



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Bulletin

VÚRH *V o d ň a n y*

ročník
volume

47/2/2011

duben–červen / April–June

Tato publikace byla vydána z prostředků Evropského rybářského fondu v rámci projektu „Příprava a vydání 47. ročníku odborného čtvrtletníku Bulletin VÚRH Vodňany“ (CZ.1.25/3.1.00/11.00302)



Evropský rybářský fond
„Investice do udržitelného rybolovu“

OBSAH / CONTENTS

Původní články – Original papers

M. FLAJŠHANS, V. PIAČKOVÁ

5

Biometrické charakteristiky ve vztahu ke vstřebávání anestetik a rychlosti nástupu anestézie vyvolané 2-fenoxyetanolem u diploidních a chromozomově manipulovaných línů obecných, *Tinca tinca* L. • *Biometrical parameters associated with the uptake of anaesthetics and rate of the onset of anaesthesia induced by 2-phenoxyethanol in diploid and chromosomally-manipulated tench, *Tinca tinca* L.*

D. SOCHOROVÁ, S. BORYSHPOLETS

15

Kryokonzervace spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) při různých teplotách zmrazování • *Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm under different temperatures*

Přehledové články – Review papers

D. BYTYUTSKYY, M. FLAJŠHANS

27

Vzájemný vztah mezi ploidní úrovní, velikostí genomu a velikostí buněk v sérii modelů ryb s ploidní úrovní od 2n do 12n (přehled) • *Interrelationship between ploidy level, genome size and cell size in a series of ploidy level models from 2n to 12n fish (a review)*

Překlady článků (zkrácené) – Translations of papers (shortened)

P. LI, Z-H. LI, B. DZYUBA, M. HULÁK, M. RODINA, O. LINHART

41

Vyhodnocení dopadů osmotického a oxidačního stresu na spermie kapra obecného (*Cyprinus carpio*, L.) způsobených zmrazovacími technikami • *Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques*

Zprávy a Informace / News and Information

T. POLICAR

47

Vědecká konference Diversification in Inland Finfish Aquaculture

B. KOČMÁNKOVÁ

49

Slavnostní zahájení činnosti CENAKVA a oslavy 90. výročí VÚRH na zámku Hluboká nad Vltavou

Pokyny pro autory

51



BIOMETRICKÉ CHARAKTERISTIKY VE VZTAHU KE VSTŘEBÁVÁNÍ ANESTETIK A RYCHLOSTI NÁSTUPU ANESTÉZIE VYVOLANÉ 2-FENOXYETANOLEM U DIPLOIDNÍCH A CHROMOZOMOVĚ MANIPULOVANÝCH LÍNŮ OBECNÝCH, *TINCA TINCA* L.

BIOMETRICAL PARAMETERS ASSOCIATED WITH THE UPTAKE OF ANAESTHETICS AND RATE OF THE ONSET OF ANAESTHESIA INDUCED BY 2-PHENOXYETHANOL IN DIPLOID AND CHROMOSOMALLY-MANIPULATED TENCH, *TINCA TINCA* L.

M. FLAJŠHANS, V. PIAČKOVÁ

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, e-mail: flajshans@rov.jcu.cz

ABSTRACT

Experiments were carried out on amphimictic diploid ($2n$) and chromosomally manipulated (induced triploid, $3n$ and meiotic gynogenic, MeiG) tench, *Tinca tinca* (L.) of the same origin and grown in communal stocks. Gill area simplified to area of lamellae of outer hemibranchs in images of complete gill arches per specimen were found highly correlating ($r = 0.95$) with published data on complete gill area in this species. Gills of chromosomally manipulated tench did not exhibit any signs of gill filament deformity syndrome. High correlations to body weight were found for gill weight ($r = 0.97$ and 0.98 for $2n$ and $3n$, respectively), gill image area ($r = 0.94$ and 0.99 for $2n$ and $3n$, respectively) and body image area ($r = 0.99$ for both $2n$ and $3n$) irrespective of sex, allowing to assess relationships between gill parameters and anaesthesia in tench indirectly by means of body weight without a necessity to sacrifice the fish for gill dissection. Potential effects of ploidy level and sex on anaesthesia induced by means of an immersion bath of 1 ml.l^{-1} 2-phenoxyethanol at 8.8°C during a 10 min period were assessed under pilot conditions of a fish hatchery. Mean time \pm standard deviation (SD) for all diploids to gain the phase 3 of anaesthesia (total loss of reflexes, no reaction to handling) was 5.12 ± 1.60 min and for all triploids 4.43 ± 1.58 min; for $2n$ females 4.55 ± 0.80 min, $2n$ males 5.88 ± 2.02 min, $3n$ females 4.05 ± 1.25 min, $3n$ males 4.87 ± 1.80 and MeiG females 4.53 ± 2.18 min. All females gained the phase 3 of anaesthesia in mean time 4.39 ± 1.63 min, all males in mean time 5.67 ± 2.25 min. However, these differences were not found significant ($P > 0.05$) and the response of tench to anaesthesia appeared to be rather individual with high SDs ranging from 31% to 48% of the mean in unsexed populations and from 18% to 48% of the mean in sexed $2n$, $3n$ and MeiG populations than specific to genome composition or sex. Correlations of body weight vs. time of gaining the phase 3 of anaesthesia in all three populations of tench were found weak; the only positive correlation was found for MeiG tench ($r = 0.25$) while for $2n$ and/or $3n$ correlations were found negative and very weak ($r = -0.37$ and -0.18 , respectively).

Klíčová slova: 2-fenoxyetanol, anestézie, biometrie, diploidie, žábry, gynogeneze, lín obecný, triploidie
Keywords: 2-phenoxyethanol, anaesthesia, biometry, diploidy, gills, gynogenesis, tench, triploidy

ÚVOD

Anestetika jsou u ryb používána podle Zákona na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/192 Sb.) pro přiměřené zklidnění k redukci stresu a znecitlivění ryb před manipulacemi vně vodního prostředí, jimiž jsou například umělá reprodukce, biometrická měření, značkování, odběry krevních a tkáňových vzorků apod. Pro lína obecného (*Tinca tinca*) je jedním z testovaných a široce používaných anestetik etylenglykol monofenyléter (2-fenoxyetanol; Osanz Castan a kol., 1993; Kouřil a kol., 2001; Myszkowski a kol., 2003; Hamáčková a kol., 2004; Kolářová a kol., 2007). Jeho obecně doporučovaná koncentrace pro anestézii ryb je 0,20 ml.l⁻¹ koupele; pro velké generační ryby je doporučovaná koncentrace 0,30 ml.l⁻¹ (Velíšek a Svobodová, 2004). U lína obecného účinné koncentrace dosahují hodnot do 0,62 ml.l⁻¹ pro juvenilní (Myszkowski a kol., 2003) a dospělé jedince (Osanz Castan a kol., 1993; Kouřil a kol., 2001 a Hamáčková a kol., 2004), při teplotách vody od 10 °C (Osanz Castan a kol., 1993) do 25,1 °C (Hamáčková a kol., 2004). Podle Weyl a kol. (1996) a Hamáčkové a kol. (2004) se rychlost nástupu anestézie zvyšuje se stoupající teplotou vody.

Anestetikum se u ryb vstřebává převážně přes žaberní aparát difuzí v žaberním epitelu (Arnold a kol., 2002). V malém množství může také difundovat do těla ryb přes pokožku (Ferreira a kol., 1984). Účinek anestetika lze proto převážně vztahovat k ploše povrchu žaberního epitelu a k jeho poměru k hmotnosti těla (Ross a Ross, 1983). Plocha povrchu žaberního epitelu, také interpretovaná jako plocha žaber, vzrůstá u ryb s tělesnou hmotností (Price, 1931; Muir, 1969; Hughes, 1972; Pauly, 1981). Plochu žaber u lína obecného studovali Byczkowska-Smyk (1959), Hughes (1966), Hughes (1972), Hughes a Morgan (1973) a jejich údaje spolu s daty u dalších druhů ryb sumarizovali a kriticky zhodnotili Palzenberger a Pohla (1992).

Z literatury jsou známy pouze dva záznamy o morfologii žaber u triploidních ryb. Sadler a kol. (2001) popsali u lososa obecného (*Salmo salar*) vyšší frekvenci syndromu deformace žaberních filamentů (GFD) u triploidů než u diploidů a snížení indexu plochy povrchu žaber jak u normálních triploidů, tak i u triploidů postižených GFD ve srovnání s diploidy. Flajšhans a Piačková (2006) popsali u lína obecného analýzou obrazu sagitálních řezů sekundárními žaberními lamelami diploidů a triploidů vyšší difuzní vzdálenost mezi krví a vodou u diploidů než u jejich triploidních sourozenců a také rozdíly v prostorové konformaci jejich žaberních destiček, ale s podobnou průměrnou plochou průřezu destičky. Další údaje o anestézii a rozměrech žaber u jiných chromozomově manipulovaných druhů ryb nebyly v literatuře nalezeny.

Cílem studie bylo proto stanovit zjednodušené vztahy mezi vybranými biometrickými proměnnými souvisejícími s absorpcí anestetika a s rychlostí nástupu anestézie (živá hmotnost, hmotnost žaber, plocha trupu, plocha žaber) adultního diploidního a triploidního lína obecného (experiment 1) a odhadnout na základě těchto vztahů možné vlivy těchto proměnných přímo nebo nepřímo na vnímavost chromozomově manipulovaných a nemanipulovaných jedinců lína obecného k anestetiku (experiment 2).

MATERIÁL A METODIKA

Ke studii byly použity amfimiktická diploidní (2n), indukovaná triploidní (3n) a indukovaná meiotická gynogenetická (MeiG) populace lína obecného, popsané Flajšhansem a kol. (2004) a Piačkovou a Flajšhansem (2006). Individuálně značené pohlavně dospělé ryby kategorie L5 a L7 z chovných rybníků FROV JU ve Vodňanech byly odloveny záťahovou sítí, roztříděny podle ploidie a pohlaví a převezeny na líheň FROV JU.

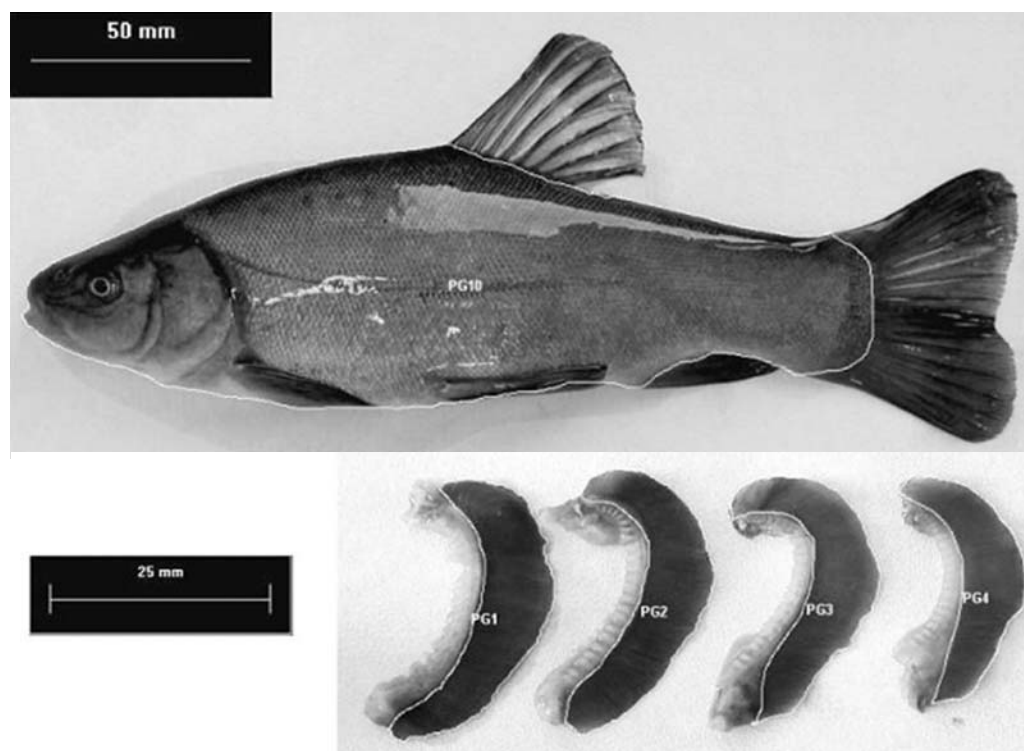
EXPERIMENT 1

Vybrané biometrické parametry byly stanoveny u 2n lína (prům. živá hmotnost $200,75 \pm 90,85$ g; 20 ex.) a 3n lína (prům. živá hmotnost $187,00 \pm 99,00$ g; 10 ex.) určených rovněž pro jinou studii. Po zvážení ryb byly snímky jejich levé strany s 50mm kalibrem referenční délky zhotoveny z konstantní vzdálenosti digitálním fotoaparátem na stativu. Pitvou byly vyjmuty jednotlivé levé žaberní oblouky, zváženy a stejným způsobem fotografovány.

Digitální snímky ryb a jejich žaberních oblouků byly převedeny do software analýzy obrazu Olympus Microlmage v. 4.0 for Windows v režimu manuálního měření a kalibrovány s 50mm referenční vzdáleností. Obrisy trupu (těla ryby bez ploutví) byly vytvořeny jako polygon pomocí nástroje "trace/wand tool" (obr. 1). Obrisy žaber, resp. žaberních lístků zevních půlžaber (*hemibranch*) všech čtyř levých žaberních oblouků každého jedince byly vytvořeny obdobně (obr. 1 dole). Ze snímků žaber byla rovněž hodnocena jejich morfologie. Hodnoceny byly údaje o změřených plochách [plocha ze snímku levé strany trupu ryby označená jako „plocha snímku trupu (*body image area*) BIA; mm^2 “, plocha všech laterálních stran každé ze zevních půlžaber z levé strany označená jako „plocha snímku žaber (*gill image area*) GIA“; mm^2].

Obr. 1. Digitální snímek diploidního jedince lína obecného (*Tinca tinca*) z experimentu 1 (nahore) a pitvou vyjmutých žaberních oblouků z levé strany (dole). Měřítka označují referenční vzdálenost. Obrisy ukazují plochu snímku trupu (BIA, mm^2 ; nahore) a plochy žaberních lístků zevních půlžaber (*hemibranch*) všech čtyř žaberních oblouků každého jedince (dole), které se sčítají jako plocha snímku žaber (GIA, mm^2).

Fig. 1. Digital image of a diploid specimen of tench, *Tinca tinca* L. from experiment 1 (above) and of gills dissected from the left side (below). Bars indicate reference distance. Outlines show the body image area (BIA, mm^2 ; above) and the areas of lamellae of the outer hemibranchs of all four gill arches (below) to be summarized per specimen as the gill image area (GIA, mm^2).



Statistické zhodnocení bylo provedeno v programu MS Excel 2002 a Statgraphics v. 5. Regresní analýzou byly hodnoceny údaje o živé hmotnosti a ploše žaber lína obecného dostupné z databáze FishBase (Pauly, 2005), do výsledné regresní rovnice $y = 1,7335x + 46,687$ ($R^2 = 0,9626$), kde x byla živá hmotnost a y byla plocha žaber, byly dosaženy živé hmotnosti studovaných jedinců lína obecného a získaná vypočtená data plochy žaber byla korelována s přímo měřenými GIA studovaných jedinců.

Korelační analýzou byly hodnoceny vztahy mezi úrovní ploidie, pohlavím, živou hmotností, hmotností žaber, BIA a GIA. Korelace s $r \geq 0,6$ byly hodnoceny jako silné. Analýza rozptylu (ANOVA) a Tukey Multiple Range Test byly použity k odhadu vlivu ploidní úrovně a pohlaví na studované proměnné na hladině významnosti $P < 0,05$.

EXPERIMENT 2

Po předchozí aklimatizaci bylo celkem jedenáct sedmiletých MeiG ($825,37 \pm 119,57$ g), čtrnáct 2n ($977,36 \pm 326,48$ g; 8 samic a 6 samců) a šestnáct 3n línů ($999,88 \pm 464,93$ g; 8 samic a 8 samců) individuálně vystaveno působení anestetika v nádrži s 2-fenoxyetanolom (Merck Co., ČR) naředěným ve 40 l vody z líhne při teplotě $8,8^\circ\text{C}$. Obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě byl $12,1 \pm 0,15$ mg $\text{O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$. Po předběžném testu byla koncentrace anestetika ve vodě upravena na $1,0$ ml.l⁻¹. Čas byl sledován od vložení ryby do lázně do doby dosažení fáze 3 anestézie – celkové úplné znecitlivění (celková ztráta reflexů, ryba leží na dně nádrže, nereaguje na manipulaci; Thienpoint a Niemegeers, 1965). Ryby byly ponechány v anestetické koupeli do 10 min, jak doporučuje Weyl a kol. (1996). Anestetizované ryby byly zváženy a vypuštěny do průtočné nádrže s čerstvou vodou bez anestetika.

Potenciální vlivy úrovně ploidie, pohlaví a živé hmotnosti na dobu dosažení fáze 3 anestézie byly stanoveny korelační analýzou a analýzou rozptylu (ANOVA, Tukey Multiple Range Test) na stejné hladině významnosti jako v experimentu 1.

VÝSLEDKY

EXPERIMENT 1

Data vybraných biometrických ukazatelů (živá hmotnost, hmotnost žaber, BIA, GIA; prům. \pm SD) adultních 2n a 3n jedinců lína obecného jsou uvedena v tab. 1. Analýzou rozptylu nebyl shledán vliv ploidní úrovně a pohlaví na tyto ukazatele ($P > 0,05$).

Žábry studovaných 2n a 3n línů se makroskopickým posouzením nelišily a vykazovaly normální morfologii. Nebyly zjištěny žádné deformity žaber.

Plocha žaber vypočtená z regresní rovnice na základě údajů z databáze FishBase vysoce korelovala ($r = 0,95$; $R^2 = 0,89$) s přímo měřenou GIA jedinců v této studii.

U 2n jedinců bez rozlišení pohlaví byly nalezeny vysoké korelace mezi sledovanými biometrickými ukazateli (tab. 2), nejvyšší korelace byla zjištěna mezi živou hmotností a BIA ($r = 0,99$; $R^2 = 0,98$), a to i pro 2n samice ($r = 0,99$; $R^2 = 0,98$) a 2n samce ($r = 0,99$; $R^2 = 0,99$).

U 3n jedinců bez rozlišení pohlaví byly rovněž shledány vysoké korelace mezi sledovanými biometrickými ukazateli (tab. 2), nejvyšší korelace byla zjištěna mezi živou hmotností a BIA, živou hmotností a GIA (vše $r = 0,99$; $R^2 = 0,99$) a mezi BIA a GIA ($r = 0,99$; $R^2 = 0,91$). U 3n samic byly rovněž nejvyšší korelace zjištěny mezi živou hmotností a BIA, živou hmotností a GIA a mezi BIA a GIA (vše $r = 0,99$; $R^2 = 0,99$). U 3n samců byly shledány nejnižší korelace mezi sledovanými biometrickými ukazateli vůbec, nejvyšší z nich byla korelace mezi živou hmotností a BIA ($r = 0,93$; $R^2 = 0,86$).

Tab. 1. Živá hmotnost, hmotnost žaber, plocha snímku trupu a plocha snímku žaber (prům. ± SD) adultních diploidních (2n) a triploidních (3n) jedinců lína obecného (*Tinca tinca*) z experimentu 1, pro celé skupiny a skupiny rozdělené podle pohlaví (samice F; samci M). Data se stejným abecedním indexem (velkým písmenem pro vliv ploidie, malým písmenem pro vliv ploidie a pohlaví) se neliší na hladině významnosti $p < 0,05$.

Tab. 1. Body weight, gill weight, body image area and gill image area (mean ± SD) of adult diploid (2n) and triploid (3n) tench, *Tinca tinca* L. of experiment 1, for both the entire and sexed populations (females, F; males, M). Data with common alphabet superscript (capital for effect of ploidy, lower case letter for effect of ploidy and sex) do not differ significantly (ANOVA, $p < 0.05$).

Skupina	Živá hmotnost (g)	Hmotnost žaber (g)	Plocha snímku trupu (mm ²)	Plocha snímku žaber (mm ²)
Všichni 2n	200,75 ± 90,85A	3,26 ± 1,38A	9244,73 ± 2745,73A	1026,29 ± 307,64A
Všichni 3n	187,00 ± 99,00A	3,39 ± 1,44A	9149,97 ± 3455,77A	1094,58 ± 340,20A
2n F	216,00 ± 92,45a	3,48 ± 1,37a	9685,28 ± 2771,73a	1077,01 ± 316,43a
2n M	155,00 ± 67,68a	2,60 ± 1,19a	7923,05 ± 2186,22a	874,14 ± 217,52a
3n F	271,25 ± 111,38a	4,65 ± 1,54a	12078,12 ± 3896,19a	1379,38 ± 382,14a
3n M	180,83 ± 13,36a	2,55 ± 0,34a	7197,88 ± 506,88a	904,71 ± 73,58a

Tab. 2. Korelace mezi živou hmotností, hmotností žaber, plochou snímku trupu a plochou snímku žaber adultních diploidních (2n) a triploidních (3n) jedinců lína obecného (*Tinca tinca*) z experimentu 1. Korelační koeficienty (r) byly vypočteny pro celé skupiny a skupiny rozdělené podle pohlaví (samice F; samci M).

Tab. 2. Correlations among body weight, gill weight, body image area and gill image area of adult diploid (2n) and triploid (3n) tench, *Tinca tinca* L. of experiment 1. Correlation coefficients (r) were computed for both the entire and sexed populations (females, F; males, M).

Index	Skupina	Živá hmotnost (g)	Hmotnost žaber (g)	Plocha snímku trupu (mm ²)
Plocha snímku žaber (mm ²)	všichni 2n	0,94	0,95	0,95
	všichni 3n	0,99	0,98	0,99
	2n F	0,93	0,96	0,95
	2n M	0,97	0,91	0,98
	3n F	0,99	0,98	0,99
	3n M	0,85	0,61	0,83
Plocha snímku trupu (mm ²)	všichni 2n	0,99	0,98	
	všichni 3n	0,99	0,98	
	2n F	0,99	0,98	
	2n M	0,99	0,97	
	3n F	0,99	0,99	
	3n M	0,93	0,60	
Hmotnost žaber (g)	všichni 2n	0,97		
	všichni 3n	0,98		
	2n F	0,97		
	2n M	0,98		
	3n F	0,98		
	3n M	0,69		

EXPERIMENT 2

Data o rybách použitých v experimentu 2 jsou uvedena v tab. 3. Analýzou rozptylu byl rozpoznán významný vliv úrovně ploidie a pohlaví na živou hmotnost, která dosáhla nejnižších hodnot u 3n samců ($558,75 \pm 73,60$ g) a nejvyšších hodnot u 3n samic ($1\,472,25 \pm 168,50$ g).

Čas potřebný k dosažení fáze 3 anestézie v koupeli 1 ml.l^{-1} 2-fenoxyetanolu při $8,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ se u všech ryb pohyboval od 2,33 do 9,50 min (tab. 3) kromě jednoho 3n samce, který nebyl dostatečně anestetizován ani po dosažení maximálního limitu 10 min v koupeli, a proto byl ze souboru vyrazen. Analýzou rozptylu nebyl zjištěn významný vliv pohlaví ani skladby genomu (MeiG, 2n, 3n) na dobu dosažení fáze 3 anestézie.

Korelace mezi živou hmotností a dobou dosažení fáze 3 anestézie byly u všech 3 skupin nízké. Jediná kladná korelace byla nalezena u MeiG ($r = 0,25$; $R^2 = 0,06$), zatímco pro 2n a 3n byly korelace negativní ($r = -0,37$; $R^2 = 0,14$ a $r = -0,18$; $R^2 = 0,03$). Při odhadu vlivu pohlaví uvnitř skupin o různé ploidií na dobu dosažení fáze 3 anestézie byla nejvyšší pozitivní korelace nalezena pro 3n samce ($r = 0,81$; $R^2 = 0,66$), zatímco u samic byla korelace velmi slabá a negativní ($r = -0,01$ až $-0,04$ s R^2 v řádu 10⁻⁴).

Tab. 3. Živá hmotnost a doba dosažení fáze 3 anestézie adultních diploidních meiotických gynogenetických (MeiG), amfimiktických diploidních (2n) a triploidních (3n) jedinců lina obecného (*Tinca tinca*) z experimentu 2 pro celé skupiny a skupiny rozříděné podle pohlaví (samice F; samci M). Data se stejným abecedním indexem (velkým písmenem pro vliv ploidie, malým písmenem pro vliv ploidie a pohlaví) se neliší na hladině významnosti $p < 0,05$.

Tab. 3. Body weight and time of gaining the phase 3 of anaesthesia in adult diploid meiotic gynogenetic (MeiG), amphimictic diploid (2n) and induced triploid (3n) tench, *Tinca tinca* L. of experiment 2 for both the entire and sexed populations (females, F; males, M). Data with common alphabet superscript (capital for effect of ploidy, lower case letter for effect of ploidy and sex) do not differ significantly (ANOVA, $p < 0,05$).

Skupina	Živá hmotnost (g)	Doba dosažení fáze 3 anestézie (min)
Všichni 2n	$977,36 \pm 326,48^A$	$5,12 \pm 1,60^A$
Všichni 3n	$999,88 \pm 464,93^A$	$4,43 \pm 1,58^A$
MeiG	$825,37 \pm 119,57^{A,b}$	$4,53 \pm 2,18^{A,a}$
2n F	$1195,50 \pm 266,98^C$	$4,55 \pm 0,80^a$
2n M	$686,50 \pm 75,02^{ab}$	$5,88 \pm 2,02^a$
3n F	$1472,25 \pm 168,50^D$	$4,05 \pm 1,25^a$
3n M	$558,75 \pm 73,60^D$	$4,87 \pm 1,80^a$
Všechny F	$1126,71 \pm 330,01^b$	$4,39 \pm 1,63^a$
Všichni M	$613,50 \pm 97,25^a$	$5,67 \pm 2,25^a$

DISKUSE

Studie měření povrchu žaberního epitelu ryb počínaje Rieszem (1881) byly popsány řadou autorů, jejichž práce shrnuli a kriticky zhodnotili např. Palzenberger a Pohla (1992), Caltran a Silan (1996) a Hartl a kol. (2000). Pracnost a časová náročnost těchto studií byla příčinou nápadu využít, podobně jako Sadler a kol. (2001), zjednodušeného postupu měření rozměrů žaberních oblouků s žaberními lístky. Vysoká korelace publikovaných dat plochy žaber u lína obecného, která by měla představovat celkovou plochu povrchu žaberního epitelu k přímo měřené GIA v této práci, se zdá podporovat tuto hypotézu.

V rozporu se sledováními Sadlera a kol. (2001) u lososa obecného 3n líni v experimentu 1 nevykazovali žádné zjevné makroskopické známky syndromu deformity žaberních lístků ani redukci plochy povrchu žaber ve srovnání s diploidními sourozenci.

Žádní 2n a 3n líni v experimentu 1, ať již netřídění nebo třídění podle pohlaví, se od sebe nelišili ve sledovaných biometrických ukazatelích, nebyl tedy prokázán vliv ploidie ani pohlaví na tyto ukazatele a soubor sledovaných jedinců mohl být považován za homogenní. To bylo v rozporu s početnými předchozími nálezy Flajšhans a kol. (1993a, b; 2004), Wanga a kol. (2002) a Buchtové a kol. (2003a, b), kteří popsali zvýšený růst 3n línů, jež se nejvíce manifestoval u 3n samic. Potlačení růstového potenciálu 3n ryb v experimentu 1 odpovídá potravní kompetici v polykulturní obsádce (Gela, os. sděl.) v souladu se závěry Sedláčka (1999). U 2n a 3n línů, ať již netříděných nebo tříděných podle pohlaví, se živou hmotností vysoce korelovaly všechny ukazatele, které mohly být spojovány se vstřebáváním anestetika, jako GIA, hmotnost žaber a též BIA, neboť vstřebávání anestetika pokožkou nelze zcela vyloučit (Ferreira a kol., 1984). Tato zjištění byla v souladu s nálezy Byczkowské-Smyk (1959), Hughese (1966, 1972), Hughese a Morgana (1973), i když tito autoři nespécifikovali ploidní úroveň ryb. To by znamenalo, že vztah mezi biometrickými ukazateli žaber a anestézií u lína obecného lze stanovit nepřímou pomocí živé hmotnosti bez nutnosti zabití pokusné ryby pro pitvu a vyšetření žaber. Z tohoto důvodu byla vybrána živá hmotnost s nejvyšší korelací k biometrickým ukazatelům žaber jako reprezentativní ukazatel pro experiment 2, v němž byly pokusné ryby sledovány dlouhodobě (Flajšhans a kol., 2010).

Skupiny jedinců MeiG, 2n a 3n v experimentu 2 netříděné podle pohlaví se od sebe živou hmotností nelišily. Vliv ploidie a pohlaví se projevil nejvyšší živou hmotností 3n samic následovaných 2n samicemi a nejnižší živou hmotností samců obou ploidních úrovní, v souladu s předchozími zjištěními, které shrnuli na základě dlouhodobých sledování a dílčích publikací Flajšhans a kol. (2010) a Gela a kol. (2010). Tito autoři v předchozích letech dlouhodobého sledování populace 2n a 3n línů empiricky zjistili určitou odlišnost mezi nimi v době potřebné k dosažení fáze 3 anestézie. Přelovení ryb při dlouhodobém sledování bylo prováděno vždy na jaře a na podzim při nižší teplotě vody a tomu odpovídaly i teplotní podmínky v experimentu 2. Naproti tomu žádný z autorů, kteří se zabývali anestézií u lína obecného (Osanz Castan a kol., 1993; Kouřil a kol., 2001; Myszkowski a kol., 2003 a Hamáčková a kol., 2004), nepracoval s teplotami vody pod 10 °C. To může být důvodem, proč koncentrace 0,6 ml.l⁻¹ 2-fenoxyetanolu, doporučená pro teploty kolem 20 °C, v tomto pokusu anestézii nevyvolala a musela být zvýšena na 1,0 ml.l⁻¹ 2-fenoxyetanolu, aby bezpečně vyvolala nástup fáze 3 anestézie do 10 min, jak doporučil Weyl a kol. (1996).

Srovnání průměrné doby potřebné k dosažení fáze 3 anestézie pro všechny tři sledované skupiny lína obecného naznačovalo, že 3n líni následování MeiG by mohli být anestetizováni dříve než 2n líni a že samice se zdály být anestetizovány dříve než samci bez ohledu na úroveň ploidie. Analýza rozptylu však významnost těchto rozdílů nepotvrdila. Odezva na anestézii se

v této studii ukázala jako vysoce individuální, jak dokazují směrodatné odchylky lišící se od 31 % do 48 % průměru skupiny netříděné podle pohlaví a od 18 % do 48 % průměru skupiny tříděné podle pohlaví.

V celých skupinách MeiG, 3n a 2n byl vztah živé hmotnosti zastupující biometrické ukazatele, které lze spojovat se vstřebáváním anestetik, k době dosažení fáze 3 anestézie vyjádřený vzájemnou korelací kladný a slabý pro diploidní MeiG líny, zatímco pro ostatní skupiny byl negativní a velmi slabý.

Po roztřídění skupin dle pohlaví 3n samci vykazovali nejnížší živou hmotnost, která však nejsilněji korelovala s dobou potřebnou k dosažení fáze 3 anestézie; ve všech ostatních skupinách byly tyto korelace negativní a velmi slabé. Tyto první výsledky ukazují, že vlivy sledovaných ukazatelů na vyvolání anestézie u lína obecného nemusí být rozhodující, a bude nutné brát v úvahu i další fyziologické proměnné, jako například respirační frekvenci aj.

SOUHRN

Sledování biometrických charakteristik ve vztahu ke vstřebávání anestetik u lína obecného a rychlost nástupu fáze 3 anestézie vyvolané 2-fenoxyetanolem byly provedeny u jedinců amfikytické diploidní (2n), indukovaně triploidní (3n) a u diploidní meiotické gynogenetické populace (MeiG). Plocha žaber zjednodušená na plochu žaberních lístků zevních půlžaber ze snímků celých žaberních oblouků každého jedince vysoce korelovala ($r = 0,95$) s publikovanými údaji o úplné ploše žaber u tohoto druhu. Živá hmotnost u 2n a 3n línů vysoce korelovala s hmotností žaber, plochou obrazu žaber a s plochou obrazu těla bez ohledu na pohlaví, což umožnilo odhadnout vztahy mezi parametry žaber a anestézií u lína obecného nepřímo, bez nutnosti zabít rybu pro pitvu žaber. Potenciální vlivy ploidie a pohlaví na anestézii vyvolanou koupelí v 1 ml.l⁻¹ 2-fenoxyetanolu při 8,8 °C po dobu 10 min byly hodnoceny v poloprovozních podmínkách rybí líhně. Průměrná doba (\pm SD) potřebná k dosažení fáze 3 anestézie (úplná ztráta reflexů, poloha na boku, nulová odezva na manipulaci) se u jednotlivých skupin statisticky významně nelišila ani v závislosti na konstituci genomu, ani podle pohlaví a odezva na působení anestetika se ukázala jako vysoce individuální se směrodatnými odchylkami od 31 % do 48 % průměru celých skupin a od 18 % do 48 % průměru skupin podle pohlaví. Korelace mezi živou hmotností a dobou dosažení fáze 3 anestézie byly u všech tří skupin nízké. Při podrobnějším hodnocení odezvy na anestézii bude nutné brát v úvahu i další fyziologické proměnné jako například respirační frekvenci aj.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za podpory projektů CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024, GAČR 524/07/0188 a GAJU 047/2010/Z.

LITERATURA

- Arnold, G.P., Davenport, J., Maoiléidigh, N.Ó., Thorsteinsson, V., 2002. Improvements of tagging methods for stock assessment and research in fisheries. CATAG FAIR CT.96.1394 final report, Marine Research Inst., Reykjavík, Iceland, 183 pp.
- Buchtová, H., Svobodová, Z., Flajšhans, M., Vorlová, L., 2003a. Analysis of growth, weight and relevant indices of diploid and triploid population of tench *Tinca tinca* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*, 34: 719–726.
- Buchtová, H., Svobodová, Z., Flajšhans, M., Vorlová, L., 2003b. Analysis of slaughtering value of diploid and triploid population of tench (*Tinca tinca*, Linnaeus 1758). *Czech Journal of Animal Science*, 48: 285–294.
- Byczkowska – Smyk, W., 1959. The respiratory surface of the gills of teleosts. Part III. The respiratory surface of the gills in the tench (*Tinca tinca* L.), the silver bream (*Blicca bjoerkna* L.) and the chondrostoma (*Chondrostoma nasus* L.). *Acta Biol. Cracov.*, 1: 83–97.
- Caltran, H., Silan, P., 1996. Gill filaments of *Liza ramada*, a biotope for ectoparasites: surface area acquisition using image analysis and growth models. *J. Fish Biol.*, 49: 1267–1279.
- Ferreira, J.T., Schoonbee, H.J., Smit, G.L., 1984. The uptake of the anaesthetic benzocaine hydrochloride by the gills and the skin of 3 freshwater fish species. *J. Fish Biol.*, 25, 1: 35–41.
- Flajšhans, M., Linhart, O., Kvasnička, P., 1993a. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): Induced triploidy and tetraploidy and first performance data. *Aquaculture*, 113: 301–312.
- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Ráb, P., 1993b. Genetic studies in tench (*Tinca tinca* L.). A high incidence of spontaneous triploidy. *Aquaculture*, 110: 243–248.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Gela, D., Piačková, V., 2004. The first results on interactions among diploid, gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. under communal testing. *Aquaculture International* 12: 103–118.
- Flajšhans, M., Piačková, V., 2006. Difference in blood and water diffusion distance in gill lamellae of diploid and triploid tench *Tinca tinca* (L.). *J. Fish Biol.*, 69: 1870–1873.
- Flajšhans, M., Gela, D., Kocour, M., Buchtová, H., Rodina, M., Pšenička, M., Kašpar, V., Piačková, V., Sudová, E., Linhart, O., 2010. A review on the potential of triploid tench for aquaculture. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 20: 317–329.
- Gela, D., Kocour, M., Flajšhans, M., Linhart, O., Rodina, M., 2010. Comparison of performance of genome manipulated and standard tench, *Tinca tinca* (L.), groups under pond management conditions. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 20: 301–306.
- Hamáčková, J., Lepičová, A., Kozák, P., Stupka, Z., Kouřil, J., Lepič, P., 2004. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca* L.) related to water temperature. *Vet. Med.-Czech*, 49(12): 467–472.
- Hartl, M.G.J., Hutchinson, S., Hawkins, L.E., Eledjam, M., 2000. The biometry of gills of 0-group European flounder. *J. Fish Biol.*, 57: 1037–1046.
- Hughes, G.M., 1966. The dimension of fish gills in relation to their function.. *J. Exp. Biol.*, 45: 177–195.
- Hughes, G.M., 1972. Morphometrics of fish gills. *Respir. Physiol.*, 14 (1): 25.
- Hughes, G.M., Morgan, M., 1973. The structure of fish gills in relation to their respiratory function. *Biol. Rev.*, 48: 419–475.
- Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L., Novotný, L., 2007. Anestetika pro ryby. *Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany*, č. 77, 19 s.

- Kouřil, J., Stuka, Z., Hamáčková, J., Lepičová, A., 2001. Předběžné výsledky účinku tří anestetik na různé druhy ryb. In: J. Kolářová (Editor), Ochrana zdraví ryb. VÚRH JU, Vodňany, ČR, s. 131–136.
- Muir, B.S., 1969. Gill dimensions as a function of fish size. J. Fish. Res. Bd. Canada, 26: 165–170.
- Myszkowski, L., Kaminski, R., Wolnicki, J., 2003. Response of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to the anaesthetic 2-phenoxyethanol. J. Appl. Ichthyol., 19(3): 142–145.
- Osanz Castan, E., Esteban Alonso, J., del Nino Jesus, A., Josa Serrano, A., Espinosa Velazquez, E., 1993. Study on quinaldine and 2-phenoxyethanol anaesthetics: Age and species influence. In: A. Cervino, A. Landin, A. de Coó, A. Guerra, M. Torre (Editors), 4. Natl. Congr. on Aquaculture, Vilanova de Arousa, Spain, Sept. 21–24, 1993. Centro de Investigaciones Marinas, Pontevedra, Spain, pp. 737–742.
- Palzenberger, M., Pohla, H., 1992. Gill surface area of water – breathing freshwater fish. Rev. Fish. Biol. Fish., 2: 187–216.
- Pauly, D., 1981. The relationship between gill surface area and growth performance in fish: a generalization of von Bertalanffy's theory of growth. Meeresforschung, 28: 251–282.
- Piačková, V., Flajšhans, M., 2006. Long-term examination of health conditions in monoculture of communally tested amphimictic diploid, diploid gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. Aquacult. Int., 14(1–2): 43–59.
- Price, J.W., 1931. Growth and gill development in the small mouthed black bass, *Micropterus dolomieu*, Lacepede. Stud. State Univ. Ohio, 4: 3–46.
- Riess, J.A., 1881. Der Bau der Kiemenblätter bei den Knochenfischen. Archiv für Naturgeschichte, 47: 518–550.
- Ross, L.G., Ross, B., 1983. Principles and practice of fish anaesthesia. Proceedings of the Association of Veterinary Anaesthesiologists of Great Britain and Ireland, 11: 154–189.
- Sadler, J., Pankhurst, P. M., King, H.R., 2001. High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 198 (3–4): 369–386.
- Sedláček, P., 1999. Studie vybraných morfologických, fyziologických a užitkových vlastností triploidních línů. Diplomová práce, MZLU Brno, 81 s.
- Steffens, W., 1995. The tench (*Tinca tinca* L.), a neglected pond fish species. Pol. Arch. Hydrobiol., 42: 161–180.
- Thienpoint, D., Niemegeers, C.J.E., 1965. R 7464 – a new potent anaesthetic in fish. International Zoo Yearbook, 5: 202–205.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., 2004. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. Acta Vet. Brno, 73: 247–252.
- Wang, J., Min, W., Linhart, O., Guan, M., 2002. Report on the experiment about gynogenesis and triploidy of tench *Tinca tinca* (L) in China. Proc. Int. Scientific Conference XX. Genetic Days, 12th – 13th September 2002, Brno, Mendelian University of Agriculture and Forestry, pp. 299–300.
- Weyl, O., Kaiser, H., Hecht, T., 1996. On the efficacy and mode of action of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for goldfish, *Carassius auratus* (L.), at different temperatures and concentrations. Aquacult. Res., 27: 757–764.

KRYOKONZERVACE SPERMIÍ KAPRA OBECNÉHO (CYPRINUS CARPIO L.) PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH ZMRAZOVÁNÍ

CRYOPRESERVATION OF COMMON CARP (CYPRINUS CARPIO L.) SPERM UNDER DIFFERENT TEMPERATURES

D. SOCHOROVÁ¹, S. BORYSHPOLETS²

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, DenisaSochorova@seznam.cz

²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, sboryshpolets@frov.jcu.cz

ABSTRACT

Influence of temperature and freezing rate on sperm survival after thawing were objective of this study. Motility (percentage of moving sperm), velocity and duration of sperm movement before and after process of freezing were observed in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. Solutions recommended by Kopeika (1986) and Kurokura (1984) were used as a cryoprotective media. Sperm freezing was performed in 0.5 ml straws layed in styrofoam box 3, 6 and 9 cm above the level of liquid nitrogen for 20 min. Temperature changes during process of freezing were recorded inside and outside straws using thermocouple thermometer with miniature probes T type (cuprum – constantan). At a first level (corresponding to height 3 cm above level of liquid nitrogen) we recorded lowest temperature -170 °C, on a second (6 cm) -110 °C and on a third level (9 cm) -70 °C. Best results of sperm motility after freezing – thawing were achieved using Kopeika solution and freezing at first level (3 cm above liquid nitrogen) where we reported 27 % of motile spermatozoa and velocity of movement 118 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Freezing by Kurokura solution resulted in motility 14 % and velocity 76 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ whereas motility of native sperm was 95 % and velocity 136 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Klíčová slova: kryokonzervace, sperma, motilita, kapr obecný, *Cyprinus carpio*

Key words: cryopreservation, sperm, motility, common carp, *Cyprinus carpio*

ÚVOD

SPERMA RYB

Sperma ryb vypadá jako mléčná až smetanová tekutina, u některých druhů (okounek pstruhový, sumec velký) je to opaleskující tekutina vznikající v cystách mezi Sertoliho buňkami lalůček varlat. Ke konci spermiogeneze cysty praskají a spermie se uvolňují do lalůček varlate, odkud je sperma při výtěru odváděno chámovody na povrch urogenitální papily (Linhart a Pokorný, 1984).

Sperma tvoří spermie a spermiální plazma. Spermie se skládá z hlavičky, která obsahuje DNA, ze spojovacího oddílu, který spojuje hlavičku s bičíkem, ve kterém jsou mitochondrie, a z bičíku, jehož podstatu tvoří systém mikrotubulů uspořádaných do tzv. struktury 9+2 a který

slouží k pohybu spermie. Celá spermie je kryta cytoplazmatickou membránou. Spermialní plazma tvoří prostředí pro spermie, obsahuje mimo vody bílkoviny, cukry a anorganické látky, především ve formě iontů (Linhart a kol, 1991). Spermie ryb jsou v pohlavním traktu a při odběru nepohyblivé (Lahnsteiner, 1995). Spermie sladkovodních ryb se začínají pohybovat po smísení s vodou (změna osmotického tlaku nebo koncentrace některých iontů v okolí spermie) (Cosson, 2008).

KRYOKONZERVACE

Kryokonzervace je metoda, která uchovává živé buňky a tkáně při velmi nízkých teplotách (nejčastěji pomocí tekutého dusíku nebo suchého ledu) a při použití ochranných látek – tzv. kryoprotektantů. Pro úspěšnou kryokonzervaci je důležité zachovat pohyblivost a schopnost oplození buněk.

V této metodě dochází k tvorbě intracelulárních a extracelulárních krystalů vody (záleží na velikosti a uspořádání krystalů vody), následně dochází ke kolísání iontové koncentrace (intracelulární i extracelulární), které vedou k lokálnímu narůstání koncentrace elektrolytů a případným narušení struktury membrány.

K zamezení těmito vlivům na buněčnou membránu a bičík spermie jsou aplikovány ochranné látky – KRYOPROTEKTORY (kryoprotektanty). Nejpoužívanější kryoprotektory jsou GLYCEROL, DMSO, METANOL, PROPANDIOL, ETHYLENGLYCOL a další látky. Kryoprotektory omezují tvorbu, velikost a uspořádání (polarizaci) krystalů ledu (intracelulárně i extracelulárně), chrání membránu před strukturálními změnami a lokálním působením zvýšené koncentrace iontů.

Ve většině prací věnované kryokonzervaci můžeme vysledovat následující kroky:

- Výběr a příprava vhodných ryb – hlediskem výběru je jednak známý původ – plemeno, chovná skupina, dále aktuální zdravotní stav a kondice. Příprava spočívá především v úpravě teplotního režimu a hormonální stimulaci mlíčáků (Rodina, 2006).
- Odběr spermatu – je specifický podle druhu, cílem je získat nekontaminované sperma, popř. eliminovat účinek kontaminantů, hlavně moči, použitím vhodných postupů a prostředků (Lahnsteiner, 1995, Rodina, 2004).
- Kontrola kvality spermatu – zahrnuje makroskopickou (barva, konzistence příměsí) a mikroskopickou kontrolu (motilita, koncentrace) (Linhart, 1984).
- Vlastní zmrazení – je postupné zchlazování dávek obvykle pomocí tekutého dusíku v programovatelném zmrazovacím přístroji (podle zvoleného zmrazovacího programu), nebo pouze v parách nad hladinou tekutého dusíku (Kopeika, 1986).
- Uchování zmrazených dávek – se provádí v kontejnerech pod hladinou tekutého dusíku při teplotě -196 °C (Kopeika, 1986).
- Rozmrazení dávek zmrazeného spermatu se provádí ve vodní lázni teploty 37–40 °C, doba potřebná k rozmrazení dávky se liší podle formy a objemu dávky a pohybuje se od 10 do 100 s. Bezprostředně po rozmrazení se sperma používá k oplození jiker (Kopeika, 2008).

Naším cílem bylo:

- zmrazení spermatu kapra v parách v různých hladinách nad povrchem tekutého dusíku,
- registrace průběhu teplot v průběhu zmrazování (uvnitř zmrazovacího boxu a uvnitř zmrazené dávky),
- porovnání dvou kryoprotektivních médií.

MATERIÁL A METODIKA

V této studii jsou zahrnuty výsledky ze dvou experimentů: První experiment byl prováděn v roce 2009 na šesti mlíčácích kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) (kusová hmotnost 1–1,5 kg, stáří 3 roky). Jeho náplní bylo zaznamenat průběh teplot během zmrazování spermatu v polystyrénovém termoboxu ve třech různých hladinách nad povrchem tekutého dusíku a jeho vliv na výsledek zmrazování. Jako ukazatel úspěšnosti byl použit procentický podíl pohybujících se buněk – motilita spermií po rozmrazení.

Druhou částí experimentů, konaných v roce 2010, byl srovnávací pokus na 7 mlíčácích, kdy byly zaznamenávány hodnoty: motility, rychlosti a doby pohybu před a po zmrazení ve dvou různých kryoprotektivních médiích.

CHOV RYB A ODBĚR SPERMATU

Ryby byly přechovávány v manipulačních bazénech rybí líhně Genetického rybářského centra FROV JU Vodňany při teplotě 22–23 °C. Ryby byly individuálně označeny implantovaným čipem. Spermiace byla indukována injekcí suspenze kapří hypofýzy v dávce 1 mg.kg⁻¹ hmotnosti ryby, aplikovanou do dutiny tělní (pod prsní ploutev) 24 hodin před odběrem spermatu.

HODNOCENÍ POHYBLIVOSTI SPERMIÍ

Pro hodnocení pohyblivosti spermií byla použita mikroskopická metoda. Do kapky 50 µl aktivního média (voda z líhně) na podložním skle bylo na špičce preparační jehly přeneseno sperma a dokonale promícháno. Pohyb spermií byl sledován pod mikroskopem Olympus BX50 v tmavém poli s použitím stroboskopické lampy (Chadwick-Helmuth). Mikroskopický obraz byl snímán videokamerou (Sony SSC-DC50AP) a zaznamenáván na DVD (DVD recorder SONY DVO1000MD).

Pro vyhodnocení byl použit program micro Image 4.0. Tento postup využívá 5 po sobě jdoucích videosnímků záznamu mikroskopického obrazu pohybu spermií, jejichž složením v jeden se zachytí pohyb – trajektorie pohybu spermií. Živé spermie se označí barevně a mrtvé zůstanou bílé (Rodina a kol., 2008).

Sperma od mlíčáků bylo odebráno do stříkaček bez kontaminace vodou a močí.

Během všech pokusů se sperma udržovalo na ledu.

KRYOKONZERVACE SPERMATU

Ředění spermatu: Nativní sperma se ředilo jednotlivými kryoprotektivními médii:

Kopeika, 1986 (**Kop**): (59 mM NaCl, 0,68 mM KCl, 0,68 mM CaCl₂, 2,1 mM Mg₂SO₄, 27 mM NaHCO₃, 3,4 mM sacharóza, 69 mM D-manitol, 118 mM Tris-HCl, pH 8,1, 16% ethylenglycol, 10 % vaječného žloutku) v poměru 1 : 1.

Kurokura (modifikovaný), 1984 (**Kk**): 62 mM NaCl, 134 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 0,39 mM MgCl₂, 2,4 mM NaHCO₃, 16% DMSO v poměru 1 : 1.

Kryoprotektivní médium se přidávalo do spermatu pomalu po kapkách, za stálého míchání!

Zmrazení spermatu: naředěné sperma se plnilo do pejet (0,5 ml) a umísťovalo na rámeček („plovák“) odpovídající výšky – 3, 6 nebo 9 cm do polystyrénového boxu (60 × 40 × 35 cm) nad povrchem tekutého dusíku (sloupec dusíku 7 cm) po dobu 20 minut a následně se ponořilo do tekutého dusíku.

Rozmrazování spermatu: pejety se rozmrazovaly ve vodní lázni teploty 40 °C během 6 s.

REGISTRACE TEPLOT BĚHEM ZMRAZOVÁNÍ

Pro registraci teplot byl použit experimentální prototyp (vyroben na zakázku – firma Sladký) vícekanálového registračního teploměru pracujícího s termočlánky typu T (měď – konstantan), které bylo možno umístit do pejet nebo volně do zmrazovacího boxu. Frekvence záznamu teplot byla 1x za sekundu.

Zmrazování a záznam teplot jsme prováděli ve třech hladinách (3, 6, a 9 cm) nad povrchem tekutého dusíku. Měření bylo prováděno podle počtu kaprů (13).

STATISTICKÁ ANALÝZA

Pro statistické vyhodnocení byl použit statistický software Statistica 9.1, konkrétně analýza rozptylu ANOVA a Tukey test.

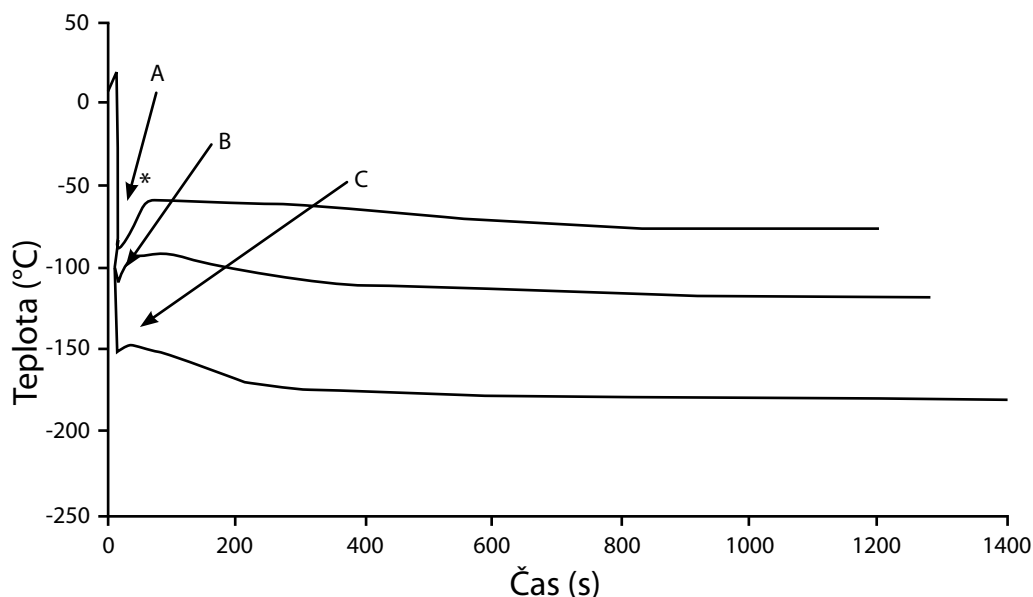
VÝSLEDKY

TEPLoty V RŮZNÝCH HLADINÁCH NAD TEKUTÝM DUSÍKEM (BEZ VZORKU)

Ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku, byla zaznamenána nejnižší teplota $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$, v 6 cm $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v 9 cm $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (obr. 1).

Obr. 1. Teploty uvnitř boxu během 20 minut v různých hladinách nad povrchem tekutého dusíku A-3 cm, B-6 cm, C-9 cm.

Fig. 1. Temperature inside the box in 20 minutes at various levels above the surface of liquid nitrogen (A-3 cm, B-6 cm, C-9 cm).



Teplota po uzavření boxu na všech třech hladinách klesala až na výše uvedené hodnoty. Výkyv teploty (obr. 1 *) na začátku cyklu může být způsobený rámečkem („plovákem“), zejména jeho tepelnou energií, případně uvolněním skupenského tepla a na něm vázané vlhkosti.

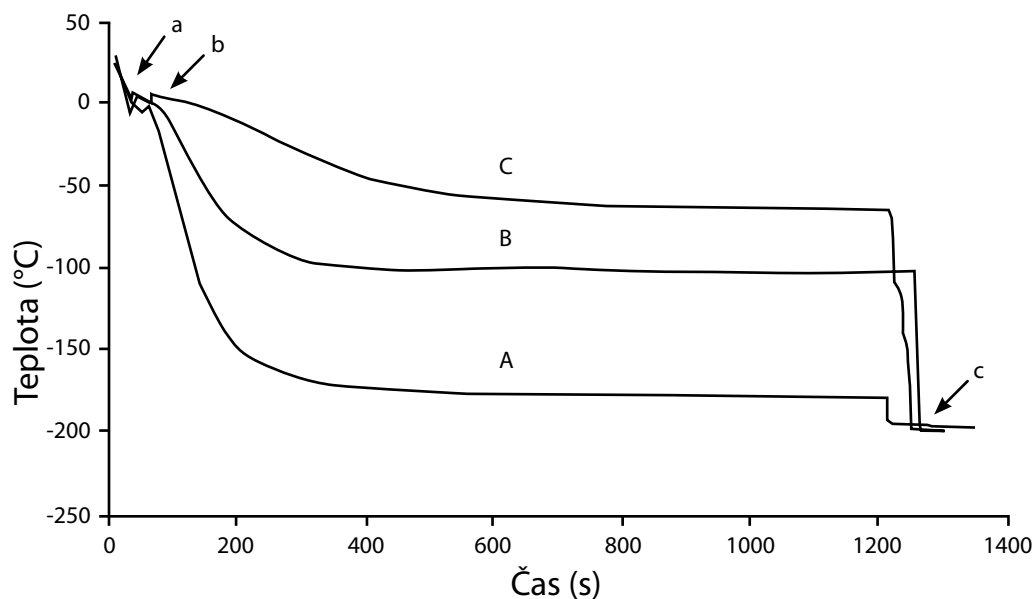
TEPLOTY V RŮZNÝCH HLADINÁCH VE VZORCÍCH SPERMATU

Průběhy teplot uvnitř zmrazovaného spermatu (pejetách) znázorňuje pro všechny 3 hladiny graf na obr. 2, který zachycuje i bod krystalizace ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ve 3 a 6 cm (nad povrchem tekutého dusíku) byl bod krystalizace ve stejném bodě (obr. 2 a), v 9 cm krystalizace nastala později (obr. 2 b), protože byla jiná rychlost ochlazování.

V závěru cyklu mrazení graf zaznamenává ponoření vzorku (pejet) do dusíku (obr. 2 c).

Obr. 2. Teploty uvnitř vzorku během 20 minut na různých hladinách nad povrchem tekutého dusíku (3–A cm, 6–B cm, 9–C cm).

Fig. 2. Temperatures inside the sample during 20 minutes at various levels above the surface of liquid nitrogen (3–A cm, 6–B cm, 9–C cm).



POHYBLIVOST SPERMII

Pohyblivost spermií šesti mlíčáků (2009) zmrazovaných v roztoku Kop ve třech zvolených hladinách nad povrchem tekutého dusíku uvádí tabulka 1.

Tab. 1. Pohyblivost spermií od šesti mlíčáků (2009) zmrazovaných v roztoku Kop v procentech před a po zmrazení.

Tab. 1. The motility of sperm from six males (2009) in percentage before and after cryopreservation.

Mlíčák	Nativní	Pohyblivost spermatu (%), (zvažovaná chyba měření ± 5 %)		
		3 cm nad povrchem tekutého dusíku	6 cm nad povrchem tekutého dusíku	9 cm nad povrchem tekutého dusíku
1	99	40	25	5
2	40	15	25	20
3	99	50	30	15
4	95	55	35	15
5	99	60	60	35
6	99	10	40	5
Průměr	88	37	36	17

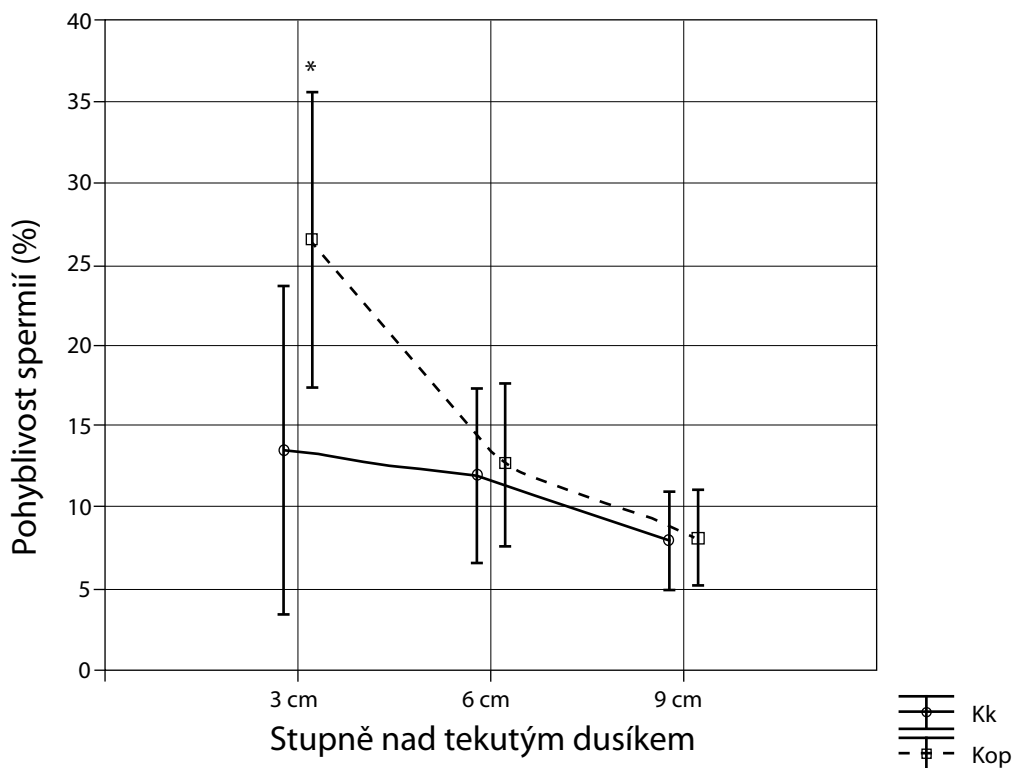
Nejvyšší motilita po rozmrazení byla pozorována: u mlíčáků 1, 3, 4, 5 u vzorků mrazených ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku, u mlíčáků 2, 6 v 6 cm. Celková průměrná motilita u rozmrazeného spermatu byla 37 % pro 3 cm, 36 % pro 6 cm a 17 % pro 9 cm.

Protože se zjištěné hodnoty motility pro jednotlivé hladiny zmrazování mezi sebou statisticky průkazně nelišily, rozhodli jsme se práci v následujícím experimentu (2010) rozšířit jak počtem použitých mlíčáků (k dosavadním 6 přidat dalších 7), tak počtem použitých kryoroztoků (Kop, Kk), to vše za stejných teplotních podmínek zmrazování, tedy hladinou nad povrchem tekutého dusíku. Sledované parametry byly rozšířeny o rychlost a dobu pohyblivosti spermií.

Procentický podíl pohyblivých spermií po rozmrazení a aktivaci pohybu (po smíchání s aktivačním roztokem nebo vodou) spermatu, zmrazeného na třech uvedených hladinách nad povrchem tekutého dusíku, ukazuje obr. 3. Ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku s kryoprotektivním médiem Kop byla dosažena pohyblivost 27 %, s kryoprotektivním médiem Kk 14 %. V 6 cm nad povrchem tekutého dusíku s kryoprotektivním médiem Kop byla dosažena pohyblivost 13 %, s kryoprotektivním médiem Kk byla pohyblivost téměř totožná. V 9 cm nad povrchem tekutého dusíku s kryoprotektivním médiem Kop byla dosažena pohyblivost 8 %, stejně tak jako u roztoku Kk. U nativního spermatu byla dosažena pohyblivost v průměru 88 %.

Obr. 3. Pohyblivost spermií (%) od 7 mlččků zmrazených ve 3, 6, 9 cm, nad tekutým dusíkem (experiment z roku 2010). Hvězdičkou označena statisticky odlišná hodnota. Použity kryoprotektivní média Kopeika (Kop) a Kurokura (Kk).

Fig. 3. The motility of sperm from 7 males (%) cryopreserved at 3 different levels above liquid nitrogen (3, 6, 9 cm), (2010). The asterisk shows statistically different values.



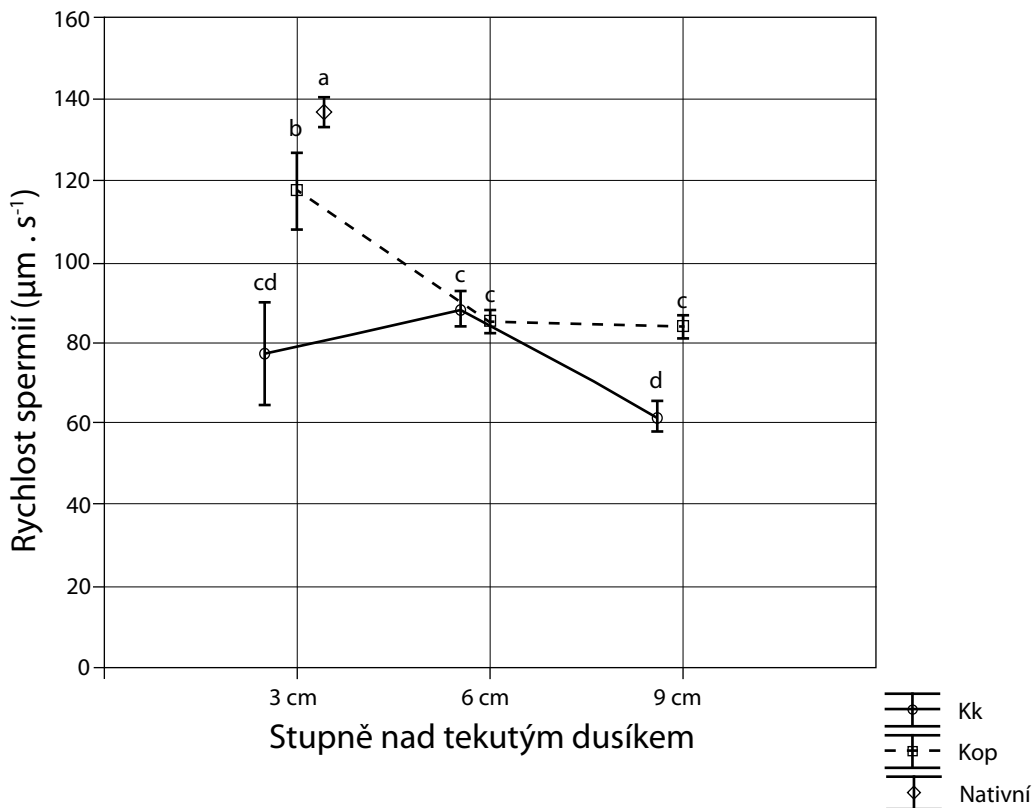
Nejvyšší pohyblivost spermií byla dosažena s kryoprotektivním médiem Kop ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku.

RYCHLOST POHYBU SPERMIÍ

Hodnoty rychlosti pohybu ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) nativních a rozmrazených spermií 15 s po aktivaci jsou patrné z grafu na obr. 4. Statisticky průkazně nejvyšší rychlost ($118 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) po zmrazení byla naměřena ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku za použití kryoprotektivního média Kop. Nativní sperma mělo nejvyšší rychlost ($138 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$).

Obr. 4. Rychlost spermií ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) od 7 mličáku zmrazených ve 3, 6, 9 cm, nad tekutým dusíkem. Hodnoty se stejným písmenem se průkazně statisticky neliší.

Fig. 4. Sperm velocity ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) in 7 males cryopreserved on 3, 6, 9 cm. The values with same letter are statistically different.



DOBA POHYBLIVOSTI SPERMIÍ

Po rozmrazení spermatu mrazeného na třech hladinách nad povrchem tekutého dusíku (3, 6, 9 cm) byla sledována doba pohyblivosti spermií (s) po jejich aktivaci pohybu (po smíchání s aktivčním roztokem nebo vodou). Doba pohyblivosti u rozmrazeného spermatu se statisticky průkazně nelišila mezi jednotlivými hladinami ani použitými roztoky. Ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku byla průměrná doba pohybu 53 s, v 6 cm nad povrchem tekutého dusíku 50 s a v 9 cm nad povrchem tekutého dusíku 48 s. Nativní sperma vykazovalo pohyb spermií ve stejných podmínkách 68 s a statisticky průkazně se tak lišilo od rozmrazeného spermatu.

DISKUSE

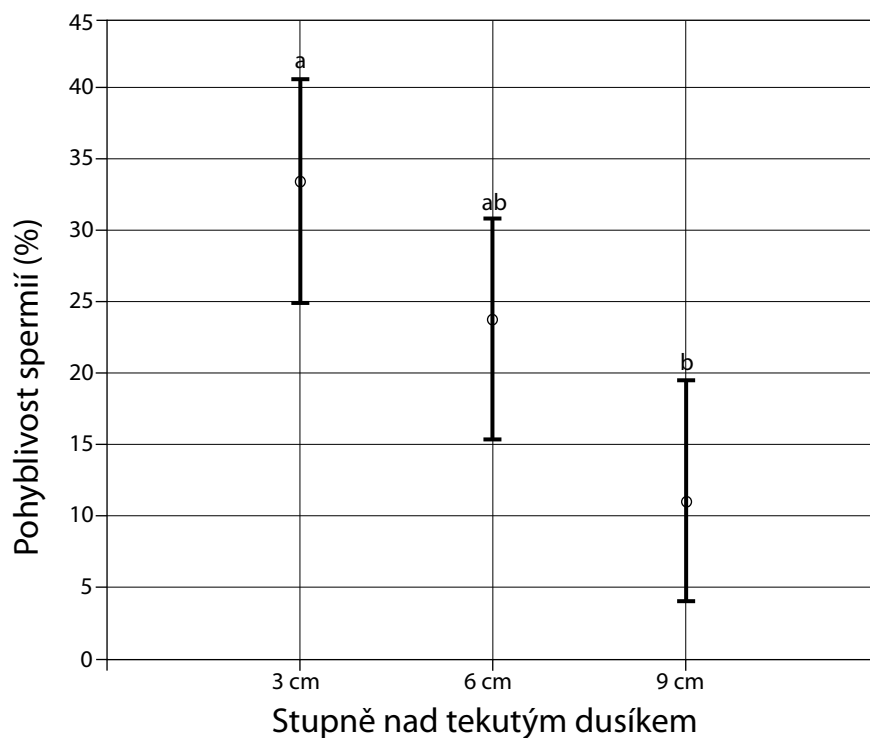
Snížení motility, rychlosti i zkrácení doby pohybu spermií po rozmrazení pozorované v našich experimentech, je známý jev způsobený procesem zmrazení a rozmrazení a je popisován různými autory (např. Lanhsteiner a kol., 2000, Rodina a kol., 2008). Tento jev je dán nejen kryopoškozením části buněk, ale i kryoaktivací nepoškozených a aktivací schopných buněk, jak uvádí Boryshpolets a kol., 2009. Vliv kryopoškození a kryoaktivace se projevuje nejen na snížení přeživších buněk či pozorovatelné motility, ale je patrný i na ostatních sledovaných parametrech, jako byla rychlost a doba pohybu.

Obecně lze říci, že se doporučované metodiky kryokonzervace spermií ryb liší nejen podle druhů, mnohdy příbuzných, ale i v rámci jednoho druhu v různých podmínkách (Lahnsteiner, 1995) (geografických, ekologických, chovných). Proto jsou různými autory doporučována různá média, která jsou v různých podmínkách různě úspěšná. Dvě kryomédia použitá v naší práci sledují tento fakt. V našich podmínkách kryoroztok Kopeika vykazoval lepší výsledky motility i rychlosti v téměř všech hladinách zmrazování (statisticky průkazné pouze u motility ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku).

Sumarizované výsledky motility spermií mrazených v roztoku Kop v experimentech 2009 a 2010 uvádí graf na obr. 5, ze kterého je patrný pokles motility se zvětšující hladinou nad povrchem dusíku, resp. se snižující se rychlostí mrazení.

Obr. 5. Pohyblivost spermií (%) zmrazených ve třech hladinách nad tekutým dusíkem ve 3, 6, 9 cm, u 13 mlíčáků. Hodnoty se stejným písmenem se průkazně statisticky neliší.

Fig. 5. The motility of sperm (%) from 13 males cryopreserved on 3 degrees above liquid nitrogen (3, 6, 9 cm). The values with same letter are statistically different.



ZÁVĚR

- Nejlepších výsledků bylo dosaženo ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku.
- Ze dvou porovnávaných kryoprotektivních médií (Kop x Kk) se jako úspěšnější v našich podmínkách jevil roztok Kopeika (Kop).
- Kombinace první hladiny s kryomédiem Kopeika vykazala větší rychlosti a přežití spermií po rozmrazení.
- Výsledek potvrdil v literatuře doporučené mrazení pejet ve výšce 3 cm nad povrchem tekutého dusíku, které se ukázalo jako nejefektivnější pro většinu mlíčáků s daným kryomédiem a objemem pejety i v našich experimentech.
- Získané termogramy mohou být použity k dalšímu výzkumu na programovatelných přístrojích a pro vypracování dalších metod zmrazení spermatu jiných druhů ryb.

SOUHRN

V této studii byl sledován vliv teploty a rychlosti mrazení a následného rozmrazení na životnost spermií. Motilita (procento pohyblivých spermií), rychlost a doba pohybu spermií byla sledována u kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) před a po zmrazení. Jako kryoprotektivní média byly použity roztoky doporučené Kopeikou (1986) a Kurokuro (1984).

Sperma bylo po naředění mrazeno v pejetách 0,5 ml v termoboxu 3, 6 a 9 cm nad povrchem tekutého dusíku po dobu 20 minut. Průběh teplot během zmrazování byl zaznamenáván uvnitř a vně pejet termočláňkovým teploměrem s miniaturními sondami typu T (měděno-konstantanové). Ve 3 cm nad povrchem tekutého dusíku, byla zaznamenána nejnižší teplota $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$, v 6 cm $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v 9 cm $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nejlepších výsledků po zmrazení a rozmrazení bylo dosaženo u roztoku Kopeika ve 3 cm nad tekutým dusíkem: 27 % pohyblivých spermií, rychlost pohybu $118\text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Při použití roztoku Kurokura byla dosažena motilita 14 % a rychlost pohybu $76\text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. U nativního spermatu byla motilita 95 % a rychlost $136\text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla v rámci projektu Letní rybářské školy a současně podpory projektů NAZV QH82119, CZ.1.05/2.1.00/01.0024 a GAJU 046/2010/Z.

Za metodickou pomoc při přípravě toho příspěvku děkujeme panu Ing. Marku Rodinovi, Ph.D.

LITERATURA

- Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Li, P., Hulák, M., Gela, D., Linhart, O., 2009. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology*, 59: 291–296.
- Cosson, J., 2008. The motility apparatus of fish spermatozoa. In: S.M.H. Alavi, J. Cosson, K. Coward (Editors), *Fish Spermatology*, Alfa Science, Oxford, UK, pp. 281–316.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A., 1995. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. *J. Fish Biol.*, 47, 492–508.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., Weismann, T., 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54: 1477–1498.
- Linhart, O., Pokorný, J., 1984. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. *Edice Metodik, VÚRH, Vodňany*, č. 14, 3 s.
- Linhart, O., Šlechta, V., Slavík, T., 1991. Fish sperm composition and biochemistry. *Bulletin of the Institut of Zoology, Academia Sinica, Monography*, 16, 288–311.
- Kopeika, E., Kopeika, J., 2008. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: S.M.H. Alavi, J. Cosson, K. Coward (Editors), *Fish Spermatology*, Alfa Science, Oxford, UK, pp. 347–396.
- Kopeika, E.F., 1986. Instruction on low temperature preservation of carp sperm, VNIPRKh, Moscow.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., Iwahashi, M., 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37: 267–273.
- Rodina, M., Policar, T., Linhart, O., Rougeot C., 2008. Sperm motility and fertilizing ability of frozen spermatozoa of males (XY) and neomales (XX) of perch (*Perca fluviatilis*). *J. Appl. Ichth.*, 24(4): 438–442.
- Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi, S.M.H., Hulák, M., Linhart, O., 2007. Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: sperm motility and hatching success of embryos. *Theriogenology*, 67: 931–940.
- Rodina, M., 2006. Kryokonzervace rybích spermií k ochraně genofondu. *Disertační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta*.
- 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.



VZÁJEMNÝ VZTAH MEZI PLOIDNÍ ÚROVNÍ, VELIKOSTÍ GENOMU A VELIKOSTÍ BUNĚK V SÉRII MODELŮ RYB S PLOIDNÍ ÚROVNÍ OD 2N DO 12N (PŘEHLED)

INTERRELATIONSHIP BETWEEN PLOIDY LEVEL, GENOME SIZE AND CELL SIZE IN A SERIES OF PLOIDY LEVEL MODELS FROM 2n TO 12n FISH (A REVIEW)

D. BYTYUTSKYY, M. FLAJŠHANS

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, 389 25 Vodňany, e-mail: bytyud00@frov.jcu.cz

ABSTRACT

Present work reviews causes of evolutionary, spontaneous, selected biological features of polyploid fish, and brings a brief review of cytological methods to study the phenomenon of polyploidy in fishes. Approaches to study the DNA content and the nucleotypic effect of genome size on cell size are characterized in details. Expected and/or found physiological features of polyploid tissues with larger cells are highlighted and discussed.

Klíčová slova: jeseteři, polyploidie, velikost genomu, velikost jádra, chromozómy

Keywords: sturgeons, polyploidy, genome size, nuclei, chromosomes

ÚVOD

Polyploidie obecně znamená přítomnost tří nebo více chromozómových sad v buněčném jádře. Tento stav umožňuje existenci a zvýšený výskyt určitých procesů [např. chromozomových přestaveb, rekombinace (Pecinka a kol., 2011) nebo uspávání genů aj.]. Do polyploidního stavu se buněčné jádro dostává procesem zvaným polyploidizace, k němuž však může docházet z velmi různorodých příčin a různorodý může být i jeho průběh. Vznik sexuálního rozmnožování zhruba před miliardou let (Smith, 1978) zároveň vedl k prvním diploidním (2n) zygotám. Tento proces by měl být považován za první stadium polyploidizace mezi mnoha evolučními událostmi (Vasil'ev a kol., 2009). Polyploidizace je probíhající proces, při němž mohou být dávné události zkomplikovány další karyotypovou evolucí a novější události mohou vést k několika ploidním úrovním u jednoho druhu (Leggatt a Iwama, 2003). U některých skupin rybovitých obratlovců je výskyt polyploidie nejasný. Například mihule (*Cephalaspidomorphi*), žraloci a rejnoci (*Elasmobranchi*), ale i jeseteři (*Acipenseriformes*) a další skupiny ryb mají počty chromozómů mnohem vyšší než modální počet 48, což se připisuje starým polyploidizačním událostem (Ohno a kol., 1968; Stingo a Rocco, 1991; Birstein a kol., 1997).

Na jedné straně může polyploidie představovat relativně častou třídu mutací, takovou, která se příležitostně zavádí v populacích, kde je její fenotypický účinek relativně mírný. Jednoduše řečeno, polyploidie může být široce rozšířena, protože se odehrává opakovaně, aniž by hrála v evoluci významnou roli. Na druhé straně může být polyploidie běžná, protože se

polyploidní druhy vyvíjejí rychleji nebo novějšími směry než příbuzné diploidní druhy (Otto a Whitton, 2000).

Dříve byla polyploidie považována za nedůležitou složku evoluce obratlovců a také za jev u těchto zvířat téměř nemožný. Muller (1925) považoval vyvinutý mechanismus determinace pohlaví za podstatnou bariéru pro vznik polyploidních druhů a byl možná prvním, kdo rozvinul argumenty pro nemožnost polyploidie u bisexuálních zvířat. White (1946) a Mayr (1963) později předpokládali polyploidii u partenogenetických druhů na základě četných údajů (Vasil'ev a kol., 2009).

Velké množství nedávno nashromážděných dat potvrzuje polyploidní evoluci u jeseterů. Problémy ploidních úrovní, stejně jako způsoby polyploidizace, zůstávají nevyřešenou otázkou týkající se polyploidní evoluce v této skupině (Vasil'ev, 1985). Jedním z nejproblematictějších kroků při úspěšném zavedení polyploidie u sexuálních druhů je požadavek na geneticky kompatibilního partnera. Možná díky této překážce se zdá, že je úspěšné zavedení polyploidie podporováno samooplozením, asexualitou a dlouhou dobou života (Bell, 1982; Ramsey a Schemske, 1998; Stebbins, 1938), která podle Otto a Whitton (2000) podporuje šanci na vznik vzácných událostí. U taxonů s převážně vzdáleným křížením je překážkou, které musí čelit nově vzniklí tetraploidi ($4n$), že se často kříží s diploidními partnery za vzniku triploidů ($3n$). Triploidie se obecně považuje za evolučně slepou uličku, protože triploidi mívají nízkou plodnost a často produkují aneuploidní gamety díky problémům s párováním a segregací chromozómů během mitózy. Bez ohledu na to triploidi produkují nízký podíl euploidních (haploidních, diploidních nebo triploidních) gamet (Ramsey a Schemske, 1998; Schultz, 1980). Tyto euploidní gamety mohou vést k produkci triploidního a tetraploidního ($4n$) potomstva (Otto a Whitton, 2000).

Dostupné údaje o evoluci polyploidních druhů nepředkládají jasný důkaz o možných mechanismech tetraploidizace u ryb, ať už allo- nebo autopolyploidii, ani konečný způsob, jak k ní dochází. V případě allopolyploidie se může vyskytnout jen segmentální allopolyploidie (násobení genomů s částečně homologními chromozómy) (Vasil'ev a kol., 2009).

POLYPLOIDIZACE U JESETERŮ

Jeseteři (podtřída *Chondrostei*, řád *Acipenseriformes*) jsou velmi starobylou skupinou ryb, patřící mezi paprskoploutvé (*Actinopterygii*), jež se podle odhadu doby molekulární divergence patrně diverzifikovaly ve spodním devonu (před 416–397 miliony let) a jejich hlavní klady se oddělily na konci karbonu (před 300 miliony let; Near a Miya, 2009). Genetická charakteristika jeseterovitých je velice zajímavá nejen proto, že může poskytnout cenná data o mechanismech evoluce obratlovců, ale také kvůli důležitým ochrannářským a ekonomickým otázkám týkajícím se těchto ryb (Fontana a kol., 2001).

Jeseteři během evoluce prošli třemi stádii polyploidizace: z diploidů na tetraploidy a z tetraploidů na oktaploidy ($8n$), a poté z oktaploidů na dodekaploidy ($12n$). Dá se však diskutovat i o jiné škále ploidních úrovní. Protože druh se 120 chromozómy prakticky dosahuje úrovně funkční diploidizace a druhy s 250 chromozómy jsou téměř na úrovni funkčně tetraploidních druhů, může být u jeseterů přijata škála s úrovněmi diploid-tetraploid-hexaploid ($6n$) na základě posledního stavu genomu. První škálu vztahů diploid-polyploid u jeseterů lze nazvat „evoluční škálou“ ploidních úrovní. Na této škále jsou výše uvedené vztahy mezi jesetery diploid-tetraploid-oktaploid-dodekaploid s tím, že diploidní druhy v nedávné době vymizely. Druhá „recentní škála“ předpokládá, že tento vztah je diploid-tetraploid-hexaploid (Vasil'ev a kol., 2009).

Základní otázky, jako je chromozomová evoluce nebo fylogeneze těchto živých fosílií, jsou stále nevyřešené. Jejich evoluční věk, jejich zvláštní místo v systematice ryb a jejich široké rozšíření společně s velkým veřejným zájmem dělají z jeseterů dobrý model pro studie molekulární evoluce u ryb (Ludwig a kol., 2001).

Druhy jeseterů představují tři odlišné skupiny s různými chromozómovými čísly. První z nich zahrnuje druhy s přibližně 112–146 chromozómy, druhá skupina představuje druhy s přibližně 250–270 chromozómy a třetí zahrnuje druhy s 360–370 chromozómy. Podle Ludwiga (2001) upřednostňují někteří autoři hypotézu, že všechny druhy s ~ 120 chromozómy jsou tetraploidi (např. Ohno a kol., 1969; Dingerkus a Howell, 1976; Birstein a Vasiliev, 1987; Birstein a kol., 1997); další je nazývají funkčními diploidy (Fontana, 1994; Jenneckens, 1999; Tagliavini a kol., 1999). Přibližně polovinu těchto chromozómů představují velmi drobné chromozómy označované jako mikrochromozómy. Vyšší počty působí potíže s jejich přesným počítáním. Kromě toho jsou některé mikrochromozómy jeseterů patrně přidruženými chromozómy (B-chromozómy); mnoho těchto chromozómů může podléhat polymorfismu (Vasil'ev, 1985). Bez ohledu na to jsou navzdory potížím s přesným výpočtem počtu chromozómů u jeseterů rozdíly mezi těmito třemi chromozómovými skupinami zjevné. Proto dokonce i první data o přítomnosti dvou skupin jeseterů lišících se dvojnásobným počtem chromozómů umožnila hypotézu o vztahu diploid-polyploid u těchto ryb (Nikoljukin, 1972; Vasil'ev a kol., 2009). Počty chromozómů různých druhů jeseterů jsou uvedeny v tab. 1.

Ke studiu polyploidních vztahů mezi skupinami se používá objem jaderné DNA. Podle literárních zdrojů (Dingerkus a Howell, 1976; Tiersch a kol., 1989; Vasiliev a kol., 1980, 1985, 2008, 2009; Birstein a kol., 1993; Kim a kol., 2005b; Fontana a kol., 1975, 1977, 2004; Fontana, 1976, 1994; Birstein a Vasiliev, 1987; Arefjev, 1983, 1989a, 1989b; Vlasenko a kol., 1989; Van Enennaam a kol., 1998, 1999; Fontana a Colombo, 1974; Nowruzfashkhami a kol., 2000; Sokolov a Vasilev, 1989; Li a kol., 1985; Ráb, 1986; Serebryakova, 1970; Yu a kol., 1987; Mirsky a Ris, 1951; Hedrick a kol., 1991; Burtzev a kol., 1976; Ohno a kol., 1969;) můžeme předpokládat, že druhy jako *Polyodon spathula*, *Acipenser nudiventris*, *Acipenser ruthenus*, *Acipenser stellatus*, *Acipenser sturio* a *Huso huso* mají ~ 120 chromozómů. Druhy jako *Acipenser baerii*, *Acipenser fulvescens*, *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser medirostris*, *Acipenser mikadoi*, *Acipenser naccarii*, *Acipenser persicus*, *Acipenser schrenckii*, *Acipenser sinensis*, *Acipenser transmontanus* či *Huso dauricus* mají ~ 250 až ~ 270 chromozómů a *Acipenser brevirostrum* má ~ 370 chromozómů (Kim a kol., 2005a). U druhů jako *Acipenser oxyrinchus desotoi* a *Scaphirhynchus platyrhynchus* zůstává situace nejasná.

Z tab. 1 je zřejmé, že obsah DNA u tří druhů *Acipenser baerii*, *Acipenser fulvescens* a *Acipenser schrenckii* je téměř shodný, ~ 8 pg DNA.jádro⁻¹, zatímco u druhu *Acipenser nudiventris* je dvakrát nižší, ~ 4 pg DNA.jádro⁻¹. Druh *Acipenser brevirostrum* má ~ 13–13,22 pg DNA.jádro⁻¹. Tito různí autoři (tab. 1) mají pro druhy jako *Polyodon spathula*, *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser medirostris*, *Acipenser mikadoi*, *Acipenser transmontanus*, *Huso huso* či *Huso dauricus* značně rozdílné údaje, které vyžadují další ověření.

Tab. 1. Množství DNA v buněčných jádrech u jeseterovitých ryb.**Tab. 1.** Amount of DNA in cell nuclei of acipenseriform fishes.

	Český název	C-hodnota (pgDNA.jádro ⁻¹)	Odkaz
<i>Polyodon spathula</i>	veslonos americký	3,9	Tiersch a kol., 1989a
		3,17	Birstein a kol., 1993
		4,89	Blacklidge a Bidwell, 1993
		3,5	Zhou a kol., 2009
<i>Acipenser baerii</i>	jeseter sibiřský	8,29–8,31	Birstein a kol., 1993
		7,87–8,30	Birstein, 1993
		7,8–8	Zhou a kol., 2009
<i>Acipenser brevirostrum</i>	jeseter krátkorypý	13,08	Blacklidge a Bidwell, 1993
		13,22	Hardie a Hebert, 2003
		18,63*	Hardie a Hebert, 2003
		13,22	Hardie a Hebert, 2004
<i>Acipenser fulvescens</i>	jeseter jezerní	18,63*	Hardie a Hebert, 2004
		8,9	Blacklidge a Bidwell, 1993
		7,9–8	Zhou a kol., 2009
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	jeseter ruský	7,86–7,88	Birstein a kol., 1993
		7,87–8,30	Birstein, 1993
		4,2\8,0	Zhou a kol., 2009
<i>Acipenser medirostris</i>	jeseter sachalinský	13,93–14,73	Birstein a kol., 1993
		7,8–8,3	Birstein, 1993
		8,82	Blacklidge a Bidwell, 1993
<i>Acipenser mikadoi</i>	jeseter severní	14,4	Birstein, 1993
		8,0–9,0	Zhou a kol., 2009
<i>Acipenser naccarii</i>	jeseter jadranský	5,7–6,3	Fontana, 1976
<i>Acipenser persicus</i>	jeseter perský		
<i>Acipenser nudiventris</i>	jeseter hladký	3,88–4,04	Birstein a kol., 1993
<i>Acipenser oxyrinchus desotoi</i>	jeseter ostrorypý	4,55	Blacklidge a Bidwell, 1993
		4,38	Hardie a Hebert, 2003
		6,61*	Hardie a Hebert, 2003
<i>Acipenser ruthenus</i>	jeseter malý	3,74	Birstein a kol., 1993
		3,8–3,9	Zhou a kol., 2009
		7,9–8,2	Zhou a kol., 2009
<i>Acipenser schrenckii</i>	jeseter amurský		
<i>Acipense sinensis</i>	jeseter čínský		
<i>Acipenser stellatus</i>	jeseter hvězdnatý	3,74	Birstein a kol., 1993
		3,5–4	Zhou a kol., 2009
<i>Acipenser sturio</i>	jeseter velký	3,2	Mirsky and Ris, 1951
		3,6	Fontana, 1976
		10,6	Hinegardner, 1976
<i>Acipenser transmontanus</i>	jeseter bílý	9,56	Blacklidge a Bidwell, 1993
		8,5–9,0	Zhou a kol., 2009
		3,6	Fontana, 1976
<i>Huso huso</i>	vyza velká	2,42–2,45	Birstein a kol., 1993
<i>Huso dauricus</i>	vyza malá, kaluga	3,74–3,81	Birstein a kol., 1993
		8,3–8,4	Zhou a kol., 2009
		4,73	Blacklidge a Bidwell, 1993
<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	lopatonos americký		Ohno a kol., 1969

*3n

Protože je polyploidie stále probíhajícím procesem, stejně je tomu s jejím studiem a k lepšímu porozumění skutečného rozsahu a role polyploidie u ryb je zapotřebí mnoha dalších šetření. Přesto však existují významné potíže při stanovování potenciálních výhod polyploidie u ryb. U allopolyploidie je obtížné oddělit účinek polyploidie od účinků hybridizace. U druhů s prokázanou autopolyploidii mohou evoluční směry lišící se od diploidních příbuzných zastínit účinky polyploidie. Potenciálně by bylo možné ke stanovení okamžitých výhod polyploidie použít uměle odchovanou polyploidní rybu (Leggatt a Iwama, 2003).

NĚKTERÉ BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI POLYPLOIDNÍCH RYB

Studie ukazují, že na velikost buňky má výrazný vliv velikost genomu, kterou vyjadřuje obsah (možství) DNA v buněčném jádře. Patrně nejjednodušší demonstrací vztahu mezi obsahem DNA a velikostí buňky je ta, kterou nám poskytuje polyploidie. V tomto případě je celá chromozómová sada zdvojena, takže rozdíly v obsahu DNA mezi druhy jsou velké a je možné je snadno kvantifikovat. Již dlouho je známo, že polyploidie vede k větším epidermálním a krevním buňkám (např. Fankhauser, 1955; Licht a Bogart, 1987) a velikost erytrocytů se dnes často používá jako způsob identifikace polyploidních jedinců (např. Austin a Bogart, 1982; Garcia-Abiada a kol., 1999). Změny ve velikostech haploidního genomu jsou obvykle mnohem méně patrné než změny u ploidních úrovní, přesto však existují mezi taxony velké rozdíly. Přesto je to u ryb tak, že vztah mezi velikostí genomu a velikostí erytrocytů je zatím ten nejméně známý (Gregory, 2001a).

Různá vysvětlení korelace mezi velikostí genomu a velikostí buněk vždy spadají do jedné z těchto dvou kategorií: teorie mutačního tlaku nebo teorie optimální DNA.

TEORIE MUTAČNÍHO TLAKU

V první teorii se na velikosti genomu nahlíží jako na produkt probíhajícího procesu hromadění DNA (tj. mutační tlak) zastavený pouze tehdy, kdy replikační náklady převýší toleranci „hostitelské“ buňky. Podle těchto teorií se obecně předpokládá, že větší buňky mohou jednoduše tolerovat více DNA, a tak je korelace těchto dvou faktorů pouze náhodná. Jak přehledně uvádí Gregory (2001b) a z něho vycházející Würtherlová (2010), dvěma hlavními příklady tohoto přístupu jsou teorie sobecké DNA (která se umí sama množit v rámci genomu a u níž celkový počet jednotlivých kopií je určen intragenomovou selekcí mezi sobeckými sekvencemi; Doolittle a Sapienza, 1980) a teorie odpadní DNA (jež připisuje nárůst genomu nefunkčním genům nahromaděným v genomu během evoluce působením genetického driftu; Ohno, 1972). Obě teorie jsou velmi užitečné při řešení původu a rozšíření nekódující DNA, avšak nepomáhají vysvětlit vztah k velikosti buňky. Zjednodušeně řečeno není důvod očekávat, že by větší buňky proporcionálně lépe tolerovaly nekódující DNA než malé buňky (Gregory, 2001b). Naproti tomu teorie optimální DNA stanoví určitě fyziologické, cytologické a podobné role nekódující DNA. Jedná se o možné funkce (nebo alespoň účinky) objemu DNA, které nezávisí na její specifické nukleotidové sekvenci. Konkrétně se vysvětlení korelace velikosti genomu a velikosti buněk založená na optimální DNA obvykle soustředí na vztah mezi těmito dvěma parametry a velikostí jádra. Tento vztah je od přelomu minulého století znám jako „cytonukleární poměr“ nebo „karyoplazmatický poměr“ (Strasburger, 1893, Hertwing, 1903, Wilson, 1925).

TEORIE OPTIMÁLNÍ DNA

Dvě hlavní teorie optimální DNA jsou a) nukleoskeletální teorie a b) nukleotypová teorie, z nichž obě předpokládají kauzativní vztah mezi obsahem DNA a velikostí jádra, ale liší se vysvětlením toho, proč by měla velikost buňky záležet na velikosti jádra, nebo opačně (Gregory, 2001a). Nukleoskeletální teorie, poprvé vyslovená Cavalier-Smithem v roce 1991, předpokládá existenci selekčního tlaku podporujícího větší buňky, přičemž koevolucí dochází ke zvětšení jádra, aby byl zachován vyrovnaný růst buňky. Nukleotypová teorie, poprvé vyslovená Commonerem v roce 1964, předpokládá přímý vliv velikosti jádra na velikost buňky a nukleotypem označuje celkovou velikost jádra nezávisle na funkčnosti sekvencí, přičemž nukleotyp určuje minimální velikost buňky (podle Gregoryho, 2001a a Würtherlové, 2010).

Často studovaným typem buněk v podobných tezích jsou erytrocyty (červené krvinky, RBC). Je mnoho hledisek, ze kterých je velikost erytrocytů významná pro biologii organismu. Větší erytrocyty obsahují více hemoglobinu (Hawkey, a kol., 1991), ale vyžadují také větší krevní cévy. Druhy s velkými buňkami mají obvykle méně buněk (Hawkey, a kol., 1991; Kuramoto, 1981). Krevní viskozita, celkový obsah hemoglobinu a další podobné parametry mají zjevný význam pro fyziologii organismu, žádnému parametru se však nevěnovalo více pozornosti s ohledem na vztah velikosti genomu a velikosti buněk než poměru povrchu a objemu erytrocytů (poměr SA:V) (Gregory, 2001a).

Význam poměrů SA:V u erytrocytů pro metabolismus organismu podrobně diskutoval Harvey Smith v roce 1925: „Skutečnost, že objem těla roste jako třetí mocnina lineárního rozměru, zatímco povrch roste jako druhá mocnina, je v biologii již dlouho známa. Aplikovat stejnou představu na velikost buňky je jen dalším krokem.“ Od té doby se poznatek, že velikost erytrocytu ovlivňuje fyziologii organismu, aplikuje jednostranně na všechny třídy obratlovců. Smith (1925) diskutoval souvislost mezi velikostí genomu a metabolickou rychlostí u obojživelníků. U ryb se zdá, že je velikost genomu spojena s některými měřítky „vývojové komplexity.“ To znamená, že malé genomy jsou typické pro komplexní druhy, které se výrazně morfologicky liší od typického „rybího“ designu (Hinegardner 1968, 1976). Jedním rozumným vysvětlením tohoto jevu je, že počet kroků, které je třeba provést v komplexním vývojovém programu, jako mají například mořští koníci, je vyšší než u „typických“ ryb, jako je pstruh. Dělení a diferenciace buněk musí být proto u těchto komplexnějších organismů rychlejší (a genomy menší). Možná proto, ačkoli vztah mezi velikostí genomu a velikostí erytrocytů u ryb zjevně existuje, je jen sekundárním následkem primární cílené selekce v této třídě (Gregory, 2001a).

Obecný vztah mezi obsahem DNA (nebo alespoň velikostí jádra) a velikostí buněk je znám již déle než sto let. Vysvětlení tohoto spojení však dodnes zůstává předmětem diskusí.

ZÁKLADNÍ METODY ZJIŠŤOVÁNÍ PLOIDNÍ ÚROVNĚ U RYB

Některé z nejranějších studií zahrnovaly techniky biochemické objemové extrakce DNA pro hodnocení celkového obsahu DNA roztoku, která se pak rozdělila podle odhadu počtu přítomných jader. Tyto metody byly dostatečné k prokázání konstantního objemu DNA ve všech tkáních a mezi jedinci ze stejného druhu, a k naznačení značné variability velikosti genomu při srovnání různých druhů (např. Vendrely a Vendrely 1948, 1949, 1950). Analýzy reasociační kinetiky obdobně poskytly použitelné, ale poněkud zpochybnitelné odhady obsahu DNA. Krátce po zveřejnění těchto počátečních průzkumných studií začala metodologie směřovat k denzitometrickým technikám. Tento přístup v dnešních studiích převládá (Hardie a kol., 2002).

Metody používané k přesnému určení ploidní úrovně ryb je možné rozdělit na přímé a nepřímé.

Přímé metody jsou založeny na stanovení obsahu DNA v buňkách. Tyto metody zahrnují stanovení karyotypu (např. Ueno 1984; Krasznai a kol., 1984; Krasznai a Marian, 1986; Chao a kol., 1993; Linhart a kol., 2001; Flajšhans, 2006), kvantifikaci obarvených jader v buňce (Phillips a kol., 1986; Flajšhans a kol., 1992; 1993a, b; Linhart a Flajšhans, 1995; Kucharczyk a kol., 1996; Flajšhans, 1997a; Kucharczyk a kol., 1999; Linhart a kol., 2001 a další), kvantifikaci obsahu DNA ve zvlášť obarvených jádrech pomocí průtokové cytometrie (Thorgaard a kol., 1982; Allen, 1983; Ewing a kol., 1991; Morgan a kol., 1993; Lecommandeur a kol., 1994; Flajšhans, 2006;), spektrofluorometrii a/nebo mikrodenzitometrii (Baun, 1987; Schwarzbaum a kol., 1992).

Nepřímé metody mohou být založeny na kontrole velikosti buněk a/nebo jejich jader klasickými hematologickými technikami, analýzou Coulter counter (Wattendorf, 1986; Wycherlay a O'shea, 1978; Flajšhans, 2006) nebo měřením buněčných/jaderných geometrických vlastností (Swarup, 1959; Wolters a kol., 1982; Benfey a kol., 1984; Boroń, 1994; Flajšhans, 1997b; Linhart a kol., 2001) či případně na rozdílech v externí morfologii mezi diploidními a tetraploidními jedinci (Purdom, 1972; Gold a Avise, 1976; Thorgaard a Gall, 1979; Allen a Stanley, 1983; Cassani a kol., 1984; Scheerer a kol., 1987; Pandian a Koteeswaran 1998; Flajšhans, 2006; Piferrer a kol., 2009).

ZÁVĚR

Polyploidní stavy se u ryb vyskytují velice často a jeseterovité ryby s různými úrovněmi evoluční polyploidie se jeví být velmi vhodným modelem pro studium vlivu závislosti mezi velikostí genomu a buňky. Výzkum specifického obsahu DNA u série polyploidních jeseterovitých nám umožní ověřit teoretická očekávání nukleotypického účinku projevujícího se růstem velikosti buněk/jader s rostoucí úrovní ploidie. Uvedené metody umožní zjistit přítomnost nebo nepřítomnost vztahu mezi ploidní úrovní ryb a plošným (2-D) i prostorovým (3-D) uspořádáním buňky a buněčného jádra a s využitím moderní techniky, jako je např. konfokální mikroskopie, získat jasnější vztah mezi ploidní úrovní, velikostí genomu a velikostí jádra, či buňky.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla podpořena projekty CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024, GAJU 046/2010/Z, GACR 523/08/0824.

LITERATURA

- Allen, Jr.S.K., 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture*, 33: 317–328.
- Allen, Jr.S.K., Stanley, J.G., 1983. Ploidy of the hybrid grass carp x bighead carp determined by flow cytometry. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115: 841–848.
- Arefjev, V.A., 1983. Polykaryogrammic analysis of the ship *Acipenser nudiventris* Lovetsky (Acipenseridae, Chondrostei). *Vopr Ikhtiolog.*, 23: 209–218. [Russian]
- Arefjev, V.A., 1989a. Study of karyotype of the sturgeon *Acipenser gueldenstaedti* Brandt (Chondrostei). *Tsitologia i Genetika*, 23: 7–10. [Russian]
- Arefjev, V.A., 1989b. Karyotype variability in successive generations after hybridization between the great sturgeon, *Huso Huso* (L.), and the sterlet, *Acipenser ruthenus* (L.). *J. Fish Biol.*, 35: 819–828.
- Austin, N.E., Bogart, J.P., 1982. Erythrocyte area and ploidy determination in the salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex. *Copeia*, 485–488.
- Baun, R.D., 1987. Introduction to Instrumental Analysis, McGraw-Hill, N.Y., Chapter 11.
- Bell, G., 1982. The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality. Berkeley: Univ. Calif. Press.
- Benfey, T.J., Sutterlin, A.M., Thompson, R.J., 1984. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 980–984.
- Birstein, V.J., Vasiliev, V.P., 1987. Tetraploid-octaploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces). Karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organizer regions in four acipenserid species. *Genetica*, 72: 3–12.
- Birstein, V.J., 1993. Is *Acipenser medirostris* one or two species? *Sturgeon Q.*, 1: 2.
- Birstein, V.J., Pletaev, A.I., Goncharov, B.F., 1993. DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry. *Cytometry*, 14: 377–383.
- Birstein, V.J., Hanner, R., DeSalle, R., 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches. *Environ. Biol. Fishes*, 48: 127–155.
- Blackledge, K.H., Bidwell, C.A., 1993. Three ploidy levels indicated by genome quantification in Acipenseriformes of North America. *J. of Heredity*, 84: 427–430.
- Boroń, A., 1994. Use of erythrocyte measurements to detect natural triploids of spined loach *Cobitis taenia* (L.). *Cytobios*, 78: 197–202.
- Burtzev, J.A., Nikoljukin, J., Serebryakova, E.V., 1976. Karyology of the Acipenseridae family in relation to the hybridization and taxonomy problems. *Acta Biol. Jugosl. Ser. Ichthyol.*, 8: 27–34.
- Cassani, J.R., Caton, W.E., Clark, B., 1984. Morphological comparisons of diploid and triploid hybrid grass carp, *Ctenopharyngodon idella* female x *Hypophthalmichthys nobilis* male. *J. Fish Biol.*, 25: 269–278.
- Cavalier-Smith, T., 1991. Coevolution of vertebrate genome, cell, and nuclear sizes. In *Symposium on the Evolution of Terrestrial Vertebrates*. Mucchi, Modena, 51–86.
- Chao, N.H., Li, F.G., Huang, C.F., Yang, C.P., Liao, I.C., 1993. Investigation on artificially induced triploidy in common carp using flow cytometer. *J. Taiwan Fish. Res.*, 1(2): 39–54.
- Dingerkus, G., Howell, W.M., 1976. Karyotypic analysis and evidence of tetraploidy in the North American paddlefish, *Polyodon spathula*. *Science*, 177: 664–669.
- Doolittle, W.F. and Sapienza, C., 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284: 601–603.
- Ewing, R.R., Scalet, C.G., Evenson, D.P., 1991. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes. *Prog. Fish-Cult.*, 53: 177–180.

- Fankhauser, G., 1955. Role of nucleus and cytoplasm. In *Analysis of Development*. Saunders, Philadelphia, 126–150.
- Flajšhans, M., Ráb, P., Dobosz, S., 1992. Frequency analysis of active NORs in nuclei of artificially induced triploid fish. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 68–72.
- Flajšhans, M., Kvasnička, P., Ráb, P., 1993a. Genetic studies in tench (*Tinca tinca* L.) High incidence of spontaneous triploidy. *Aquaculture*, 110: 243–248.
- Flajšhans, M., Linhart, O., Kvasnicka, P., 1993b. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. *Aquaculture*, 113: 301–312.
- Flajšhans, M., 1997a. Reproduction sterility caused by spontaneous triploidy in tench (*Tinca tinca*). *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 44 (1–2): 39–45.
- Flajšhans, M., 1997b. A model approach to distinguish diploid and triploid fish by means of computer-assisted image analysis. *Acta Vet. Brno*, 66: 101–110.
- Flajšhans, M., 2006. Spontaneous and induced polyploidy in selected species of freshwater fish. Dissertation, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin, 98.
- Fontana, F., 1976. Nuclear DNA content and cytometry of erythrocytes of *Huso huso* L., *Acipenser sturio* L. and *Acipenser naccarii* Bonaparte. *Caryologia*, 29: 127–137.
- Fontana, F., 1994. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). *Genome*, 37: 888–892.
- Fontana, F., Colombo, G., 1974. The chromosomes of Italian sturgeons. *Experientia*, 30: 739–742.
- Fontana, F., Jankovic, D., Zivkovic, S., 1975. Somatic chromosome of *Acipenser ruthenus* L. *Arch. Biol. Nauka*, Beograd, 27: 33–35.
- Fontana, F., Jankovic, D., Zivkovic, S., 1977. Somatic chromosomes of *Acipenser ruthenus* L. *Arh. Biol. Nauka* 27, 33–35.
- Fontana, F., Tagliavini, J., Congiu, L., 2001. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica*, 111: 359–373.
- Fontana, F., Ronald, M., Bruch, F., Binkowski, P., Lanfredi, M., Chicca, M., Beltrami, N., Congiu, L., 2004. Karyotype characterization of the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* (Rafinesque 1817) by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. *Genome*, 47: 742–746.
- Garcia-Abiado, M.A.R., Dabrowski, K., Christensen, J.E., Czesny, S., 1999. Use of erythrocyte measurements to identify triploid saugeyes. *N. Am. J. Aquacult.*, 61: 319–325.
- Gold, J.R., Avise, J.C., 1976. Spontaneous triploidy in the California roach *Hesperoleucus symmetricus* (Pisces: Cyprinidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 17: 144–149.
- Grande, L., Bemis, W.E., 1991. Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes. *J. Vert. Paleo.*, 11(Suppl. 1), 121.
- Gregory, T.R., Hebert, P.D.N., 1999. The modulation of DNA content: Proximate causes and ultimate consequences. *Genome Res.*, 9: 317–324.
- Gregory, T.R., 2001a. The Bigger the C-Value, the Larger the Cell: Genome Size and Red Blood Cell Size in Vertebrates.
- Gregory, T.R., 2001b. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol. Rev.*, 76: 65–101.
- Hardie, D.C., Gregory, T.R., Hebert, P.D.N., 2002. From pixels to picograms: A beginners guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *J. Histochem. Cytochem.*, 50(6): 735–749.

- Hardie, D.C., Hebert, P.D.N., 2003. The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes. *Genome*, 46: 683–706.
- Hardie, D.C., Hebert, P.D.N., 2004. Genome-size evolution in fishes. *Canadian J. of Fish. and Aquatic. Scienc.*, 61: 1636–1646.
- Hawkey, C.M., Bennett, P.M., Gascoyne, S.C., Hart, M.G., Kirkwood, J.K., 1991. Erythrocyte size, number and haemoglobin content in vertebrates. *Br. J. Haematol.*, 77: 392–397.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Rosemark, R., Aronstein, D., Lannan, C.N., 1991. Two cell lines from white sturgeon. *Trans. Am. Fish Soc.*, 120: 528–534.
- Hertwig, R., 1903. Über Korrelation von Zell- und Kerngröße und ihre Bedeutung für die geschlechtliche Differenzierung und die Teilung der Zelle. *Biol. Centralbl.*, 23: 49–62.
- Hinegardner, R., 1968. Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *Am. Nat.*, 102: 517–523.
- Hinegardner, R., 1976. Evolution of genome size. In *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland, 179–199.
- Jennekens, I., 1999. Investigations on the suitability of biochemical and molecular markers for an identification of different sturgeon species as well as their hybrids. Ph.D. Thesis, University of Göttingen, Göttingen, Germany.
- Kim, D.S., Nam, Y.K., Noh, J.K., Park, C.H., Chapman, F.A., 2005a. Karyotype of North American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the Acipenseriformes. *Ichthyol Res.*, 52: 94–97.
- Kim, P., Kim, N., Lee, Y., Kim, B., Shin, Y., Lee, S., 2005b. ECgene: genome annotation for alternative splicing. *A&A* 441, 663–674.
- Krasznai, Z., Marian, T., 1986. Shock- induced triploidy and its effect on growth and gonad development of the European catfish, *Silurus glanis* L. *J. Fish Biol.*, 29: 519–527.
- Krasznai, Z., Marian, T., Jeney, Z., Jeney, G., Zsigri, A., 1984. Effect of triploidy on the blood cell size of hybrid grass carp. *Aquacult. Hung.*, 4: 17–24.
- Kucharczyk, D., Luczynski, M.J., Jankun, M., Luczynski, M., 1996. Preliminary observations on the induction of triploidy in *Abramis brama* by cold shock. *Cytobios*, 88: 153–160.
- Kucharczyk, D., Woznicki, P., Luczynski, M.J., Klinger, M., 1999. Ploidy level determination in genetically manipulated northern pike based on the number of active nucleoli per cell. *North American J. of Aquaculture*, 61: 38–42.
- Kuramoto, M., 1981. Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69A: 771–775.
- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquacult. and Fish. Manag.*, 25: 345–350.
- Leggatt, R.A., Iwama, G.K., 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 13: 237–246.
- Li, M.F., Marrayatt, V., Annand, C., Odense, P., 1985. Fish cell culture: two newly developed cell lines from Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and guppy (*Poecilia reticulata*). *Can. J. Zool.*, 63: 2867–2874.
- Licht, L.E., Bogart, J.P., 1987. Comparative size of epidermal cell nuclei from shed skin of diploid, triploid and tetraploid salamanders (Genus *Ambystoma*). *Copeia*, (2): 284–290.
- Linhart, O., Flajšhans, M., 1995. Triploidization of European catfish *Silurus glanis* L. by heat shock. *Aquacult. Res.*, 26: 367–370.
- Linhart, O., Haffray, P., Ozouf-Costaz, C., Flajšhans, M., Vandeputte, M., 2001. Triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.) with heat-, cold-, hydrostatic pressure shocks and growth experiment. *J. Appl. Ichthyol.*, 17: 247–255.

- Ludwig, A., Belfiore, N., Christian, P., Svirsky, V., Jenneckens, I., 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 158: 1203–1215.
- Mayr, E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA., 797.
- Mirsky, A.E., Ris, H., 1951. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *J. Gen Physiology*, 34: 451–462.
- Morgan, J.A.W., Pottinger, T.G., Rippon, P., 1993. Evaluation of flow cytometry as a method for quantification of circulating blood cell populations in salmonid fish. *J. Fish Biol.*, 42: 131–141.
- Muller, H.J., 1925. Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *Am. Nat.*, 59: 346–353.
- Near, T.J. and Miya, M. 2009. Ray-finned fishes (Actinopterygii). *The Time of Life*, Oxford University Press, 328–331.
- Nikoljukin, N.I., 1972. Hybridization of sturgeons and bony fishes. (Theory and Practice). Publ. Food Industry, 335. [Russian]
- Nowruzfashkhami, M.R., Pourkazemi M., Baradarannoveiri, S., 2000. Chromosome study of persian sturgeon *Acipenser persicus*. *B. Cytologia*, 65: 197–202.
- Ohno, S. 1972. So much “junk” DNA in our genome. *Evolution of Genetic Systems*. Gordon and Breach, New York, 366–370.
- Ohno, S., Wolf, U., Atkin, N.B., 1968. Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas*, 59: 169–187.
- Ohno, S., Muramoto, J., Stenius, C., Christian, L., Kittrel, W.A., Atkin, N.B., 1969. Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holostean fishes. *Chromosoma*, 26: 35–40.
- Otto, S.P., Whitton, J., 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 34: 401–437.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384: 167–243.
- Patterson, C., 1982. Morphology and interrelationships of primitive actinopterygian fishes. *Am. Zool.*, 22: 241–259.
- Pecinka, A., Fang, W., Rehmsmeier, M., Levy, A.A., Mittelsten, S.O., 2011. Polyploidization increases meiotic recombination frequency in *Arabidopsis*. *BMC Biol* 2011, Apr 21, 9(1): 24.
- Phillips, R.B., Zajicek, K.D., Ihssen, P.D., Johnson, O., 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture*, 54: 313–319.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293: 125–156.
- Purdom, C.E., 1972. Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity*, 29: 11–24.
- Ráb, P., 1986. A note on the karyotype of the sterlet, *Asipenser ruthenus* (Pisces, Acipenseridae). *Folia Zool.*, 35: 73–78.
- Ramsey, J., Schemske, D.W., 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 29: 467–501
- Scheerer, P.D., Thorgaard G.H., and Seeb J.E., 1987. Performance and developmental stability of triploid tiger trout (brown trout female x brook trout male). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 116: 92–97.
- Schultz, R.J., 1980. Role of polyploidy in the evolution of fishes. See Ref., 69: 313–404.
- Schwarzbaum, P.J., Varcarel, A., Maggese, M.C., 1992. Ploidy of South American catfish *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) determined by spectrofluorometry. *J. Aqua. Trop.*, 7: 151–156.

- Serebryakova, E.V., 1970. Chromosome complements of hybrids between acipenserids with different karyotypes. In: Distant Hybridization of Plants and Animals. Kolos, Moscow, 2: 413–419. [Russian]
- Smith, H.M., 1925. Cell size and metabolic activity in amphibia. Biol. Bull., 48: 347–378.
- Smith, J.M., 1978. The Evolution of Sex. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sokolov, L.I., Vasil'ev, V.P., 1989. The Freshwater Fishes of Europe, vol. 1, part II, General Introduction to Fishes, Acipenseriformes, AULA-Verlag, Wiesbaden, 206–226.
- Stebbins, G.L., 1938. Cytological characteristics associated with the different growth habits in the dicotyledons. Am. J. Bot., 25:189–198.
- Stingo, V., Rocco, L., 1991. Chondrichthyan cytogenetics: A comparison with teleosts. J. Mol. Evol., 33: 76–82.
- Strasburger, E., 1893. Über die Wirkungssphäre der Kerne und die Zellgröße. Histol. Beitr., 5: 97–124.
- Swarup, H., 1959. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). J. Genet., 56: 143–155.
- Tagliavini, J., Conterio, G., Gandolfi, G., Fontana, F., 1999. Mitochondrial DNA sequences of six sturgeon species and phylogenetic relationships within Acipenseridae. J. Appl. Ichthyol., 15: 17–22.
- Thorgaard, G.H., Gall, G.A.E., 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. Genetics, 93: 961–973.
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A.E., Propp, J., Utter, F.M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. Aquaculture, 29: 305–309.
- Tiersch, T.R., Chandler, R.W., 1989. Chicken erythrocytes as an internal reference for analysis of DNA content by flow-cytometry in grass carp. Trans. Am. Fish. Soc., 118: 713–717.
- Tiersch, T.R., Chandler, R.W., Wachtel, S.S., Elias, S., 1989a. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. Cytometry, 10: 706–710.
- Ueno, K., 1984. Induction of triploid carp and their haematological characteristics. Jpn. J. Genet., 59: 585–591.
- Van Eenennaam, A.L., Murray, J.D., Medrano, J.F., 1998. Mitotic analysis of the North American white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number. Genome, 41: 266–271.
- Van Eenennaam, A.L., Murray, J.D., Medrano, J.F., 1999. Karyotype of the American green sturgeon. T. Am. Fish. Soc., 128: 175–177.
- Vasil'ev, V.P., Sokolov, L.I., Serebryakova, E.V., 1980. Karyotype of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt from the Lena River and some questions of the acipenserid karyotypic evolution. Vopr. Ikhtiol. 20: 814–822. [Russian]
- Vasil'ev, V.P., 1985. Evolutionary Karyology of Fishes. Nauka, Moscow, 300 pp. [Russian]
- Vasil'ev, V.P., Vasil'eva, E.D., Shedko, S.V., Novomodny, G.V., 2008. Karyotypes of the Kaluga *Huso dauricus* and Sakhalin Sturgeon *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces) in Materials of the Account Conference on Biodiversity and Dynamics of Gene Pools (RAS, Moscow), 19–21.
- Vasil'ev, V.P., Vasil'eva, E.D., Shedko, S.V., Novomodny, G.V., 2009. Ploidy Levels in the Kaluga *Huso dauricus* and Sakhalin Sturgeon *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces). Dokl. Biol. Sci., 426: 228–231.
- Vendrely, R., Vendrely, C., 1948. La teneur du noyau cellulaire en acide desoxyribonucleique a travers les organes, les individus et les especes animales: techniques et premiers resultat. Experientia, 4: 434–436.

- Vendrely, R., Vendrely, C., 1949. La teneur du noyau cellulaire en acide desoxyribonucleique a travers les organes, les individus et les especes animales: techniques et premiers resultat. *Experientia*, 5: 327–329.
- Vendrely, R., Vendrely, C., 1950. Sur la teneur absolue en acide desoxyribonucleique du noyau cellulaire chez quelques especes d'oiseaux et de poissons. *C.R. Acad. Sci.*, 230: 788–790.
- Vlasenko, A.D., Pavlov A.V., Vasil'ev V.P., 1989. *Acipenser gueldenstaedti* Brand, 1833. In *The Freshwater Fishes of Europe*, Vol. 1, Part II: General Introduction to Fishes. *Acipenseriformes*, pp. 294–345.
- Wattendorf, R.J., 1986. Rapid identification of triploid grass carp with a Coulter Counter and Channelyzer. *Prog. Fish Cult.*, 48: 125–132.
- White, M.J.D., 1946. The evidence against polyploidy in sexually reproducing animals. *Am. Nat.*, 80: 610–618.
- Wilson, E.B., 1925. *The Cell in Development and Heredity*. Macmillan, New York.
- Wolters, W.R., Chrisman, C.L., Libey, G.S., 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.*, 20: 253–258.
- Würtherlová, T., 2010. *Genetika hub, evoluce genomu a využití průtokového cytometru při studiu DNA*. PŘF UK, Praha, 38 pp.
- Wycherley, P.A. and O'shea, M.J., 1978. Abridged differential leucocyte counts provided by a Coulter Channelyzer in a routine haematology laboratory. *J. Clinical Pathology*, 31: 271–274.
- Yu, X., Zhou, T., Li K., Li Y., Zhou M., 1987. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. *Genetica*, 72: 225–236.
- Zhou, H., Fujimoto, T., Adachis, S., Yamaha, E., Arai, K., 2009. Genome size variation estimated by nuclear DNA content Flow Cytometry in ten sturgeon species and several interspecific hybrids reared in Japan. *Wuhan Book of Abstracts Harmonizing the relationships between Human Activities and Nature: the Case of Sturgeons*, pp. 61–62.



VYHODNOCENÍ DOPADŮ OSMOTICKÉHO A OXIDAČNÍHO STRESU NA SPERMIE KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*, L.) ZPŮSOBENÝCH ZMRAZOVACÍMI TECHNIKAMI

*Evaluating the Impacts of Osmotic and Oxidative Stress on Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.) Sperm Caused by Cryopreservation Techniques*

PING LI,^{1,2} ZHI-HUA LI,^{1,2} B. DZYUBA,^{2,3} M. HULÁK,¹ M. RODINA,¹ O. LINHART¹

¹Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Vodnany, Czech Republic, pingli06@yahoo.com

²Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Jingzhou, China

³Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

(rozšířený abstrakt práce publikované v *Biology of Reproduction* 83: 852-858. 2010)

Zmrazování (kryokonzervace) spermatu ryb představuje důležitý nástroj využívaný k uchování genetických zdrojů ryb formou ex situ. Forma ochrany ex situ je ochrana in vitro, která by měla být doplňkem metody in situ (tj. přímo v produkčních systémech formou živých genových bank), zejména jako pojistka pro krizové situace, ale také s výhledem budoucího využívání biotechnologických metod (např. klonování, přenosy nebo eliminace genů). Nejběžnější in vitro technikou je uchování spermatu ryb v hluboce zmrazeném stavu tzv. kryokonzervace.

Zmrazení (kryokonzervace) suspenze buněk indukuje tvorbu ledových krystalů v extracelulárním prostoru s následnou tvorbou osmotického gradientu napříč plazmatickou membránou mezi původně izotonickým intracelulárním prostředím a zmrazeným roztokem kryoprotektiva v extracelulárním prostoru (Devireddy a kol. 2002). Indukované osmotické změny a oxidační poškození mají za následek subletální a letální účinky na spermie ryb (Lahnsteiner a kol. 2002).

Cílem prezentované práce bylo studium vlivu kryokonzervace na kvalitu spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio*). V rámci studie byl analyzován vliv osmotického a oxidačního stresu na pohyblivost spermií kapra obecného, membránovou integritu, úroveň thiobarbitur-acid-reaktivní látky (TBARS) a karbonylové skupiny (CP) a činnost superoxid dismutázy (SOD), glutathion reduktázy (GR) a glutathion peroxidázy (GPx).

Rychlost pohybu a procento pohyblivých spermií a celková doba pohybu spermií byla stanovena podle Linharta a kol. (2002). Úroveň thiobarbitur-acid-reaktivní látky (TBARS) a karbonylové skupiny (CP) a činnost superoxid dismutázy (SOD), glutathion reduktázy a glutathion peroxidázy (GPx) byly stanoveny podle Lushchaka a kol. (2005) a Marklunda a kol. (1974). Membránová integrita byla stanovena podle Flajshanse a kol. (2004). Experimentální data

byla statisticky vyhodnocována s použitím programu SPSS 13.0. Hladina významnosti byla stanovena na ($P < 0.05$).

Osmotický a oxidační stres byl u spermatu kapra obecného indukován použitím dvou kryoprotektiv a to dimethylsulfoxidu (DMSO) a ethylenglykolu z následnou ekvilibrací, a procesy zmrazení a rozmrazování.

Ekvilibrace spermatu d použitím DMSO vedla k výraznému snížení pohyblivosti spermií. Navíc oba typy použitých extenderů měly negativní vliv na rychlost pohybu spermií (obr. 1A, 1B) a membránovou integritu (obr. 2) po zmrazení a rozmrazení spermatu.

Použití obou typů extenderů nemělo průkazný vliv na koncentraci TBARS nebo CP nebo na činnost SOD. Na straně druhé, procesy zmrazování a rozmrazování indukovaly vyšší koncentraci TBARS (obr. 3A), CP (obr. 3B) a aktivitu GP (obr. 3C), ale neměly průkazný vliv na hladinu SOD (obr. 4A).

Navíc aktivita glutathion reduktázy byla inhibována ve vzorcích vystavených extenderu DMSO (obr. 4B).

Závěrem můžeme konstatovat, že dosažené výsledky prokázaly, že ethylen glycol je lepším kryoprotektantem pro zmrazování spermatu kapra obecného z důvodu průkazně nižší indukce osmotického a oxidačního stresu v průběhu zmrazování spermatu.

Klíčová slova: antioxidant, zmrazování, kryoprotektant, osmotický stres, spermie, pohyblivost spermií, stres.

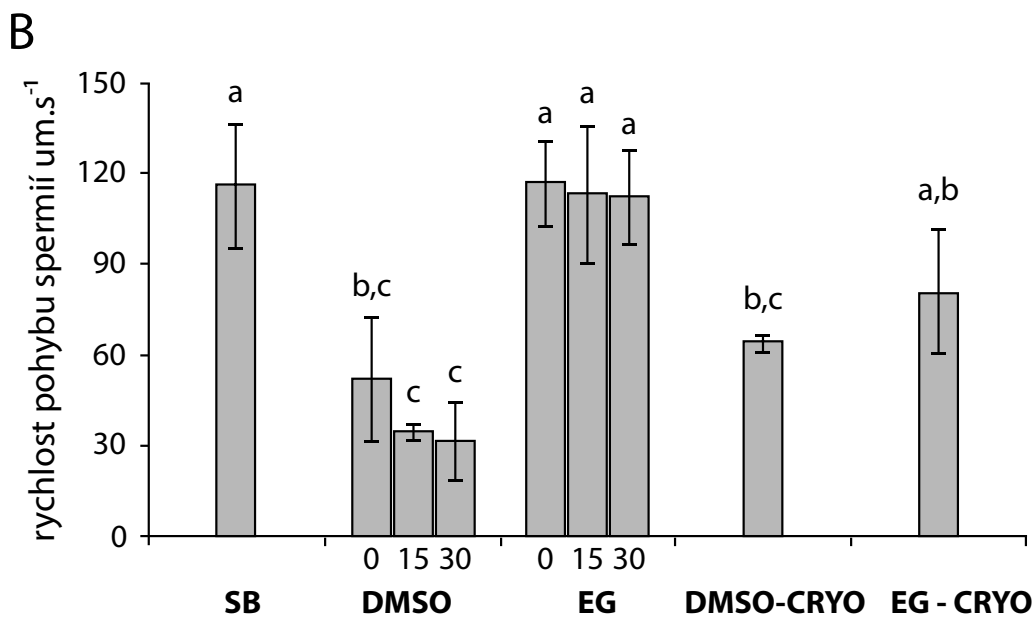
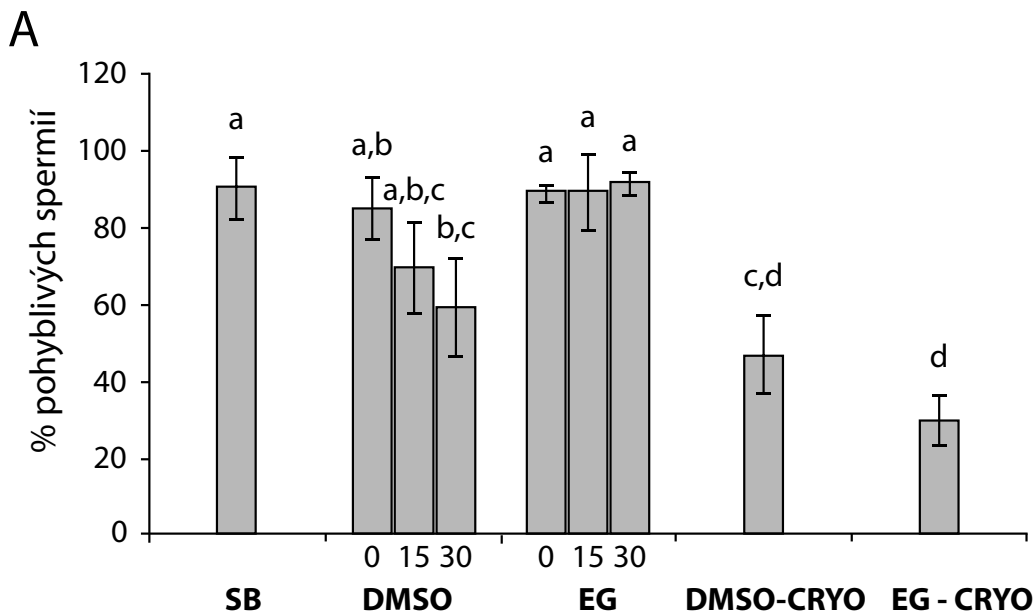
PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podporována projekty CZ.1.05/2.1.00/01.0024, MSM 6007665809, LC06073, IAA608030801, ME10015, QH92308, QH82118, QH82119, GAJU 003/2010/Z, 046/2010/Z, a 047/2010/Z, a projektem 200701029 (Čína).

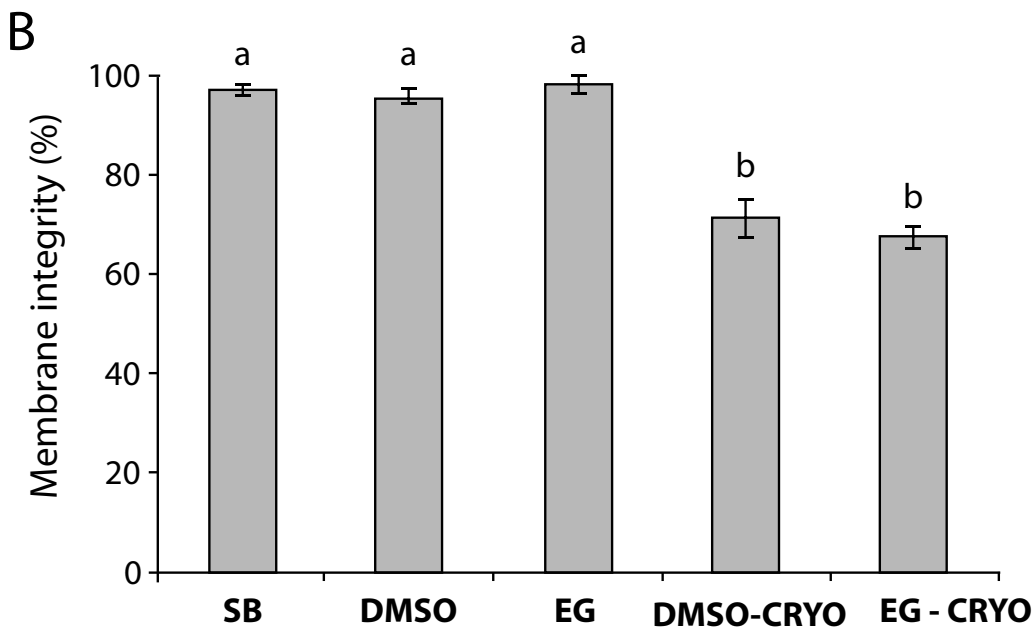
LITERATURA

- Devireddy R.V., Swanlund D.J., Olin T., Vincente W., Troedsson M.H.T., Bischof J.C., Roberts K.P., 2002. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol. Reprod.*, 66: 222–231.
- Flajshans M., Cosson J., Rodina M., Linhart O., 2004. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell. Biol. Int.*, 28: 955–959.
- Lahnsteiner F., Mansour N., Weismann T., 2002. The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). *Cryobiology*, 45: 195–203.
- Linhart O., Cosson J., Mims S.D., Shelton W.L., Rodina M., 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reproduction*, 124: 713–719.
- Lushchak V.I., Bagnyukova T.V., Husak V.V., Luzhna L.I., Lushchak O.V., Storey K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2005, 37:1670–1680.
- Marklund S., Marklund G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47: 469–474.

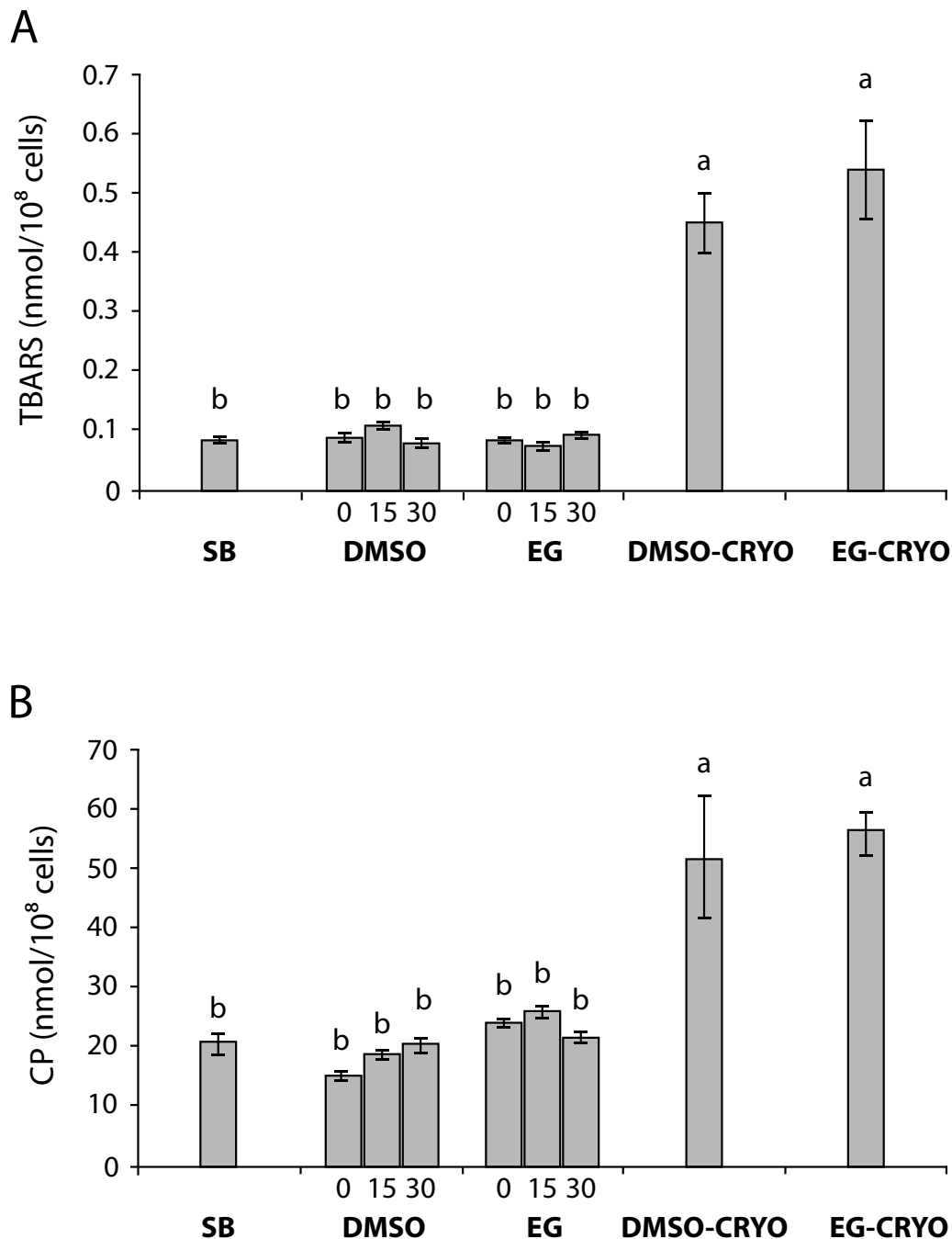
Obr. 1 Procento pohyblivých spermíí (A) a rychlost pohybu spermíí (B). SB označuje kontrolu (fyziologický roztok), DMSO označuje kryoprotektivum dimethylsulfoxid DMSO a délku ekvilibrace 0, 15 a 30 minut. EG označuje ethylenglykolu a délku ekvilibrace 0, 15 a 30 minut. DMSOCRYO označuje zmrazený vzorek spermátu z použitím kryoprotektiva DMSO a EGCRYO označuje zmrazený vzorek spermátu s použitím kryoprotektiva ethylenglykol. Data jsou uvedena jako průměry \pm SD. Horní indexy vyznačují významné rozdíly mezi analyzovanými vzorky (ANOVA, $P < 0,05$).



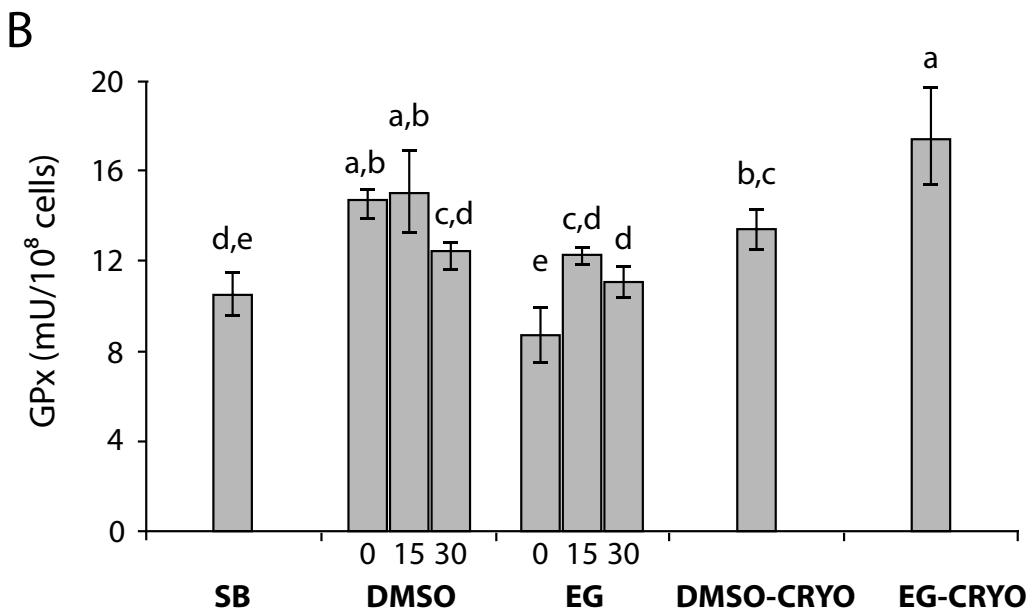
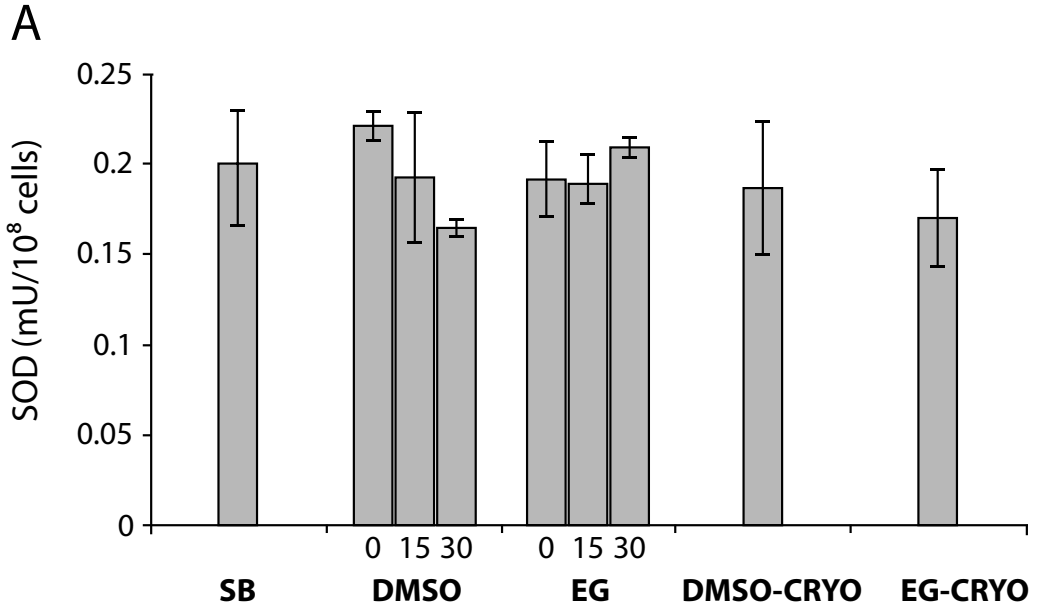
Obr. 2. Procento membránové integrity spermií. SB označuje kontrolu (fyziologický roztok). DMSO označuje kryoprotektivum dimethylsulfoxid DMSO a délku ekvilibrace 0, 15 a 30 minut. EG označuje ethylenglykolu a délku ekvilibrace 0, 15 a 30 minut. DMSOCRYO označuje zmrazený vzorek spermatu z použitím kryoprotektiva DMSO a EGCRYO označuje zmrazený vzorek spermatu z použitím kryoprotektiva ethylenglykol. Data jsou uvedena jako průměry \pm SD. Horní indexy vyznačují významné rozdíly mezi analyzovanými vzorky (ANOVA, $P < 0,05$).



Obr. 3. Úroveň thiobarbitur-acid-reaktivní látky (TBARS) (A) a karbonylové skupiny (CP) (B). SB označuje kontrolu (fyziologický roztok). DMSO označuje kryoprotektivum dimethylsulfoxid DMSO a délku ekvilibrace 0, 15 a 30 minut. EG označuje ethylenglykolu a délku ekvilibrace 0, 15 a 30 minut. DMSOCRYO označuje zmrazený vzorek spermatu s použitím kryoprotektiva DMSO a EGCRYO označuje zmrazený vzorek spermatu s použitím kryoprotektiva ethylenglykol. Data jsou uvedena jako průměry \pm SD. Horní indexy vyznačují významné rozdíly mezi analyzovanými vzorky (ANOVA, $P < 0,05$).



Obr. 4. Úroveň superoxid dismutázy (SOD) (A) a glutathion reduktázy (GR) (B). SB označuje kontrolu (fyziologický roztok). DMSO označuje kryoprotektivum dimethylsulfoxid DMSO a délku ekvilibrace 0, 15 a 30 minut. EG označuje ethylenglykolu a délku ekvilibrace 0, 15 a 30 minut. DMSOCRYO označuje zmražený vzorek spermatu z použitím kryoprotektiva DMSO a EGCRYO označuje zmražený vzorek spermatu s použitím kryoprotektiva ethylenglykol. Data jsou uvedena jako průměry \pm SD. Horní indexy vyznačují významné rozdíly mezi analyzovanými vzorky (ANOVA, $P < 0,05$).



VĚDECKÁ KONFERENCE DIVERSIFICATION IN INLAND FINFISH AQUACULTURE

T. POLICAR

Fakulta rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích uspořádala ve dnech 16. až 18. května 2011 první ročník mezinárodní vědecké konference s názvem Diversification in Inland Finfish Aquaculture (dále jen DIFA 2011). Symposia v Písku se zúčastnilo celkem 116 účastníků z 26 zemí. V průběhu setkání zaznělo celkem 52 ústních a 42 posterových prezentací týkajících se následujících témat: 1) Diverzifikace chovu sladkovodních ryb, 2) Inovace chovu ryb v rybnících, 3) Chov a biologie okounovitých ryb, 4) Chov a biologie jeseťů, 5) Výživa a chov juvenilních ryb, 6) Reprodukce ryb, 7) Genetika a šlechtění ryb, 8) Kvalita masa chovaných ryb. Celá akce byla podporována projektem CENAKVA – Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Evropskou akvakulturní společností EAS.

Vědecký výbor této akce, který pracoval ve složení Zdeněk Adámek, Jacky Cosson, Pascal Fontaine, Jana Pickova, Tomáš Policar, Harald Rosenthal a Damien Toner, ohodnotil na závěr nejlepší studentskou ústní a posterovou prezentaci. S ohledem na vysokou kvalitu všech výstupů vyhodnotil výbor vždy dvě nejlepší ústní a posterové prezentace studentů.

NEJLEPŠÍMI ÚSTNÍMI PREZENTACEMI BYLY VYHLÁŠENY NÁSLEDUJÍCÍCH PŘÍSPĚVKY:

Podhorec P., Socha M., Sokolowska-Mikolajczyk M., Policar T., Švinger V.W., Kouřil J.: Influence of temperature on hormonal induction of ovulation in tench (*Tinca tinca* L.).

Mráz J., Adámková V., Kozák P., Pickova J.: Carp flesh – a healthy product for prevention of cardiovascular diseases.

NEJLEPŠÍMI POSTEROVÝMI PREZENTACEMI BYLY VYHLÁŠENY NÁSLEDUJÍCÍ PŘÍSPĚVKY:

Hatef A., Alavi H., Linhartova Z., Rodina M., Policar T., Linhart O., Effects of mercury chloride and bisphenol A on sperm motility characteristics in *Perca fluviatilis*.

Hermelink B., Wuertz S., Trubiroha A., Rennert B., Kloas W., Schulz C.: Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*.

Všem oceněným studentům gratulujeme a přejeme mnoho úspěchů v jejich dalším studiu, vědecké práci a běžném životě.

Obr. 1. Skupinová fotografie účastníků vědecké konference DIFA 2011.



SLAVNOSTNÍ ZAHÁJENÍ ČINNOSTI CENAKVA A OSLAVY 90. VÝROČNÍ VÚRH NA ZÁMKU HLUBOKÁ NAD VLTAVOU

B. KOCMÁNKOVÁ

Dne 18. 5. 2011 se v prostorách Alšovy jihočeské galerie na zámku Hluboká nad Vltavou uskutečnilo slavnostní setkání u příležitosti zahájení činnosti Jihočeského výzkumného centra akvakultury a biodiverzity hydrocenóz (CENAKVA) a 90. výročí založení Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech (VÚRH) Fakulty rybářství a ochrany vod, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Na základě pozvání rektorky Jihočeské univerzity prof. Ing. Magdaleny Hrabánkové, CSc., prof.h.c. a děkana FROV prof. Ing. Otomara Linharta, DrSc. se slavnostního setkání zúčastnil předseda Senátu ČR Milan Štěch, radní Jihočeského kraje Ing. Vlasák a Ing. Štangel, starosta města Vodňany Ing. Viktor Blaščák, prezident rybářského sdružení Ing. Jan Hůda, předseda Grantové agentury ČR prof. PhDr. Petr Matějů, PhD, bývalá ministrně školství ČR PhDr. Miroslava Kopicová, hejtman Jihočeského kraje Mgr. Jiří Zimola, a další významní představitelé veřejného života, ministerstev, rybářských a vodohospodářských podniků, univerzit a vědecko-výzkumných institucí včetně stovky významných zahraničních hostů z celého světa. Přítomni byli představitelé European Aquaculture Society a účastníci mezinárodní konference Diversification in Inland Finfish Aquaculture (DIFA), kterou v Písku pořádala v předešlých dnech Fakulta rybářství a ochrany vod.

Při slavnostní příležitosti byly také předány pamětní medaile VÚRH udělované za zásluhy osobnostem, které se významným způsobem zasadily o rozvoj ústavu. Letos je z rukou doc. Ing. Pavla Kozáka, Ph.D. převzal bývalý ředitel VÚRH doc. Ing. Jan Kouřil, Ph.D. Ten tuto cenu dostal jako vyjádření díků za celoživotní výzkum zaměřený na umělou reprodukci ryb a především za jeho zápal pro vědu a patriotské cítění vzhledem k našemu ústavu ve Vodňanech. Druhým oceněným byl bývalý rektor Jihočeské univerzity prof. PhDr. Václav Bůžek, CSc., jeden z prvních strůjců myšlenky vzniku samostatné Fakulty rybářství a ochrany vod a podporovatel projektu Jihočeského výzkumného centra akvakultury a biodiverzity hydrocenóz.

Na toto nové výzkumné centrum se Jihočeské univerzitě podařilo získat z Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace MŠMT ČR finanční podporu ve výši necelých 274 milionů korun. Tyto prostředky budou využity na rekonstrukci a rozšíření tří staveb a venkovní žlabovny, jejichž dokončení je plánováno na závěr roku 2012. Od roku 2011 je pořizována přístrojová laboratorní technika. Během roku 2012 budou prostory vybaveny kancelářským a laboratorním nábytkem.

Oslavy 90. výročí VÚRH a zahájení projektu CENAKVA na zámku Hluboká nad Vltavou skončilo slavnostním přípitkem a s přáním zdárného dosažení všech vytyčených cílů. Pokud vše půjde podle plánu, bude v roce 2013 další důvod k oslavám, neboť ve Vodňanech zahájí činnost největší a nejmodernější vědecko-výzkumné rybářské centrum v Evropě.

Obr. 1. Skupinové foto u příležitosti oslav 90. výročí VÚRH a slavnostního zahájení činnosti CENAKVA.



Pokyny pro autory

ODBORNÉ ZAMĚŘENÍ ČASOPISU

Bulletin VÚRH přijímá k publikování a následně po lektorování uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení, přehledové referáty a recenze, týkající se všech aspektů sladkovodního rybářství, ichtyologie a akvakultury. Tato odborná oblast zahrnuje především vědecké práce týkající se: biologie, fyziologie, reprodukce, genetiky, šlechtění, chovu, výživy a nemocí sladkovodních ryb a dále také sladkovodní ekologie, toxikologie, hydrobiologie, rybářské statistiky a ekonomiky chovu ryb. Příležitostně jsou v něm publikovány i příspěvky přednesené na vědeckých a odborných konferencích či seminářích.

AUTORSKÁ PRÁVA PŘEDKLÁDANÉ PRÁCE

Autor předkládané práce je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. Autor se při předkládání práce do redakce časopisu zaručuje, že tato práce je jeho autorské dílo, které nebylo nikde publikováno a neporušuje (či nebude porušovat) autorská díla třetích osob. První autor předkládané práce přebírá veškerou zodpovědnost za všechny spoluautory práce. Autoři práce se zaručují, že žádná část jejich práce nebude dále publikována či nijak rozšiřována bez souhlasu vydavatele Bulletinu VÚRH Vodňany.

V případě využití částí děl jiných autorů se autor zavazuje dodržovat citační pravidla dle § 31 autorského zákona 121/2000 Sb.

PROCES PŘEDLOŽENÍ, POSOUZENÍ, LEKTOROVÁNÍ A NÁSLEDNÉ UVEŘJNĚNÍ PŘEDKLÁDANÉ PRÁCE

Autoři předkládají práce (především odborné a přehledové články) výhradně elektronicky bez tištěného originálu na emailovou adresu dvorakz@frov.jcu.cz. Předložená práce je posouzena redakcí časopisu. Poté je práce zaslána ke korektuře. Dva nezávislí odborní oponenti z jiných českých vědecko-výzkumných institucí posoudí předloženou práci z hlediska odborného a věcného. Po korektuře a případných vyžádaných úpravách, které jsou realizovány a odsouhlaseny samotnými autory, je předložená práce doporučena k uveřejnění. O konečném uveřejnění prací rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k vědeckému významu, přínosu a kvalitě předložené práce. Před konečným uveřejněním první autor práce odsouhlasí publikování práce v konečné podobě vlastním podpisem na speciálním formuláři „Souhlas s vytištěním dané publikace“. Po tomto odsouhlasení se práce stává majetkem vydavatele. Všechna následná autorská práva jsou poté chráněna copyrigthem vydavatele.

TECHNICKÁ ÚPRAVA RUKOPISU

Text příspěvku bude zpracovaný v českém jazyce v programu Microsoft Word (pokud možno v co nejaktuálnější verzi) s příponou *.rtf. Vyžadovaný formát příspěvku je: formát stránky A4; řádkování 2; zarovnání textu do bloku; font Times New Roman CE; základní písmo textu velikosti 12; okraje 2,5 cm po všech stranách; stránky i řádky textu budou průběžně číslovány; u každého odstavce bude odsazení prvního řádku 1 cm; žádný text ani informace nesmí být v záhlaví ani v zápatí stránky. Text je doporučeno graficky upravit tak, jak si jej autor přeje otisknout, tedy s vložením tabulek, grafů i obrázků přímo do textu. Vyžaduje se tabulky přímo vytvářet v programu Microsoft Word. Obrázky a grafy se vyžaduje vkládat do textu jako grafický formát „obrázek“ a to v černobílém provedení (stupních šedi). Všechny grafy a obrázky musí být dělány s dostatečným rozlišením, velikostí písma atd., aby byly přehledné a čitelné i po zmenšení na jednu stránku formátu velikosti B5. Nepřehledné, barevné či jinak neodpo-

vídající grafy a tabulky nebudou do textu zařazeny. Pro kvalitnější otištění se vyžaduje grafy a obrázky zaslat ještě elektronicky ve formátu *.tif, *.bmp, *.jpg. Na každou tabulku, graf či obrázek musí být odkaz v textu (jako např.: tab. 1 nebo obr. 1). U tabulek nejsou povoleny žádné barevné prvky ani stínování buněk tabulky. Nadpis a legenda tabulky, grafu a obrázku jsou vždy umístěny nad tabulkou, grafem či obrázkem velikostí písma 12, s řezem písma obyčejné. Pod českým názvem je vyžadován anglický překlad nadpisu a legendy, který je psán kurzívou s velikostí písma 12.

V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě SI. Pokud autor používá v práci zkratku jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byla zkratka při prvním použití vysvětlena. V názvu práce a v souhrnu se použití zkratk nedoporučuje. Jakékoliv cizí názvosloví je nutné při prvním použití v textu vysvětlit v českém jazyce. Při první zmínce v textu o živočišném či rostlinném taxonomickém subjektu je nutné uveřejnit jejich vědecký český (pokud je znám) i latinský název.

VLASTNÍ ÚPRAVA PRÁCE

Název

Název se píše velkými písmeny, tučně se zarovnáním na střed, velikost písma 14. Anglický název se uvede hned pod český název velkými písmeny, kurzívou (ne tučně), velikost písma 13 se zarovnáním na střed. Mezi českým a anglickým názvem není žádné odsazení řádků.

Autoři

Autorský kolektiv se uvede pod název práce s odsazením jednoho řádku, velikost písma 12, tučně, zarovnání na střed, všechna písmena velká. Uvádí se nejprve počáteční písmeno křestního jména autora následované celým příjmením daného autora. Jednotliví autoři se od sebe oddělují čárkou, za počátečním písmenem křestního jména daného autora se dává tečka (bez čárky).

Afilace

Pod jména autorů se s odsazením jednoho řádku uvádí adresy pracoviště autorů včetně e-mailových adres. Velikost písma 10, kurzíva, zarovnání do bloku. Jsou-li autoři z více pracovišť, uvede se na každý řádek jedno pracoviště a u jednotlivých autorů se jejich příslušnost k adrese vyznačí číslicí s horním indexem za jejich příjmením.

Abstrakt

Po afilaci autorů s odsazením 2 řádků následuje anglický abstrakt. Abstrakt se píše kurzívou, velikost písma 10, zarovnání do bloku. Vypracování abstraktu je nutné věnovat zvláštní péči. Autor do něj má shrnout vše, co je na jeho práci pozoruhodné a nové a co má být zdokumentováno. Abstrakt má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru článku, nikoli však jeho pouhým popisem. V abstraktu se nepoužívají žádné zkratky. Abstrakt musí obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Abstrakt se uvádí jen v jednom odstavci a jeho rozsah je maximálně 250 slov.

Klíčová slova

Klíčová slova následují s odsazením 1 řádku po anglickém abstraktu v českém a následně anglickém jazyce. Velikost písma 10, zarovnání do bloku, klíčová slova v českém jazyce – obyčejný řez písma, klíčová slova v anglickém jazyce – kurzíva.

Úvod

Má obsahovat současný stav studovaného problému a hlavní důvody, proč byla práce uskutečněna. Je nutno se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům.

Materiál a metodika

Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní, jinak postačuje citovat autora metod a uvádět jen případné odchylky. Je popsán pokusný materiál. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoliv z odborníků mohl podle něho a při použití uvedených citací práci opakovat. Členění textu na podseky je možné, grafické řešení ale musí být řešeno přehledně a srozumitelně.

Výsledky

Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy a hodnoty. Doporučuje se dát přednost grafickému vyjádření a minimalizovat počet tabulek. Tabulky, grafy a obrázky v textu nesmí obsahovat zdvojené informace. Tzn., co se vyjádří v textu, se již nesmí uvádět v tabulce či jiném grafickém vyjádření.

Diskuse

Obsahuje zhodnocení práce a vlastní postřehy autorů. Výsledky práce se konfrontují s dříve publikovanými výsledky, pokud mají souvislost nebo jsou s předloženou prací srovnatelné.

Souhrn (v českém jazyce)

U původních prací (včetně přehledových prací) následuje po diskusi souhrn v českém jazyce, který je obdobou anglického abstraktu na začátku předložené práce.

Poděkování

Zde se uvádí především titul, číslo a zdroj finančních prostředků poskytnutých k provádění publikované práce a dále poděkování těm spolupracovníkům, kteří svým úsilím jakkoliv významně přispěli k realizaci publikované práce.

Literatura

Všechny publikace citované v textu příspěvku musí být zahrnuty do seznamu použité literatury. Velikost písma u seznamu literatury je 10. První řádek každého literárního odkazu je předsazen o 1 cm.

Literární odkazy v textu musí obsahovat jméno autora a rok vydání, podle vzoru: (Al-Sabti, 1986); ... jak uvádí Linhart (1991) ... Práce kolektivu tří a více autorů budou v textu citovány podle vzoru: (Kouřil a kol., 1988); ... podle Streisingera a kol. (1984)... V těchto případech však budou u příslušného příspěvku v seznamu literatury uvedeni všichni spoluautoři.

Seznam literatury bude sestaven abecedně podle jmen autorů a chronologicky u jednotlivých autorů podle pořadí: 1) chronologický seznam publikací autora, 2) chronologický seznam publikací téhož autora s jedním spoluautorem, 3) chronologický seznam publikací téhož autora s více než jedním spoluautorem. Více prací jednoho autora v témž roce bude odlišeno písmenem (např. 1989a, 1989b, atd.).

PUBLIKACE BUDOU V SEZNAMU LITERATURY UVEDENY PODLE VZORU:

Publikace v periodikách:

Svobodová, Z., Vykusová, B., Máchová, J., Bastl, J., Hrbková, M., Svobodník, J., 1993. Monitoring cizorodých látek v rybách z řeky Jizery v lokalitě Otradovice. Bull. VÚRH Vodňany, 29(1): 28–42.

Publikace z konferencí ve sbornících a zvláštních vydáních periodik:

Flajšhans, M., Ráb, P., Kálal, L., 1993. Genetics of salmonids in Czechoslovakia: Current status of knowledge. In: J.G. Cloud and G.H. Thorgaard (Editors), Genetic Conservation of Salmonid Fishes. Proceedings of NATO.ASI, June 24 – July 5 1991 at Moscow, ID and Pullman, WA, U.S.A. Plenum Press, New York: pp. 231–242.

Knižní publikace:

Bartík, M. and Piskač, A. (Editors), 1981. Veterinary toxicology. Developments in Animal and Veterinary Sciences, 7. Elsevier, Amsterdam, 346 pp.

Další zdroje publikací:

Citace nepublikovaných příspěvků se neuvádějí. Informace v dopise se uvádí zkratkou (in litt.), osobní sdělení zkratkou a časovým údajem, tj. rokem (Fuka, os. sděl., 1993); podle Fuky (os. sděl., 1993). Při nedostupnosti původního zdroje se citace uvádějí formou: Meske, 1983 (ex Hamáčková a kol., 1993).

PŘÍSPĚVKY, KTERÉ NESPLŇUJÍ POŽADAVKY DLE POKYNŮ PRO AUTORY, BUDOU PŘED POSOUZENÍM A VLASTNÍM LEKTOROVÁNÍM VRÁCENY ZPĚT K PŘEPRACOVÁNÍ.
