

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

Využití zmrazování spermatu ve šlechtění a ochraně genofondu kapra
obecného

Autoři

**Sotnikov A., Dzyuba B., Rodina M., Kašpar V., Prchal M., Kocour M.
Linhart O.**

č. 210

Vodňany

ISBN

Vydání publikace bylo uskutečněno za finanční podpory:
Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky
projekt Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK21010141 Management
gamet a reprodukce při ochraně genetických zdrojů a šlechtitelském programu kapra
obecného v podmínkách akvakultury ČR

Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:

- Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky – projektům: Národní agentury pro zemědělský výzkum QK21010141 – 50 %
- MŠMT projektu CENAKVA projektu CENAKVA (LM2023038) – 25 %
- MŠMT projektu Reprodukční a genetické postupy pro uchování biodiverzity ryb a akvakulturu (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007370) – 25 %

Obsah:

- 1. Cíl metodiky**
- 2. Proč vytváříme metodiku zmrazování spermatu pro šlechtitelské, případně produkční chovy kapra**
- 3. Teorie kryokonzervace spermatu u kapra obecného**
- 4. Vlastní popis metodiky**
 - 4.1. Základní charakteristika spermií a spermatu kapra obecného**
 - 4.2. Výběr a příprava vhodných samců (mlíčáků) kapra k odběru spermatu**
 - 4.3. Kontrola kvality spermatu**
 - 4.4. Vlastní zmrazování (kryokonzervace) spermií kapra ve velkých objemech**
 - 4.5. Uložení zmrazených dávek spermatu do velkokapacitních kontejnerů pro dlouhodobé uchování**
 - 4.6. Evidence zmrazeného spermatu**
 - 4.7. Rozmrazení spermatu**
 - 4.8. Osemenění, oplození, odlepkování a inkubace jiker**
 - 4.9. Úroveň oplozenosti, líhnivosti, růstu a přežití kapra obecného při použití zmrazeného spermatu**
- 5. Srovnání „novosti postupů“**
- 6. Popis uplatnění certifikované metodiky**
- 7. Ekonomické aspekty**
- 8. Seznam použité související literatury**
- 9. Seznam publikací, které předcházely metodice**

1. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je poskytnout praktický návod na zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio*) ve větších objemech. Tato metodika částečně vychází z metodiky Rodiny a kol. (2010), ale s ohledem na zvýšení objemu zmrazovaných dávek je z našeho pohledu dobře využitelná nejen pro uchování genofondu, ale i pro šlechtitelské a chovatelské účely. Metodika popisuje zmrazování spermatu s využitím tekutého dusíku. Jsou zde detailně popsány kroky jako optimalizace složení kryoprotektivního média, poměry ředění spermatu a kryoprotektivního média, rychlost zmrazování a způsob skladování zmrazeného spermatu. Samozřejmostí je i popis způsobu rozmrazování spermatu a jeho využití při oplozování jiker. Všechny tyto kroky se u zmrazování spermatu ve větších objemech (cca 4 ml) velmi liší oproti metodice Rodiny a kol. (2010), která popisuje zmrazování spermatu v pejetách o objemu 0,5 ml. Zejména dosavadní metodické postupy týkající se složení kryoprotektivního média, poměru ředění spermií a rychlosti zmrazování a rozmrazování nelze v případě zmrazování spermatu ve velkých objemech vůbec využít. Kromě vlastního postupu zmrazování spermatu v tekutém dusíku, které je jediným nástrojem pro dlouhodobé uchování oplození schopných samčích pohlavních buněk ryb a jeho použití, se metodika zaměřuje i na srovnání užitkovosti obsádek kapra obecného vzniklých s využitím čerstvého a zmrazeného spermatu.

2. Proč vytváříme metodiku zmrazování spermatu pro šlechtitelské, případně produkční chovy kapra

Produkce tržního kapra obecného v ČR je za posledních deset let poměrně stabilní a pohybuje se na úrovni 17 000 t ročně (web RS ČR, Produkce ryb a trh, 2023). Kapr je stále nejvýznamnějším hospodářským rybím druhem v ČR a také v rámci EU patří Česká republika, Polsko a Maďarsko ke státům produkujícím 68 % ročního objemu produkce kapra. V celosvětovém měřítku ukazují historické záznamy významný nárůst produkce kapra obecného z 1,2 milionu tun v roce 1990 na 4,4 miliónu tun v roce 2020, přičemž většina produkce pochází z akvakultury. Hlavním producentem kapra ve světě je Čínská lidová republika (Shazada a kol., 2023).

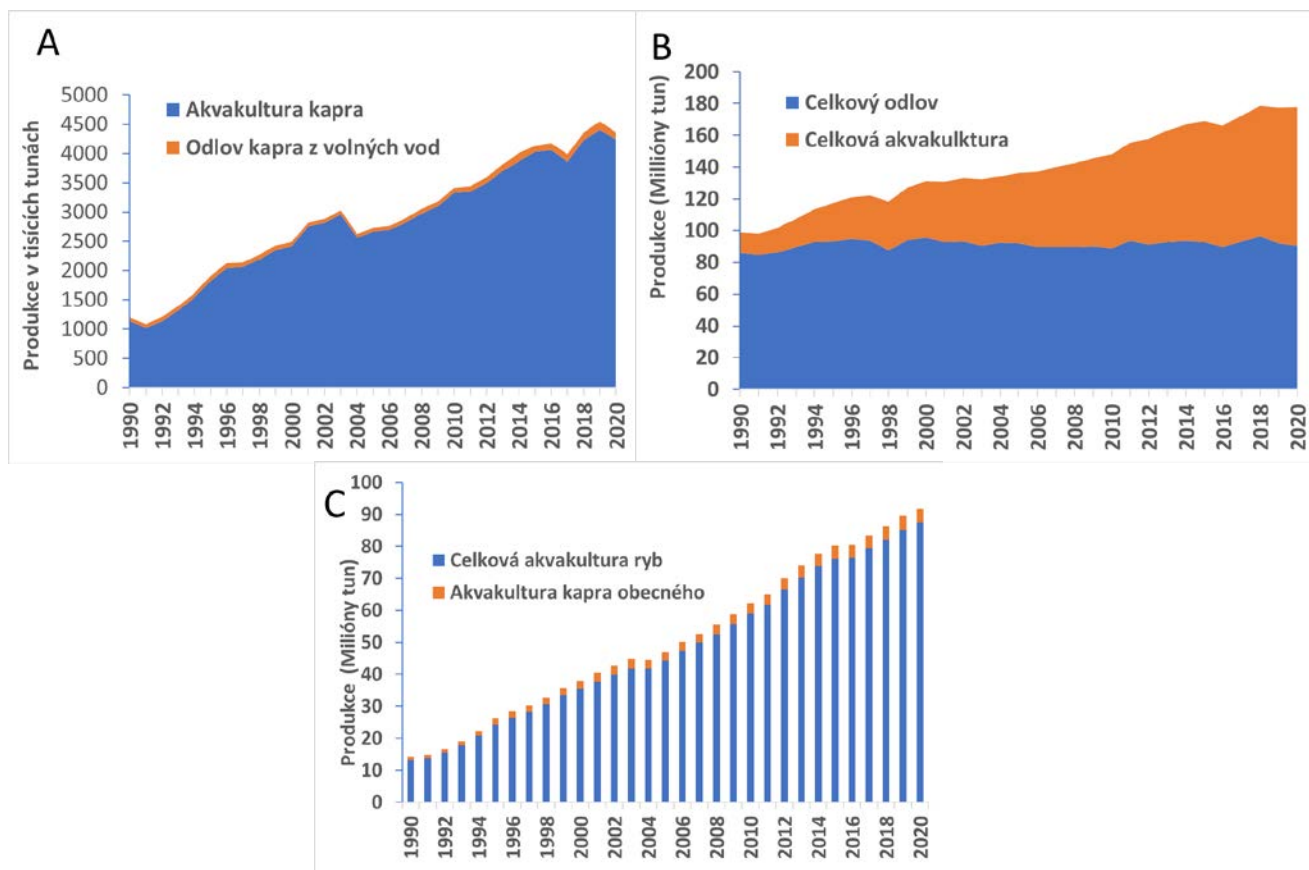
Kapr obecný má nejdelší historii domestikace mezi rybími druhy chovanými v akvakultuře (Balon, 1995). Na celém světě existuje mnoho užitkově i exteriérově různorodých plemen kapra obecného. Pro produkční chov v rybníční akvakultuře se ale v zásadě využívají zejména produkční kříženci plemen s cílem dosažení nejlepších užitkových vlastností. Uchovávání plemen kapra obecného v živých genových bankách v rybníčním chovu je důležité pro ochranu genofondu i pro šlechtitelské programy. Česká republika je dobrým příkladem země, kde ochrana plemen kapra je dlouhodobou aktivitou jednotlivých chovatelů a Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech (dříve Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického) Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Od roku 1993 je ochrana genetických zdrojů ryb podporována programem MZe nesoucím název: Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat (Flajšhans a kol., 1999). V současné době program aktivně využívá obou možných strategií, tedy *in situ* uchování generačních ryb specifických rybích druhů, plemen a linií a *in vitro* uchování kryokonzervovaného spermatu v kryobance. Uchování spermatu v kryobance je nezbytné pro uchování spermatu z lokálních plemen kapra, které představují historické dědictví českého rybníkářství, datované od 19. století, a zároveň představují zálohovaný genetický materiál pro šlechtění. Výše zmíněný program využívá různé zmrazovací kontejnery, různá kryoprotektivní média a režimy zmrazování, které byly

metodicky propracovány (Dzyuba a kol., 2013; Boryshpolets a kol., 2017; Linhart a kol., 2000). Po dvaceti letech využívání zmrazování spermatu a jeho dalšího výzkumu však stále přetrvávají nedostatky v technice kryokonzervace vedoucí k problémům s využitím zmrazené spermy rutinně ve šlechtitelském programu kapra.

Využití zmrazeného spermatu přinášelo poměrně nestabilní výsledky, což bylo zapříčiněno nestálým množstvím vhodných živých spermií schopných oplození. Během zmrazování buněčné suspenze led totiž postupně přirůstá a krystaly tlačí buňky do úzkých kanálků koncentrovaného roztoku, kde dochází k mechanickému stlačování buněk, tzv. „packing“ efektu (Sotnikov a kol., 2023). Většina doposud používaných protokolů pro zmrazování spermií počítá s významným naředěním zmrazovaného spermatu. Více zředěné spermie mají větší šanci uniknout tomuto mechanickému poškození. Na druhou stranu, přestože jsou získané spermie potenciálně použitelné k oplození, jejich celkové množství zůstává nadále příliš nízké na to, aby umožnilo efektivní využití v rozsahu potřebném pro cílenou reprodukci, například při snaze o rozšíření populace nebo její udržitelné obnovení. Proto bylo nutné se vydat cestou, která by umožňovala mrazit co možná nejméně ředěné sperma. Touto cestou je ředění spermatu hypotonickým extenderem, který může i při nízkém stupni ředění packing efekt omezit (Sotnikov a kol., 2024).

Rovněž vysoký objem kryomédia, tedy dimethylsulfoxidu (DMSO) či metanolu, komplikuje proces oplodnění a následné odstranění lepivosti jiker kapra. Při umělé reprodukci kapra se při využití čerstvého spermatu k osemenění jiker používá několik mililitrů (5-10 ml) spermatu na 1 kg jiker (500-700 000 ks jiker) (Linhart a kol., 2015). Pro produkci užitkových obsádek nebo pro širší šlechtitelskou práci je vyšší množství jiker a spermatu nezbytné. Při zmrazování spermatu do pejet je ale velmi problematické takové množství spermatu zajistit.

Zároveň je nutné konstatovat, že nízká koncentrace spermií s nízkým procentem pohyblivých spermií po rozmrazení neumožňuje dosáhnout obvyklé koncentrace pohyblivých spermií ve fertilizačním objemu (Ginzburg a kol., 1972; Linhart a kol. 2020) k dobré aktivaci jiker. Proto bylo nutné vytvořit novou metodiku zmrazování spermatu, která by umožnila využití takového spermatu při běžné umělé reprodukci kapra. To byl jeden z cílů projektu NAZV č. **QK21010141**, jehož výstupem je tato metodika.



Obr 1. (A) Celosvětová produkce ryb rybolovem s nárůstem produkce akvakultury od roku 1990 do roku 2020. (B) Celosvětová produkce kapra obecného (*Cyprinus carpio*) lovem a akvakulturou. (C) Akvakulturní produkce kapra obecného ke světové produkci rybí akvakultury (převzato ze Shazady a kol., 2023).

3. Teorie kryokonzervace spermatu u kapra obecného

Kryokonzervace, nebo také „mražení či zmrazování“ je metoda uchování živých buněk a tkání při velmi nízkých teplotách do -196°C dosahovaných obvykle s využitím tekutého dusíku. Životaschopnost buněk je zajišťována pomocí ochranných látek, tzv. kryoprotektantů. Kryoprotektanty chrání integritu buněk vůči působení krystalů ledu, změnám iontové koncentrace a změnám struktury buněčné membrány (Linhart a kol., 2012). U kapra používáme jako kryoprotektanty nejčastěji DMSO, etylenglykol nebo metanol (Sotnikov a kol., 2023, 2024). Více o principech kryokonzervace je popsáno v metodice Rodiny a kol. (2010). Optimalizace protokolu kryokonzervace spermií kapra v kapalném dusíku spočívala ve stanovení:

- 1) složení nejvhodnějšího kryoprotektantu,
- 2) poměru ředění spermatu s kryoprotektantem,
- 3) optimální rychlosti zmrazování a rozmrazování,
- 4) a podmínek pro oplodnění jiker.

Zejména u prvních třech bodů je optimalizace protokolu závislá i na objemu a tvaru budoucích kryokontejnerů, ve kterých je sperma zmrazováno. Různé typy kontejnerů (pejety, kryozkumavky) pro kryokonzervaci mají různé poměry povrchu k jejich objemu a vytvářejí rozdílnou teplotně-energetickou kapacitu vzorku. Pejeta má tvar slánky, tedy k jejímu objemu

má relativně velký povrch. Naopak kryozkumavka má tvar klasické zkumavky, tedy k objemu relativně menší povrch než u pejety. Tato skutečnost dramaticky změnila podmínky tuhnutí roztoku a profily tvorby ledových krystalů, což si vyžádalo úpravu obsahu kryoprotektantu a profil rychlosti zmrazování (Sotnikov a kol., 2023, 2024):

- **Použití vhodného kryoprotektantu**

Kryoprotektant, jak již bylo zmíněno, je směs látek sloužících k ochraně spermií při zmrazování, k naředění jejich koncentrace a k adaptaci spermií na určitý osmotický tlak a pH. Kryoprotektant vyvazuje vodu ze spermií, omezuje formování nežádoucích krystalů ledu co do velikosti a tvaru, váže elektrolyty, čímž se zamezuje tvorba koncentrovaných residuálních nezmrazených roztoků a snižuje se bod tuhnutí zmrazovaného roztoku (Rodina a kol., 2010). U kapra se pro zmrazování velkých objemů spermatu (cca 4 ml) jako nejvhodnější ukázal směsný roztok, který v 1 litru obsahuje 3,51 g NaCl, 1,03 g sacharózy, 50 ml ethylenglykolu a 220 ml metanolu (Dokina a kol., 2019; Sotnikov a kol., 2024).

- **Úroveň ředění**

Kryoprotektant vychlazený na stejnou teplotu jako sperma, tedy cca 4 °C, se míchá se spermatem v poměru 1:1 (Sotnikov a kol., 2024). V minulosti se obvykle používal poměr ředění spermatu s kryoprotektantem na úrovni 1:5 (Linhart a kol., 2000). Výhodou nižšího ředění je to, že v daném objemu zmrazovaného směsi spermatu a kryoprotektantu je výrazně vyšší počet spermií než při ředění 1:5.

- **Zmrazovaný objem**

V rámci programu na ochranu genofundu kapra se dříve zmrazovaly objemy spermatu a kryoprotektantu v poměru 1:5 do 1 ml v kryozkumavkách (Linhart a kol., 2000) a kolem 0,5 ml v pejetách (Rodina a kol., 2010). Nově lze výše uvedenou směs zmrazovat v kryozkumavkách o objemu 4,5 ml (Sotnikov a kol., 2024). Kryozkumavky se vkládají do zmrazovacího automatu s výchozí teplotou cca 6 °C dle teploty spermatu naředěného kryoprotektantem. Jedna kryokumavka se spermatem o objemu 2,25 ml (tedy objemem neředěného spermatu) by měla stačit k oplození 200 g jiker.

- **Rychlost zmrazování spermatu vždy ovlivňuje úspěšnost zmrazení**

V průběhu zmrazování jsou krystaly ledu formovány v extracelulárním roztoku. Voda se uvolňuje z buněk s vyrovnáváním osmotických úrovní až po dosažení tzv. osmotické ekvilibrace (Linhart a kol., 2012). Vlastní mrazení dávek spermatu se provádí v parách tekutého dusíku programovatelného zařízení (firma Planer, série Kryo III, Velká Británie) specifickým dvoustupňovým programem od +6 °C do – 160 °C s finálním přenesením zmrazených dávek do kapalného dusíku (- 196 °C, Sotnikov a kol., 2024).

- **Rychlost rozmrazení spermatu**

Rychlost rozmrazování u spermií kapra je stejně důležitá jako rychlost zmrazování. Platí, že čím rychlejší rozmrazení, tím lépe. Při pomalém rozmrazování hrozí rekrystalizace vody a mechanické poškození rozmrazovaných buněk. Obecně lze pro pejety o objemu 0,5 ml použít vodu 40 °C teplou, v níž rozmrazujeme sperma po dobu do 6 s (Rodina a kol., 2010). Naopak kryozkumavky o velkém objemu spermatu 4,5 ml je vhodné rozmrazovat ve vodní lázni o teplotě 60 °C po dobu 100 s (Sotnikov a kol., 2024).

4. Vlastní popis metodiky

Metodika popisuje praktický postup efektivního dlouhodobého uchování spermatu kapra obecného ve velkých dávkách a jeho následného využití v rámci šlechtitelské činnosti a ochraně genofondu na rybářských pracovištích.

4.1. Základní charakteristika spermií a spermatu kapra obecného

Spermie kapra obecného, jako všechny spermie kostnatých ryb, mají fylogeneticky primitivní stavbu, tzn. kulatou hlavičku bez akrozomu s velmi tenkým bičíkem (Billard a kol., 1995). Vybíjejí se v cystách varlat lokalizovaných v břišní dutině, odkud se zralé spermie po prasknutí cyst dostávají do chánovodů a v průběhu „tření“ jsou vypuzeny do vnějšího prostředí (Alavi a kol., 2008). Sperma kapra je mléčné barvy a poměrně husté konzistence. Je tvořeno buněčnou frakcí (spermiemi) a nebuněčnou frakcí (semennou plazmou), která je produktem především Sertoliho buněk. Semenná plazma svým složením poskytuje spermiím ochranné a výživné látky a obvykle se v ní spermie nepohybují (Linhart a kol., 2012). Při výtěru je sperma kapra, byť kapr nemá močový měchýř, velmi omezeně naředěno močí (Perchec a kol., 1995). Moč pouze minimálně kontaminuje sperma a zásadně nemění jeho osmolalitu a iontové složení, proto v běžné praxi není nutné odebírat sperma kapra do imobilizačního roztoku. Imobilizační roztok, někdy označovaný také jako extendor, je vhodné použít v případech, že je potřeba uchovat sperma po dobu delší než čtyři hodiny (Shazada et al., 2025).

4.2. Výběr a příprava vhodných samců (mlíčáků) kapra k odběru spermatu

V rámci umělé reprodukce kapra zpravidla vycházíme z přesně vedené evidence individuálně značených generačních ryb (nejčastěji pomocí mikročipu), u kterých provádíme předvýtěrový výběr na základě jejich zdravotního stavu a kondice (tzv. negativní výběr) nebo jiných parametrů (užitkových, genetických apod.; tzv. pozitivní výběr). Podrobnosti k evidenci, značení, výběru, předvýtěrové přípravě a vlastnímu umělému výtěru samců jsou k dispozici v metodice Gely a kol. (2009). Specifické záležitosti vztahující se k výtěru samců za účelem kryokonzervace jejich spermatu jsou uvedeny v metodice Rodina a kol. (2010). Doporučujeme před vlastním umělým výtěrem samce uvést do anestezie (Kolářová a kol., 2007; Gela a kol., 2009), čímž snížíme stres ryb, a navíc ryby v relaxační fázi lépe uvolňují sperma. Pokud provedeme umělý výtěr samců kapra správně, můžeme očekávat v průměru přibližně 20–40 ml spermatu od jedince s relativním objemem spermatu 3,2 až 11,1 ml na 1 kg hmotnosti mlíčáka (Shazada a kol., 2023). Je důležité, aby nádoby pro odběr spermatu měly objem alespoň 2x větší, než je množství do nich odebíraného spermatu a aby byly uzavíratelné bez možnosti proniknutí vody do nádoby nebo spermatu z nádoby. Jako ideální nádoby se jeví kultivační kontejnery o objemu 250 ml. Do jedné nádoby odebíráme vždy sperma jednoho samce. Velmi důležité je precizní označení každé nádoby, aby nebylo pochyb o původu spermatu (plemeno či chovná skupina, identifikace konkrétního jedince) (viz obr. 2).



Obr. 2. *Sperma odebrané do kontejnerů v termoboxu při teplotě 4 °C (převzato z Rodina a kol., 2010). Kontejnery jsou uskladněny naležato, kvůli maximalizaci styčné plochy spermatu s aerobním prostředím.*

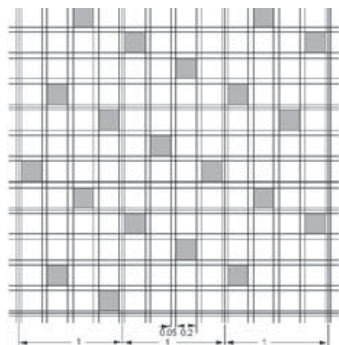
Odebrané sperma uchováváme po celou dobu manipulace při teplotě ideálně kolem 2-4 °C. V podmínkách rybích líhní se jako nejschůdnější jeví skladování v termoizolačních bednách s šupinkovým nebo vločkovým ledem. Mezi ledem a nádobami se spermatem by měla být tenká bariéra (tenká látka, igelit apod.). Zabráníme tím namrznutí spermatu (viz metodika Rodiny a kol. 2010 a Linhart a kol., 2012), které se projevuje změnou konzistence spermatu (mírné zrosolovatění či koagulace spermatu).

4.3. Kontrola kvality spermatu

Sperma hodnotíme makroskopicky a mikroskopicky. Makroskopicky hodnotíme barvu a konzistenci. Sperma pro zmrazování musí vykazovat mléčnou barvu. Sperma může být kontaminováno krví (zbarvení do růžova), výkaly (zbarvení do žlutozelené), nebo vodou či slizem ryb. Obdobně jako u přemrzlého spermatu vede kontaminace větším množstvím vody a slizu ke zrosolovatění či koagulaci spermatu. Sperma mírně kontaminované krví můžeme ke zmrazování použít. Sperma kontaminované výkaly, slizem nebo vodou vždy ze zmrazování vyřadíme (Linhart a kol., 2012).

Mikroskopicky sperma posuzujeme podle metodiky Linhart a kol. (2011). Zajímá nás procento motility spermií a koncentrace spermií. Pro posouzení motility spermií je nejvhodnější použít mikroskop zvětšující 100-200x (objektiv 10-20x s okuláry 10x) s tmavým polem nebo fázovým kontrastem. Lze ale použít i běžný mikroskop (Linhart a kol., 2012). Na podložní sklo pod mikroskopem kápneme kapku 50-100 µl destilované vody s 0,125 % Pluronicem F-127 (katalogové č. P2443, Sigma-Aldrich) pro eliminaci přilepování spermií na podložní sklíčko. Špičku suché a čisté preparační nebo injekční jehly namočíme do spermatu a lehkým ťuknutím přeneseme sperma do kapky na podložním skle. Pomocí jehly okamžitě rozmícháme sperma v kapce. Roztáhneme kapku co nejvíce do plochy, zaostříme mikroskop a snažíme se odhadnout podíl pohyblivých spermií v průběhu proostřování jednotlivými vrstvami kapky. Pokud pohyblivost spermií odhadneme na méně než 80 %, sperma zpravidla nezmrazujeme. Rovněž sperma viditelně nemocných ryb nezmrazujeme. V případě záchrany populace či individuálních samců se rozhodujeme podle hodnot procenta pohyblivých spermií, ale i rychlosti pohybu spermií, včetně cennosti populace či jedinců, zda je vhodné sperma zmrazit. Koncentraci spermií zjistíme jejich spočítáním v některém typu počítací komůrky pod

mikroskopem (Linhart a kol., 2011, 2012). Sperma se naředí 1000x a to jednostupňově, tj. 999 μl fyziologického roztoku se smíchá s 1 μl spermatu, dokonale se protřepe. Kapka 10 μl naředěného spermatu se kápne na okraj krycího skla počítací komůrky. Spermie se nechají 5-10 minut sedimentovat a následuje počítání spermií pod mikroskopem, a to v 16 čtvercích komůrky (Linhart a kol. 2011, 2012).

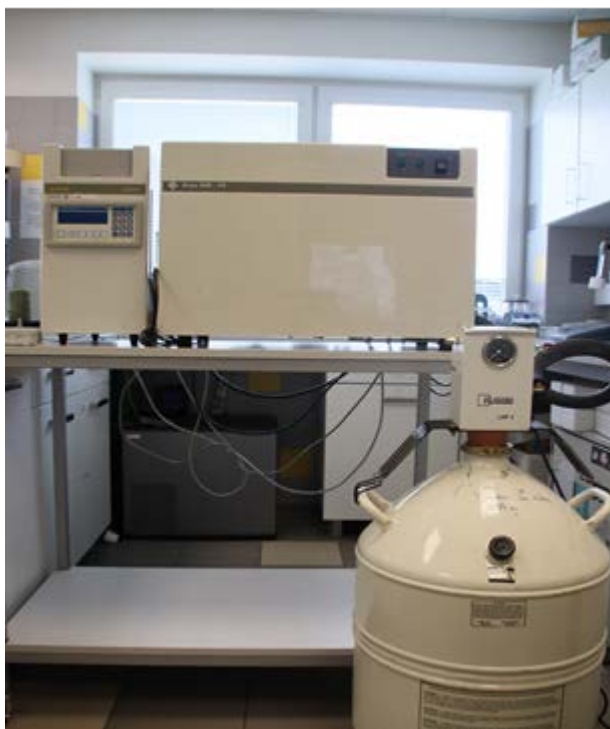


Obr. 3. Rastr Bürkerovy počítací komůrky s vyznačenými možnými čtverci pro počítání (převzato z Linhart a kol., 2011, 2012).

Pokud použijeme Bürkerovu komůrku, potom koncentraci spermií vypočítáme podle vzorce: $0,15625 \times \text{počet spermií v 16 čtvercích (obr. 3)}$, výsledek je v 10^9 spermií v 1 ml. Průměrná koncentrace spermií kapra při jednorázovém sezonním výtěru je vysoká a obvykle se pohybuje v rozmezí $7,9\text{--}19,4 \times 10^9$ spermií v 1 ml spermatu. Celkový počet spermií na jednoho mlíčka se pohybuje mezi 143 a 803×10^9 spermií a relativní počet spermií na 1 kg hmotnosti mlíčka dosahuje hodnot od 23 do 181×10^9 spermií (Shazada et al., 2023). Pro účely zmrazování spermatu využíváme vyšší koncentrace spermií, a to obvykle nad 15 miliard spermií v ml spermatu. V případě chovu v recirkulačních systémech je možné odebírat kvalitní sperma prakticky kontinuálně v průběhu celého roku při teplotě chovu $20\text{--}21^\circ\text{C}$ (Siddique a kol., 2024).

4.4. Vlastní zmrazování (kryokonzervace) spermií kapra ve velkých objemech

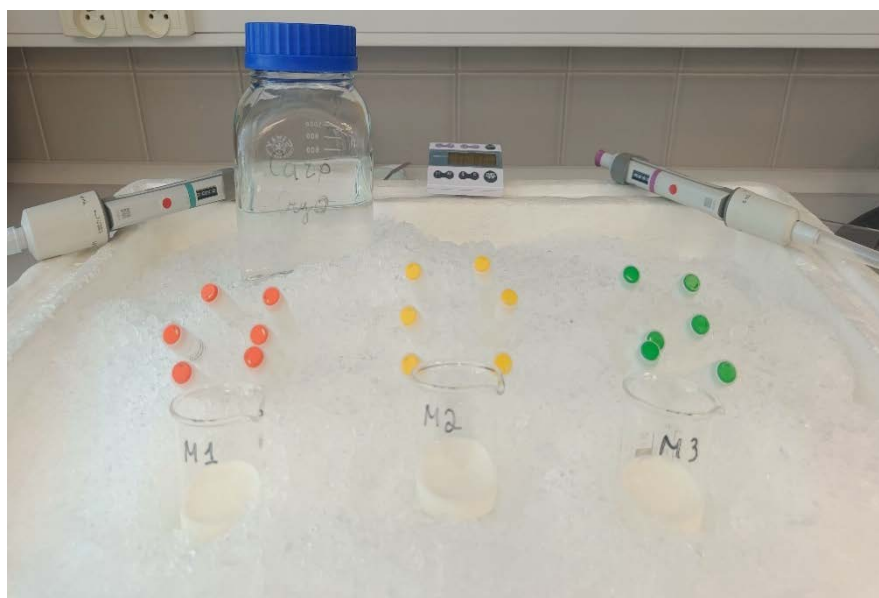
Sperma ve velkých objemech se zmrazuje v 4,5 ml kryozkumavkách v mrazícím automatu Kryo Planer III (obr 4), ve kterém je možné zmrazit najednou celkem 48 kryozkumavek, tedy najednou 216 ml ředěného spermatu (2,25 ml neředěného spermatu v kryozkumavce). Celý proces mrazení trvá 17 minut a po 20minutovém ohřátí automatu na výchozí teplotu 6°C je možné opět zmrazovat dalších 48 zkumavek do -160°C .



Obr 4. Zmrazovací automat Kryo Planer III s řídicí jednotkou (A), krykomorou 560-16 (B) a zásobním kontejnerem kapalného dusíku (C). Kapalný dusík je v závislosti na zmrazovacím programu postupně vstřikován do krykomory od +6 do -160 °C (Foto Sotnikov).

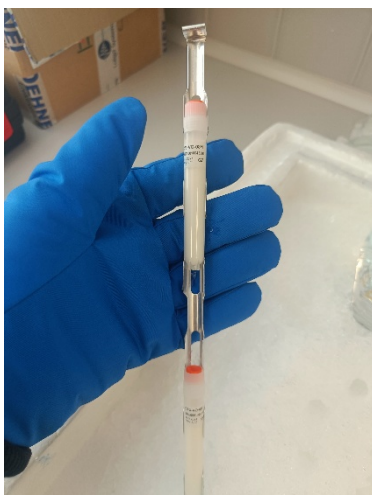
a) Ředění spermatu a vkládání kryozkumavek do mrazícího automatu.

Celý proces od prvního naředění spermatu až po zpuštění zmrazování nesmí trvat déle než 15 minut. Po 15 minutách obvykle dochází ke snížení motility spermií. Pro zmrazování si připravíme vždy roztok kryoprotektantu, jehož použití je omezeno na dobu 24 h (obr 5A). Při manipulaci s kryoprotektantem dbáme zvýšené opatrnosti, neboť obsahuje metanol, který je pro člověka při požití jedovatý! Na ledu vychlazené sperma jednoho samce smísíme s vychlazeným kryptoprotektantem v poměru 1:1 v kádince, a to obvykle v minimálních objemech 15 ml spermatu a 15 ml kryoprotektantu (obr 5B). Následně pipetou plníme vychlazené kryozkumavky (obr 5C) naředěným spermatem o objemu 4,5 ml a uzavřeme zátkou, pod kterou je stále malý vzduchový prostor.



Obr. 5. Zásobní roztok kryoprotektantu (A) se spermatem kapra M1-M3 v kádinkách (B), připravenými kryozkumavkami (C), pipetami pro dávkování objemů 4,5 ml a stopkami. Vše umístěno v polystyrénové krabici na šupinkovém ledu (Foto Sotnikov).

Každá kryozkumavka je označena plemenem či chovnou skupinou, číslem ryby a datem zmrazování (obr 6A). Od jednoho mlíčka tak naplníme minimálně 6 kryozkumavek, umístíme vždy 2 kryozkumavky do držáku (obr 6B) a vložíme do kryokomory kryoautomatu, která je vychlazená na 6 °C. Postupně tak do 15 minut vložíme do automatu 24 držáků s 48 kryozkumavkami od 8 mlíčků a spustíme zmrazování. Po celou dobu plnění kryozkumavek pracujeme v rukavicích, abychom neovlivnili teplotu vychlazeného spermatu.



Obr 6. A) Detail popisu kryozkumavky. B) Umístění dvou kryozkumavek do držáku před vložením do kryokomory kryoautomatu (Foto Sotnikov).

b) Zmrazování v zmrazovacím automatu trvá 17 minut.

Zmrazování probíhá dvoustupňovým mrazicím režimem. První fáze od 6 °C probíhá rychlostí -2 °C/min, dokud není dosaženo bodu krystalizace, tedy -12 °C (9 minut). Poté následuje zmrazování rychlostí -20 °C/min až do dosažení teploty -160 °C, tedy dalších necelých 8 minut. Po dosažení teploty -160 °C jsou kryozkumavky přeneseny do polystyrénového boxu s 4-5 l kapalného dusíku do -196 °C, kde jsou pod hladinou dusíku ukotveny velkými pinzetami do předem označených hliníkových držáků (obr 7). Na jeden držák se vždy připevňují tři kryozkumavky, použijeme tedy minimálně 2 držáky pro sperma jednoho samce (mlíčka). Celkem tak připravíme 24 držáků. Pokud nedodržíme pravidlo manipulace kryozkumavek pod hladinou tekutého dusíku dojde k znehodnocení dávek (Linhart a kol., 2012). Při práci s kapalným dusíkem vždy používáme rukavice a ochranný štít na obličej.



Obr. 7. Ukázka vkládání držáku se třemi kryozkumavkami do gobletu (oranžová trubice) pomocí pinzet pod hladinou kapalného dusíku v polystyrénové krabici (Foto Sotnikov).

4.5. Uložení zmrazených dávek spermatu do velkokapacitních kontejnerů pro dlouhodobé uchování

Na každý držák se třemi kryozkumavkami navlékneme pod hladinou kapalného dusíku koblet (obr 7), tedy určitý tubus, který brání uvolnění kryozkumavek z držáku, a přeneseme jej do polystyrénové válcové nádoby s kapalným dusíkem o objemu 2 l (obr 8 A), kde shromáždíme větší množství naplněných a označených držáků. Následně je vždy po jednom držáku přenášíme do kanystru v kontejneru (obrázek 8 B, v kontejneru je celkem 6 kanystrů). Kanystr je z 80 % ponořený v kontejneru v kapalném dusíku. Při přenosu držáků vždy na okamžik zanoříme celý kanystr pod hladinu dusíku. Takto cyklicky přenášíme držáky až po naplnění kanystru držáky a jeho definitivní zanoření v kontejneru s kapalným dusíkem (obr 8 C). Při zmrazování musíme dodržovat základní pravidla BOZP, tzn. musíme se chránit před mrazem, parami dusíku, vyšší hladinou dusíku ve vzduchu a jedy, se kterými při zmrazování pracujeme. Při manipulaci s kapalným dusíkem (-196 °C) vždy používáme ochranné rukavice proti chladu, obličejový štít a ochranné brýle. Kapalný dusík může způsobit omrzliny nebo může poškodit zdraví chladem. Důležité je pravidelně, obvykle jednou týdně, doplňovat kapalný dusík do kontejnerů. Hladina kapalného dusíku, a tím i teplota -196 °C, je v kontejnerech hlídána elektronickou signalizací upozorňující na jeho případný nedostatek. Obecně se při práci v kryobance řídíme provozním řádem krybanky, který je vždy jeho nedílnou součástí.

Obr. 9: Evidenční protokol o kryokonzervaci (převzato z Rodina a kol., 2010 a Linhart a kol., 2012).

4.7. Rozmrazení spermatu

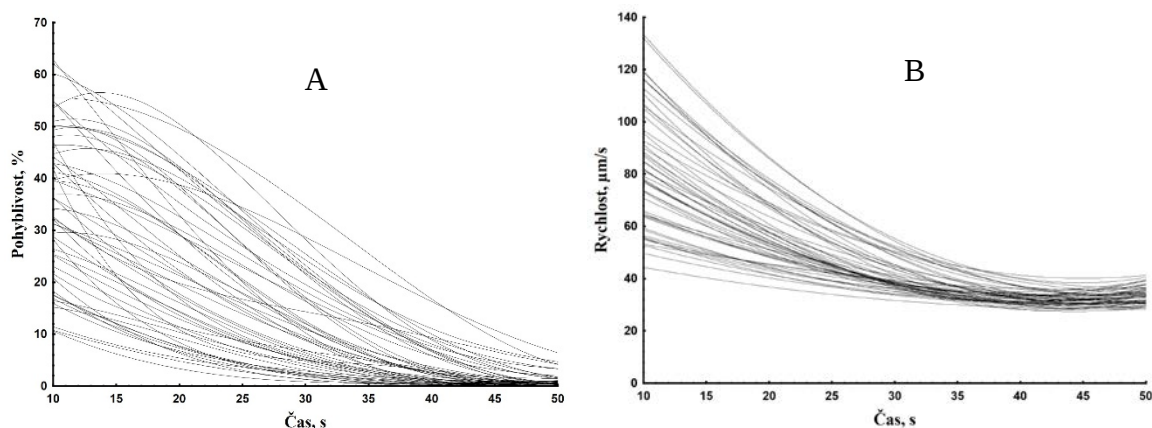
Zmrazené kryozkumavky určené pro šlechtitelské chovy se vyjmou z kanystru kontejneru i s držáky a přenesou do manipulační polystyrenové krabice s kapalným dusíkem. Pod hladinou kapalného dusíku se jednotlivé kryozkumavky vyjmou pinzetou z držáků, vloží do sítky (obr. 10A) a společně se sítkou se přemístí do cirkulující vodní lázně o teplotě 60 °C (obr. 10B). Po 100 sekundách se kryozkumavky vyjmou z lázně, osuší a umístí na led. Rozmrazené sperma se při teplotě 4 °C uchovává maximálně po dobu 30 minut, během které je použito k provoznímu oplození, oplozovacímu testu nebo testu pohyblivosti spermií.



Obr. 10. A) Sítkou přenášíme kryozkumavky z polystyrénové krabice s dusíkem do B) vodní lázně o teplotě 60 °C a rozmrazujeme po dobu 100 s (Foto Sotnikov).

4.8. Osemenění, oplození, odlepkování a inkubace jiker

Podrobný popis způsobů osemeňování jiker dle účelu umělé reprodukce je podrobně popsán v metodice Kocoura a kol. (2012). Sperma z jedné kryozkumavky o objemu 4,5 ml lze využít na osemenění 200 g jiker. Osemeněné jikry lze aktivovat přidáním aktivčního roztoku pro kapra (Billard a kol., 1995) nebo vody z líhně používané k inkubaci jiker o teplotě, při níž bude inkubace jiker probíhat (optimálně 19-22 °C). Pro úspěšnou aktivaci gamet a oplození jiker se doporučuje přidat 0,5–1 objemový díl aktivčního média (aktivční roztok nebo voda z líhně) k objemu jiker v misce (1 l jiker váží přibližně 1,2 kg). Úspěšnost oplození jiker je i přes nižší procento motility spermií po rozmrazení zajištěna vysokým počtem spermií na 1 jikru, který čítá přibližně 250 000 spermií. Při použití čerstvého spermatu stačí 10 000–30 000 spermií na jednu jikru (Linhart a kol., 2015). V případě rozmrazeného spermatu ale musíme počítat s tím, že úroveň pohyblivosti může být velmi variabilní a pohybuje se od 10 do 63 % (obr. 11A) s rychlostí na úrovni 30–140 $\mu\text{m/s}$ (obr. 11B).



Obr. 11. Dynamika procenta motility (A) a průměrné rychlosti dráhy (B) ve vzorcích spermií kapra po kryokonzervaci. Křivky značí průměrné hodnoty pro každého samce použitého ve studii.

Po aktivaci a oplození jiker následuje před vlastní inkubací jiker jejich odlepkování. Pro odlepkování jiker oplozovaných kryokonzervovaným spermatem se osvědčilo ošetření jiker kyselinou taninovou (tanin, např. Sigma-Aldrich, objednáací číslo 1401-55-4). Postup odlepkování spočívá v tom, že oplozené jikry nejprve mícháme ve vodě z líhně tak, aby jikry mohly bobtnat, ale zabránilo se jejich časnému slepení. Brzkému slepení jiker zamezíme tím, že neustále udržujeme objem vody k objemu jiker v poměru 0,5–1:1. Po procesu oplození (cca 90 s po aktivaci osemeněných gamet vodou či aktivačním roztokem) se doporučuje, zejména pokud jsme nedodrželi výše zmíněný poměr mezi objemem aktivačního média a jiker, odstranit aktivační médium se spermatem. Aktivační médium se spermatem odstraníme opatrným slitím roztoku přes hranu misky poté, co necháme jikry usadit (cca 5 s) v misce v klidném stavu bez míchání. Po slití aktivačního média se spermatem přidáme vodu z líhně tak, aby její hladina v misce s jikrami v klidném stavu dosahovala právě k hornímu okraji jiker. Tím je zajištěn poměr objemu vody k objemu jiker v rozmezí 0,5–1:1. Jak jikry bobtnají, přidáváme opatrně za stálého míchání (manuálně nebo na míchacím pultu při 250 otáčkách za minutu, obr. 12A) další vodu. Takto postupujeme 10–15 minut od aktivace gamet. Poté přidáme pozvolna roztok taninu o koncentraci 2 g/l vody z líhně o objemu odpovídajícímu celkovému objemu nabobtnaných jiker a jikry mícháme po dobu 30–60 s. Následně roztok slijeme a znovu doplníme k jikrám roztok taninu v objemu 1,5x převyšující objem nabobtnaných jiker (hladina roztoku je 1–2 cm nad horním okrajem usazených jiker) a pokračujeme v míchání. Po uplynutí 3–5 min působení taninu propláchneme jikry 2–3x vodou z líhně a nasadíme jikry k inkubaci na inkubační lahve (obrázek 12B). Pokud se jikry při promývání vodou lepí, můžeme jikry vystavit opětovnému působení roztoku taninu až na 8 min bez vlivu na oplozenost nebo líhnivost jiker (Kašpar a kol., 2023).

Inkubace jiker se provádí dle našich obvyklých zvyklostí. Doporučujeme užít Zugské inkubační lahve o objemu 7–10 l, které lze plnit až do 2/3 jejich objemu. Inkubace jiker probíhá při teplotách 19–22 °C do vylíhnutí váčkového plůdku, které nastává za 3–4 dny po oplození jiker. Následně se váčkový plůdek do rozplavání udržuje v kolíbkách či inkubačních aparátech různých typů, podle množství plůdku a našich běžných zvyklostí.



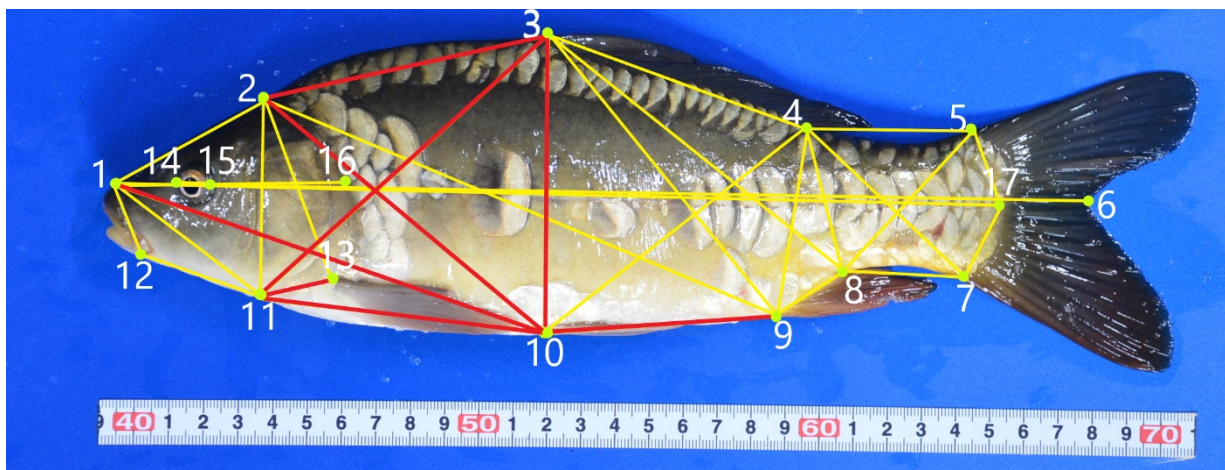
Obr. 12: A) Odlepkování oplozených jiker taninem při použití míchacího pultu. B) Oplozené a odlepkované jikry v inkubační lahvi (Foto Prchal).

4.9. Úroveň oplozenosti, líhnivosti, růstu a přežití kapra obecného při použití zmrazeného spermatu

V rámci studie zaměřené na vliv čerstvého a zmrazeného spermatu na základní reprodukční parametry (oplozenost, líhnivost, malformace larev) a užitkovost potomstva byl využit standardní model testování užitkovosti využívaný k testování plemen a hybridů kapra (Kocour a kol., 2005). V této studii bylo využito čisté plemeno amurského lysce, které je předmětem selekčního programu na FROV JU.

Směs jiker vytvořená alikvotními dávkami od 15 samic byla rozdělena na dvě části. Jedna byla oplodněna čerstvým spermatem od 25 samců, ta druhá 1 rok zmrazeným a následně rozmrazeným spermatem od stejných samců, a to podle výše popsané metodiky. Pro objektivní porovnání užitkovosti obou obsádek v rybníčních podmínkách byla využita i kontrolní skupina šupinatého fenotypu ošupení (Prchal a kol., 2024; Kocour a kol., 2025). V prvním roce testování byly obě testované skupiny chovány odděleně ve dvojím opakování pouze s dosazenou kontrolní skupinou. Ve druhém roce došlo k sesazení všech skupin včetně daných kontrol a společnému chovu ve třech rybnících do stáří dvouleté násady po zimním období. Každá skupina měla tedy v průběhu druhého roku testování 6 opakování.

Po první vegetační sezoně a komorování byly zaznamenány růstovo-délkové parametry (hmotnost, standardní délka, Fultonův kondiční koeficient – FC) a přežití. Po druhém vegetačním období byl navíc na živých rybách zaznamenán obsah tuku ve svalovině s využitím tukoměru a prediktor výtěžnosti s využitím ultrazvuku, tedy poměr mezi tloušťkou rybiho filetu a hloubkou břišní dutiny označovaný jako E8/E28 (Prchal a kol., 2021). S využitím digitalizace pořízených fotografií a šířky těla bylo rovněž u zhruba 200 ryb od každé testované skupiny a její kontrolní skupiny digitalizováno 17 morfometrických bodů stanoveno 36 různých biometrických ukazatelů pro porovnání exteriérových rozdílů (obr 13).



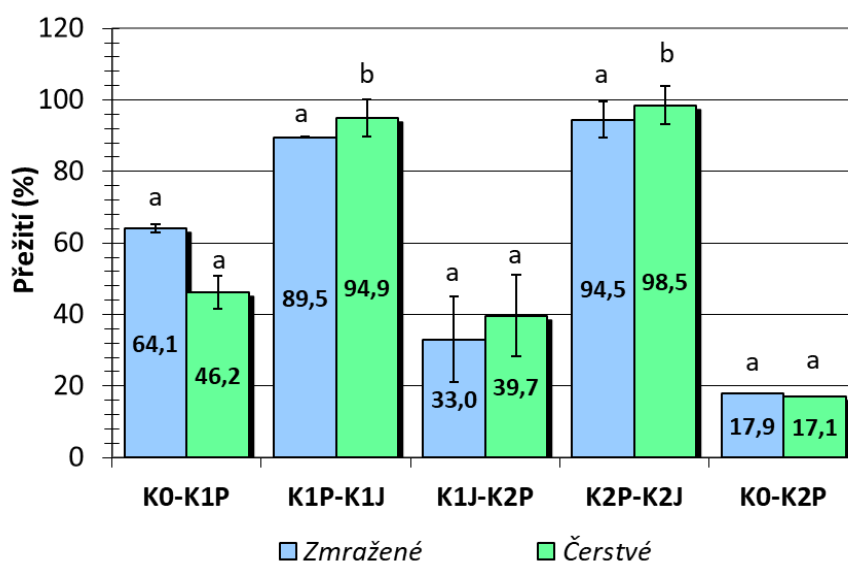
Obr. 13. Digitalizace 17 morfometrických bodů k vyhodnocení 36 biometrických ukazatelů – poměry mezi příslušnou vzdáleností dvou bodů a délkou těla (vzdálenost bodů 1 – 7) nebo délkou hlavy (vzdálenost bodů 1 – 16). Červeně zvýrazněné ukazatele byly statisticky odlišné mezi populací ze zmrazeného a čerstvého spermatu) (Foto Prchal).

Výsledky ukázaly, že oplozenost (81 % vs. 91,8 %) jiker nebyla statisticky významně nižší ve srovnání s čerstvým spermatem. Na druhé straně celková líhnivost byla při použití čerstvého spermatu vyšší. Původ spermatu neměl žádný vliv na malformace (Tab. č. 1).

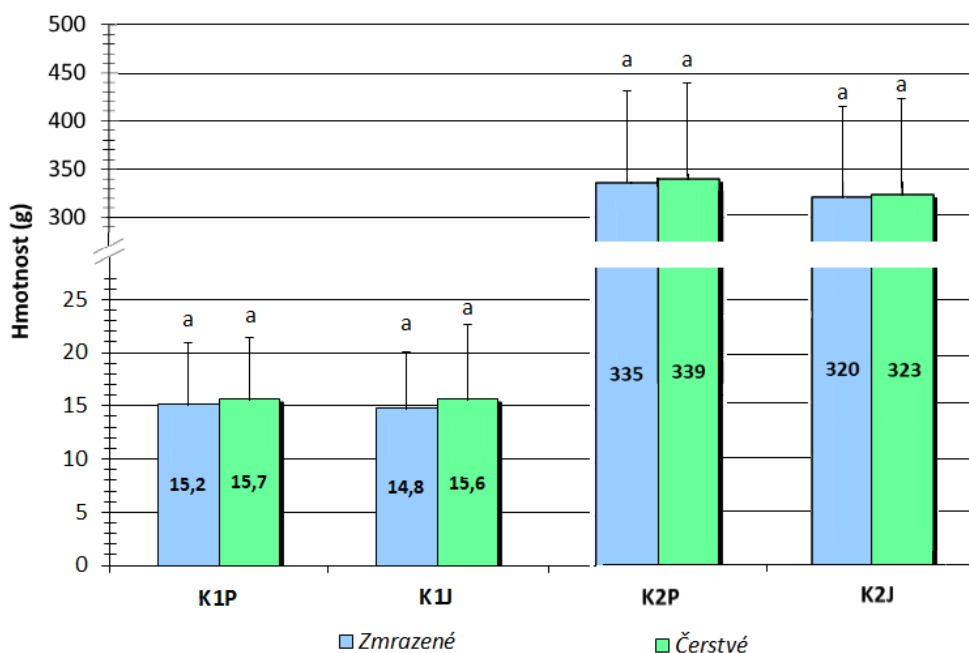
Tab. č. 1: Statistické porovnání reprodukčních parametrů při užití zmrazeného a čerstvého spermatu. Hodnoty se stejným abecedním znakem nejsou v rámci daného parametru statisticky odlišné při $p < 0,05$.

Reprodukční parametr	Zmražené	Čerstvé
Oplozenost (%)	81,0 ^a	91,8 ^b
Líhnivost (celkový počet jiker) (%)	74,7 ^a	84,7 ^b
Líhnivost (oplozené jikry) (%)	92,2 ^a	91,2 ^a
Malformované larvy (%)	2,7 ^a	2,8 ^a

Přežití obou testovaných skupin během jednotlivých vegetačních období a stejně tak i celkové kumulativní přežití ryb bylo statisticky srovnatelné (obr 14). Nicméně přežití ryb během zimního období bylo průkazně vyšší u obsádky založené z čerstvého spermatu. Procentní rozdíly v přežití nebyly ale vysoké. Vliv kryokonzervace tedy neměl žádný významný dopad na přežití potomstva kapra v rybníce. V případě růstu (obr 15) a dalších užitkových vlastností nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami. Jedinou výjimku činil FC, ovšem pouze v rámci prvního testovaného období (3,33 – zmražené spermie vs. 3,26 čerstvé spermie).



Obr. 14. Srovnání hodnot přežití korigovaných na rozdíly prostředí (Linhart a kol., 2002) u obsádek amurského lysce založených s využitím zmrazeného a čerstvého spermatu. Hodnoty se stejným abecedním znakem nejsou v rámci sledovaného období statisticky odlišné při $p < 0,05$. **K0-K1P** – první vegetační sezóna; **K1P-K1J** – první zimní období; **K1J-K2P** – druhá vegetační sezóna; **K2P-K2J** – druhé zimní období; **K0-K2P** – kumulativní přežití od váčkového plůdku do jara po druhém zimním období.



Obr. 15. Srovnání hmotností korigovaných na rozdíly prostředí (Linhart a kol., 2002) u obsádek amurského lysce založených s využitím zmrazeného a čerstvého spermatu. Hodnoty se stejným abecedním znakem nejsou v rámci sledovaného období statisticky odlišné při $p < 0,05$. **K1P** – konec první vegetační sezóny; **K1J** – konec prvního zimního období; **K2P** – konec druhé vegetační sezóny; **K2J** – konec druhého zimního období.

Z hlediska exteriéru byl zjištěn statisticky významný rozdíl u 8 z 36 sledovaných biometrických ukazatelů (obr 13), ale fyzické rozdíly byly obdobně jako u přežití prakticky zanedbatelné. Lze tedy konstatovat, že využití zmrazeného spermatu nemělo zásadní vliv na celkový exteriér ryb.

Závěrem lze konstatovat, že kryokonzervace spermatu kapra významně neovlivnila užitečnost ani exteriérové ukazatele obsádky do věku, ve kterém probíhá selekce rodičů pro založení budoucí generace. Využití zmrazeného spermatu pro selekční program tedy nic nebrání. Lze očekávat, že využití zmrazeného spermatu nebude mít negativní vliv ani na jiné šlechtitelské programy (např. hybridizaci) ani na uchovávání plemen a genetických zdrojů či na produkci užitkových obsádek kapra.

5. Srovnání „novosti metodiky“

Metodika zmrazování velkých objemů spermatu kapra pro účely šlechtění a ochranu genofondu kapra obecného v podmínkách českého rybářství představuje jednu z možných alternativ uplatnění nové metody v praktických chovech. Podobná metodika pro šlechtitelské, případně praktické chovy prozatím nebyla v ČR publikována. Je možné ji proto označit za prvotní a zcela originální metodiku v oblasti zmrazování spermatu ve velkých objemech.

6. Popis uplatnění certifikované metodiky

Rybářské sdružení České republiky je uznané chovatelské sdružení pro plemenářskou práci u ryb dle zák. č. 154/2000 Sb. K zabezpečení produkce má chovatelské sdružení šlechtitelský program v rozsahu, který používá čistokrevné plemenitby, selekce a inbredizace. Současně se udržují genetické zdroje ryb v rozsahu daném Národním programem konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat podle § 14, odst. 1, zákona č. 154/2000 Sb., ve znění zákona č. 130/2006 Sb (Kašpar a kol., 2014). Na podkladě této metodiky bude možné část genofondu uchovávat ve zmrazeném stavu. Metodiku lze implementovat do běžných chovatelských postupů při reprodukci kapra díky použití velkých a snadno manipulovatelných zkumavek vhodných pro produkci větších populací, než bylo doposud možné získat z kryokonzervovaného spermatu.

Tato metodika vznikla ve spolupráci s Rybářstvím Nové Hradky s.r.o, které se mimo jiného zajímá i o možnost využití zmrazeného spermatu v chovu plemenných ryb. Tento subjekt disponuje moderní rybí líhni, kde je schopen využít zmrazené sperma k vlastní plemenitbě kapra. Z toho důvodu podnikají metody uchování spermatu ve velkých objemech k produkci rezistentních a kvalitních plemen kapra pro rychlejší ekonomické zhodnocení vynaložených prostředků.

7. Ekonomické aspekty

Metodika najde uplatnění všude tam, kde existuje plemenný chov kapra a kde je založena banka spermatu.

- a) Prvním ekonomickým dopadem je uchování genetické variability plemen kapra, která se vlivem chovu neustále zužuje. Zhruba po pěti až deseti generacích je obvykle nutné provést osvěžení krve jednotlivých plemen. Zmrazením spermatu jsme schopni oddálit zánik plemene. Vyjdeme-li z aktuálního ceníku Ministerstva zemědělství pro generační ryby kapra obecného využívaného pro kalkulaci škod vzniklých na rybách z důvodu škodných událostí a neoprávněného lovu ryb v akvakultuře a v rybářských revírech (web MZe, <https://mze.gov.cz/public/portal/mze/lesy/rybarstvi-a-rybnikarstvi/ceniky/ceniky>) ze skutečnosti, že jedno generační hejno čítá min. 120 ks ryb a průměrná hmotnost generačních ryb kapra obecného činí 7 kg, lze ohodnotit cenu jednoho generačního hejna kapra obecného přibližně na 680 tis. Kč. V případě úhynu většího množství generačních ryb je možné využít zmrazené sperma k rekonstrukci plemen. Je nutno ale pamatovat na to, že zánik plemene lze z pohledu existence genofondu (souboru variant všech kódujících genů a další genetické informace ovlivňující expresi těchto genů) velmi obtížně finančně ohodnotit.
- b) Ekonomický přínos využití zmrazování spermatu dle této metodiky při realizaci šlechtitelského programu lze spatřovat v minimalizaci negativního dopadu v případě ztráty (onemocnění, predace, jiné nenadálé události) n-té selektované generace a tím nutnosti opětovného zahájení selekčního programu. Ekonomickou ztrátu lze vyčíslit s využitím kalkulací z roku 2023 na základě provozního ověřování rentability chovu kapra obecného s využitím obsádek simulujících užitkový potenciál po 3-4 generacích selekčního programu na podniku Klatovské rybářství a.s. Bylo zjištěno, že při rozloze hlavních rybníků 772 ha, a využití obilí k přikrmování, je možné zvýšit hrubý zisk podniku o 1,4 mil. Kč ročně (Kocour a kol., 2023). Pokud bychom díky ztrátě ryb v selekčním programu museli celý selekční program opakovat, získáme čtvrtou selektovanou generaci za 12 let při využití RAS pro

zkrácení generačního intervalu (Kocour a kol., 2022) nebo 20 let při klasickém chovu. Za tuto dobu bychom tedy přišli min. o 16,8 mil. Kč díky nižšímu hrubému zisku. V případě, že bychom měli k dispozici zmrazené sperma čtvrté selektované generace, zkrátíme časovou ztrátu v selekčním programu na polovinu, neboť zmrazovat lze pouze samčí pohlavní buňky. Tím dojde ke zmírnění finanční ztráty o 8,4 mil. Kč (700 tis. Kč ročně). Po započtení nákladů spojených s kryokonzervací (cca 200 tis. Kč ročně) bychom snížili finanční ztrátu o 500 tis. Kč ročně.

- c) Pro produkci referenční chovatelské zásoby ve zmrazeném stavu, kdy hlavní zásoby jsou v živém stavu (Flajšhans a kol., 2009).
- d) Pro mezinárodní výměnu spermatu při dodržování principu přístupu a sdílení benefitů, tzv. ABS (z angl. *Access and Benefit Sharing*, FAO OSN), vzhledem k unikátnosti chovaných plemen kapra v Eurasii (Flajšhans a kol., 2009).

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

- Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K., Rodina, M., 2008. Implication for aquaculture management. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, R. (Eds.), *Fish Spermatology*, Alpha Science Ltd, Oxford, pp. 397-460.
- Balon, E.K., 1995. Origin and Domestication of the Wild Carp, *Cyprinus-Carpio* - from Roman Gourmets to the Swimming Flowers. *Aquaculture* 129(1-4): 3-48. doi: 10.1016/0044- 424 8486(94)00227-F.
- Billard R, Cosson J, Perchec G, Linhart O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*. 1995;129(1-4): 95-112. doi:10.1016/0044-8486(94)00231-C
- Boryshpolets, S., Sochorova, D., Rodina, M., Linhart, O., Dzyuba, B., 2017. Cryopreservation of Carp (*Cyprinus carpio* L.) Sperm: Impact of Seeding and Freezing Rates on Post-Thaw Outputs. *Biopreservation and Biobanking* 15(3): 234-240. doi: 10.1089/bio.2016.0065.
- Dokina, O., Pronina, N., Kovalev, K., Milenko, V., Tsvetkova, L., 2019. Improved technology of carp sperm cryopreservation in a large-scale cryobank. *Fisheries* 5(5): 97-105. doi:https://files.tsuren.ru/journal/full-numbers/rh_2019-05.pdf.
- Dzyuba, B., Cosson, J., Yamaner, G., Bondarenko, O., Rodina, M., Gela, D., Bondarenko, V., Shaliutina, A., Linhart, O., 2013. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Cryobiology* 66(2): 192-194. doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.12.003.
- Flajšhans, M., Linhart, O., Šlechtová, V., Šlechta, V., 1999. Genetic resources of commercially important fish species in the Czech Republic: present state and future strategy. *Aquaculture* 173(1): 471-483. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00477-3.
- Flajšhans M., Hulák M., Kašpar V., Rodina M., Kocour M., Gela D., 2009. Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 133, 23 s.
- Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízené reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 99, 43 s.
- Ginzburg, A.S., 1972. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. In: Dettlaff TA (eds), *Israel Program for Scientific Translations*, Vol. 71, 366 p.
- Kašpar, V., Rodina, M., Flajšhans, M., 2014. Hromadná indukce gynogeneze a androgeneze u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). *Edice metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 145, 29 s.
- Kašpar, V., Hubálek, M., Franěk, R., Novotný, V., Gela, D., 2023. Umělá reprodukce kapra s využitím alternativních způsobů odlepkování jiker. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 201, 37 s.
- Kocour, M., Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2005. Testing of performance in common carp *Cyprinus carpio* L. under pond husbandry conditions I: top-crossing with Northern mirror carp. *Aquaculture Research* 36 (12): 1207-1215.
- Kocour M., Kašpar V., Gela D., Flajšhans M., 2012. Způsoby osemeňování jiker při umělé reprodukci ryb z hlediska následného využití potomstva. *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 133, 38 s.
- Kocour, M., Prchal, M., Gela, D., Kocour Kroupová, H., Steinbach, Ch., Garayová, M., Policar, T., 2022. Opatření na zkrácení generačního intervalu u kapra obecného. *Edice metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 198, 53 s.
- Kocour, M., Prchal, M., Lipka, J., Valentová, O., Kroupová, H.K., 2025. Effect of common carp group, mass yield and supplemental feeding on basic water quality parameters under semi-

- intensive pond management in Central Europe: Implications for selective breeding under near-natural conditions. *Aquaculture* 742168.
- Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., Šlechtová, V., Šlechta, V., 2002. Top-crossing with paternal inheritance testing of common carp (*Cyprinus carpio* L.) progeny under two altitude conditions. *Aquaculture* 204: 481–491.
- Linhart O., Rodina M., Cosson J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: Sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 41: 241-250.
- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S., 2011. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 114, 19 s.
- Linhart, O., Rodina, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., 2012. Metodika zmrazování spermatu lína obecného. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 134, 26 s.
- Linhart, O., Rodina, M., Kašpar, V., 2015. Common carp (*Cyprinus carpio* Linneaus, 1758) male fertilization potency with secure number of spermatozoa per ova. *Journal of Applied Ichthyology* 31: 169–173.
- Linhart, O., Cheng, Y., Xin, M.M., Rodina, M., Tuckova, V., Shelton, W.L., Kaspar, V., 2020. Standardization of egg activation and fertilization in sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Aquaculture Reports* 17: 100381 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100381>.
- Perchec G, Cosson J, André F, Billard R., 1995. Degradation of the quality of carp sperm by urine contamination during stripping. *Aquaculture* 129(1-4): 135-136. doi:10.1016/0044-8486(95)91958-x
- Prchal, M., Zhao, J., Gela, D., Kašpar, J., Lepič, P., Kašpar, V., Kocour, M., 2021. Simplified method for genetic slaughter yields improvement in common carp under European pond conditions. *Aquaculture Reports* 21: 100832.
- Prchal, M., Lipka, J., Benedikt, A., Gela, D., Kocour, M., 2024. The effect of a genetically improved common carp stock on the productivity of pond ecosystem: Implication for selective breeding in nature-close conditions. *Aquaculture Reports* 36: 102071
- Rodina, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Linhart, O., 2010. Zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) pro potřeby uchování genofondu v praktických podmínkách. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 102, 25 s.
- Shazada, N.E., Alavi, S.M.H., Siddique, M.A.M., Cheng, Y., Zhang, S., Rodina, M., Kocour, M., Linhart, O., 2023 Sperm short-term storage in common carp from laboratory research to aquaculture – A review. *Reviews in Aquaculture* 12827, <https://doi.org/10.1111/raq.12827>
- Siddique, M.A.M., Shazada, N.E., Zhang, S., Linhart, O., Boryshpolets, S., 2024. Effects of multiple hormonal stimulation and stripping during out-of-spawning season on sperm quality of common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Reports*, 39, 102519 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102519>
- Sotnikov, A., Rodina, M., Stechkina, T., Benevente, C.F., Gela, D., Boryshpolets, S., Kholodnyy, V., Linhart, O., Dzyuba B., 2023. High sperm concentration during cryopreservation decreases post-thaw motility percentage without compromising in vitro fertilization outcomes in common carp. *Aquaculture* 562: 738746, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738746>
- Sotnikov, A., Rodina, M., Gela, D., Boryshpolets, S., Kholodnyy, V., Kašpar, V., Linhart, O., Dzyuba, B., 2024. Optimizing aquaculture-scale common carp artificial reproduction: a novel approach to sperm cryopreservation using large-volume containers and elevated thawing temperatures. *Frontiers in Marine Science* 11: 1342483. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1342483>.

9. SEZNAM VÝSTUPŮ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízené reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 99, 43 s.
- Kocour, M., Kašpar, V., Gela, D., Flajšhans, M., 2013. Způsoby osemeňování jiker při umělé reprodukci ryb z hlediska následného využití potomstva. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 133, 38 s.
- Rodina, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Linhart, O., 2010. Zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) pro potřeby uchování genofondu v praktických podmínkách. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 102, 25 s.
- Siddique, M.A.M., Shazada, N.E., Zhang, S., Linhart, O., Boryshpolets, S., 2024. Effects of multiple hormonal stimulation and stripping during out-of-spawning season on sperm quality of common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Reports* 39: 102519.
- Sotnikov, A., Rodina, M., Stechkina, T., Benevente, C.F., Gela, D., Boryshpolets, S., Kholodnyy, V., Linhart, O., Dzyuba, B., 2023. High sperm concentration during cryopreservation decreases post-thaw motility percentage without compromising *in vitro* fertilization outcomes in common carp. *Aquaculture* 562: 738746, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738746>
- Sotnikov, A., Rodina, M., Gela, D., Boryshpolets, S., Kholodnyy, V., Kašpar, V., Linhart, O., Dzyuba, B., 2024. Optimizing aquaculture-scale common carp artificial reproduction: a novel approach to sperm cryopreservation using large-volume containers and elevated thawing temperatures. *Frontiers in Marine Science* 11: 1342483, <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1342483>.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumných projektů MŠMT č. **CZ.1.05/2.1.00/01.0024** s názvem „Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz“ – 25 %, CENAKVA II v rámci programu NPU I č. **LO1205** s názvem „Udržitelnost a excelence centra akvakultury a biodiverzity hydrocenóz“ – 25 %, a projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK21010141 – 50 %.

Externí odborný oponent

Ing. Miroslav Blecha, Ph.D.
Dvůr Lnáře, spol. s r.o.
Lnáře 18, 387 42 Lnáře

Interní odborný oponent

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

Oponent za státní správu

Ing. Ondřej Tomášek
Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 65/17,
110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatnění certifikované metodice č. ze dne

Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 65/17,
110 00 Praha 1

Adresa autorského kolektivu

Anatolii Sotnikov, Ph.D. (30 %)
doc. MSc. Borys Dzyuba, Ph.D. (20 %)
Ing. Marek Rodina, Ph.D. (10 %);
Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D. (10 %);
Ing. Martin Prchal, Ph.D. (10 %)
doc. Ing. Martin Kocour, Ph.D. (10 %)
prof. Otomar Linhart, DrSc. (10 %)

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

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz;
přidělený editor: dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková;
náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2025; vytištěna v roce 2025;
grafický design a technická realizace:.