MDH, acetyl- a butyryl-esterázy, alanyl- a leucyl-aminopeptidázy a glukosaminázy (Breton et al., 1974).

Francis et Miller (1972) sledovali závislost doby uchování semenné plazmy na měnící se koncentraci  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADPH}$  a  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ .

Doba uchování	$\text{NAD}^+$	$\text{NADH}$	$\text{NAD}^+/\text{NADH}$	$\text{NADP}^+$	$\text{NADPH}$	$\text{NADP}^+/\text{NADPH}$
<b>0h</b>	639	20	31	27	40	0,68
<b>24h</b>	545	38	14,3	11	53	0,21

Koncentrace  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$  se snížila a naopak se zvýšila koncentrace  $\text{NADH}$  a  $\text{NADPH}$ , což souvisí s průběhem glykolózy.

### 2.2.3. Výtěr

Lín obecný je typickým fytofilním druhem, vytírajícím se na vodní rostliny, či v případě nově napouštěných údolních nádrží a rybníků na zbytky odumřelých suchozemských porostů. Jedním z hlavních enviromentálních faktorů, ovlivňující výtěr lína je teplota vody (Pimpicka, 1989). Výtěrová sezóna začíná v květnu, kdy teplota převyšuje rozmezí 17 °C až 22 °C. Výtěr probíhá 6 – 9 týdnů při 22 – 25 °C. V normálních třecích rybnících kladou jikernačky během výtěrové sezony 3 – 4 dávky jiker (Horoszewicz, 1981; Morawska, 1984). Interval mezi výtěry byl 15 – 22 dní a 1. dávka představovala 33 – 38 % z celkové plodnosti za sezonu jak shrnují Linhart a Billard (1995). Hladina a sezónní výkyvy teplot ovlivňují stupeň vývoje reprodukčních buněk a ovulační periodu. Optimální teplota pro přírodní výtěr je 22 – 24 °C, při nižších a vyšších teplotách se ryby začínají vytírat poněkud méně aktivně a v menších skupinách. Maximální teplota, ve které se lín může vytírat je 29 °C. Ukončení výtěrové sezony nastává od počátku do poloviny srpna, a není limitováno teplotou vody, stupněm zralosti gonád a kondicí ryb (Horoszewicz, 1981). Zbylé ovocyty, prázdné folikulární obaly a nejstarší zralé jikry, zbývající po posledním výtěru jsou pomalu resorbovány (Epler a kol., 1981).

#### 2.2.3.1. Plodnost

Údaje o plodnosti línů vykazované různými autory se liší v závislosti na stáří samic a odlišnosti životního prostředí. Plodnost se u lína stanovuje na konci května a začátku června. Měla by se stanovovat před vytřením první dávky jiker. Relativní plodnost línů je vysoká. Pohybuje se od 140 tis. do 230 tis. oocytů.  $\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti (Kubů a Kouřil,

1985), od 85,7 tis do 543,9 tis. oocytů.  $\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti (Pimpicka, 1991), nebo od 250 tis. do 400 tis. oocytů.  $\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti (Chábera, 1980). Krupauer et Pekař (1966) zjistili na Lipně u línů o hmotnosti 600 – 1300 g plodnost v rozmezí 78 322 – 302 164 jiker. Maximální plodnost stanovili u jikernačky o hmotnosti 1830 g (607 380 jiker). Absolutní plodnost je obvykle vyjádřena jako počet oocytů trofoplazmatického růstu. Pimpicka (1990) navrhla pro stanovení absolutní plodnosti, v dané sezoně, hraniční velikost trofoplazmatických oocytů na úroveň 0,2 mm. Linhart a Billard (1995) sumarizovali absolutní plodnost jikernaček v rozsahu 30 až 700 tis. na jednu jikernačku. Ne všechny zralé jikry jsou vytřeny a postupně se resorbují. Resorpční procesy mohou probíhat zároveň se zráním a ovulací dalších dávek jiker (Morawska, 1982).

Objem spermatu zjištěný Linhartem (1995) byl 0,7 – 0,8 ml, zatímco relativní objem na  $\text{kg}$  hmotnosti mlička byl 1,6 – 2,6 ml. Koncentrace spermií se pohybuje od 1,0 do  $20 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$ .

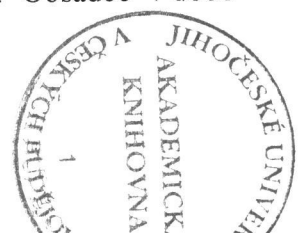
Masový progresivní pohyb spermií trvá od 36 do 52 sekund s celkovou úrovní pohybu od 161 do 181 sekund (Linhart a kol., 1986).

### 2.2.3.2. Umělý výtěr lína obecného

Umělý výtěr lína spojený s hypofyzací nebo s aplikací GnRH analogů patří k nejlepším metodám získávání plůdku lína. Dříve používané metody výtěru v přirozených podmínkách, popř. v modifikace s následným přepuštěním, dostatečně nevyužívají potenciální možnosti výtěru lína (dávkový výtěr), a neposkytují dostatečně vysoké procento oplození jiker, kulení a i přežití líního plůdku. Navíc nejsou dostatečně spolehlivé. V posledním období byl umělý výtěr lína obecného včetně spermatogeneze, ovogeneze a reprodukčních ukazatelů popsán Linhartem a Billardem (1995a), detailní popis umělého výtěru jikernaček podal Kouřil (1998) a výtěr mliček Linhart a kol. (1995). Sledováním vývoje lína v embryonální a larvální periodě života se zabývali Peňáz et al. (1981, 1982).

### 2.2.3.3. Příprava generačních ryb

Rybníky s komorovanými generačními rybami lovíme v průběhu měsíce dubna. Rozdělení ryb v průběhu komorování dle pohlaví je velmi důležité. Zamezí se tím přirozená reprodukce generačních ryb. Ryby sexujeme podle velikosti a tvaru břišních ploutví. Triploidní (sterilní) jedince z generačního hejna vyřazujeme. Obsádce v době



manipulace zajistíme vhodné podmínky (co nejkratší doba manipulace, přechovávání v průtočných nádržích, šetrné zacházení s rybou, atd.). Při výběru ryb k umělému výtěru se doporučuje zařadit trojnásobně větší počet mličáků než jikernaček. Předjde se tak případnému problému s nedostatkem spermatu. Jikernačky se k umělému výtěru používají ve věku 4 - 8 let o kusové hmotnosti 400 - 1500 g, mličáci od 3 let při kusové hmotnosti 250 - 800 g. V manipulačních rybnících rybám zajistíme v předvýtěrovém období ty nejlepší podmínky (přirozená potrava, příkrmování kvalitními obilovinami, naklíčeným obilím, krmnými směsmi KP-1, speciálními směsmi pro generační ryby). Ryby se krmí dvakrát až třikrát v týdnu a denní dávka činí 1 - 3 % celkové hmotnosti ryb (Pokorný a Kouřil, 1983).

Rybník lovíme v průběhu měsíce června podle možností 2 - 3 dny před plánovaným výtěrem. Je nutno se vyvarovat nebezpečí přidušení a poškození ryb. Při převozu dbáme na kolíkování a na 2000 l vody v přepravní bedně dáváme maximálně 80 - 100 kg ryb. Jikernačky v optimální zralosti se převezou na líheň do přípravných žlabů (50 kg na 1000 l vody) s vodou vytemperovanou na teplotu v rybníce (Linhart, 2000).

V období před výtěrem je vhodné u několika kusů jikernaček posoudit jejich připravenost podle polohy jádra v ovocytu (Kálal a kol., 1986). Po celkové anestézii jikernačky se provede biopsie přes stěnu břišní. Odběr ovocytů se provádí do fyziologického roztoku a po přidání pětinasobného objemu prosvětlovacího roztoku (složení ve 100ml: 60 ml koncentrovaného etanolu, 30 ml formaldehydu, 10 ml kyseliny octové) jsou jikry za pět minut průhledné, jádro je zřetelné a můžeme posoudit polohu jader v ovocytech. Tuto polohu pozorujeme po přenesení na hodinové sklíčko nebo do Petriho misky pod stereolupou.

#### **2.2.3.4. Hormonální stimulace**

Možnost využití exogenních přirozených rybích hormonů k vyvolání ovulace a spermiace u ryb je známa téměř sedmdesát let a již déle než půl století je v chovatelské praxi i využívána. Spouštěcí faktory savčích a rybích gonadotropinů zprvu v přirozené a v zápětí v syntetické podobě, byly v sedmdesátých a osmdesátých letech poměrně rychle odzkoušeny a zaváděny do chovatelské praxe v rybářství. Na přelomu šedesátých a sedmdesátých let se stal významným mezníkem objev spouštěcích faktorů (hormonů) gonadotropních hormonů (označovaných LHRH a později GnRH) Američany Guelleminem a Schallem. Princip účinku LHRH spočívá v tom, že stimuluje ve vlastní

hypofýze ryby produkci gonadotropního hormonu (GTH I + II), který je krví přiváděn do vaječníků. Zde je prostřednictvím dalších hormonů vyvolávána konečná fáze dozrání jiker a jejich uvolnění z Graffových folikulů. Uvolněním jiker je umožněn výtěr.

K hormonální indukci ovulace a spermiace se tedy používají rovněž některé synteticky vyrobené analogy. Jako jeden z nejuniverzálnějších a nejdostupnějších přípravků se dlouhodobě osvědčil analog savčího GnRH, [D-Ala<sup>6</sup>]GnRHPro NH<sub>2</sub>Et, vyznačující se vysokou účinností. Injekční podání GnRH nebo jeho analogu rybám ve stavu vrcholné předvýtěrové připravenosti, připravovaných v odpovídajících podmínkách (teplota vody, obsah kyslíku apod.), vyvolá za určitou dobu u jikernaček ovulaci a u mlíčáků spermiaci. Vzhledem k tomu, že GnRH, resp. jeho analogy, působí na uvolnění gonadotropinu a ten vyvolává další změny v gonádách, je časový interval od injekce přípravků do vyvolání ovulace přibližně o polovinu delší, než při použití v jedné dávce aplikované hypofýzy. Avšak hormonální indukce ovulace ryb pomocí analogu GnRH je nákladově lacinější než hypofyzace (Kouřil et al., 1997).

Jikernačky lína se stimulují k výtěru jednorázovou vnitrosvalovou injekcí roztoku Kobarelinu (syntetického analogu (D-Ala<sup>6</sup>)LH-RH Pro NH<sub>2</sub>Et) ve fyziologickém roztoku (Kouřil, 1998) v dávce 5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby. Časový interval od injekce analogu GnRH do dosažení ovulace je ovlivňován zejména druhem ryby a teplotou vody. U lína dojde k ovulaci při teplotě vody 20 °C za 42 h, při 22 °C za 33 h nebo při 24 °C za 29 h po injekci analogu GnRH (Kouřil et al., 1997). Stimulace lze provést rovněž kapří hypofýzou při 20 až 23 °C dávkou 3-10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  hmotnosti jikernačky s ovulací po 400 h°. Injekce se provádí obdobně jako u kapra, tj. ze strany pod hřbetní ploutev.

Od mlíčáků lína obecného lze odebírat jen omezené množství spermatu. Ryby je nutno stimulovat. Mlíčáci lína se stimulují jednorázovou vnitrosvalovou injekcí kapří hypofýzy, rozetřené ve fyziologickém roztoku, v dávce 1,5 - 2,0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti ryby. Vyšší dávka hypofýzy (4 mg na kg živé hmotnosti) má rovněž kladný vliv na zvýšení objemu spermatu, dochází ovšem k poklesu koncentrace spermií a tím i k celkovému množství spermií ve srovnání s 1,5 mg hypofýzy na kg hmotnosti mlíčáka (Linhart a kol., 1995). Optimální doba k odběru spermatu je po 24 hodinách, případně po 48 hodinách působení hormonu při teplotě vody 21 – 23 °C (Linhart a kol., 1995). Dále lze užít GnRH analog [D-Tle<sup>6</sup>, GnRH Pro NH<sub>2</sub>Et] v dávce 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hmotnosti mlíčáků, s možností spermiace po dobu 3 dnů nebo s [D-Arg<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>NH<sub>2</sub>Et] lososím GnRH analogem v dávce 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hmotnosti



mličáka s možností spermiace po dobu 5 dnů (Linhart a kol., 1991, 1995). Linhart et al. (1991) zjistil, že savčí GnRH analog [D-Tle<sup>6</sup>, GnRH ProNHet] v dávce 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  zvýší počet spermií na kg o 13.3 %, ve srovnání s rybou u které byla použita kapří hypofýza v dávce 1  $\text{mg.kg}^{-1}$ . V jiném experimentu (Linhart et al., 1995), byla spermiace u lína stimulována pomocí extraktu kapří hypofýzy v dávce (0.5  $\text{mg.kg}^{-1}$ ), kapří homogenizované hypofýzy (1  $\text{mg.kg}^{-1}$ ), [D-Arg<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>NHET] lososí GnRH analog (GnRHa, 20  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) a [D-Ala<sup>6</sup>, ProNHET] obsažených v pomale se uvolňujících implantátech v dávce 25  $\mu\text{g}$  na samce (průměrná hmotnost – 652g). Odběr spermatu byl prováděn každý den v průběhu pěti dnů a zředován imobilizačním roztokem (180 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7). Celkový počet spermií získaný po stimulaci ryb lososí GnRHa [D-Arg<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>NHET] byl výrazně vyšší ve srovnání s rybami stimulovanými pomocí kapří hypofýzy. Největší objem spermií byl získán u ryb stimulovaných pomocí GnRH implantátů čtvrtý den po implantaci, ale s výrazně sníženým počtem spermií na mličáka.

Během spermatogeneze dochází ke zvýšení testosteronu a 11 - KT v plazmě, který hraje klíčovou roli v regulaci jako testikulární mediátor gonadotropinu (GTH) indukovaný spermatogenezí, spermiogenezí a sekundárními charakteristickými znaky (Pinillos et al., 2003). Na konci spermiogeneze je u většiny mličáků z nadřádu kostnatých spermiace synchronizovaná s ovulací jikernaček. Jikernačky produkující ve folikulech ovariální feromony (komplex E2 hormonů), které jsou z podstatné části uvolněné do okolního prostředí. Feromony zapříčiňují urychlení dozrávání, což indukuje koncentrace steroidů (MISs, Baynes a Scott, 1985, Schulz a Miura, 2002).

Pinillos et al. (2003) popsal roční profil 11 – KT, testosteronu a androstendionu v plazmě mličáků. 11 – KT se vyskytoval pod detekčním limitem vzorku (0.4  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) v zimě a na podzim. Na jaře vystoupila hladina 11 – KT na 4.8  $\text{ng.mL}^{-1}$ , v červenci byla výrazně nižší a v srpnu znovu vystoupila. Koncentrace testosteronu byla výrazně vyšší na jaře a v létě než v zimě a na podzim. Androstendion vykazoval sezónní profil podobný testosteronu, ale jeho koncentrace v plazmě mličáků byla přibližně třikrát vyšší.

Před výtěrem generační ryby je vhodná anestezie například hřebíčkovým olejem v dávce 4 ml.100 l<sup>-1</sup> nebo např. 2 - phenaxyethanolem, Merk, s dávkováním 1-3 ml anestetika na 10 l vody (Linhart, 2000). Výsledkem anestéze je dočasná ztráta citlivosti k bolesti, nervových reflexů i zmenšení napětí svalů, a proto i lepší možnost manipulace s rybami (Trzebiatowski a kol., 1996). Byly prováděny experimenty na anesteziologický účinek

hřebíčkového oleje u lína v závislosti na teplotě vody (Hamáčková et al., 2001). Doba dosažení anestézie u lína byla nepřímo úměrná teplotě vody: Se vzrůstající teplotou vody se při použití hřebíčkového oleje jak u jikernaček tak mlíčáků zkracovala doba dosažení anestézie i jejího odeznění. Výhodou hřebíčkového oleje je, že se jedná o přírodní látku, která nezanechává vedlejší účinky na rybách a nepředstavuje žádné ekologické ani hygienické riziko. Patří mezi snadno dostupné anestetikum, které lze získat nákupem v lékárnách. Jeho cena je vzhledem k výši používané dávky ekonomicky výhodná.

### **2.2.3.5. Příprava imobilizačního roztoku**

Jelikož je sperma lína kontaminováno močí, nelze jej krátkodobě uchovávat bez použití imobilizačního roztoku. Používá se speciálních imobilizačních roztoků (5 g NaCl, 2 g KCl a 10 g glycinu na litr destilované vody nebo 10,5 g NaCl, 2,4 g Tris-HCl, pH 7,0) v poměru jeden díl spermatu a dva díly imobilizačního roztoku (Linhart, 1996). Ředěné sperma imobilizačním roztokem se uchovává v injekčních stříkačkách nebo v uzavřeném kontejneru pro buněčné kultury uloženém v ledničce nebo polystyrénovém kontejneru při +4 °C, tzv. na plocho s desetinásobkem objemu vzduchu pro zabezpečení dobré respirace spermií. Před oplozením se dávky spermatu v imobilizačním roztoku do jednotlivých mlíčáků smísí v suché čisté odměrné nádobě a dále se pracuje s tzv. heterospermatem.

Sperma lze také přímo vytírat na jikry tzv. Metodou přímého výtěru. Po každém osemenění jsou jikry se spermatem promíchány. Promícháním spermatu jiker (spermatu a ovariální plazmy) imobilizujeme pohyb spermií. Postupně vytíráme takové množství mlíčáků, až dosáhneme minimálně objemu 0,4 ml spermatu na 100 g jiker. Po osemenění provádíme okamžitě aktivaci vodou z líhně.

### **2.2.3.6. Osemenění a aktivace jiker**

Při osemenění lze použít sperma odebrané do imobilizačního roztoku nebo metoda přímého výtěru mlíčáků na jikry. V prvním případě použijeme dávku 2 ml heterospermatu v imobilizačním roztoku na každých 100 g jiker, v druhém případě použijeme postup při přímém výtěru (Linhart, 2000).

Po dokončení osemenění se okamžitě provádí aktivace destilovanou vodou s rozpuštěným NaCl (1 g NaCl do 1000 ml destilované vody) na 100g jiker. Po 3 minutách od aktivace gamet se provede odlepování enzymem alkalázou (Alcalase, Merk EC 3.4.21.14.) podle metodiky Linharta a kol. (2000a) v objemu 5-7,5 ml enzymu do 995-



992,5 ml vody s rozpuštěným NaCl (1 g NaCl na 1000 ml destilované vody) o teplotě 20°C. 100 ml roztoku enzymu se dává na 100 g jiker a opatrným mícháním jiker s enzymem se provádí odlepování po dobu 2 min. Poté se enzym slije a jikry se 3x propláchnou čistou vodou z líhně.

#### 2.2.4. Inkubace, líhnutí a odchov

Oplozené jikry nasazujeme do Zugských láhví do dvou třetin objemu láhve. V průběhu inkubace jiker denně odstraňujeme uhynulé jikry a provádíme preventivní koupele jiker roztokem Wescodynu dvakrát denně v koncentraci 1-2 ml/l při teplotě vody 20-22 °C (Kouřil a Hamáčková, 1992). Plůdek se líhne přibližně za 1260 h°. Vykulený plůdek se přeplaví nebo přenesení po odstranění zbytků obalů z jiker do kolíbek pro váčkový plůdek. V malých provozech je možné využít pevné kolíčky o objemu např. 70 l s přítokem 0,2-0,4 l/min s nasazením až 100 tis. kusů váčkového plůdku na kolíčku. Ve velkých provozech je to modifikovaný inkubátor Dněpr s nasazením až 1 mil. ks váčkového plůdku. Peňáz et al. (1981, 1982) zjistili, že embryonální perioda vývoje (od okamžiku oplození do počátku přechodu na exogenní potravu) trvá při průměrné teplotě vody 20,2 °C celkem 10 dnů. Při průměrné teplotě vody 19,6 °C docházelo k líhnutí embryí línů ve stáří 76 hodin při průměrné velikosti 3,82 mm. Přechod do larvální periody vývoje byl pozorován 11. den vývoje, při celkové průměrné velikosti embryí 5,6 mm. V závěru larvální periody vývoje dosahovali zkoumaní jedinci celkové velikosti 15 mm. Po rozplavání se plůdek vysazuje do čerstvě napuštěného rybníka I. řádu s množstvím 1-2 mil. ks.ha<sup>-1</sup>. V září nebo až v následujícím roce lovíme plůdek 2-6 cm. Násada se odchovává obvykle ve výtažnicích s K1. Obsádka L1 bývá 20 – 30 % obsádky kapra, popř. v poměru až 1:1. Hmotnost lovené L2 bývá 50 – 150 g. K chovu tržního lína se používají většinou dvouhorkové hlavní rybníky (4letý cyklus). Hmotnost Lt při výlovu činí 200 – 400 g.

Odchov Lg se provádí v matečných rybnících buď v monokultuře nebo společně s Kg. V odůvodněných případech možno odchovávat Lg také ve výtažnicích nebo hlavních rybnících v e společné obsádce s kaprem při nižší až střední intenzitě výroby. K odchovu Lg nejsou vhodné rybníky se silně zhuštěnými obsádkami (Pokorný et al., 1983).

Při výlovu a přepravě lína je nutné se vyvarovat jeho mechanického poškození. Mimořádná pozornost se musí věnovat línům určeným k dlouhodobému sádkování. Poškození a další stresy při výloveh (dlouhodobé ponechání v kádích aj.) zvyšuje

nebezpečí zaplísnění. Při podzimním sádkování se uvažuje max. 20 – 30 kg Lt/m<sup>3</sup> (Pokorný et al., 1983).

Význam chovu doplňkových ryb v rybnících je velmi široký. Vícedruhové – polykulturní obsádky dokonaleji využívají přirozenou produkci rybníků. Potravní nároky kapra se mění podle jeho stáří a jednotná obsádka kapra nezajistí plné využití potravní základny. Toto ještě bývá zdůrazněno tím, že monokulturní obsádka kapra bývá jednoho vzrůstového ročníku. Doplňkové ryby rozšiřují sortiment ryb na trhu a tvoří důležitou součást vývozu ryb do zahraničí. Zvláště lín má větší význam v zahraničním než na domácím trhu (Kubů a Kouřil, 1985).

### 3. Materiál a metodika

Spermiace mlíčáků lina obecného byla stimulována pomocí Supergestranu, obsahujícího LHRHa Lecirelin. Tento preparát byl podáván v různých dávkách a to: 5, 10, 20 a 40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Dále pak s pomocí kapří hypofýzy v dávce 2  $\text{mg.kg}^{-1}$  a jedné skupině byl aplikován pro kontrolu pouze fyziologický roztok. Následující dny, míní se tím 24, 48 a 72 hodin po stimulaci různými preparáty, se při odběru spermatu vyhodnocoval obsah a počet spermii na mlíčáka a na kg váhy těla. Krev byla vzorkována před injekcí ke zjištění úrovně ploidie. Motilita a rychlost pohybu spermii byla měřena 48 hodin po hormonální stimulaci. Výsledky byly statisticky vyhodnocovány.

#### 3.1. Charakteristika pokusných ryb

Z Hluboké nad Vltavou bylo přemístěno 100 mlíčáků lina obecného na líheň ve VÚRH Vodňany, 5 dnů před začátkem experimentu. Teplota vody byla vytemperována a stabilizována na 22 °C. První den pokusu a rovněž při každé manipulaci byli mlíčáci anestetováni 2 ml hřebíčkového oleje, smíchaného s 10 ml etanolu na 100 litrů vody. Pokud docházelo při stlačení břišní partie k uvolňování spermatu, byly ryby připraveny k výtěru. Mlíčáci byli jeden po druhém selektováni a 42 náhodně vybraných jedinců bylo použito pro experiment. Tyto vybrané ryby byly zváženy, označeny čipy (AEG ID 162 ISO 11784/75, 134,2 KHz FDX-B) a rozděleny na šest skupin po sedmi jedincích. Ryby byly znovu anestetovány kvůli odběru vzorků (1 ml od každého mlíčáka) s následnou hormonální stimulací. Všechny experimentální skupiny byly drženy v síťených klecích v nádrži na 4000 litrů s průtokem vody 0.2  $\text{l.s}^{-1}$ . Průměrná hmotnost mlíčáků se pohybovala kolem 600g a koncentrace kyslíku v nádrži byla stabilně na hodnotách od 7 do 8  $\text{mg.l}^{-1}$ .

#### 3.2. Vyhodnocení ploidity samců a spermii

Lín je diploidní druh s častým výskytem triploidů (Kvasnicka et al. 1992) s malou schopností spermiace (Linhart et al., 2004). Po prvé byla ploidní úroveň u všech ryb vyhodnocena z 50  $\mu\text{l}$  krve, která byla fixována a zředěna 96 % etanolem. Později byla ploidní úroveň vyhodnocena u 42 mlíčáků. Krev byla připravena podle Vindelova a Christensena (1990). Jaderná DNA byla barvena pomocí DAPI (4,6-diamidin-2-fenylindol), filtrována a obsah DNA byl odhadován Partec CCA průtokovým cytometrem

(Partec GmbH, Germany). Průtoková cytometrie je velmi přesná metoda stanovení ploidie, která dokáže rozlišit buňky s různou ploidií a podrobně zpracovávat velký počet buněk. Principem metody je měření fluorescence, která je přímo úměrná obsahu DNA, po obarvení DNA fluorescentním barvivem.

### 3.3. Stimulace a vyhodnocení spermiace

Spermiace lína obecného byla stimulována tímto způsobem: Čtyři skupiny byly jedenkrát vnitrosvalově injektovány Supergestranem (Ferring-Léčiva, a.s. Czech Republic, účinná složka superanalog LHRH Lecirelin od 25 µg na 1 ml) obsahující superaktivní LHRH analog (LHRHa) v různých dávkách LHRHa: 5, 10, 20 a 40 µg.kg<sup>-1</sup>. Pátá skupina byla injektována fyziologickým roztokem (0.9 % NaCl) obsahujícím kapří hypofýzu (CPS) v dávce 2 mg.kg<sup>-1</sup>. Šestá kontrolní skupina byla injektována 0,5 ml fyziologického roztoku (0,9 % NaCl). Následující dny, miní se tím 24, 48 a 72 hodin po hormonální stimulaci, bylo odebráno sperma spolu se vzorky krve v čase 0, 24 a 72 hodin po hormonální stimulaci. 48 hodin po hormonální stimulaci byla měřena motilita a rychlost pohybu spermií, 48 a 72 hodin po hormonální stimulaci byla také vyhodnocována oplodňovací schopnost spermií.

Sperma bylo odebrané do 5 ml injekčních stříkaček, které obsahovaly 3 ml roztoku Kurokura 180 (180 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.36 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O a 2.38 mM NaHCO<sub>3</sub>). Sperma bylo odebírané a uchovávané na ledu až do měření celkového obsahu a nadále byly vzorky fixovány s použitím eppendorfních mikropipet s 2% roztokem formaldehydu (zředěném ve fyziologickém roztoku) v poměru 1:200 pro pozdější vyhodnocování koncentrací spermií.

Koncentrace spermií po dodatečném zředění byla počítána v Burkerových komůrkách pod mikroskopem (400x) a následně vypočítána tímto způsobem:

$$\left[ \frac{\left( \frac{(1/a^2 \times b)}{N} \right) \times 1000}{10^9} \right] \times \left[ \frac{1}{V_1/(V_1 + V_2)} \right] \times \left[ \frac{1}{V_3/V_3 + V_4} \right] \times [\sum (n \times N)]$$

(**a** - plocha čtverečku v mm<sup>2</sup>, **b** - hloubka čtverečku v mm, **N** - číslo čtverečku, **n**-počet spermií ve čtverečku, **V<sub>1</sub>** - obsah spermií v μl, **V<sub>2</sub>** - obsah fyziologického roztoku s formaldehydem v μl, **V<sub>3</sub>** - celkový obsah naředěného spermatu v μl, **V<sub>4</sub>** - množství dodatečného ředidla v μl). Koncentrace spermií byla vyjádřena v biliónech na ml. Obsah spermií na mlíčka a počet spermií na mlíčka, obsah spermatu na kg tělní váhy mlíčka a počet spermií na kg váhy těla mlíčka byl vyjadřován v biliónech spermií na mlíčka a v biliónech spermií na kg váhy těla a to podle popsané metodiky od Linharta et al. (1995).

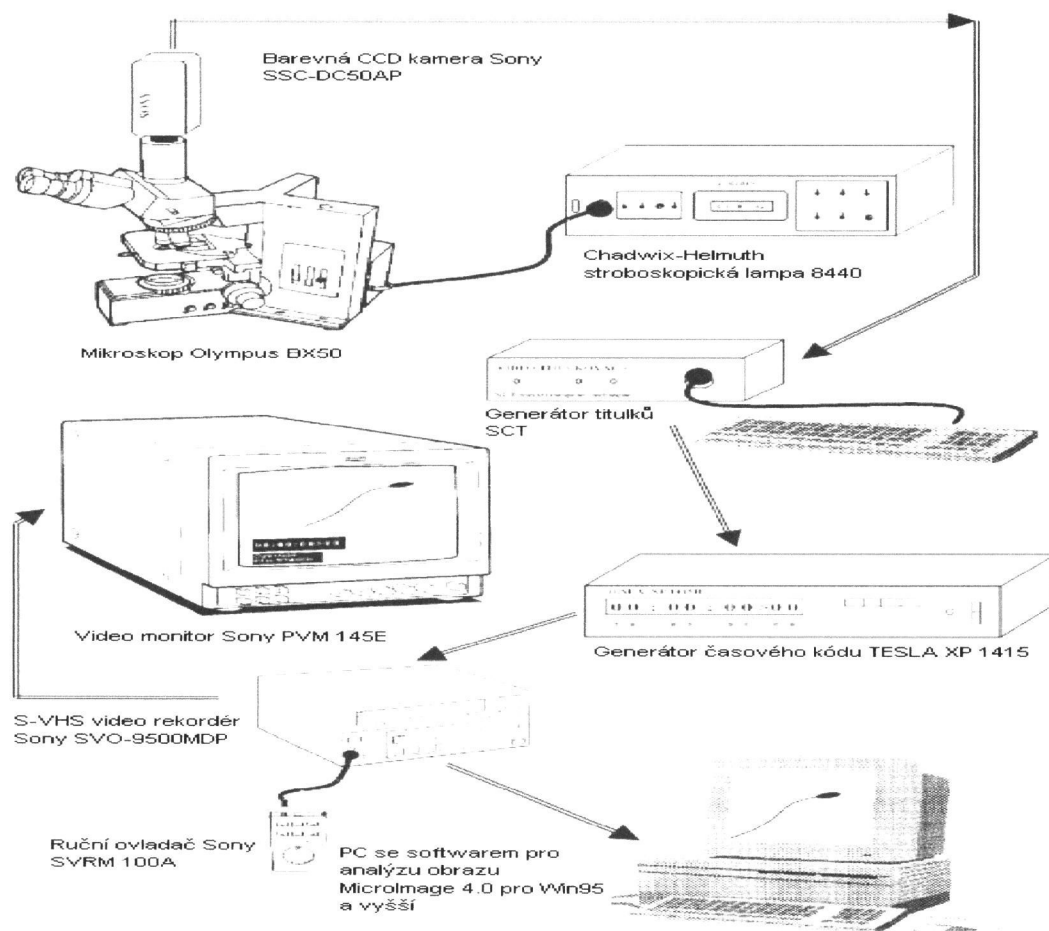
### 3.4. Pozorování pohyblivosti a rychlosti spermií

Procenticky byla vyhodnocována motilita a rychlost spermií, odebraných 48 hodin po injikaci. Měřicí technika užívající tmavého pole mikroskopu a kamery značky Sony byla nastavena podle Linharta et al. (2002). Pohyblivost a rychlost spermií byla zkoumána pod zvětšením 200x, ihned po smíchání 0.5 μl spermatu s destilovanou vodou 49.5 μl, obsahující 0.1 % BSA. Konečné zředění bylo 1:100. BSA bylo přidáno kvůli zamezení přilepení hlavičky spermie k podložnímu sklíčku. Během 10 sekund po smíchání byl udělán 2 minutový videoobraz užívaný pro vyhodnocení pohyblivé činnosti spermií. Ohnisková rovina byla vždy položena blízko povrchu krycího sklíčka. Pohyby spermií byly zaznamenány na S-VHS (SONY, SVO-9500 MDP) recorder v 50 snímcích za sekundu, s použitím CCD (snímacího zařízení obrazu) video kamery (SONY, SSC-DC50AP) připojenou na stinné pole mikroskopu (Olympus BX 50) a vizualizovanou na videomonitor osvětlený stroboskopickou lampou od Strobexu (Chadvick-Helmut, 9630, USA). Nastavitelná frekvence stroboskopického osvětlení byla naprogramována na automatický zápis obrazových snímků (50 Hz) pro měření rychlosti spermií.

### 3.5. Vyhodnocení rychlosti a motility

Následující zaznamenaná poloha hlavičky spermií ze snímku byla změřena za jednotku času, s použitím video-rekordéru (SONY SVHS, SVO-9500 MDP) v čase 30, 60 a 120 s po aktivaci spermií (nahráváno 25 snímků/sekundů) analyzována pomocí mikro - obrázkové analýzy (Verze 4.0.1. pro Windows se speciálním makro od značky Olympus Czech Republic). Rychlost a motilita byly měřeny podle změny polohy hlavičky spermií v pěti následujících snímcích s třemi různými barvami (první snímek - modrý, druhý až čtvrtý - zelený a pátý - červený). Pohyb spermií byl viditelný ve třech barvách, nepohyblivé spermie byly bílé. Procento pohybujících se spermií bylo lehce vypočitatelné z poměru bílých a červených komůrek. Rychlost pohybu spermií byla počítána v  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  podle délky stopy hlaviček spermií z modré do zelené a červené. Excel 97 automaticky vypočítá všechny hodnoty.

Schéma zapojení jednotlivých přístrojů:



### 3.6. Fertilizace a líhnutí

Oploďňovací schopnost spermií odebraných 72 hodin po aplikaci hormonů byla vyhodnocována tímto způsobem: 2 gramy jiker (1800 jiker na 1 g) byly umístěny do 20 ml misky: přesný počet spermií byl pomocí mikropipety nakapán na jikry, a to 20 000 spermií na jednu jikru. Oplozovací schopnost spermií byla definovaná při použití menšího množství spermií na jikru (20,000). Na druhé straně množství oplozených jiker bylo maximální při použití velkého množství spermií (100,000) v opakovaném oplodnění spermatem odebraném po léčbě CPE. Miska byla položena na míchací stolek (200 rpm, 10 mm odchyly). Přidalo se 2 ml dechlorizované vody o teplotě 22 °C. O dvě minuty později bylo 200 - 400 jiker umístěno do speciální inkubační nádoby na 200 ml se sterilizovanou vodou pomocí UV o teplotě 23°C, 9 mg.l<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>. Pro každou skupinu mlíčáků se postup opakoval čtyřikrát. V každé nádobě byly jikry spočítány a později během inkubace byly počítány mrtvé jikry a potěr, obvykle od čtyř dnů po začátku inkubace.

Procento oplodněných jiker ( $F_r$ ) bylo počítáno na každou nádobu z celkového počtu jiker v nádobách ( $E_t$ ) minus mrtvé jikry ( $E_d$ ) odebrané 24 h po oplodnění:

$$F_r = [(E_t - E_d)/E_t] \times 100$$

Procento líhnoucích se jiker ( $H_r$ ) bylo také počítáno na každou nádobu z celkového počtu jiker v nádobách ( $E_t$ ) a dělený počtem líhnoucích se larev ( $H_l$ ) tímto způsobem:

$$H_r = (H_l/E_t) \times 100$$

### 3.7. Analýza dat

Data byly statisticky vyhodnocovány v programu STATISTIKA 6.0. V programu bylo využíváno funkce základní statistiky/tabulky – popisné statistiky, ke zjištění průměrů a směrodatných odchylek. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly vyhodnocovány s použitím analýzy variance (rozklad & jednofak. ANOVA), dále za pomoci Levenových testů bylo zjištěno zda se jedná o homoskedasticitu ( $p > 0,05$ ), v tom případě lze použít LSD testy nebo o heteroskedasticitu ( $p < 0,05$ ), kdy využíváme Kruskal-Wallisův test.

Data, míní se tím průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou (SD) byly získávány následujícím způsobem: Vzorky na zjištění objemu a počtu spermií na mlíčka a na kg byly odebírány třikrát od každé ryby v různých časech (24, 48 a 72 hodin po injektaci). Motilita a rychlost pohybu spermií byla vyhodnocována v časech 30, 60 a 120 s, 48 hodin po stimulaci. Oplodnění a líhnutí – ve 4 opakování ve smíchaném spermatu v jedné skupině v čase (72 hodin).



## 4. Výsledky

Všech 42 samců v experimentálních skupinách bylo diploidní. V průtokovém cytometru jsme nepozorovali žádného triploidního mličáka. Pomocí ANOVY a to s využitím LSD testů ( $p > 0,05$ ) jsme zjistili, že živá váha mličáků se mezi skupinami významně nelišila (Tab. č. 1).

**Tab. č. 1:** Porovnání živé váhy mličáků v jednotlivých skupinách

			Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
		Průměr/kg	0.0 mg	2 mg	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	0.59 ± 0.08		0,872136	0,788570	0,717955	0,569122	0,338217
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	0.60 ± 0.08	0,872136		0,914546	0,841122	0,682485	0,424318
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	0.61 ± 0.08	0,788570	0,914546		0,925754	0,762647	0,488491
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	0.59 ± 0.09	0,717955	0,841122	0,925754		0,834507	0,548361
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	0.60 ± 0.10	0,569122	0,682485	0,762647	0,834507		0,694926
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	0.62 ± 0.11	0,338217	0,424318	0,488491	0,548361	0,694926	

Konečné výsledky ukazovaly obsah spermií na mličáka a na kg, počet spermií na mličáka a na kg, rychlost a motilitu spermií a procento oplodnění a líhnutí. Hodnoty objemu spermatu na mličáka a na kg jsou uvedeny v tabulce č. 13 a grafu č. 2, počet spermií na mličáka a na kg váhy těla je sumarizována v tabulce č. 14 a grafu č. 1. Výsledky z motility a rychlosti pohybu spermií jsou sumarizovány v tabulce č. 15. Oplodnění a líhnutí jsou sumarizovány v grafu č. 3.

### 4.1. Objem a počet spermií

#### 4.1.1. Objem spermatu

Pomocí ANOVY a to s využitím LSD testů ( $p > 0,05$ ) jsme zjistili, že celkový objem spermatu na mličáka a na kg, počítáno ze 3 odběrů, byl významně vyšší ve skupině injektované CPS a LHRHa v dávkování 20 a 40 µg.kg<sup>-1</sup>, ve srovnání s kontrolní skupinou nebo s nižším dávkováním LHRHa (od 5 do 10 µg.kg<sup>-1</sup>) (Tab.č. 2, Graf č.7).

**Tab. č. 2:** Rozdíly mezi jednotlivými skupinami v celkovém objemu spermatu na kg hmotnosti těla

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	0.5 ± 0.6		0,011441	0,190801	0,678784	0,029979	0,049461
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	1.5 ± 1.0	0,011441		0,195521	0,031290	0,692336	0,537321
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	1.0 ± 0.6	0,190801	0,195521		0,366634	0,364406	0,491878
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	0.7 ± 0.6	0,678784	0,031290	0,366634		0,074414	0,115757
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	1.5 ± 1.0	0,029979	0,692336	0,364406	0,074414		0,824190
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	1.5 ± 1.0	0,049461	0,537321	0,491878	0,115757	0,824190	

Největší objem spermatu na mlíčka a na kg, 24 h po stimulaci, byl pozorován u skupiny injektované pomocí CPS (1.7 ml/mlíčka a 2.9 ml/kg), LHRHa - 20 µg.kg<sup>-1</sup> (1.2 ml/mlíčka a 2.0 ml/kg ) a 40 µg.kg<sup>-1</sup> (1.0 ml/mlíčka a 1.7 ml/kg) (Graf č. 4). K vyhodnocování průkaznosti rozdílů mezi skupinami byl použit Kruskal-Wallisův test ( $p < 0,05$ ) o ten neprokázal významný rozdíl (Tab. č. 3).

**Tab. č. 3:** Rozdíly mezi skupinami v objemu spermatu odebraném 24 hodin po stimulaci

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	0.7 ± 0.7		0,086987	1,000000	1,000000	0,244729	1,000000
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	2.9 ± 1.8	0,086987		1,000000	0,244729	1,000000	1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	1.2 ± 0.5	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	0.9 ± 0.5	1,000000	0,244729	1,000000		0,613351	1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	2.0 ± 1.1	0,244729	1,000000	1,000000	0,613351		1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	1.7 ± 0.8	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Podobné výsledky byly pozorovány u stejných skupiny 48 a 72 hodin po injektaci (Graf 5, 6).

Největší objem spermatu na mlíčka a na kg byl pozorován 24 hodin po stimulaci, ve srovnání s odběry 48 a 72 hodin po stimulaci (Graf č. 2).

#### 4.1.2. Počet spermií

Vyšší celkový počet spermií na mlíčka a na kg byl zjištěn z výsledků průměrů ve skupinách ošetřených pomocí 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LHRHa a CPS (Graf č.11). Pomocí ANOVY a to s využitím LSD testů ( $p > 0,05$ ) se nepodařil prokázat průkazný rozdíl mezi skupinami (Tab. č. 4).

**Tab. č. 4:** Rozdíly mezi skupinami v celkovém počtu spermií na kg

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	40 $\mu\text{g}$
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	2.5 $\pm$ 3.9		0,231401	0,895870	0,603156	0,231168	0,796877
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	4.2 $\pm$ 2.7	0,231401		0,185517	0,089509	0,999511	0,344886
<b>LHRHa</b>	<b>5 <math>\mu\text{g}</math></b>	2.1 $\pm$ 1.4	0,895870	0,185517		0,696933	0,185320	0,697990
<b>LHRHa</b>	<b>10 <math>\mu\text{g}</math></b>	1.8 $\pm$ 1.8	0,603156	0,089509	0,696933		0,089400	0,438106
<b>LHRHa</b>	<b>20 <math>\mu\text{g}</math></b>	4.1 $\pm$ 4.6	0,231168	0,999511	0,185320	0,089400		0,344578
<b>LHRHa</b>	<b>40 <math>\mu\text{g}</math></b>	2.9 $\pm$ 2.0	0,796877	0,344886	0,697990	0,438106	0,344578	

Relativně velký, ale ne významný rozdíl byl pozorován v počtu spermatu na mlíčka a na kg 24 hodin po injekci 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LHRHa ( $3.3 \times 10^9$ /samce a  $5.7 \times 10^9\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a CPS ( $3.1 \times 10^9$ /samce a  $5.4 \times 10^9\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (Graf č. 8). Pomocí ANOVY a to s využitím LSD testů ( $p > 0,05$ ) se nepodařil prokázat průkazný rozdíl mezi skupinami (Tab. č. 5).

**Tab. č. 5:** Rozdíly mezi skupinami v počtu spermií na kg 24 hodin po stimulaci

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	40 $\mu\text{g}$
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	4.1 $\pm$ 6.2		0,231401	0,895870	0,603156	0,231168	0,796877
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	5.4 $\pm$ 2.9	0,231401		0,185517	0,089509	0,999511	0,344886
<b>LHRHa</b>	<b>5 <math>\mu\text{g}</math></b>	3.0 $\pm$ 1.8	0,895870	0,185517		0,696933	0,185320	0,697990
<b>LHRHa</b>	<b>10 <math>\mu\text{g}</math></b>	2.7 $\pm$ 2.5	0,603156	0,089509	0,696933		0,089400	0,438106
<b>LHRHa</b>	<b>20 <math>\mu\text{g}</math></b>	5.7 $\pm$ 6.8	0,231168	0,999511	0,185320	0,089400		0,344578
<b>LHRHa</b>	<b>40 <math>\mu\text{g}</math></b>	3.5 $\pm$ 0.9	0,796877	0,344886	0,697990	0,438106	0,344578	

Ani 48 hodin po stimulaci se nepodařil prokázat významný rozdíl mezi experimentálními skupinami. K vyhodnocování byl použit Kruskal-Wallisův test ( $p < 0,05$ ) (Tab. č.6). Z grafu č. 9 jsou však patrné vyšší hodnoty u skupin LHRHa ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a CPS.

**Tab. č. 6:** Rozdíly mezi skupinami v počtu spermii na kg 48 hodin po stimulaci

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	40 $\mu\text{g}$
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	1.8 ± 2.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	3.7 ± 2.4	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>5 <math>\mu\text{g}</math></b>	1.6 ± 0.5	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>10 <math>\mu\text{g}</math></b>	1.7 ± 1.5	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>20 <math>\mu\text{g}</math></b>	4.2 ± 3.9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>40 <math>\mu\text{g}</math></b>	2.5 ± 1.4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

72 hodin po stimulaci se podařil prokázat rozdíl mezi skupinou injektovanou pomocí CPS a skupinou – LHRHa ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). K vyhodnocení bylo použito LSD testů ( $p > 0,05$ ) (Tab. č.7). Výsledky viditelné z grafu č. 10 poukazují na vyšší hodnoty u skupiny stimulované pomocí CPS.

**Tab. č. 7:** Rozdíly mezi skupinami v počtu spermii na kg 72 hodin po stimulaci

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	40 $\mu\text{g}$
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	1.6 ± 2.0		0,143190	0,615113	0,580295	0,431140	0,417815
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	3.4 ± 2.9	0,143190		0,330083	0,046722	0,489623	0,504223
<b>LHRHa</b>	<b>5 <math>\mu\text{g}</math></b>	1.9 ± 1.3	0,615113	0,330083		0,293480	0,774503	0,756794
<b>LHRHa</b>	<b>10 <math>\mu\text{g}</math></b>	0.9 ± 1.0	0,580295	0,046722	0,293480		0,183554	0,176250
<b>LHRHa</b>	<b>20 <math>\mu\text{g}</math></b>	2.5 ± 1.6	0,431140	0,489623	0,774503	0,183554		0,981458
<b>LHRHa</b>	<b>40 <math>\mu\text{g}</math></b>	2.6 ± 3.1	0,417815	0,504223	0,756794	0,176250	0,981458	

Celkový počet spermií na mličáka a na kg byl znatelně vyšší 24 hodin po hormonální stimulaci (Graf č.1). Pomocí analýzy variance jsme zjistili významný vliv různého času odběru spermatu na obsah a počet spermií na mličáka a na kg. Rozdíly mezi skupinami při stejném čase odběru nebyly významné. Relativně nejvyšší hodnoty v počtu spermií byly u skupin ošetřených pomocí CPS a LHRHa v dávce 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

## 4.2. Rychlost a motilita spermií

### 4.2.1. Rychlost pohybu spermií

Rychlost pohybu spermií se mezi experimentálními skupinami v jednotlivých časech příliš výrazně neodlišovala (Graf 15, 16, 17). Ve 30 s se rychlost pohybovala od 55 do 59  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , v 60 s od 19 do 22  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  a ve 120 s se rychlost spermií pohybovala od 3 do 10  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Výsledky ve 30 s byly srovnávány pomocí ANOVY a to s využitím LSD testů ( $p > 0,05$ ) (Tab. č. 8). Tyto testy zjistily, že kontrolní skupina se průkazně liší od skupiny (CPS) a od skupiny (LHRHa - 5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Skupina (CPS) se liší od kontrolní skupiny a skupina (LHRHa - 5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) se liší rovněž od kontrolní skupiny. Kontrolní skupina vykazovala nižší hodnoty. Mezi ostatními skupinami nebyl zjištěn průkazný rozdíl.

**Tab. č. 8:** Rozdíly mezi skupinami v rychlosti pohybu spermií ve 30 s

			Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
		Průměr/kg	0.0 mg	2 mg	5 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	40 $\mu\text{g}$
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	54.5 $\pm$ 13.1		0,021092	0,023454	0,326347	0,136586	0,213454
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	59.6 $\pm$ 14.3	0,021092		0,900568	0,251383	0,389270	0,124567
<b>LHRHa</b>	<b>5 <math>\mu\text{g}</math></b>	58.7 $\pm$ 13.3	0,023454	0,900568		0,237000	0,361438	0,037534
<b>LHRHa</b>	<b>10 <math>\mu\text{g}</math></b>	56.4 $\pm$ 13.1	0,326347	0,251383	0,237000		0,699235	0,215679
<b>LHRHa</b>	<b>20 <math>\mu\text{g}</math></b>	57.3 $\pm$ 13.8	0,136586	0,389270	0,361438	0,699235		0,065442
<b>LHRHa</b>	<b>40 <math>\mu\text{g}</math></b>	58.3 $\pm$ 14.9	0,213454	0,124567	0,037534	0,215679	0,065442	

Hodnoty v 60 s byly srovnávány Kruskal-Wallisovým testem ( $p < 0,05$ ) (Tab. č. 9).

**Tab. č. 9:** Rozdíly mezi skupinami v rychlosti pohybu spermií v 60 s

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	19.3 ± 9.8		0,000000	0,000017	1,000000	0,000037	0,000014
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	21.9 ± 8.8	0,000000		0,668967	0,000000	0,563938	0,208904
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	19.9 ± 10.6	0,000017	0,668967		0,000000	1,000000	1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	19.7 ± 9.3	1,000000	0,000000	0,000000		0,000016	0,000006
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	20.7 ± 7.8	0,000037	0,563938	1,000000	0,000016		1,000000
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	22.0 ± 9.4	0,000014	0,208904	1,000000	0,000006	1,000000	

Hodnoty ve 120 s byly srovnávány rovněž Kruskal-Wallisovým testem ( $p < 0,05$ ) (Tab. č. 10). Rychlost pohybu spermií byla u ryb ošetřených s CPS významně vyšší ( $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), oproti ostatním skupinám, kromě skupiny stimulované  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  LHRHa (Graf č. 17).

**Tab. č. 10:** Rozdíly mezi skupinami v rychlosti pohybu spermií ve 120 s

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	3.7 ± 2.2		0,00	0,000011	0,000209	1,000000	0,000000
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	10.3 ± 8.8	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	8.1 ± 5.7	0,000011	0,00		1,000000	0,000000	0,999044
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	5.7 ± 2.7	0,000209	0,00	1,000000		0,000027	0,316814
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	4.3 ± 2.1	1,000000	0,00	0,000000	0,000027		0,000027
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	6.3 ± 4.5	0,000000	0,00	0,999044	0,316814	0,000027	

#### 4.2.2. Motilita spermií

Analýza variance nepotvrdila významný vliv ošetření na motilitu spermií. Průměrné hodnoty jednotlivých skupin a jejich směrodatné odchylky v jednotlivých časech jsou patrné z grafu 12, 13, 14. Motilita spermií byla pravidelně monitorována po druhém odběru (48 hodin) u všech mlíčáků použitých pro experiment. Procento pohyblivých spermií nebylo mezi jednotlivými skupinami v daném čase měření příliš odlišné.

Třicet sekund po aktivaci byla motilita spermií 87 až 90 %. S pokračujícím časem se motilita spermií snižovala a 120 s po aktivaci spermií byla od 2.41 % v kontrolní skupině do 24.4 % ve skupině, kde bylo aplikováno CPS.

Hodnoty vyhodnocované v čase 30 s byly srovnávány pomocí ANOVY a to s využitím LSD testů ( $p > 0,05$ ) (Tab. č. 11). Tyto testy nám neprokázaly významný rozdíl mezi jednotlivými testovanými skupinami.

**Tab. č. 11:** Rozdíly mezi skupinami v závislosti na motilitě spermií ve 30 s

		Průměr/kg	Kontrola 0.0 mg	CPS 2 mg	LHRHa 5 µg	LHRHa 10 µg	LHRHa 20 µg	LHRHa 40 µg
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	87.4 ± 4.0		0,441202	0,922718	0,771352	0,764472	0,942144
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	90.3 ± 2.6	0,441202		0,453637	0,664616	0,256841	0,467398
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	87.1 ± 5.7	0,922718	0,453637		0,822816	0,661494	0,982975
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	88.6 ± 9.0	0,771352	0,664616	0,822816		0,554244	0,816802
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	89.0 ± 4.1	0,764472	0,256841	0,661494	0,554244		0,696209
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	87.7 ± 7.9	0,942144	0,467398	0,982975	0,816802	0,696209	

Hodnoty v čase 60 s byly srovnávány rovněž pomocí ANOVY a to s využitím LSD testů ( $p > 0,05$ ) (Tab. č. 12). Tyto testy poukázaly na rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou stimulovanou pomocí (CPS). Kontrolní skupina vykazovala nižší hodnoty. Mezi ostatními skupinami nebyl nalezen průkazný rozdíl.

**Tab. č. 12:** Rozdíly mezi skupinami v závislosti na motilitě spermií v 60 s

		Průměr/kg	Kontrola	CPS	LHRHa	LHRHa	LHRHa	LHRHa
			0.0 mg	2 mg	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	54.7 ± 20.7		0,021755	0,473224	0,682437	0,533094	0,425986
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	77.4 ± 6.5	0,021755		0,064884	0,068801	0,060701	0,100485
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	62.2 ± 12.6	0,473224	0,064884		0,813855	0,931340	0,896595
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	58.8 ± 19.2	0,682437	0,068801	0,813855		0,875251	0,736890
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	63.8 ± 14.8	0,533094	0,060701	0,931340	0,875251		0,835700
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	62.0 ± 19.6	0,425986	0,100485	0,896595	0,736890	0,835700	

V čase 120 s nelze hodnoty v jednotlivých skupinách srovnávat žádným z předchozích testů z důvodu nedostatečného počtu dat. Avšak výsledky průměrných hodnot poukazují nato, že nejnižší hodnoty byly naměřeny v kontrolní skupině a nejvyšší ve skupině stimulované pomocí CPS.

### 4.3. Oplodnění a líhnutí

Účinek různého ošetření na oplodnění a líhnutí, kdy počty spermií na jikru byly vyrovnané, byl velmi významný (Graf č. 3). Výrazně nejvyšší kvalita spermií odebraných 72 hodin po injekci z hlediska oplodnění a líhnutí, se vyskytovala u ryb stimulovaných pomocí LHRHa v dávkování 20 a 40 µg.kg<sup>-1</sup> (62- 65 % oplodněných a 61-64 % vylíhlých). Při různém počtu spermií na jikru, v případě CPS, byly přijatelnější hodnoty oplodnění a líhnutí v počtu 20,000 spermií na jikru, ve srovnání s použitím 100,000 spermií na jikru. Výrazně nejnižší parametry se vyskytovaly u kontrolní skupiny, a to na úrovni 12 % (Graf č. 3).



## 5. Diskuze

### 5.1. Objem a počet spermií

Průměrný objem spermatu odebraného během experimentu se pohyboval od  $0.3 \pm 0.3$  k  $1.0 \pm 0.9$  ml na mlíčáka a od  $0.5 \pm 0.6$  k  $1.7 \pm 1.5$  ml na kg. Linhart et al. (1986) publikoval objem spermatu na mlíčáka od  $0.15 \pm 1.3$  do  $0.8 \pm 0.5$  ml. Vysoké hodnoty S.D. poukazovaly na to, že množství spermatu je ve skupinách výrazně proměnlivé. To je dáno obsahem moči, která zředí sperma. Obsah moči také působí na koncentraci spermatu daného počtem spermií na ml spermatu. U lína je lepší vyjadřovat kvantitu nepřímo jako počet spermií na mlíčáka nebo na kg. Zuromska (1981) pozorovala pokles počtu spermií na spermiaci v závislosti na pokročilosti sezóny a Linhart et al. (1995) zjistil, že počet spermií se mírně snížil od prvního dne do skončení experimentu. Naše výsledky odpovídají výsledkům těchto autorů, protože počet spermií na mlíčáka a na kg byl v 5 ze 6 skupin nejvyšší v prvním odběru a v druhém a třetím pomale klesal.

### 5.2. Motilita a rychlost

Motilita a rychlost pohybu spermií zjištěna v tomto experimentu byla obzvláště 60 a 120 s po aktivaci horší, než citoval Rodina et al. (2004), ve srovnání s výsledky, kde byl použit obdobný imobilizační roztok. Autoři užívali ke stimulaci kapří hypofýzu v dávce 1 mg/kg. Rozdíl může být dán mnoha vnějšími a vnitřními faktory. Zdá se, že zde není žádná spojitost mezi užívanou hormonální aplikací a motilitou, mezi skupinami se totiž nevyskytují významné rozdíly. Pokud se týče rychlosti spermií, pouze 120 s po aktivaci nám statistická analýza ukázala nějaké rozdíly, vztahující se k hormonálnímu ošetření. K získání spermatu dobré kvality s dostačující motilitou a rychlostí pohybu musí být dodržena tři základní pravidla. První – sperma lína musí být odebráno do imobilizačního roztoku, čímž se vyhneme samovolné aktivaci moči (Linhart et al., 1986). Druhá – sperma by mělo být použito co nejdříve (čerstvé sperma), kvůli zachování dobré motility a rychlosti pohybu – tyto vlastnosti klesají při uskladnění (Rodina et al., 2004; Linhart et al., 2003). A nakonec, je lepší kontrolovat reprodukční chování a stimulovat ryby k reprodukci na začátku třetího období, protože počet spermií na mlíčáka a na kg se během třetího období snižuje (Zuromska 1981; Zuromska, Markowska, 1984).

### 5.3. Oplození a líhnutí

Neexistují téměř žádná data o oplození a líhnutí jiker ryb, ošetřených různými hormonálními přípravky. Zjištěné výsledky mohou rozšířit znalosti o umělé reprodukci a chovu lína obecného. Výsledky ukazují, že při spermiaci s použitím LHRH v dávkování 20 až 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  výrazně roste procento oplodnění a líhnutí (65%), ve srovnání s CPS (50%). Musí být znovu zdůrazněno, že množství spermií na jikru bylo vyrovnáno na stejnou úroveň. Rodina et al. (2004) získal procento oplodnění a líhnutí kolem (40%) po použití kapří hypofýzy v dávce 1 mg/kg. Počet spermií na jikru je pravděpodobně další faktor, ovlivňující tyto parametry. Vyšší (5krát) koncentrace spermií nezpůsobuje automaticky zlepšení procenta oplodnění a líhnutí, naopak zjištěné hodnoty byly podstatně nižší.

## 6. Závěr

Tato diplomová práce na téma „Úroveň spermiace mlíčáků lína obecného (*Tinca tinca* L.) s použitím komerčního hormonálního preparátu“ přinesla několik zajímavých výsledků. V tomto experimentu byla ověřována možnost nahrazení přirozených hormonálních preparátů k synchronizaci spermiace syntetickými látkami.

Všech 42 samců užitých pro experiment bylo diploidních. Živá váha se mezi experimentálními skupinami příliš nelišila. Účinnější stimulace byla docílena pomocí LHRHa v dávkování od 20 do 40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  a za pomoci CPS, oproti mlíčákům z kontrolní skupiny a nižším dávkováním LHRHa. Za pomoci analýzy variance nebyl prokázán významný vliv způsobu stimulace na rychlost pohybu a motilitu spermií. Vliv odlišného hormonálního ošetření na oplodnění (počet spermií na jikru byl vyvážený) byl velmi znatelný. Podstatně nejvyšší kvalita spermatu odebraného 72 hodin po stimulaci (vyjádřená pomocí procenta oplodnění a líhnutí) byla zjištěna při použití LHRHa v dávce od 20 do 40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (62- 65 % oplodněných a 61-64 % líhnoucích se jiker). Výrazně nejnižší parametry oplodnění a líhnutí se vyskytovaly u kontrolní skupiny a to na úrovni 12%. Z hlediska objemu a počtu spermií dopadly nejlépe skupiny stimulované pomocí CPS a LHRHa v dávkách 20 a 40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Z těchto výsledků lze usuzovat, že přirozené hormonální preparáty na stimulaci spermiace mohou být nahrazovány syntetickými (LHRHa - 20 a 40  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), aniž by to nějak výrazně ovlivnilo množství a kvalitu spermií.

## 7. Seznam použité literatury

- André, J.** 1982. Contribution a la connaissance du choriome. J. Ultrastruct. Res. Suppl. (3) : 1-185.
- Baruš, V.,** Oliva, O. 1995. Fauna ČR a SROV. Mihulovci, Petromyzontes a ryby, Osteichthyes. Academia, Praha, 80 – 88.
- Baynes, S.M.,** Scott, A.P. 1985. Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentrations of sex steroids of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology 57, 150-160.
- Belova, N.V.** 1982. Ecological and physiological properties of the semen of pond cyprinids III. Physiological and biochemical parameters of the semen of some cyprinids species. Vopr. Ichtiologii 22 : 61-79.
- Berg, L.S.** 1948-1949. Ryby presnych vod SSSR i sopredelnych stran. Izd. AN SSSR. Moskva. Č.1., 1948, 466.
- Billard, R.** 1969. Ultrastructure comparée de spermatozoides de quelques poissons téléostéens. In : Comparative spermatology. (B.Bacceti ed.). Academic Press, New York. pp. 71-79.
- Billard, R.** 1986. Spermatogenesi and spermatology of some teleost fish species. Repris. Nutr. Dévelop. 877 – 920.
- Burnashova, S.A.** 1960. Znachenie processove fosforilirovanija v. osushchestvlenii dvigatelnoj funkcii semennoj kletki. In : Fosforilirovanije i funkcija. Leningrad, Nauka. pp. 231-242.
- Burnashova, S.A.** 1982. Biochemistry of motility spermatozoa. In. Sovremennyye problem spermatogenez. Nauka. pp. 225-249.
- Breton, B.** et al. 1974. Mise en evidence be quelques enzymes dans le sperme de la carpe et de la truite et dans le liquide coelomique de la truite. C.R. Acad. Sci., Paris 278 : 1285-1288.
- Cosson, M.P.** et al. 1986. Control of fragellar movement in "9+2" spermatozoa : Calcium and cyclic AMP dependence, chemotactic behavior. Cell Motil. Cytoskeleton 14, 424-434.
- Curties, B.J.** et Wood C.M. 1991. The function of urinary bladder in vivo in the fresh-water rainbow trout. J. Experiment. Biol., 155 : 567-583.
- Długosz, M.,** Grabowska, B., Wornialo, E. 1983. Sex differentiation in tench (*Tinca tinca* L.). Zesz. Nauk. ART Olézt., 12, 106 – 116.

- Długosz, M.** 1986. Owogeneza i cykl rozjeto rozwoju gonad wybranych gatuków ryb w zbiornikach o odmiennych warunkach termicznych (Oogenesis and yearly cycle of gonad developmint of some fish species in water bodies with different temperature regimes). Acta Acad. Agricult. Techn. Olsyt. 14, 67.
- Dyk, V.** 1944. Naše ryby. Nakl. Promberger. Olomouc. 317 s.
- Dyk, V.** 1956. Naše ryby. SZN. Praha.
- Epler, P., Bieniarz, K., Horoszewicz, L.** 1981. Effect of different thermal regimes on reproductive cycles of tench *Tinca tinca* (L.) Part III. Histological characteristic of ovariem. Pol. Arch. Hydrobiol., 197 – 205.
- Felix, K.H.** et al. 1956. Protamines and nucleoprotamines. Progress Biophys. Chemistry 6, 1-23.
- Flajšhans, M., Linhart, O., Kvasnička, P.** 1993b. Genetic studie sof tench (*Tinca tinca*, L.), Induced triploidy and tetraploidy and first performance data. Aquaculture. 301 – 312.
- Francis, M.H.** et Miller A.T. 1972. Cytoplasmatic and mitochondrial NAD/NADH ratio in rat brain and liver; effect of hypoxia. Comp. Biochem. 44, 829-835.
- Fribourgh, J., Clendon, D.E., Soloff. B.L.** 1970. Ultrastructure of the goldfish, *Carassius auratus* (Cyprinidae), spermatozoon. Copeia. 274 – 276.
- Frič, A.** 1908. České ryby a jejich cizopasníci. 2. vydání vlastním nákladem. Praha. 78s.
- Froese, R., Pauly, D.** 2003. FishBase. World Wide Web electronic publication. Dostupné z: <<http://www.fishbase.org>>.
- Gatti, J.L.** et al. 1990. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout spermatozoa : Role in the initiation of sperm motility. J.Cell Physiol. 143, 546-554.
- Geldhauser, F.** 1989. Untersuchungen zur reproduction der Schleie (*Tinca tinca* L.). München, 265.
- Ginsburg, A.S.** 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Moskova.
- Goryczko, K., Tomasik, L.** 1975. An influence of males on the viability and fertilization degree of trout eggs. Acta Ichthyol. Piscat. 5, 3-12.
- Gosh, R.I.** 1985. Energetičeskij obmen polovych kletok i embryonoi u ryb. Naukova dumka. Kiev. 147 pp.
- Heckel, J.** et Kner. R. 1858. Die Süßwassefische der österreichischen Monarchie mit Rücksicht an die angrenzenden Länder. W. Enfelmann, Leipzig.
- Hochman, L., Penaz, M., Prokes, M.** 1974. The volumen of milt quantity and quality of sperm in *Corygonus peled* (Gmelin 1788) from pond culture. Zool. Listy 23, 367-380.

- Horoszewicz, L.** 1981. Effect of different thermal regimes of reproductive cycles of tench *Tinca tinca* (L.) Part VIII. Towards understanding of reproduction mechanisms and requirements for controlled spawning. Pol. Arch. Hydrobiol. 79 – 92.
- Chábera, V.** 1980. Vyhodnocení umělého výtěru lína obecného (*Tinca tinca* L.) – plodnost jikernaček. M. Sc.thesis. 80. České budějovice. Agriculture University.
- Christian, R.** et al. 1987. Trout sperm motility : The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of fragellar movement. J. Biochem. 166, 667-671.
- James, H.** 1966. The application of a differential staining method to low temperature studies on Goldfish spermatozoa. Prog. Fish-Cult. 28, 227-231.
- Kála, L.,** Pružina, I., Tenzner, J. 1986. Odběr ovocytů biopsií. Reprodukce a genetika ryb – sborník referátů z vědecké konference, Bosňany, s. 188 – 190.
- Klupp R.** 1985. Die Schleie – ein vielseitigir Fisch. Fischwaid, 36 – 37.
- Kouřil, J.,** Hamáčková, J. 1992. Citlivost jiker kapra obecného, lína obecného a sumečka afrického po koupelích v roztocích malachotové zeleně a Wescodyne v průběhu inkubace. In: Sborník z vědecké konference Reprodukce ryb 92. Bosňany. 137 – 141 s.
- Kouřil, J.,** Hamáčková, J., Barth, T. 1997. Hormonální indukce umělého výtěru jikernaček některých druhů ryb. Vodňany. VÚRH, 3 – 4.
- Kouřil, J.** 1998. Hormonally induced spawning of tench *Tinca tinca* (L.) females. Po. Arch., Hydrobiol. 45. pp. 415 – 433.
- Krupauer, V.** et Pekař, Č. 1966. Přirozené rozmnožování hospodářsky významných druhů ryb v Lipenské údolní nádrži. (1. Nedravé druhy). Práce VÚRH Vodňany, 123 – 151.
- Kubů, F.,** Kouřil, J. 1985. Lín obecný. Praha. Český rybářský svaz.
- Kvasnička, P.,** Flajšhans, M., Ráb, P., Linhart, O. 1998. Inheritance studies of blue and golden varieties of tench (Pisces: *Tinca tinca* L.). J. Hered.
- Kvasnička, P.,** Flajšhans, M., Linhart, O. 1992. Výskyt spontánních triploidů ve šlechtěných populacích lína obecného (*Tinca tinca* L.). In: Řehout. V. Sborník z vědecké konference k jubileu nedožitéch 90. narozenin prof. Ing. Karla Koubka. DrSC. České Budějovice. Jihočeská univerzita, zemědělská fakulta, zootechnická řada.
- Kvasnička, P.,** Flašhans, M. 1993. Metoda morfologické identifikace triploidů v remontních hejnech lína. Edice Metodik VÚRH Vodňany. 8 s.
- Legendre M.** et al. 1996. Spawning nad management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. Aquat. Living Resour. 9 : 59-80.

Linhart, O. 1985. Použití oplozovacích roztoků při výtěru ryb. Práce VÚRH Vodňany. 17, 3-13.

**Linhart, O.**, Kouřil, J., Hamáčková, J. 1986. The motile spermatozoa of wels (*Silurus glanis* L.) and tench (*Tinca tinca* L.): after sperm collection without water activation. Práce VÚRH Vodňany. 28 – 40.

**Linhart, O.**, Šlechtová, V., Kvasnička, P., Ráb, P., Přikryl, I. 1989. Chromosome manipulations in tench (*Tinca tinca* L.) and carp (*Cyprinus carpio* L.) in Czechoslovakia. Práce VÚRH Vodňany, 53 – 60.

**Linhart, O.**, Barth, T., Kouril, J., Hamackova, J. 1991. Stimulation of spermiation in tench by analogues of Gn-RH and carp hypophysis. In : Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolf, M.S. (Eds), 4<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of fish. 282.

**Linhart, O.**, Kvasnička, P. 1992. Artificial insemination of tench (*Tinca tinca* L.) Aquacel. Fish Manager. 125 – 130.

**Linhart, O.** 1995. Spermiace některých druhů ryb včetně hodnocení kvality a kvantity spermií. Bul. VÚRH Bosňany., 31, 4.

**Linhart, O.**, Billard, R. 1995. Biology of gametes and artificial reproduction in common tench, *Tinca tinca* (L.). A review. Pol. Arch. Hydrobiol., 42, 37-56.

**Linhart, O.**, Peter. R.E., Rothbard, S., Zohar, Y., Kvasnička, P. 1995. Spemiation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extrakt. Aquaculture, 129, 119-121.

**Linhart, O.** 1996. Umělé osemenění u sumce veklého, lína obecného a bolena dravého. In: M. Flajšhans (Ed), sborník vědeckých prací k 75. výročí založení VÚRH, Bosňany. VÚRH JU. S. 42 – 46.

**Linhart, O.** et al. 1999. Stripped and testicular sperm of fresh and seawater tilapia, (*Oreochromis mossambicus*). J. Fish. Biol. 55, 1344-1358.

**Linhart, O.** 2000. Umělý výtěr lína obecného s využitím enzymu při odleповání jiker. VÚRH, JČU.

**Linhart, O.**, Rodina, M., Bastl, J., Cosson, J. 2003. Urinary bladder ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.) Journal of Applied Ichthyology 19, 177-181.

**Linhart, O.** 2004. Studijní materialy k předmětu řízená reprodukce ryb.

**Mattei, X.** et al. 1972. Ultrastructure des spermatozoides aflegellés des Mormyres (Poissons téléostens). J. Microsc. (15), 67-78.

- Matěnová, V.** et Pivnička, K. 1980. Beitrag zur geographischen Variabilität der Schleie, *Tinca tinca* (Pisces: Cyprinidae). Věst. čs. Společ. zool. 53 – 56.
- Moczarski, M.** 1976. Badania nad jakoscia nasienia karpia i wplyw na nia glebokiego mrozenia. [Studies on quality of carp sperm as affected by deep freezing]. Ph D. Thesis, Cracov, Institute of Applied Zoology, Academy of Agriculture.
- Mohri, H.** 1964. Extraction of ATPase from sea urchin and fish sperm tails. Biol.Bull.Woods hole 127(2), 381.
- Morawska, B.** 1982. Zmiany plodności lina (*Tinca tinca* L.) w wodach ogrzanych jako wyraz adaptacji gatunkowej. Changes of tench (*tinca tinca* L.) fecundity in heated waters as a reflection of species adaptation. Typescript. IRS, Warszawa – Žabenic. 1 – 54.
- Morawska, B.** 1984. Effect of water temperature elevation on incipient and cumulative fecundity of batch – spawning tench, *Tinca tinca* (L.). Aquaculture, 273 – 288.
- Oliva, O.** 1952. A revision of the cyprinid fishes of Czechoslovakia with regard to their secondary sexual characters. Bull. Int. Acad. Tchèque des Sci. 1-61.
- Oliva, O.** 1963. Kruhoústí a ryby Čech. Habil. Práce. Praha. 584 s.
- Oliva, O.,** Balon, E. 1968. Survey of the results of the Czechoslovak ichthyology and herperology in the last 23 years (1945 – 1967). St. knihovna ČSSR. 65 – 69.
- Opuszynski, K.,** 1979. Podstawy biologii ryb [Basis of the biology of fishes]. Warszawa PWRiL.
- Pekař, Č.** et Krupauer, V. 1969. Potravní vztahy dvouletých kaprů a línů ve smíšené vícedruhové obsádce. Práce VÚRH, Vodňany, 27 – 54.
- Penjaz, V.,** Ševcova, T. M., Nechajev T. I. 1973. Biologija ryb vodojemov belorusskogo polesja. Izd. Nauka I tehnika. Minsk. 238.
- Peňáz, M.,** Wohlgemuth, E., Hamáčková, J., Kouřil. 1981. Early ontogeny of the tench, *Tinca tinca*. I. Embryonic period. Folia Zool. Brno, 30 (2). 165 – 176.
- Peňáz, M.,** Wohlgemuth, E., Hamáčková, J., Kouřil. 1982. Early ontogeny of the tench, *Tinca tinca*. II. Larval period. Folia Zool. Brna. 31 (2). 175 – 180.
- Pimpicka, E.** 1989. Histological analysis of the ovariem in tench (*Tinca tinca* L.) from lake Drweckie. Acta Ichtyol. Pisc., 19, 75-95.
- Pimpicka, E.** 1990. Formation fecundity of tench, (*Tinca tinca* L.) females in lake Drweckie. Acta ichtyol.
- Pimpicka, E.** 1991. Fecundity of tench (*Tinca tinca* L.) females in lake Drweckie. Acta Ichtyol. Pisc., 75 – 95.



- Pimpicka, E.** 1998. Formation of the pool of trophoplasmatic oocytes during oogenesis in juvenile tench (*Tinca tinca* L.) Pol. Arch. Hydrobiol. 361 – 369.
- Pokorný, J., Kouřil, J.,** 1983. Intenzivní chov lina. Vodňany, VÚRH. Edice Metodik, č. 5, 12 s.
- Reiser, F., Kubů, F., Vostradovský, J.,** 1983. Rybářství součást zemědělské výroby. Účelová publikace MZV ČSR. SZN. Praha. 102.
- Rodina, M., Cosson, J., Gela, D., Linhart, O.,** 2004. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.). Aquaculture International 12, 119-131.
- Rudnicki, A., Waluga J., Walus, T.** 1971. Rybactwo jeziorowe [Lake fisheries]. Warszawa, PWRiL.
- Sakun, O.F.,** Buckaja, N.A. 1968. Определеие стадий зрелости и изучение половых циклов рыб. Murmansk, Izdat. Min. Ryb. Choz. SSSR. 1 – 45.
- Scheuring, L.** 1925. Biologische und physiologische Untersuchungen an Forellensperma. Arch. Hydrobiol. Suppl. 4, 181-318.
- Schlenk, W.** et Kahmann K. 1938. Die chemische Zusammensetzung des Spermaliquors und ihre physiologische Bedeutung. Biochem. Z. 295 (5/6), 283-301.
- Stein, H.** 1981. Licht- und elektronoptische Untersuchungen an den Spermatozoen verschiedener Süßwasserknochenfische (Teleostei). Zeitschrift für Angewandte Zoologie,
- Šimek, Z.** 1959. Ryby našich vod. Nakl. Orbis. Praha.
- Šusta, J.** 1884 (1937). Výživa kapra a jeho družiny rybníčné. Nezměněný otisk k vydání Čs. akad. Zeměděl. (1937), s poznámkami B. Dvořáka a K. Schäferny. 224s.
- Tanimoto, S.** et Morisawa M. 1988. Roles of potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout. Dev. Growth Differ. 30, 117-124.
- Terlecki, W.,** Kempinska, H. 1956. *Sieja I sielawa [Whitefish and vendace]*. Warszawa, PWRiL.
- Tibbs, J.** 1962. Adenosine-triphosphatase and acetylcholin esterase in relation to sperm motility. In : Spermatozoan motility. (D.W. Bishop ed.). Am. Assoc. Adv. Sci. Publ. 72. pp. 233-250.
- Trzebiatowski, R.,** Stepanowska, K., Siwicki, A.K., Kazu, K. 1996. Badania nad przydatnością preparatu propiscin do znieczulenia ogólnego sumca europejskiego. Komunikaty Rybackie (Olsztyn). 14 – 18.
- Turdakov, A.F.** 1972. The reproductive system of male fishes. Frunze, Izdat. "Ilim".
- Turdakov, A.F.,** Aminova, N.A. 1973. Study of the heat resistance of spermatozoa of several species of bony fishes. Vopr. Ikhtiolog. 13, 238-244.

**Wieniawski, J.**, 1965. Technika wychowu karpi [The technical culture of carp]. In :  
Rudnicki, A., (Ed.), Hodowla ryb w stawach. Warszawa PWRiL 266-308.

## 8. Příloha

**Tabulka č. 13:** Objem spermatu na mlíčka a na kg, odebraného v čase 24, 48 a 72 hodin po stimulaci LHRHa a CPS. Kontrolní skupina byla injektována fyziologickým roztokem.

Stimulace	Dávka	Váha těla	24 hodin		48 hodin		72 hodin		Průměrný obsah	
			mlíček	kg	mlíček	kg	mlíček	kg	mlíček	kg
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	0.59 ±	0.4 ±	0.7 ±	0.1 ±	0.2 ±	0.3 ±	0.5 ±	0.3 ±	0.5 ±
		0.08	0.4	0.7	0.1	0.2	0.3	0.6	0.3	0.6
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	0.60 ±	1.7 ±	2.9 ±	0.6 ±	1.1 ±	1.0 ±	1.4 ±	1.0 ±	1.5 ±
		0.08	1.0	1.8	0.5	0.9	0.9	1.0	0.9	1.0
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	0.61 ±	0.7 ±	1.2 ±	0.7 ±	1.1 ±	0.5 ±	0.8 ±	0.6 ±	1.0 ±
		0.08	0.3	0.5	0.5	0.7	0.3	0.6	0.4	0.6
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	0.59 ±	0.5 ±	0.9 ±	0.4 ±	0.6 ±	0.3 ±	0.5 ±	0.4 ±	0.7 ±
		0.09	0.2	0.5	0.5	0.7	0.3	0.5	0.3	0.6
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	0.60 ±	1.2 ±	2.0 ±	0.7 ±	1.1 ±	0.9 ±	1.4 ±	0.9 ±	1.5 ±
		0.10	0.6	1.1	0.6	1.0	0.6	0.8	0.6	1.0
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	0.62 ±	1.1 ±	1.7 ±	0.8 ±	1.2 ±	1.0 ±	1.4 ±	1.0 ±	1.5 ±
		0.11	0.8	0.8	1.1	1.4	0.9	1.0	0.9	1.0

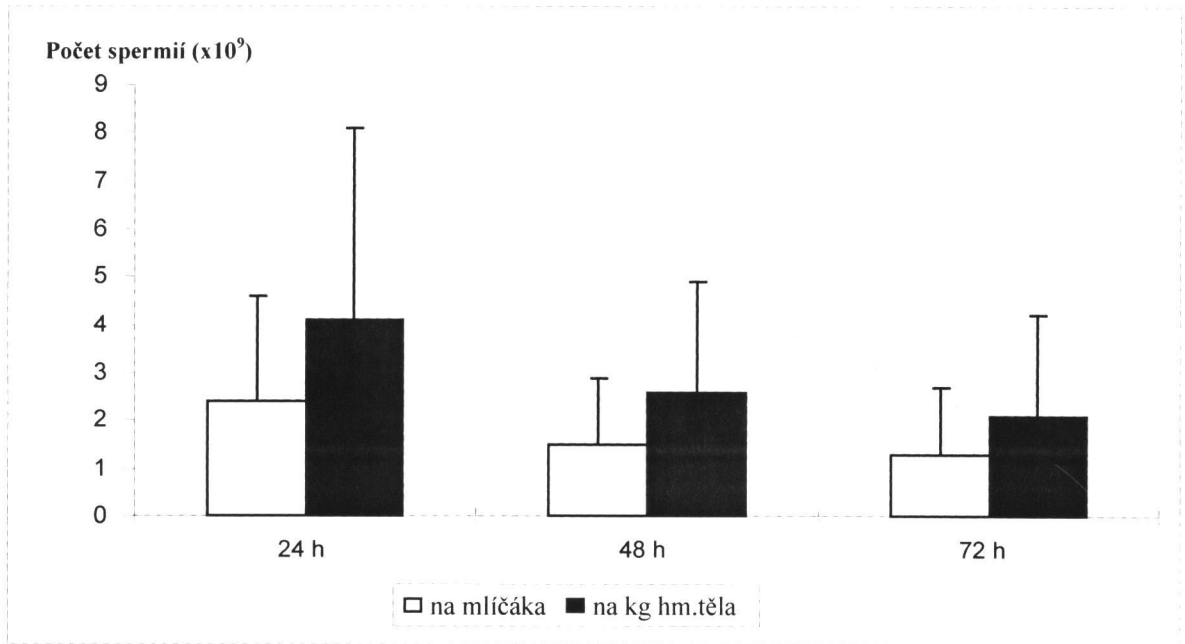
**Tabulka č. 14:** Počet spermií ( $\times 10^9$ ) na mlíčka a kg váhy těla odebraných v čase 24, 48 a 72 hodin po stimulaci LHRHa a CPS. Kontrolní skupina byla injektována fyziologickým roztokem.

Stimulace	Dávka	Váha těla	24 hodin		48 hodin		72 hodin		Průměrný počet	
			mlíček	kg	mlíček	kg	mlíček	kg	mlíček	kg
<b>Kontrola</b>	<b>0,0 mg</b>	0.59 ±	2.4 ±	4.1 ±	1.0 ±	1.8 ±	0.9 ±	1.6 ±	1.4 ±	2.5 ±
		0.08	3.5	6.2	1.0	2.0	1.1	2.0	2.2	3.9
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	0.60 ±	3.1 ±	5.4 ±	2.2 ±	3.7 ±	2.0 ±	3.4 ±	2.4 ±	4.2 ±
		0.08	1.3	2.9	1.4	2.4	1.8	2.9	1.5	2.7
<b>LHRHa</b>	<b>5 µg</b>	0.61 ±	1.8 ±	3.0 ±	0.9 ±	1.6 ±	1.1 ±	1.9 ±	1.3 ±	2.1 ±
		0.08	1.1	1.8	0.3	0.5	0.7	1.3	0.9	1.4
<b>LHRHa</b>	<b>10 µg</b>	0.59 ±	1.5 ±	2.7 ±	1.0 ±	1.7 ±	0.6 ±	0.9 ±	1.0 ±	1.8 ±
		0.09	1.5	2.5	0.8	1.5	0.6	1.0	1.1	1.8
<b>LHRHa</b>	<b>20 µg</b>	0.60 ±	3.3 ±	5.7 ±	2.5 ±	4.2 ±	1.6 ±	2.5 ±	2.5 ±	4.1 ±
		0.10	3.5	6.8	2.3	3.9	1.2	1.6	2.5	4.6
<b>LHRHa</b>	<b>40 µg</b>	0.62 ±	2.1 ±	3.5 ±	1.7 ±	2.5 ±	1.7 ±	2.6 ±	1.9 ±	2.9 ±
		0.11	0.7	0.9	1.2	1.4	2.1	3.1	1.4	2.0

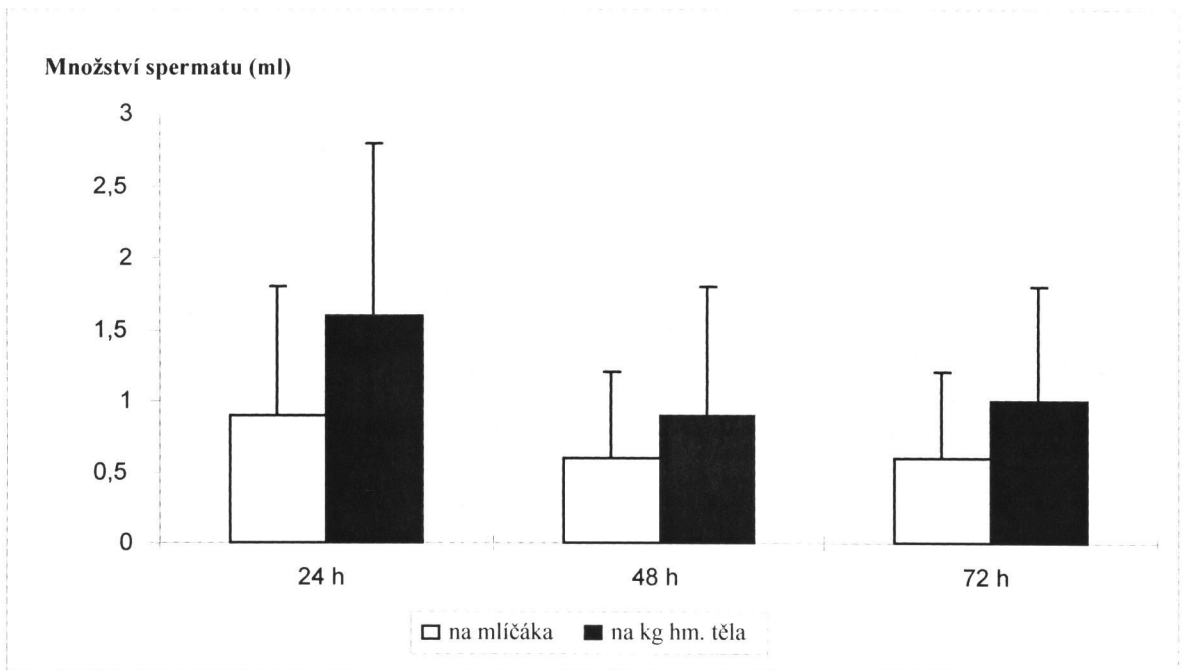
**Tabulka č. 15:** Procentické vyhodnocení motility a rychlosti pohybu spermií, 48 hodin po stimulaci pomocí LHRHa a CPS. Kontrolní skupina byla injektována fyziologickým roztokem. Rychlost a pohyblivost spermií byli měřeny podle postavení hlavičky spermie 30, 60 a 120 sekund po aktivaci destilovanou vodou, obsahující 0.1 % BSA.

Stimulace	Dávka	Váha těla	30 s		60 s		120 s	
			Motilit (%)	Rychlost ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Motilita (%)	Rychlost ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Motilita (%)	Rychlost ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
<b>Kontrola</b>	<b>0.0 mg</b>	0.59 ±	87.4 ±	54.5 ±	54.7 ±	19.3 ±	2.31 ±	3.7 ±
		0.08	4.0	13.1	20.7	9.8	0.0	2.2
<b>CPS</b>	<b>2 mg</b>	0.60 ±	90.3 ±	59.6 ±	77.4 ±	21.9 ±	24.4 ±	10.3 ±
		0.08	2.6	14.3	6.5	8.8	26	8.8
<b>LHRHa</b>	<b>5 <math>\mu\text{g}</math></b>	0.61 ±	87.1 ±	58.7 ±	62.2 ±	19.9 ±	22.0 ±	8.1 ±
		0.08	5.7	13.3	12.6	10.6	13.3	5.7
<b>LHRHa</b>	<b>10 <math>\mu\text{g}</math></b>	0.59 ±	88.6 ±	56.4 ±	58.8 ±	19.7 ±	11.0 ±	5.7 ±
		0.09	9.0	13.1	19.2	9.3	12.0	2.7
<b>LHRHa</b>	<b>20 <math>\mu\text{g}</math></b>	0.60 ±	89.0 ±	57.3 ±	63.8 ±	20.7 ±	4.9 ±	4.3 ±
		0.10	4.1	13.8	14.8	7.8	0.2	2.1
<b>LHRHa</b>	<b>40 <math>\mu\text{g}</math></b>	0.62 ±	87.7 ±	58.3 ±	62.0 ±	22.0 ±	23.5 ±	6.3 ±
		0.11	7.9	14.9	19.6	9.4	18.0	4.5

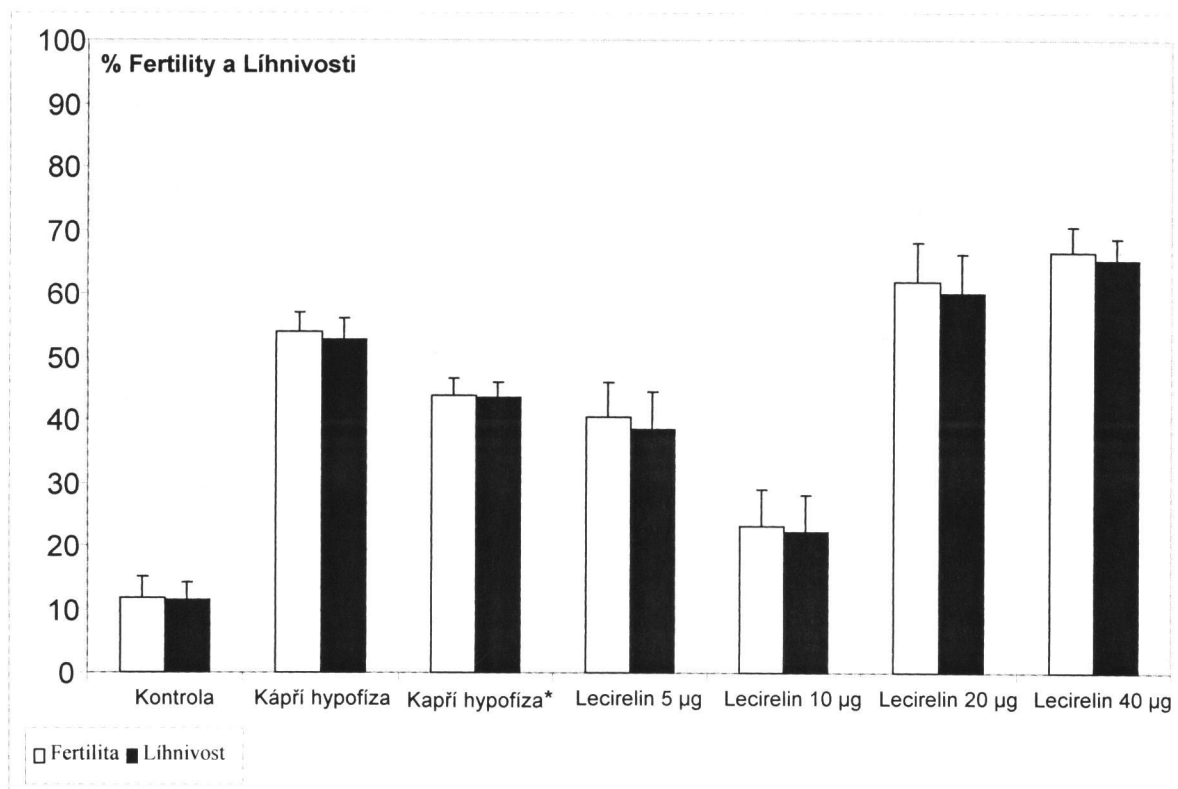
**Graf č. 1:** Počet spermií na mlíčka a na kg hm. těla ( $\times 10^9$ ) v různých časech odběru



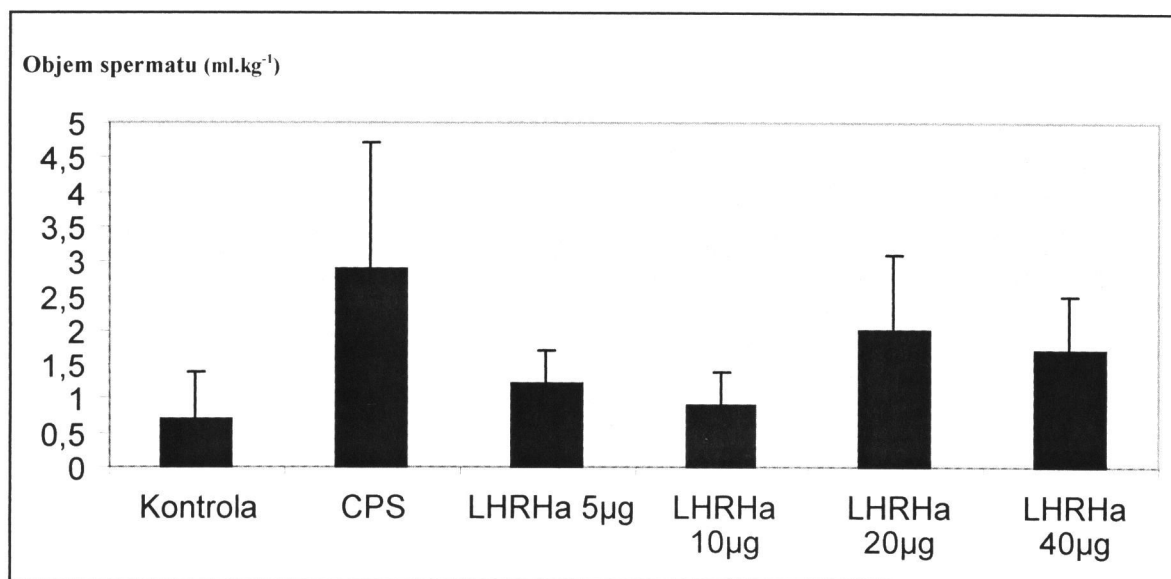
**Graf č. 2:** Množství spermatu (ml) v různých časech odběru



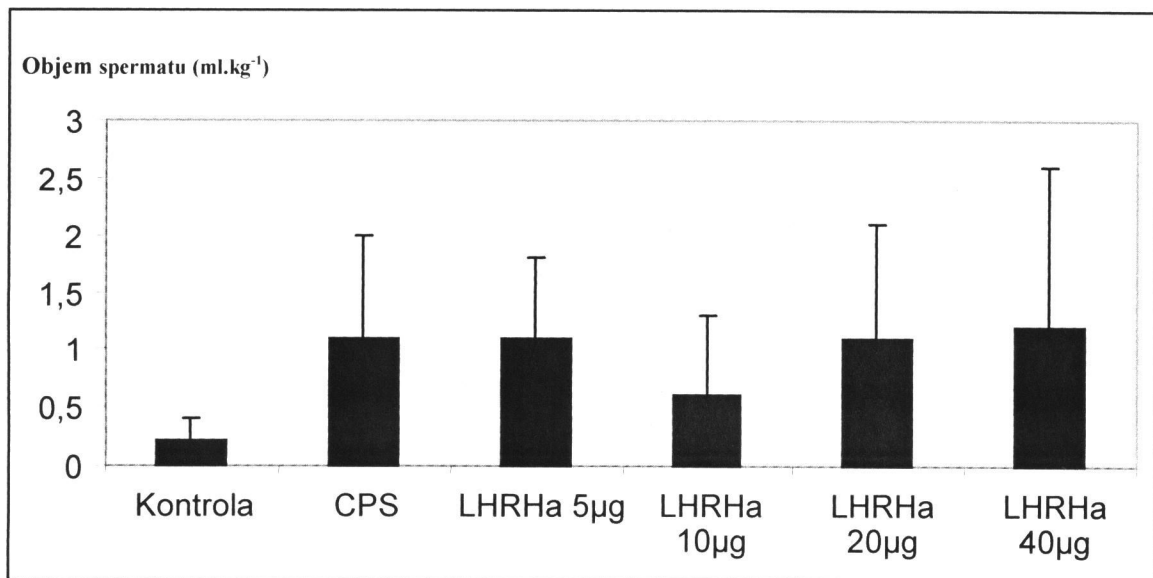
**Graf č. 3:** Procentické vyhodnocení fertility a líhnivosti v závislosti na způsobu stimulace spermiace



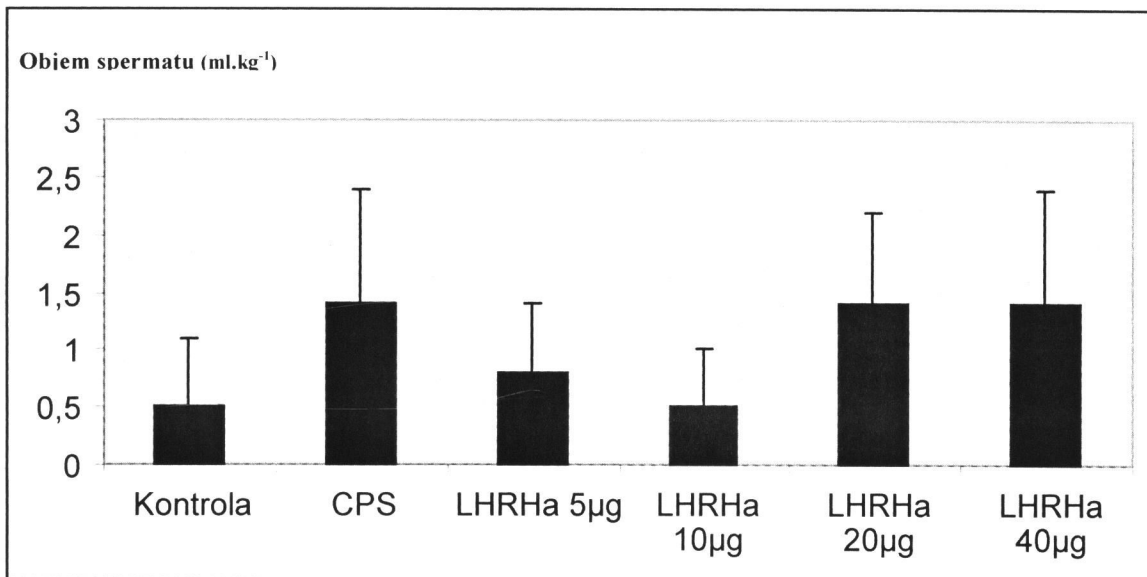
**Graf č. 4:** Objem spermatu ( $\text{ml.kg}^{-1}$ ) 24 h po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



**Graf č. 5:** Objem spermatu ( $\text{ml.kg}^{-1}$ ) 48 h po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace

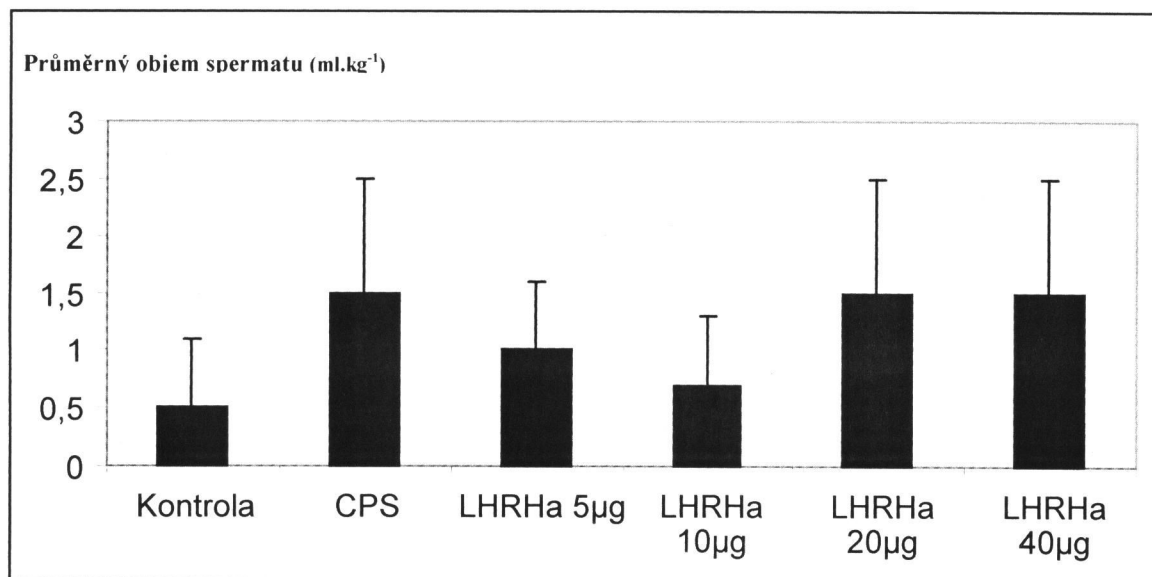


**Graf č. 6:** Objem spermatu ( $\text{ml.kg}^{-1}$ ) 72 h po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace

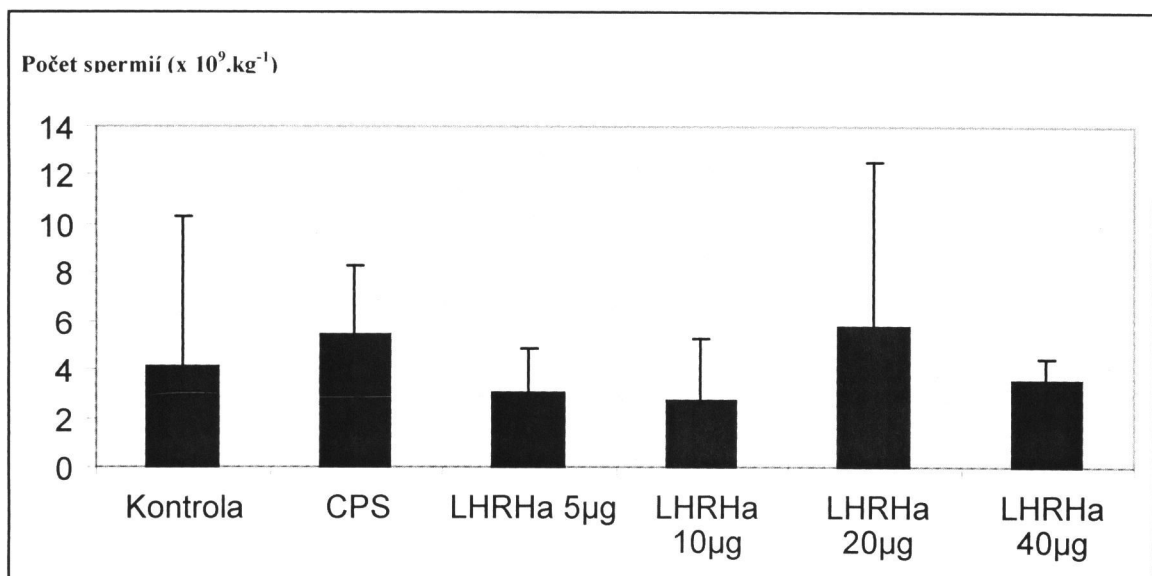




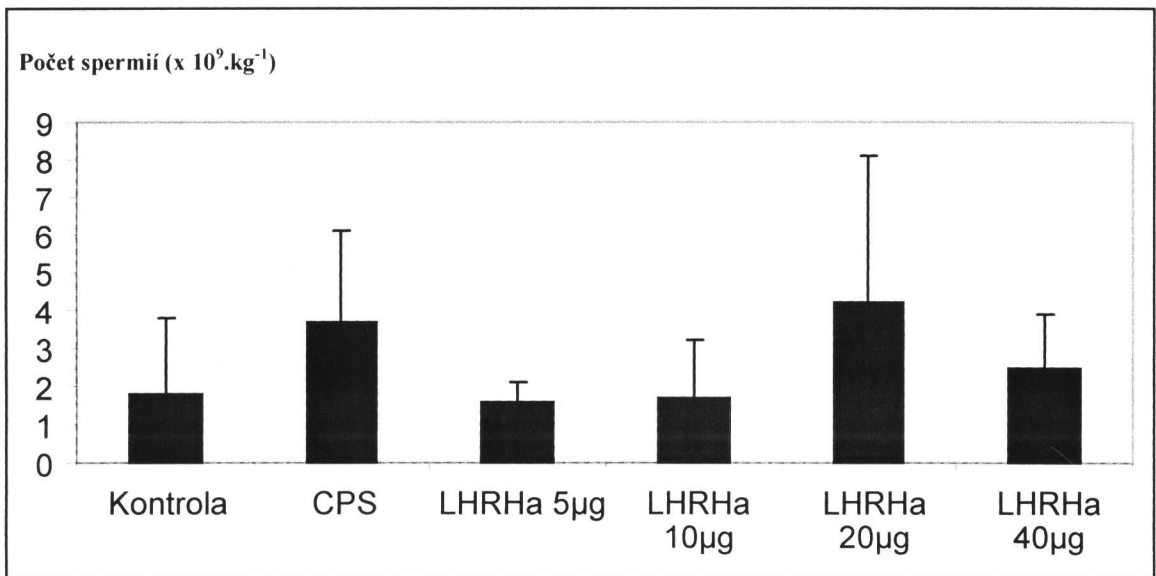
**Graf č. 7:** Průměrný objem spermatu ( $\text{ml.kg}^{-1}$ ) v závislosti na způsobu stimulace spermiace



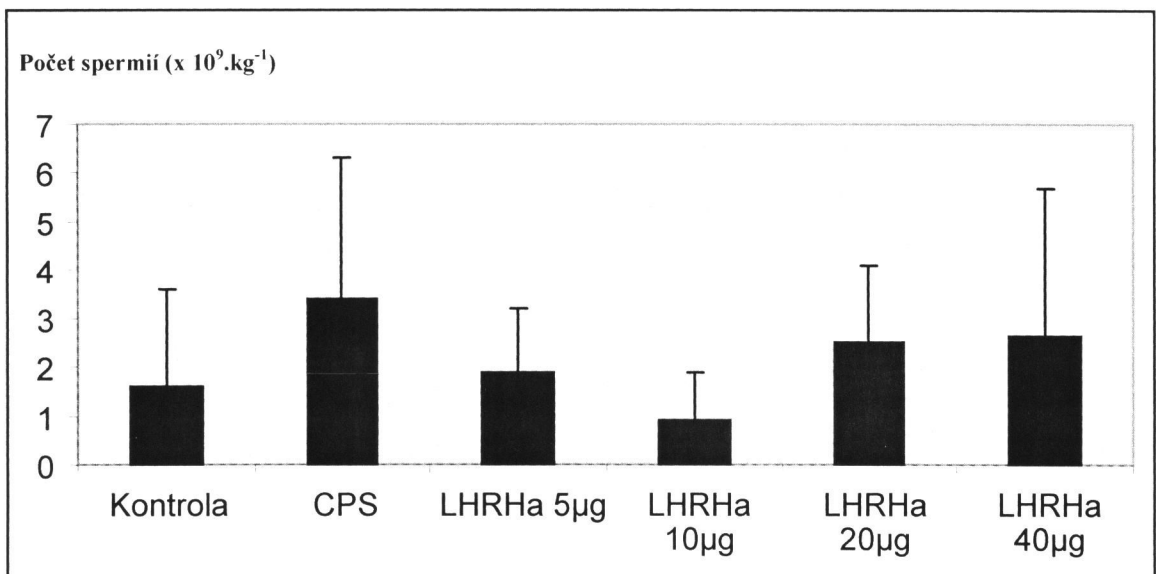
**Graf č. 8:** Počet spermií ( $\times 10^9.\text{kg}^{-1}$ ) 24 h po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



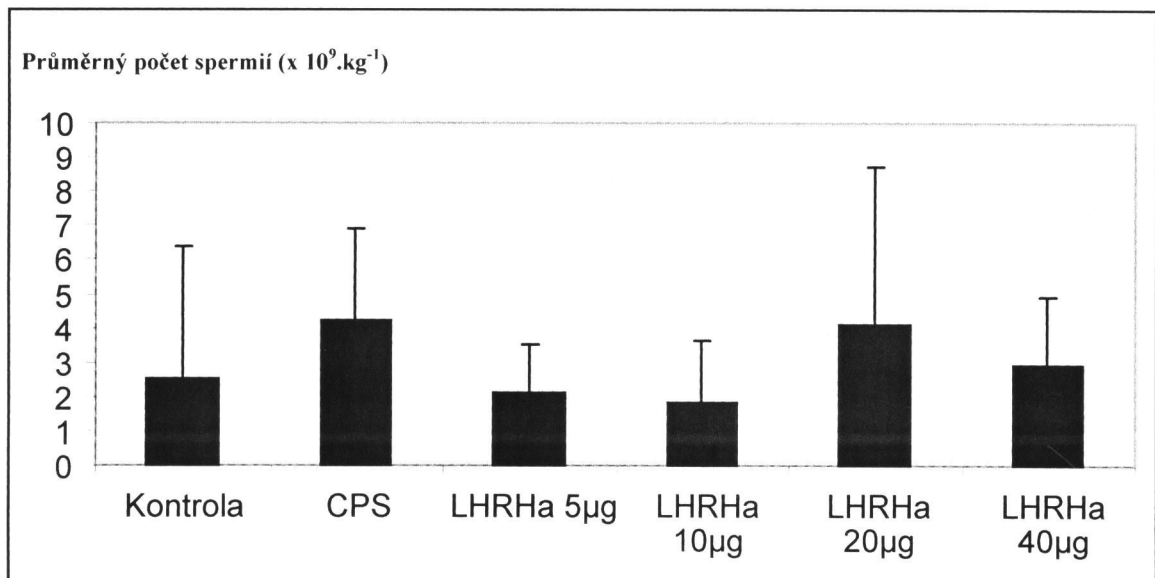
**Graf č. 9:** Počet spermií ( $\times 10^9 \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 48 h po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



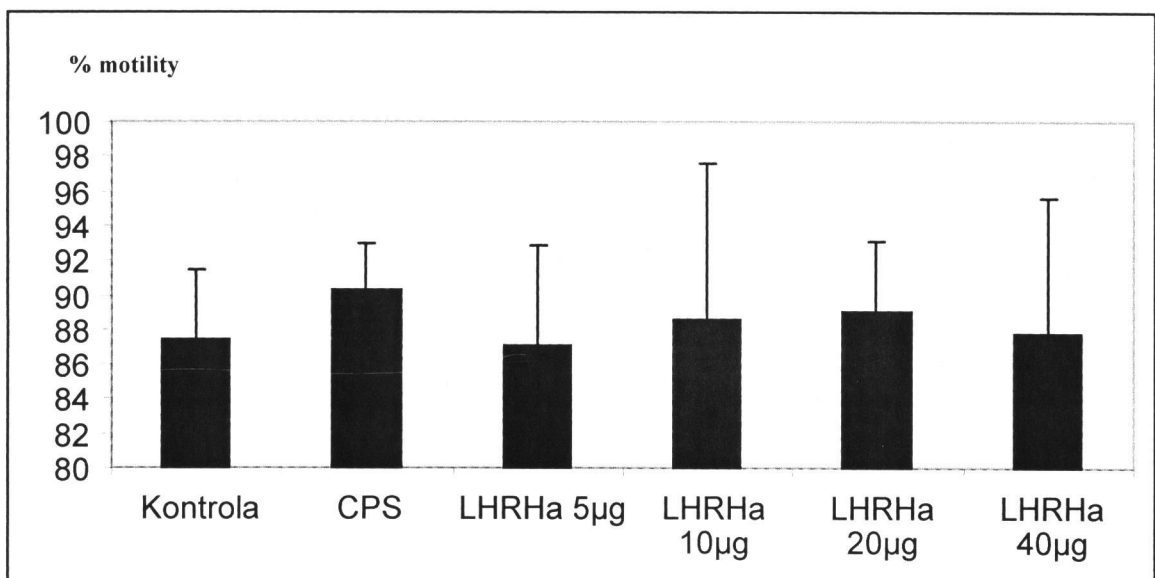
**Graf č. 10:** Počet spermií ( $\times 10^9 \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 72 h po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



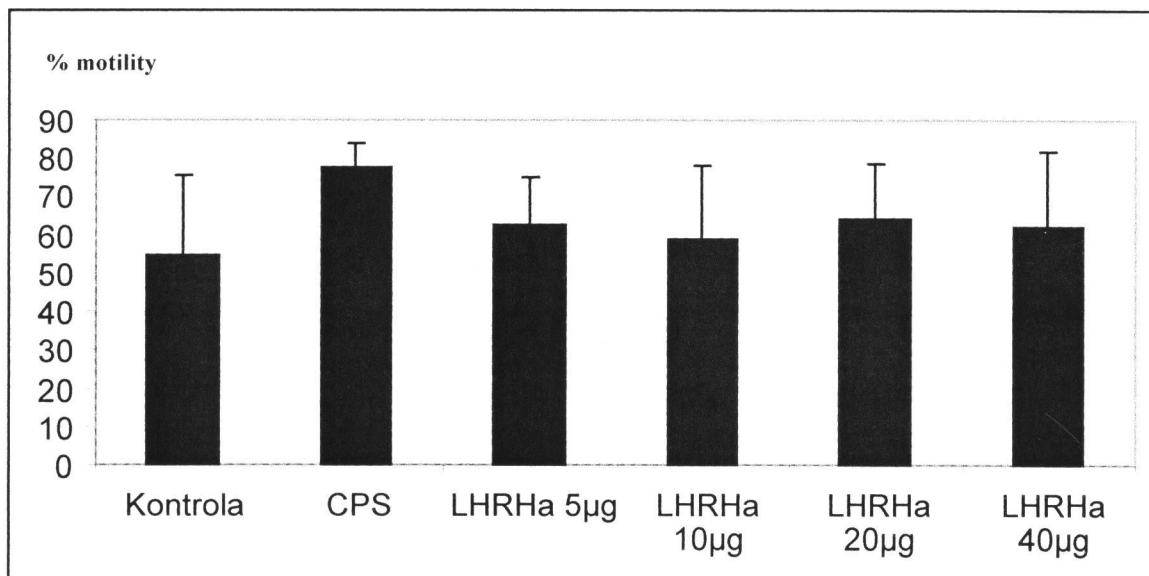
**Graf č. 11:** Průměrný počet spermií ( $\times 10^9 \cdot \text{kg}^{-1}$ ) v závislosti na způsobu stimulace spermiace



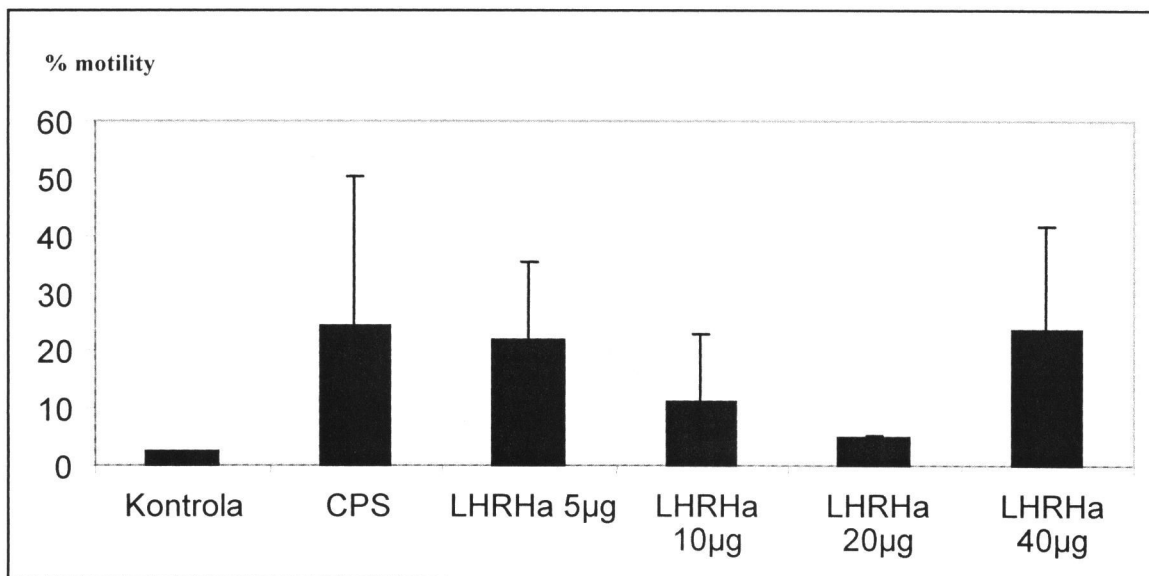
**Graf č. 12:** Procento motility spermií ve 30 s po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



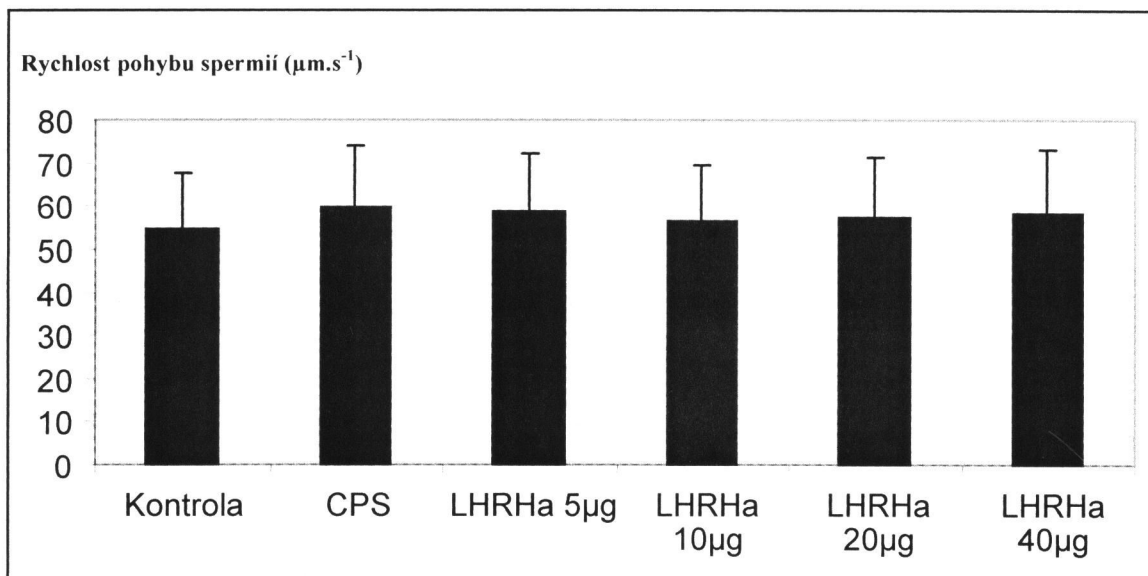
**Graf č. 13:** Procento motility spermií v 60 s po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



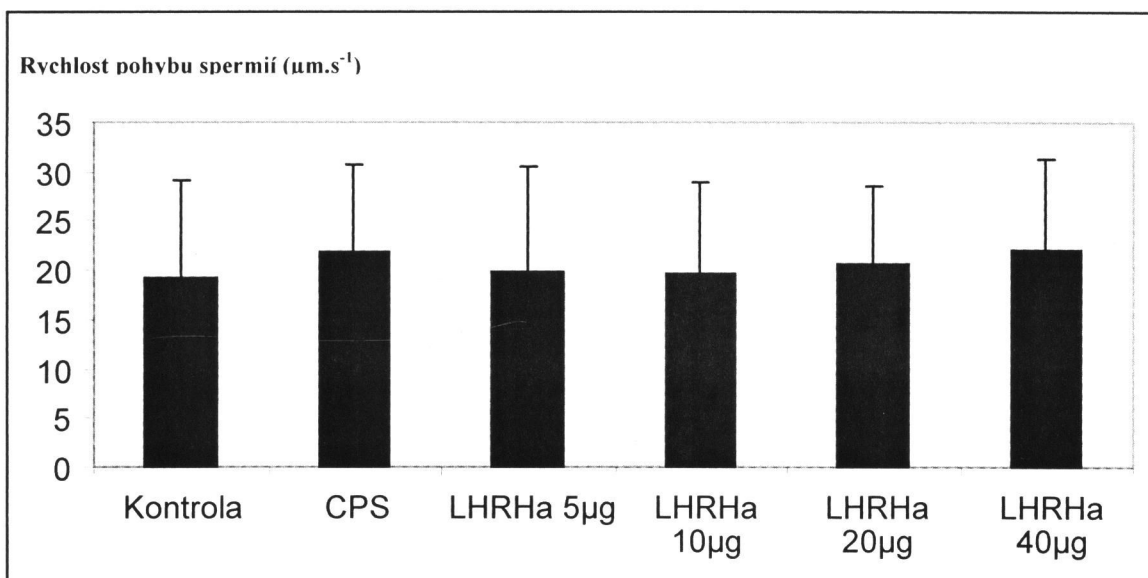
**Graf č. 14:** Procento motility spermií ve 120 s po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



**Graf č. 15:** Rychlost pohybu spermií ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ve 30 s po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



**Graf č. 16:** Rychlost pohybu spermií ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) v 60 s po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace



**Graf č. 17:** Rychlost pohybu spermií ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ve 120 s po aktivaci v závislosti na způsobu stimulace spermiace

