

B U L L E T I N
V Ú R H V O D Ň A N Y

3

Vydává Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
ve Vodňanech

Published by University of South Bohemia České Budějovice, Research Institute of Fish Culture and
Hydrobiology, Vodňany, Czech Republic

ISSN 0007-389X

OBSAH
CONTENTS**Původní články – Original papers**

- J. HAMÁČKOVÁ, P. KOZÁK, A. KOUBA, P. LEPIČ 65
Sledování růstu larev podoustve říční (*Vimba vimba*) při krmení naupliemi a
dekapsulovanými vajíčky *Artemia salina*
Growth of vimba (Vimba vimba L.) larvae fed on nauplii and decapsulated eggs of
Artemia salina
- M. PŠENIČKA, V. KAŠPAR, J. COSSON, O. LINHART, A. CIERESZKO 70
Metodika hodnocení integrity akrozomu spermií jeseterů
Methodology of acrosome integrity evaluation in sturgeon

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

- M. FLAJŠHANS, M. RODINA, K. HALAČKA, L. VETEŠNÍK, D. GELA, V.
LUSKOVÁ, S. LUSK 78
Charakteristika spermatu polyploidního karase stříbřitého, *Carassius gibelio*
Characteristics of sperm of polyploid Prussian carp, Carassius gibelio
- M. HULÁK, M. RODINA, O. LINHART 82
Charakteristika vytřeného a testikulárního spermatu štiky obecné (*Esox lucius* L.): motilita
a rychlost spermií
Characteristics of stripped and testicular northern pike (Esox lucius) sperm: spermatozoa
motility and velocity

- Pokyny pro autory 85

SLEDOVÁNÍ RŮSTU LAREV PODOUSTVE ŘÍČNÍ (*VIMBA VIMBA*) PŘI KRMENÍ NAUPLIEMI A DEKAPSULOVANÝMI VAJÍČKY *ARTEMIA SALINA*

GROWTH OF *VIMBA (VIMBA VIMBA L.)* LARVAE FED ON NAUPLII AND DECAPSULATED EGGS OF *ARTEMIA SALINA*

J. HAMÁČKOVÁ, P. KOZÁK, A. KOUBA, P. LEPIČ

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, Česká republika, e-mail: hamackova@vurh.jcu.cz

Abstract

Growth performance and survival rate were compared for vimba (*Vimba vimba L.*) larvae fed for different periods of time by either nauplii or decapsulated eggs of *Artemia salina*. Rearing was done in aquariums filled with 12 l of water at a water temperature of $22,5 \pm 0,7$ °C. The highest final mean body weigh (*w*), mean body length (*TL*) and cumulative survival rate after a 16 day rearing period were achieved in larvae fed only by live nauplii ($17,4 \pm 3,8$ mg.ind.⁻¹; $13,2 \pm 1,0$ mm and 91,5 %, respectively). Specific growth rate reached 17,08 %·d⁻¹. Growth of other groups was similar, except for the group fed only by decapsulated cysts ($14,0 \pm 3,7$ mg.ind.⁻¹; $12,5 \pm 1,1$ mm; 78,4 % and 15,49 %·d⁻¹).

Klíčová slova: Podoustev, žabronožka solná, dekapulovaná vajíčka, růst, přežití

Key words: *Vimba bream*, *Artemia salina*, decapsulated eggs, growth, survival

ÚVOD

V důsledku existence nepříznivého stavu přirozených populací podoustve říční *Vimba vimba* (Linnaeus, 1758) u nás bylo v posledních deseti letech zahájeno u tohoto druhu ověřování možností umělé reprodukce a odchovu plůdku a násad v kontrolovaných podmínkách prostředí.

Výsledky a porovnání růstu a přežití raného plůdku některých ryb z čeledí *Cyprinidae*, *Gasterosteidae*, *Siluridae*, *Cobitidae* a *Acipenseridae* krmeného zooplanktonem, naupliiemi nebo dekapulovanými cystami artemií (*Artemia salina*) uvádějí Jänichen a Kohlmann (1999). U některých kaprovitých ryb bylo dosaženo srovnatelného nebo lepšího přežití i celkové délky plůdku při krmení dekapulovanými cystami než živým zooplanktonem. Pro podoustev říční nejsou zatím k dispozici podobná data.

Cílem naší práce bylo zjistit (porovnáním rychlosti růstu), od jakého věku lze krmit larvy podoustve říční dekapulovanými cystami žabronožky solné bez negativního vlivu na jejich přírůstek.

MATERIÁL A METODIKA

Váčkový plůdek podoustve říční (*Vimba vimba*) byl získán z umělého výtěru hejna generačních ryb chovaných v rybníčních podmínkách. Výtěr i odchov byl uskutečněn v experimentálním rybochovném zařízení VÚRH JU ve Vodňanech. Odchov byl proveden ve 20l průtočných akváriích (užitný objem 12 l) vřazených do recirkulačního systému (Hamáčková a kol., 2008 v tisku). Experiment probíhal při teplotě vody $22,5 \pm 0,74$ °C po dobu 16 dnů. Průměrná koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě byla na úrovni 7,9–8,3 mg.l⁻¹, maximální zjištěné rozmezí 7,2–8,5 mg.l⁻¹. Hodnota pH se pohybovala mezi 7,4 a 7,8.

Počáteční průměrná kusová hmotnost plůdku byla 1,3 mg. Plůdek byl vysazen do 15 experimentálních akvárií (5 pokusných skupin A4, A8, A12, A16 a C16 ve třech opakováních) a jednoho akvária, kde plůdek nebyl krmen z důvodu sledování dostupnosti potravních zdrojů v systému (negativní kontrola). Počáteční hustota obsádky byla 400 ks na

akvárium, tj. $33,3 \text{ ks.l}^{-1}$. Plůdek skupiny A4 byl po dobu 4 dnů krmen mladými nauplii *A. salina* a následně krmen dekapulovanými cystami *A. salina*, plůdek skupiny A8 a A12 byl krmen 8, resp. 12 dnů nauplii a pak dekapulovanými cystami. Plůdek skupiny A16 byl krmený po celou dobu odchovu nauplii, resp. dekapulovanými cystami žábřonožky solné (C16). Akvária jednotlivých skupin byla řazena střídavě.

Krmení bylo předkládáno 4krát denně (v 7, 11, 15 a 19 h). K experimentu byly použity cysty artemií INVE AQUACULTURE ($220\,000 \text{ ks.g}^{-1}$). Líhnutí artemií i dekapulace cyst byly prováděny podle metodiky Adámkové (1999). Nauplia byla navažována vždy pro jednotlivé krmné dávky po důkladném osušení na sítku. Krmné dávky dekapulovaných cyst (též důkladně osušených) byly připravovány pro jednotlivé skupiny i krmné dávky vždy pro následující 4 dny a do spotřeby uchovávány v chladničce. Akvária byla denně osvětlena od 6,30 do 20 h.

Každý 4. den odchovu (tj. 4., 8., 12. a 16. den pokusu) byl z jednotlivých skupin z každého opakování odebrán reprezentativní vzorek (31–34 ks) larev pro zjištění hmotnosti larev z důvodu stanovení výše krmné dávky. Na konci každého období bylo u larev sledováno a vyhodnoceno přežití (%), specifická rychlost růstu (SGR v $\% \cdot \text{d}^{-1}$) a přírůstek biomasy. Vzorky byly fixovány ve 4% formaldehydu a po 3 měsících u nich byla zjišťována individuální hmotnost (w v mg), celková délka těla (TL v mm) a vypočítáván Fultonův koeficient kondice (FC).

Po splnění předpokladů (homogenita variance testována Levenovým testem, normalita dat testována Kolmogorov-Smirnovovým testem) byly hmotnost a celková délka testovány pomocí analýzy variance a následně vyhodnoceny Tukeyovým HSD testem.

Hodnoty Fultonova koeficientu byly (pro nesplnění výše zmíněných předpokladů) hodnoceny Kruskal-Wallisovým testem a následně testovány metodou vícenásobného porovnání průměrného pořadí všech skupin. Zvolená hladina významnosti pro všechny testy byla $\alpha = 0,05$. Všechny prezentované hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Statistika 8.0 (StatSoft, Inc.).

VÝSLEDKY

Po celou dobu experimentu bylo přežití larev podoustve vysoké a téměř vyrovnané ve všech skupinách i v jednotlivých obdobích a pohybovalo se na úrovni 95,5–100 %. Výjimkou bylo pouze druhé období odchovu u larev skupiny C16, kde přežití dosáhlo hodnoty jen 83,2 %. Lze se domnívat, že důvodem je jednak vyčerpání zásobních látek plůdku a jeho postupný návyk na dekapulované cysty, které oproti naupliím artémie po nakrmení leží bez pohybu na dně akvária. V tomto období došlo též u plůdku negativní kontroly k 60% mortalitě. Totální úhyn larev této skupiny byl zjištěn 11. den odchovu. Průměrné hodnoty kumulativního přežití ze tří opakování u skupin A4–A16 byly vyrovnané a pohybovaly se mezi 91,5 až 92,6 %. Nejnižší kumulativní přežití za celou dobu odchovu 78,5 % bylo dosaženo u plůdku krmeného po celou dobu dekapulovanými cystami. Při sledování výsledků kumulativní mortality u plůdku krmeného dekapulovanými cystami je patrné, že k jejímu snížení z 21,6 % na polovinu dojde, pakliže je plůdek rozkrmen nauplii 4 dny. Při rozkrmení 8 dní se výsledky mortality vyrovnávají již s plůdkem krmeným po celou dobu odchovu nauplii artémií.

Mezi experimentálními skupinami byly zjištěny průkazné rozdíly v celkové délce těla (Anova; $F = 7,51$; $df = 4$; $p < 0,0001$) a hmotnosti (Anova; $F = 13,196$; $df = 4$; $p < 0,0001$). Nejvyšší průměrnou celkovou délkou ($TL = 13,2 \pm 1,04 \text{ mm}$) a hmotností ($w = 17,4 \pm 1,84 \text{ mg}$) dosáhly larvy krmené po celou dobu nauplii artémie. Průkazně nejnižší průměrná celková délka ($TL = 12,5 \pm 1,05 \text{ mm}$) a hmotnost ($w = 14,0 \pm 3,74 \text{ mg}$) byly zjištěny u larev krmených po celou dobu odchovu dekapulovanými cystami. Rovněž v hodnotách Fultonova koeficientu jednotlivých skupin byly nalezeny průkazné rozdíly (Kruskal-Wallisův test; $H =$

45,785; $p < 0,001$), kde skupina krmená po celou dobu odchovu dekapsulovanými cystami vykazovala nejnižší úroveň. S přibývajícím časovou délkou rozkrmení larev podoustve říční nauplii *A. salina* se délka a hmotnost larev postupně zvyšovala. Podrobnější údaje jsou uvedeny v Tab. č. 1.

Tab. 1. Celková délka, hmotnost a Fultonův koeficient plůdku podoustve říční na konci experimentu (16 dnů odkrmu); AN = nauplia *Artemia salina*; AD dekapsulovaná vajíčka *Artemia salina*

Tab. 1. Total length (TL), weight (w) and Fulton's coefficient of condition (FK) vimba bream larvae at the end of the experiment (16 days from the start of exogenic feeding). Notes: AN = nauplia *Artemia salina*; AD = decapsulated cysts

| | n | TL (mm)* | | w(mg)* | | FK** | | AN/AD (dny) |
|-----|-----|----------------------|------|--------------------|------|--------------------|-------|-------------|
| | | mean. | SD. | mean. | SD. | mean. | SD. | |
| A16 | 100 | 13,15 ^a | 1,04 | 17,43 ^a | 3,84 | 0,758 ^a | 0,080 | 16/0 |
| A12 | 99 | 13,08 ^a | 0,90 | 17,19 ^a | 3,97 | 0,760 ^a | 0,080 | 12/4 |
| A8 | 99 | 12,83 ^{a,b} | 0,91 | 16,32 ^a | 3,38 | 0,764 ^a | 0,069 | 8/8 |
| A4 | 98 | 12,86 ^a | 0,95 | 16,98 ^a | 3,97 | 0,786 ^a | 0,079 | 4/12 |
| C16 | 97 | 12,46 ^b | 1,05 | 13,99 ^b | 3,74 | 0,711 ^b | 0,097 | 0/16 |

* Tukeyův HSD test; ** Metoda vícenásobného porovnání průměrného pořadí všech skupin. Hodnoty popsané různými písmeny jsou průkazně odlišné na $\alpha = 0,05$

Nejnižší průměrná hodnota SGR larev za celou dobu odchovu činila 15,49 $\% \cdot d^{-1}$, a to u skupiny krmené po celou dobu dekapsulovanými vajíčky artemií a následně se zvyšovala s prodlužující se délkou rozkrmení pomocí nauplií žábřonožky solné. Při 4denním a 8denním rozkrmení dosáhla shodné hodnoty 16,39 $\% \cdot d^{-1}$, při 12denním rozkrmení 16,68 $\% \cdot d^{-1}$. Nejvyšší hodnota SGR za celou dobu odchovu 17,08 $\% \cdot d^{-1}$ byla dosažena u plůdku krmeného po celou dobu nauplií žábřonožky solné. U plůdku skupin A4–A16 došlo za celou dobu odchovu průměrně ke zvýšení kusové hmotnosti 12,9 až 13,2krát. Nejnižší nárůst kusové hmotnosti byl zjištěn u skupin C16, a to 10,6krát.

DISKUSE

K totální mortalitě hladovějícího plůdku, prokazující absenci potravního zdroje v odchovném prostředí, došlo v našem experimentu 11. den hladovění. Podle Jirásk a Mareše (2001) dochází u K_0 k totálnímu úhynu po 9 až 12 dnech hladovění.

Hmotnostní růst larev podoustve krmených od počátku příjmu potravy dekapsulovanými cystami artemií jsou obdobné, jako dosáhl Wolnicki (1996). V našem případě byly dosaženy u konečné hmotnosti plůdku podoustve statisticky průkazné rozdíly mezi skupinami krmenými po celou dobu odchovu jen živými nauplii anebo dekapsulovanými cystami artemií. Obdobně jako v našem experimentu dosáhl Regenda (2004) průkazně nejvyšších hodnot TL a w u larev kapra krmených výhradně živou artemií. Jähnichen a Kohlmann (1999) při porovnávání hmotnosti plůdku kapra krmeného živými nauplii nebo cystami získali po 17denním odchovu statisticky neprůkazné výsledky.

Průměrné hodnoty přežití plůdku podoustve krmeného cystami od počátku příjmu potravy byly mírně nižší (94,4 %) než při použití dekapsulovaných cyst od 4. resp. 8. dne, kdy se průměrné hodnoty přežití pohybovaly mezi 97,5–98,1 %. Jähnichen a Kohlmann (1999), Buras a Wolnicki (1996), Wolnicki (1996, 2000), Wolnicki a kol. (2000) uvádějí přežití 99–

100 % u plůdku podoustve krmené buď cystami nebo naupliemi artemií. V práci Hamáčková a kol. (2006) při odkrmu larev podoustve naupliemi bylo dosaženo nižšího průměrného přežití, a to 92–94 %. Při použití dekapsulovaných cyst artemií při odkrmu kapra po dobu 12 dnů dosáhli Jirásek a kol. (2002) vysokého přežití (99,1 %), shodného s přežitím plůdku krmeného živou artemií (99,5 %). Buras a Wolnicki (1996) sledovali růst a vývoj ošupení u plůdku podoustve krmeného též živými nauplii a dekapsulovanými vajíčky artemií. V experimentu zaznamenali průkazně vyšší hodnoty celkové délky larev ve skupině krmené nauplii, v našem experimentu jsme zaznamenali obdobný trend, a to nejen u délkového, ale také u hmotnostního růstu sledovaných ryb. Obdobně, jako ve svých pracích uvádějí Kujawa (2004) a Hamáčková a kol. (2005 a 2006), Regenda (2004), se individuální konečná hmotnost plůdku zvyšovala s prodlužující se délkou období rozkrmu nauplii artémie. Lze předpokládat, že jednou z příčin nižší dosažené růstové schopnosti i přežití plůdku krmeného výhradně dekapsulovanými cystami je adaptace na předkládanou potravu. Cysty po aplikaci do nádrží padají na dno, kde leží bez pohybu oproti naupliím, která jsou rozptýlena ve vodním sloupci mezi plůdkem. Ale po poměrně krátké době je plůdek podoustve schopný se adaptovat na toto krmivo, a pak dosahuje shodných výsledků růstu i přežití.

Odkrm raných stádií plůdku dekapsulovanými vajíčky artemií má pro praxi několik výhod: proces dekapsulace artemií je časově méně náročný a dekapsulovaná vajíčka lze uchovávat v chladničce. Mechanicky dekapsulované cysty artemií lze koupit i ve specializovaných obchodech. Výsledky experimentu ukazují, že pro počáteční odchov plůdku podoustve říční lze úspěšně využít (kromě naupliových stádií žábronožky solné) i dekapsulované cysty artemií. Z důvodu dosažení rychlejšího růstu doporučujeme počáteční odkrm živými naupliovými stádii a dekapsulované cysty krmit nejdříve od 4., spíše až 8. dne příjmu potravy.

Souhrn

V kontrolovaných podmínkách prostředí bylo provedeno srovnání růstu a přežití raných stádií plůdku podoustve říční (*Vimba vimba* L.) odkrmovaných různou dobu nauplii a dekapsulovanými cystami žábronožky solné (*Artemia salina*). Odchov probíhal v 15 experimentálních 20l nádržích s užitným objemem 12 l po dobu 16 dnů, při průměrné teplotě vody $22,5 \pm 0,74$ °C. Při krmení nauplii artemií byly získány nejvyšší průměrné hodnoty kusové hmotnosti $17,43 \pm 3,84$ mg.ks⁻¹, celkové délky $13,15 \pm 1,04$ mm a specifické rychlosti růstu $17,08$ %·d⁻¹. Jen o málo nižší a poměrně vyrovnané byly tyto sledované hodnoty při použití dekapsulovaných cyst po 4, 8 a 12denním rozkrmení nauplii. Jen při krmení výhradně dekapsulovaných cyst po celou dobu odchovu byly dosažené výsledky těchto parametrů nižší ($13,99 \pm 3,74$ mg.ks⁻¹; $12,46 \pm 1,05$ mm; $15,49$ %·d⁻¹). U ryb této skupiny byla celková délka a hmotnost statisticky průkazně nejnižší. Přežití plůdku se pohybovalo ve všech skupinách a obdobích mezi 96,9 a 99,7 %, vyjma 83,2 % ve druhém období u skupiny C16.

Poděkování

Tato práce byla finančně podpořena výzkumným záměrem VÚRH JU MSM6007665809 a projektem MZe ČR NAZV QH71305.

LITERATURA

- Adámková, I., 1999. Postup dekapsulace trvalých vajíček artémie a jejich použití v akvakultuře. Metodika VÚRH JU Vodňany, č. 58, 10 pp.
- Buras, P., Wolnicki, J., 1996. Formation and growth of scales in juvenile vimba *Vimba vimba* (L.) under experimental conditions. Arch. Ryb. Pol., 4(1): 91-100.
- Hamáčková, J., Lepičová, A., Lepič, P., Kozák, P., Polícar, T., Stanny, L., 2005. Odkrm larev podoustve říční (*Vimba vimba*) naupliemi žábronožky solné a startérovým krmivem v experimentálních podmínkách – předběžné výsledky. In: Spurný, P. (ed.) VIII. Česká ichtyologická konference, MZLU Brno 14. – 15. září 2005, pp. 209-214.

- Hamáčková, J., Lepič, P., Policar, T., Kozák, P., Stanny, A.L., 2006. Vliv intervalu krmení na počáteční růst podoustve říční (*Vimba vimba* L.). Bulletin VÚRH Vodňany, 42(1): 3-8.
- Hamáčková, J., Prokeš, M., Kozák, P., Peňáz, M., Stanny, L.A., Policar, T., Baruš, V. 2008. Growth and development of vimba bream (*Vimba vimba*) larvae in relation to feeding duration with live and/or dry starter feed. Aquaculture (v tisku).
- Jähnichen, H., Kohlmann, K., 1999. Decapsulated Artemia cysts – a good alternative to live zooplankton. Fish Farmer, 22(3): 10-11.
- Jirásek, J., Mareš, J., 2001. Výživa a krmení raných vývojových stádií kaprovitých ryb. I. Biologické a fyziologické aspekty výživy larválních stádií. Bulletin VÚRH Vodňany, 37(1): 23-38.
- Jirásek, J., Mareš, J., Regenda, J. 2002. Nutriční aspekty odchovu raných stádií kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) v kontrolovaných podmínkách. In: Spurný P. (ed.) V. Česká ichtyol. konf. Brno 25. – 26. 9. 2002, pp. 170-175.
- Kujawa, K., 2004. Biologiczne podstawy podchowu larw reofilnych ryb karpowatych w warunkach kontrolowanych. Rozprawy i monografie, Wydawnictwo UWM. Olsztyn, 88: 5-88.
- Regenda, J. 2004. Odchov rychleného plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio*) v kontrolovaných podmínkách. Zpráva MZLU Brno, pp. 145.
- Wolnicki, J., 1996. Intensive rearing of larval and juvenile vimba, *Vimba vimba* (L.), fed natural and formulated diets. Pol. Arch. Hydrobiol., 43: 447-454.
- Wolnicki, J., 2000. Możliwosci produkcji materialu obsadowego karpowatych ryb reofilnych w warunkach kontrolowanych (Podsumowanie wyników badan z lat 1992–1999). In: Jakucewicz, H. a Wojda, R. (Editors), Karpowate ryby reofylne, II. krajowa konferencja hodowców i producentów karpowatych ryb reofylnych Brwinów. pp. 165-173.
- Wolnicki, J., Myszkowski, L., Kamiński, R., Kwiatkowski, S., 2000. Kontrolowany podchów stadiów larwalnych i młodocianych certy (*Vimba vimba* L.). In: Jakucewicz, H. a Wojda, R. (Editors), Karpowate ryby reofylne, II. krajowa konferencja hodowców i producentów karpowatych ryb reofylnych Brwinów. pp. 111-116.

METODIKA HODNOCENÍ INTEGRITY AKROZOMU SPERMÍÍ JESETERŮ METHODOLOGY OF ACROSOME INTEGRITY EVALUATION IN STURGEON

M. PŠENIČKA¹, V. KAŠPAR¹, J. COSSON², O. LINHART¹, A. CIERESZKO³

¹Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, University of South Bohemia, Vodnany, Czech Republic, e-mail: psenicka@vurh.jcu.cz

²UMR 7009 CNRS – Univ. Paris VI, Observatoire de Villefranche/mer; Marine Station, Villefranche-sur-mer 06230 France, e-mail: cosson@obs-vlfr.fr

³Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland, e-mail: acieresz@pan.olsztyn.pl

Abstract

Gametes of sturgeon fishes differ from those of teleost fishes by the presence of acrosomes with 8–10 posterolateral projections (PLPs) in spermatozoa and multiple micropyles in eggs. Despite the multiplicity of micropyles may provide the spermatozoa with an advantage of easier entry finding into the egg, it increases the risk of polyspermy, which is lethal for the embryo or can affect its ploidy level. The acrosome reaction includes a formation of a spear-like fertilization filament, coming from 3 endonuclear canals and implantation fossa (opposite side of nucleus) through the acrosome, and which accelerates the process of polyspermy prevention. Another unique feature of the acrosome was an anchor-like opening of PLPs against release from the micropyle. In addition spermatozoa with artificially disrupted acrosome were not able to fertilize eggs. Inasmuch as this suggests an importance of acrosome for fertilization, work focusing on integrity of sturgeon spermatozoa acrosome should be done. In this study the methodology for acrosome integrity evaluation is described. Using a fluorescent soybean trypsin inhibitor (SBTI) conjugate with the Alexa Fluor[®] 488 dye for visualization of permeable sturgeon spermatozoa acrosome, a strong signal was observed in the acrosome and implantation fossa region. The examination of 8 males shows 8,5 % of faulty spermatozoa in average. We also supposed combination of SBTI Alexa staining with propidium iodide, which reveals the number of dead spermatozoa. As the control of a proper use SBTI-Alexa staining for the acrosome integrity face contrast scanning electron microscope with focusing on PLPs and the fertilization filament was used.

Klíčová slova: Akrosomální reakce, jeseter, spermie

Key words: Acrosomal reaction, sturgeon, spermatozoa

ÚVOD

Kostnaté ryby mají primitivní strukturu spermie tzv. „aqua sperm“ (Jamieson, 1991) postrádající akrozom, což je váček v anteriorní části hlavičky spermie sloužící k průniku přes vaječné obaly. Jejich absence je u ryb kompenzována přítomností mikropyle, což je otvor ve vajíčku sloužící k průniku spermie (Ginsburg, 1968). Např. spermie lína obecného *Tinca tinca* má téměř kulatý tvar hlavičky, 1,71 µm v průměru. Tímto rozměrem a s délkou bičíku 25,41 µm patří k nejmenším popsaným spermím ryb (Pšenička a kol., 2006). Naopak spermie jeseterů mají protáhlou hlavičku s akrozomem s posterolaterálními výběžky a jádrem. Od akrozomu po implantační jamku, „dutinku“ v centrální poloze posteriorní části jádra, vedou obvykle 3 endonukleární kanály (ENK). Jasně diferencovaná střední část je tvořena mitochondriemi a krčkem (centriolárním komplexem), který tvoří basální aparát pro bičík složený z 9+2 mikrotubulů s laterálními lemy zvyšující efektivitu pohybu (Dettlaff a kol., 1993; DiLauro a kol., 1998, 1999, 2000, 2001; Cherr a Clark, 1984; Pšenička a kol., 2007, 2008a).

Paradoxně je množství mikropylárních otvorů pro průnik spermíí u jiker chrupavčitých ryb vyšší a zpravidla velmi variabilní a to jak v rámci jedince, tak i v rámci jednotlivých druhů (j. hvězdnatý *A. stellatus* 1–13 mikropylí, j. ruský *A. gueldenstaedti* až 52) (Dettlaff a kol., 1993). Akrozom tedy teoreticky k vlastnímu průniku spermie nepotřebují. Průměr mikropyle u ryb obvykle umožňuje průnik pouze jediné spermie (Kudo, 1980), což může být považováno za první prevenci polyspermie pro kostnaté ryby s jedním mikropylem. Ovšem

ne u jeseterů. Přestože vyšší počet mikropylí může poskytnout spermii výhodu snadnějšího nalezení vstupu do jikry, na druhou stranu zvyšuje riziko polyspermatického oplození, které je pro embryo letální nebo může ovlivnit jeho ploidii.

Pšenička a kol. (2008a) popisuje komunikaci akrozomu a implantační jamky pomocí ENK u spermií jesetera malého *Acipenser ruthenus*. V obou těchto částech byl navíc pomocí imunoznačení pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) lokalizován akrosin. Implantační jamka, která se po akrozomové reakci vyprazdňuje, se tedy pravděpodobně podílí na formování tzv. fertilizačního filamentu. Ten slouží jako "harpuna" při penetraci do jikry a zvýhodňuje tím postavení první spermie. Poskytuje totiž rychlý signál pro vytvoření perivitellinního prostoru, který zabraňuje proniknutí dalších spermií v některém z dalších mikropylárních otvorů (Pšenička a kol. submitted).

Naše další předběžné výsledky dokazují, že spermie po uměle spuštěné indukované akrozomové reakci (tedy s již nefunkčním akrozomem) není schopná oplození (nepublikovaná data). Flajšhans a kol. (2004) popisuje hodnocení životnosti rybích spermií pomocí techniky dvojitého fluorescenčního značení. Touto technikou, založenou na permeabilitě membrány, je dnes již běžně hodnocena kvalita spermií všech druhů ryb. Ovšem v případě spermií jeseterů postihuje tato technika jen permeabilitu jádra, nikoliv akrozomu, který má vlastní akrozomovou membránu a který je podle dosavadních předběžných výsledků pro průběh fertilizace rovněž nezbytný.

Trypsinu podobná aktivita byla identifikována a charakterizována u spermií jeseterů podle Ciereszka a kol. (1994, 1996, 2000). Tato aktivita je podobná aktivitě akrosin proteinázy lokalizované v akrozomu. Akrosinu podobná aktivita může být cílem pro barvenou serin proteinázu, včetně akrosinu podobné aktivitě spermií jeseterů (Ciereszko a kol., 1994). Soybean trypsin inhibitor (SBTI) inhibuje katalytickou aktivitu serin proteinázy. SBTI-Alexa je fluorescent SBTI konjugovaný s barvivem Alexa Fluor[®] 488. Tento konjugát byl již úspěšně použit pro pozorování akrozomové reakce u spermií savců (Tollner a kol., 2003), ale nebyl zatím testován pro spermie nižších obratlovců.

Tato studie popisuje metodiku značení permeabilizovaného (aktivovaného nebo jinak poškozeného) akrozomu, se kterou je možné posuzovat kvalitu spermatu z další perspektivy.

MATERIÁL A METODIKA

Mlčáci jesetera malého pocházeli z chovu Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech. Dva týdny byli drženi v bazénech o teplotě vody 14 °C a 24 hodin po injikaci kapří hypofýzou (4 mg.kg⁻¹ hmotnosti ryby) byli vytřeni pomocí kanyly. Integrita akrozomu a celé spermie byla posuzována na živých čerstvých spermiích. Zásobní roztok SBTI-Alexa Fluor[®] 488 conjugate (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA) byl rozředěn v PBS na koncentraci 10 µg/ml a skladován při teplotě -20 °C. Pro značení permeabilizovaného akrozomu je dostačující použít konečnou koncentraci 0.5 µg/ml (20x ředění zásobního roztoku). Detailněji je použití SBTI-Alexa popsáno v práci Pšenička a kol. (2008b). Pro značení mrtvých, permeabilizovaných spermií byl použit propidium jodid v konečné koncentraci 5 µl/ml podle práce Flajšhans a kol. (2004). Obě fluorescentní látky byly smíchány s imobilizačním roztokem o osmotické úrovni a iontovém složení shodném se semennou plazmou podle Pšeničky a kol. (2008c). Hodnoty uměle připravené semenné plazmy pro jesetera malého jsou: pH 8; osmolalita 51 mOsmol Kg⁻¹; Ca²⁺ 0,16; Na⁺ 20; K⁺ 1,26 a Cl⁻ 6,11 mM. Doporučujeme však vždy vyrovnat osmolalitu pomocí trisu podle konkrétního vzorku a zkontrolovat, zda-li jsou spermie v takto připraveném roztoku nepohyblivé. 5 µl spermií jesetera bylo smícháno s 30 ml umělé semenné plasy obsahujícími fluorescentní látky na připraveném podložním sklíčku. K vyšetření byl použit světelný mikroskop Olympus BX50 s fluorescenční lampou (100 W Ushio mercury lamp) nastavený na modrém filtru. Procenta spermií mrtvých (červený signál v jádru) a

s poškozeným či aktivovaným akrozomem (zelený signál v akrozomu a oblasti implantační jamky) byly vypočítány ze všech spermií pozorovaném ve světelném poli.

Metoda hodnocení množství spermií s aktivovaným akrozomem byla kontrolována skenování elektronovou mikroskopií (SEM) a fázovým kontrastem světelného mikroskopu (FK). Při těchto dvou technikách byl za aktivovaný považován akrozom s jasně patrným fertilizačním filamentem.

Elektronová mikroskopie

Spermie byly fixovány jeden den ve 4 °C v 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M PBS a poté třikrát vyprány jen v 0,1 M PBS. Vzorky byly postfixovány oxidem osmičelým a znovu vyprány. Dehydratace vzorků proběhla v acetonové sérii (30, 50, 70, 90 a 100 %). Vzorky byly dehydratovány pomocí kritického bodu (dryer Pelco CPD 2; Ted Pella, Inc., Redding, Calif.), poté pozlaceny ve vakuu pomocí SEM Coating Unit E5100 (Polaron Equipment Ltd., England) a pozorovány JSM 6300 skenovacím elektronovým mikroskopem (JEOL Ltd., Akishima, Tokyo, Japan). Některé vzorky byly pro detailnější popis vyšetřeny pomocí cryo field-emission SEM JSM 7401-F (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) s větším rozlišením, kde byly vzorky vkládány do tekutého dusíku a poté přímo do kryodržáku mikroskopu (CryoALTO 2500, Gatan) bez předchozí přípravy.

Data

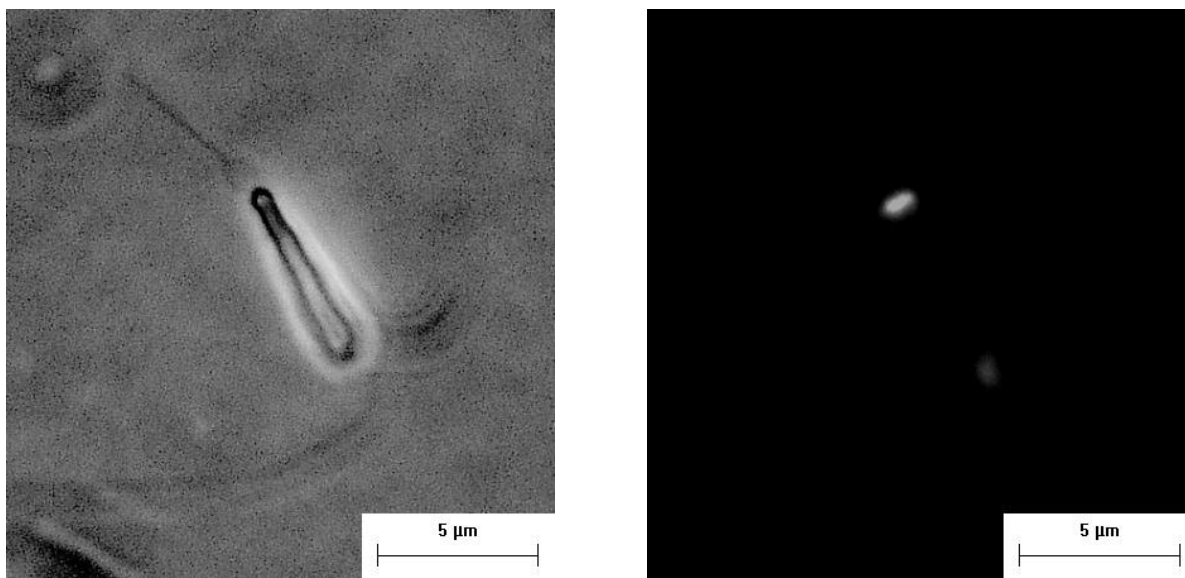
Bylo analyzováno sperma 8 mlíčáku. Pomocí každé ze tří technik hodnocení integrity akrozomu (fluorescence se značením SBTI-Alexa, FK a SEM) bylo vyhodnoceno vždy minimálně 300 spermií pro každého mlíčáka, ze kterých bylo vypočteno procentuální zastoupení spermií s aktivovaným akrozomem. Tyto tři soubory dat byly testovány na korelaci pomocí softwaru Statistika 8.0.

VÝSLEDKY A DISKUSE

SBTI-Alexa úspěšně značila aktivované či poškozené akrozomy spermií jesetera (Obr. 1a, b). Zelený signál byl viditelný v akrozomu a v oblasti implantační jamky, která podle Pšeničky a kol. (2008a) komunikuje s akrozomem pomocí endonukleárních kanálů. Procentuální zastoupení spermií se signálem z porušeného akrozomu jednotlivých mlíčáků ukazuje Tabulka 1. Průměrně však mlíčáci vykazovali 8,5 % takových spermií. Při použití dvojitého barvení SBTI-Alexa a propidium jodidem byl podíl značených akrozomů 4,8 % a podíl značených jader 6,5 %. Toto snížení je však na úkor spermií značených propidium jodidem, tedy spermií s permeabilizovaným jádrem, neboť fluorescenční signál propidium jodidu je silnější a většinou “přesvítí“ signál SBTI-Alexa. SBTI-Alexa sice rovněž postihuje permeabilizované jádro, signál ovšem není vždy tak silný, zvláště když zůstane akrozom neporušený. Proto doporučujeme toto dvojité barvení ke komplexnějšímu zhodnocení kvality spermií jeseterů.

Obr. 1a, b. Spermie jesetera malého s aktivovaným akrozomem a vytvořeným fertilizačním filamentem z fázového kontrastu světelného mikroskopu (a). Stejná spermie značená SBTI-Alexa se signálem z akrozomu a oblasti implantační jamky (b). Měřítka jsou 5 μm .

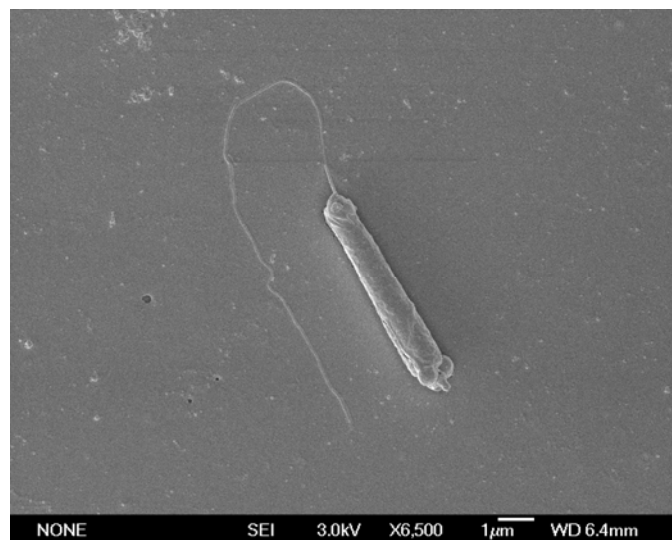
Fig. 1a, b. Sterlet spermatozoa with activated acrosome and created fertilization filament using phase contrast of light microscopy (a). The same spermatozoa staining with SBTI-Alexa with signal from acrosome and implantation fossa area (b). Scale bar 5 μm .



Tyto výsledky podporují techniky FK a SEM (data v tabulce 1) pro vizualizaci fertilizačního filamentu (Obr. 1a, 2), který je podle Pšeničky a kol. (submitted) součástí akrozomové reakce jeseterů. FK odhalil u každého mlíčka menší počet aktivovaných akrozomů (průměrně 6,5 %). To vysvětlují snímky ze SEM, ze kterých je patrné, že šířka fertilizačního filamentu je na hranici rozlišení světelné mikroskopie (275 nm). Některé užší filameny nemusí být tedy FK postihnutečné. Naopak pomocí SEM byl pozorován větší počet, průměrně 11,8 %. Vyšší procento můžeme vysvětlit lepším rozlišením, ovšem vzhledem ke složité přípravě vzorků v elektronové mikroskopii se jedná pravděpodobně o artefakt a další akrozomové reakce mohly být indukovány při fixaci. Pokud by byla SEM zvažována jako nástroj k určování integrity akrozomu, je třeba si uvědomit, že metody přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopii jsou nejen značně složité, ale i nákladné. Nicméně obě kontrolní metody do určité míry korelovaly s hodnotami získané pomocí značení SBTI-Alexa (Tab. 1 a Obr. 3). Podle koeficientu determinace R^2 (0,59 a 0,43 pro FK a SEM) a standardizovaného regresního koeficientu β (0,77 a 0,66 pro FK a SEM) se značením SBTI-Alexa lépe koreluje FK. Navíc, když byla použita SBTI-Alexa společně s FK, všechny spermie s viditelným fertilizačním filamentem ve FK vykazovaly rovněž signál pod fluorescenčním světlem z aktivovaného akrosomu (Obr. 1a, b). Což nemůžeme tvrdit opačně. To potvrzuje náš názor, že některé filameny jsou za hranici rozlišení a nejsou tedy FK detekovatelné, přestože spermie vykazuje zjevný signál SBTI-Alexa.

Obr. 2. Obrázek spermie jesetera malého s aktivovaným akrozomem a vytvořeným fertilizačním filamentem ze skenovacího elektronového mikroskopu. Měřítka je 5 μm .

Fig. 2. Sterlet spermatozoon with activated acrosome and created fertilization filament using scanning electron microscopy. Scale bar 5 μm .



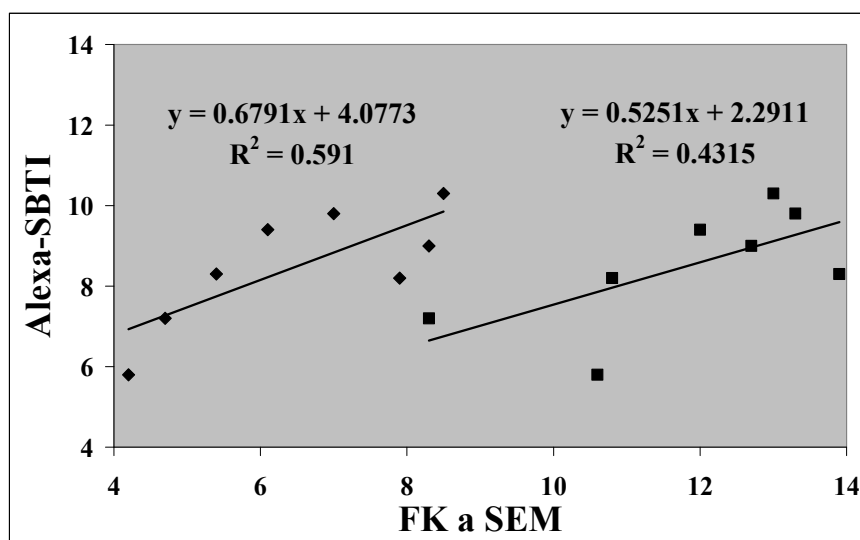
Tab. 1. Procenta spermií jednotlivých mlíčáků jesetera malého vykazující znaky aktivovaného akrozomu různými metodami

Tab. 1. Percentage of spermatozoa of individual males with activated acrosome

| Mlíčák | SBTI-Alexa | Fázový kontrast | SEM |
|---------------|------------|-----------------|-------------|
| 1 | 8,2 | 7,9 | 10,8 |
| 2 | 9,0 | 8,3 | 12,7 |
| 3 | 10,3 | 8,5 | 13,0 |
| 4 | 5,8 | 4,2 | 10,6 |
| 5 | 9,4 | 6,1 | 12,0 |
| 6 | 8,3 | 5,4 | 13,9 |
| 7 | 7,2 | 4,7 | 8,3 |
| 8 | 9,8 | 7,0 | 13,3 |
| průměr | 8,5 | 6,5 | 11,8 |

Obr. 3. Graf ukazující korelace mezi výsledky fázového kontrastu, elektronové mikroskopie a SBTI-Alexa

Fig. 3. Graph showing correlation between data from phase contrast, electron microscopy and SBTI-Alexa



ZÁVĚR

Pokud je správné tvrzení, že akrosom spermií jeseterů je nutný pro jejich fertilizaci, pak k testům životnosti, které se provádějí standardně pomocí propidium jodidu podle Flajšhane a kol. (2004), doporučujeme přidat testování značením SBTI-Alexa, které postihuje navíc ještě integritu akrozomu. U savců se detekce integrity akrozomu standardně používá k diferenciální diagnostice stavu spermie a detekci patologie (Peknicova a kol., 2002; 2005; Tepla a kol., 2006). SBTI-Alexa se navíc zdá být nejvhodnějším a nejjednodušším z metod popisovaných v této studii. Tato technika může odhalit i vliv různého ošetření spermatu jeseterů na akrozom, tedy různé aktivační či imobilizační roztoky či vliv různých způsobů kryopresevace, jak popisuje Pšenička a kol. (2008d).

Souhrn

Gamety jeseterů se liší od gamet kostnatých ryb přítomností akrozomu s 8–10 posterolaterálními výběžky (PLPs) u spermie a více mikropylárními otvory v jikře. Vyšší počet mikropylí může poskytnout spermií výhodu snadnějšího nalezení vstupu do jikry, na druhou stranu zvyšuje riziko polyspermatického oplození, které ovlivňuje ploidii vzniklého embrya, anebo může být pro embryo i letální. Akrozomální reakce zahrnuje formování fertilizačního filamentu s funkcí jakéhosi “kopí” vycházející ze 3 endonukleárních kanálů a implantační jamky (opačná strana jádra) skrz akrozom. Ten zrychluje proces prevence polyspermie. Další unikátní funkcí akrozomu bylo rozevírání PLPs s funkcí kotvy proti uvolnění z mikropyle. Spermie s deaktivovaným akrozomem nebyly schopné oplodnit jikry. Vzhledem k těmto výsledkům, naznačujícím nezbytnost akrozomu k oplození, bychom se měli zaměřit na práce hodnotící integritu akrozomu. Metodika hodnocení integrity akrozomu spermií jeseterů je popsána v této studii, pro niž byl nástrojem fluorescent „Soybean trypsin inhibitor (SBTI) conjugate with the Alexa Fluor® 488 dye“ pro vizualizaci permeabilního akrozomu spermií jeseterů. Po inkubaci v SBTI-Alexa byl pozorován silný signál v oblasti akrozomu a implantační jamky. Vyšetření 8 mlíčáků prokázalo průměrně 8,5 % porušených

spermií. Dále doporučujeme kombinovat značení SBTI Alexa s propidium jodidem, který odhaluje množství mrtvých spermií. Pro kontrolu vhodnosti použití SBTI-Alexa pro určení integrity akrozomu jsme stejné vzorky hodnotili pomocí fázového kontrastu světelné mikroskopie a skenovací elektronovou mikroskopií se zaměřením přítomnosti fertilizačního filamentu.

Poděkování

Tato práce byla finančně podpořena projektem VURH JU MSM6007665809 a GAČR 524/06/0817.

LITERATURA

- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Lin, F., Doroshov, S.I., 1994. Identification of trypsin-like activity in sturgeon spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 268: 486-491.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Ochkur, S.I., 1996. Characterization of acrosin-like activity of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 45: 72-77.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Mims, S.D., Glogowski, J., 2000. Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 125: 197-203.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., 1993. *Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture* Berlin, Springer-Verlag, 300 pp.
- DiLauro, M.N., Kaboord, W., Walsh, R.A., 1998. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. I. The Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*). *Can. J. Zool.* 76: 1822-1836.
- DiLauro, M.N., Kaboord, W.S., Walsh, R.A., 1999. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. II. The shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*, Lesueur, 1818). *Can. J. Zool.*, 77: 321-330.
- DiLauro, M.N., Kaboord, W.S., Walsh, R.A., 2000. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeon. III. The Lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* Rafinesque, 1817). *Can. J. Zool.*, 78: 438-447.
- DiLauro, M.N., Walsh, R.A., Peiffer, M., 2001. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. IV. The pallid sturgeon (*Scaphirhynchus albus* Forbes and Richardson, 1905). *Can. J. Zool.*, 79: 802-808.
- Flajšhans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O., 2004. The application of image cytometry for viability assessment of dual fluorescent-stained spermatozoa of fish. *Cell Biol. Int.*, 28: 955-959.
- Ginsburg, A.S., 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Moscow: Izdatelnaya Nauka (in Russian).
- Cherr, G.N., Clark, W.N., 1984. An acrosome reactions in sperm from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *J. Exp. Zool.*, 232: 129-139.
- Jamieson, B.G.M., 1991. *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, pp. 230-295.
- Kudo, S., 1980. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Dev. Growth Differ.*, 22: 403-414.
- Peknicova, J., Kyselova, V., Buckiova, D., Boubelik, M., 2002. Effect of endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *Amer. J. Reprod. Immunol.*, 47: 311-318.
- Peknicova, J., Chladek, D., Hozak, P., 2005. Monoclonal antibodies against sperm antigens as markers for detection of physiology and pathology of human spermatozoa and estimation of spermatogenesis. *Amer. J. Reprod. Immunol.*, 53: 42-49.
- Pšenička, M., Rodina, M., Nebesářová, J., Linhart, O., 2006. Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. *Theriogenology*, 66: 1355-1363.
- Pšenička, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Gela, D., Nebesářová, J., Linhart, O., 2007. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. *Biol. Cell*, 99(2): 103-115.
- Pšenička, M., Alavi, S.M.H., Vancova, M., Koubek, P., Nebesářová, J., Linhart, O., 2008a. Fine structure and morphology of sterlet (*Acipenser ruthenus* L. 1758) spermatozoa and acrosin localization. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2008.02.006.
- Pšenička, M., Cosson, J., Alavi, S.M.H., Linhart, O., Ciereszko, A., 2008b. Staining of sturgeon spermatozoa with trypsin inhibitor from soybean, Alexa Fluor® 488 conjugate for visualization of sturgeon acrosome. *J. Appl. Ichthyol.*, 24: 514-516.
- Pšenička, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Čičova, Z., Gela, D., Cosson, J., Nebesářová, J., Linhart, O., 2008c. Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: A comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*). *J. Appl. Ichthyol.*, 24: 371-377.

- Pšenička, M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Nynca, J., Rodina, M., Linhart, O., Cosson, J., Ciereszko, A., 2008d. Acrosome staining and motility characteristics of sterlet spermatozoa after cryopreservation with use of methanol and DMSO. *Cryobiology*, 56(3): 251-253.
- Pšenička, M., Rodina, M., Nebesářová, J., Linhart, O., (submitted): Study on fertilization process in sturgeon, function of acrosome and prevention of polyspermy.
- Tepla, O., Peknicova, J., Koci, K., Mika, J., Mrazek, M., Elzeinova, F., 2006. Evaluation of reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection of varied human semen tested by antiacrosomal antibodies. *Fertil. Steril.*, 86: 13-120.
- Tollner, T.L., Yudin, A.I., Cherr, G.N., Overstreet, J.W., 2003. Real-time observations of individual Macaque sperm undergoing tight binding and the acrosome reaction on the zona pellucida. *Biol. Reprod.*, 68: 664-672.

CHARAKTERISTIKA SPERMATU POLYPLOIDNÍHO KARASE STŘÍBŘITÉHO, *CARASSIUS GIBELIO*

(Rozšířený abstrakt práce publikované v roce 2008 v *Journal of Fish Biology*.

Flajšhans, M., Rodina, M., Halačka, K., Vetešník, L., Gela, D., Lusková, V., Lusk, S., 2008. Characteristics of sperm of polyploid Prussian carp, *Carassius gibelio*. *Journal of Fish Biology*, 73, 323–328.)

M. FLAJŠHANS¹, M. RODINA¹, K. HALAČKA², L. VETEŠNÍK², D. GELA¹, V. LUSKOVÁ², S. LUSK²

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 389 25 Vodňany, e-mail: flajshans@vurh.jcu.cz, rodina@vurh.jcu.cz, gela@vurh.jcu.cz

²Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v.v.i., Květná 8, 603 65 Brno, e-mail: halacka@ivb.cas.cz, vetesnik@ivb.cas.cz, luskova@ivb.cas.cz, lusk@ivb.cas.cz

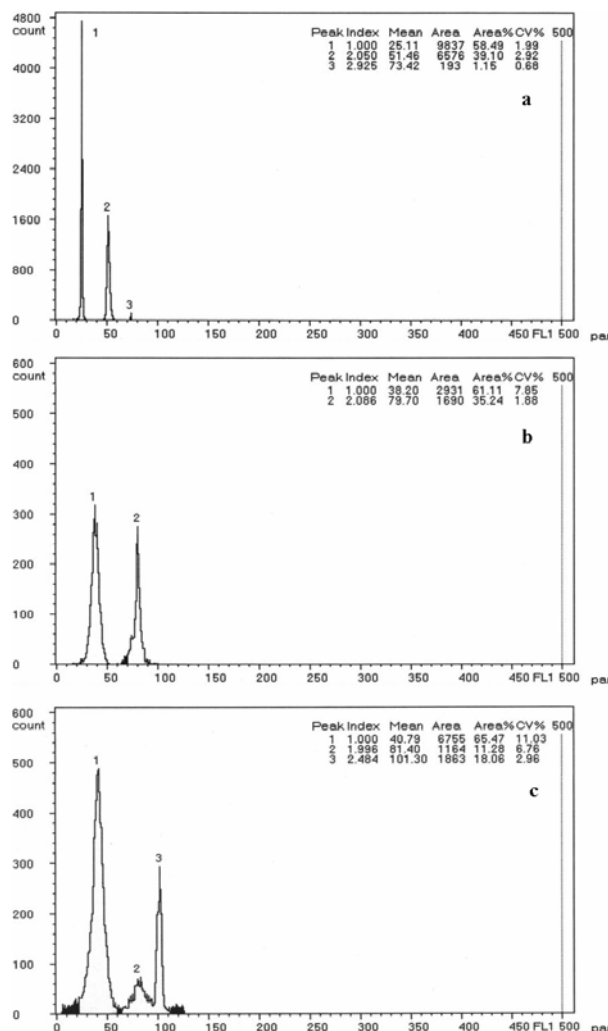
Karas stříbřitý *Carassius gibelio* (Bloch) je v Evropě invazním druhem. V České republice jeho výskyt poprvé zachytili Lusk a kol. (1977) v dolním toku Dyje, postupně tento druh invadoval celý hydrologický systém země (Lusk a kol., 1998). Triploidní populace vznikají chromozómovou duplikací bez prvního meiotického dělení oocytů, následuje oddělení druhého pólového tělíska při druhém meiotickém dělení (Horváth a Orbán, 1995) a gynogenetická reprodukce popsána již Golovinskou a Romashovem (1947). Možnosti alternující gynogenetické a gonochoristické reprodukce *C. gibelio* a možnosti výskytu samčího potomstva nedávno shrnuli Tóth a kol. (2005). Výskyt tetraploidních samců u tohoto druhu v České republice poprvé zaznamenali Halačka a Lusková (2000). Cílem této studie bylo charakterizovat spermie odlovených diploidních, triploidních a tetraploidních samců *C. gibelio*.

Celkem bylo v letech 2003–2006 získáno šestnáct diploidních (2n), pět triploidních (3n) a jeden tetraploidní (4n) samec *C. gibelio* z dolního toku Dyje poblíž soutoku s Moravou. Ryby byly převezeny do VÚRH JU ve Vodňanech na líheň odd. genetiky a šlechtění ryb, hormonálně stimulovány podle Linharta a kol. (2003), sperma bylo odebráno a koncentrace, motilita a rychlost pohybu spermií stanovena podle Linharta a kol. (2000). Krev byla odebrána podle Svobodové a kol. (1991). Životnost spermií jako poměr živých : mrtvých spermií v % byla stanovena epifluorescenční mikroskopií duálním barvením DNA spermií podle Flajšhans a kol. (2004).

Úroveň ploidie každého vzorku byla stanovena jako relativní obsah DNA v erytrocytech a spermiích průtokovou cytometrií (Partec CCA I; Partec GmbH, Münster, Německo) s použitím 4',6-diamidino-2-fenylindolu (DAPI) podle protokolu Linharta a kol. (2006) nejdříve odděleně a poté jako směsné vzorky krvinek a spermií. Erytrocyty a spermie 2n samců byly vzaty jako diploidní, resp. haploidní standard. Vliv ploidie na studované proměnné byl hodnocen ANOVou a Tukey multiple-range testem v programu Statgraphics 5.0 (StatPoint, Inc., Herndon, VI, U.S.A.).

Relativní obsah DNA ve spermiích a erytrocytech všech hodnocených vzorků ukazuje Tabulka 1. Spermie 2n, 3n a 4n samců měly průměrný obsah DNA ekvivalentní 1n (haploidní; Obr. 1a, vrchol histogramu 1), 1,5n (aneuploidní; Obr. 1b, vrchol histogramu 1) a 1,6n (aneuploidní; Obr. 1c, vrchol histogramu 1). Variační koeficient obsahu DNA ve spermiích byl pro 2n nízký, pro 3n vyšší a pro 4n nejvyšší, přičemž zde vykázal rozsah hodnot od haploidních až po aneuploidní vyšší než 2n (hyperdiploidní). Erytrocyty 3n a 4n samců měly průměrný obsah DNA ekvivalentní 1,5 resp. 2násobku hodnoty pro 2n (Obr. 1). Variační koeficient obsahu DNA v erytrocytech byl pro 4n nejvyšší. (Tab. 1).

Obr. 1. Relativní obsah DNA ve spermích karase stříbřitého: a) 2n samce s 1n spermii (vrchol 1) a s 2n erytrocyty (vrchol 2). Nízký vrchol 3 ukazuje trojice spermii; b) 3n samce s aneuploidními spermii (vrchol 1) a 3n erytrocyty (vrchol 2); c) 4n samce s aneuploidními až hyperdiploidními spermii (vrchol 1) a 4n erytrocyty (vrchol 3). Nízký vrchol 2 ukazuje dvojice spermii.



Tab. 1. Relativní obsah DNA (č. kanálu; variační koeficient, C_V ; prům. \pm SD) a vypočtené hladiny ploidie spermii a erytrocytů diploidních (2n), triploidních (3n) a tetraploidního (4n) samce karase stříbřitého, *Carassius gibelio*. Hodnoty se stejným abecedním indexem se průkazně neliší na úrovni $P < 0,05$.

| Samci | Spermie | | | Erytrocyty | | |
|-------|-----------------------------|----------------|---------|------------------------------|---------------|-----------|
| | Kanál č. | C_V (%) | Ploidie | Kanál č. | C_V (%) | Ploidie |
| 2n | 25,0 \pm 0,4 ^a | 2,2 \pm 0,3 | 1n | 49,9 \pm 0,8 ^a | 2,6 \pm 0,4 | (2,0n) 2n |
| 3n | 36,3 \pm 3,1 ^b | 9,5 \pm 1,3 | 1,5n | 77,1 \pm 2,3 ^b | 1,8 \pm 0,3 | (3,1n) 3n |
| 4n | 40,3 \pm 0,5 ^b | 10,3 \pm 1,8 | 1,6n | 100,9 \pm 1,4 ^c | 2,7 \pm 0,7 | (4,0n) 4n |

Úroveň ploidie neměla žádný vliv na koncentraci spermii, ale životnost spermii 2n a 3n byla vyšší než u jediného zachyceného 4n (Tab. 2).

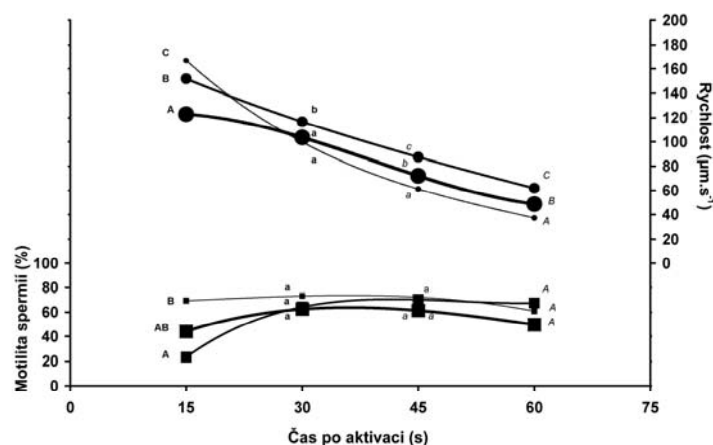
Tab. 2. Relativní objem spermatu na 1 kg živé hmotnosti (b.w.), koncentrace a životnost spermií (spz) a jejich motilita 15 s po aktivaci (prům. ± SD) u spermatu diploidních, triploidních a tetraploidního samce karase stříbřitého, *Carassius gibelio*. Hodnoty se stejným abecedním indexem se průkazně neliší na úrovni $P < 0,05$.

| Samci | Počet ryb | Relativní objem spermatu (ml.kg ⁻¹ b.w.) | Koncentrace (10 ⁹ . ml ⁻¹) | Životnost (% živých spz) | Motilita (% pohyblivých spz) |
|-------|-----------|---|---|---------------------------|------------------------------|
| 2n | 16 | 0,89 ± 0,48 ^a | 16,93 ± 5,62 ^{ab} | 97,37 ± 1,11 ^b | 69,42 ± 37,63 ^b |
| 3n | 5 | 0,98 ± 0,39 ^a | 13,88 ± 4,82 ^{ab} | 96,70 ± 1,45 ^b | 23,18 ± 18,60 ^a |
| 4n | 1 | 0,59 ± 0,16 ^a | 9,38 ± 1,99 ^a | 83,03 ± 1,76 ^a | 44,05 ± 8,41 ^b |

Počáteční rychlosti pohybu spermií 15 s po aktivaci se významně lišily mezi jednotlivými úrovněmi ploidie, ale do 60 s po aktivaci vykázaly podobnou klesající tendenci (Obr. 2). Procento pohybujících se spermií 15 s po aktivaci u 3n bylo významně nižší než u 2n a 4n. Nicméně, od 30 s došlo k vyrovnání těchto rozdílů a v 45 s a 60 s po aktivaci nebyl již žádný významný rozdíl mezi nimi zaznamenán. Ve srovnání s 2n produkovali 3n samci i 4n samec sperma s vysoce variabilním obsahem DNA, což dokazuje aneuploidii spermií 3n samců a aneuploidii s přítomností subpopulace aneuploidních hyperdiploidních spermií u sledovaného 4n samce. Linhart a kol. (2006) došli při sledování úrovně ploidie ve spermatu indukovaných 3n lína obecného (*Tinca tinca*) k podobným závěrům.

Jak 2n, tak 3n samci *C. gibelio* vykazovali podobně vysokou životnost spermií ve srovnání s nižší hodnotou nalezenou u jediného zachyceného 4n samce, přičemž tato nízká hodnota by mohla být způsobena vlivem ploidní úrovně nebo vlivem jedince. Tyto skutečnosti, společně se zjištěním vyrovnané úrovně pohyblivosti spermií ve 30 s po aktivaci, by mohly naznačovat podobné schopnosti spermií samců *C. gibelio* všech tří úrovní ploidie oplodovat oocyty, či při nejmenším indukovat jejich gynogenetický vývoj.

Obr. 2. Motilita (%; čtverec) a rychlost pohybu ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$; kruh) spermií diploidních (2n; malý čtverec a kruh), triploidních (3n; střední čtverec a kruh) a tetraploidního (4n; velký čtverec a kruh) karase stříbřitého, *Carassius gibelio* v čase 15 až 60 s po aktivaci. Hodnoty se stejným abecedním indexem v každém čase po aktivaci se průkazně neliší na úrovni $P < 0,05$.



Poděkování

Tato studie byla podpořena projekty GAČR 206/05/2159 a MSM6007665809.

LITERATURA

- Benfey, T.J., 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 7: 39-67.
- Blanc, J.M., Chourrout, D., Krieg, F., 1987. Evaluation of juvenile rainbow trout survival and growth in half-sib families from diploid and tetraploid sires. *Aquaculture*, 65: 215-220.
- Blanc, J.M., Poisson, H., Escaffre, A.M., Aguirre, P., Vallée, F., 1993. Inheritance of fertilizing ability in male tetraploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 110: 61-70.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females – Potential of tetraploid fish. *Theoretical and Applied Genetics*, 72: 193-206.
- Flajshans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O., 2004. The application of image cytometry for viability assessment of dual fluorescent-stained spermatozoa of fish. *Cell Biology International*, 28: 955-959.
- Golovinskaya, K.A., Romashov, D.D., 1947. Issledovanye po ginogenezu u serebryanogo karasya. *Trudy Vserossiyskogo nautschno issledovatelskogo instituta prudovogo rybnogo khozyaystva*, Moscow, 4: 73-113.
- Halačka, K., Lusková, V., 2000. Polyploidy in Silver crucian carp (*Carassius auratus*) in lower reaches of Dyje river – determination according to erythrocyte nuclear sizes. In: J. Mikešová (ed.), *Sborník referátů IV. české ichthyologické konference, Vodňany, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický*: pp. 110-113.
- Horváth, L., Orbán, L., 1995. Genome and gene manipulation in the common carp. *Aquaculture*, 129, 157-181.
- 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., Gela, D., Kocour, M., Rodriguez, M., 2003. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of eggs stickiness. *Aquatic Living Resources*, 16: 450-456.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Mavrodiev, N., Nebesarova, J., Gela, D., Kocour, M., 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture International*, 14: 9-25.
- Lusk, S., Baruš, V., Veselý, V., 1977. On the occurrence of *Carassius auratus* in the Morava river drainage area. *Folia Zoologica*, 26: 377-381.
- Lusk, S., Lusková, V., Halačka, K., 1998. Silver crucian carp, 25 years after its natural introduction. In J. Mikešová (Editor), *Sborník referátů III. české ichthyologické konference, Vodňany, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický*: pp. 135-140.
- Myers, J.M., Hershberger, W.K., 1991. Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 96: 97-107.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1991. Unified methods of haematological examination of fish. *Manuals of Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodňany*, 22 pp.
- Tóth, B., Várkonyi, E., Hidas, A., Edviné Meleg, E., Váradi, L., 2005. Genetic analysis of offspring from intra- and interspecific crosses of *Carassius auratus gibelio* by chromosome and RAPD analysis. *Journal of Fish Biology*, 66: 784-797.

CHARAKTERISTIKA VYTŘENÉHO A TESTIKULÁRNÍHO SPERMATU ŠTIKY OBECNÉ (*ESOX LUCIUS* L.): MOTILITA A RYCHLOST SPERMIÍ

(Rozšířený abstrakt práce publikované v roce 2008 *Aquatic Living Resources*.)

Hulák, M., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Characteristics of stripped and testicular northern pike (*Esox lucius*) sperm: Spermatozoa motility and velocity. *Aquatic Living Resources*, 21: 207-212.)

M. HULÁK, M. RODINA, O. LINHART

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 389 25 Vodňany, e-mail: hulak@vurh.jcu.cz

Štika obecná je hodnocena jako hospodářsky velmi cenná ryba, která vyniká vysokou konzumní i sportovní hodnotou. Základním problémem v případě reprodukce štiky obecné je kvalita a množství odebraného spermatu. Odebrané sperma je často kontaminováno močí, která aktivuje pohyblivost spermií (Billard a kol., 1978). Zmíněné důvody vedou v praktických podmínkách k vyžívání testikulárního spermatu k oplozování jiker (Billard a kol., 1976).

Cílem práce byla analýza semenné plazmy a moči, zjištění koncentrace spermií u štiky obecné a jejich vztah k pohyblivosti spermií. Metodika práce spočívala v odběru moči, vytřeného a testikulárního spermatu u 37 mlíčáků v období března až dubna. U vytřeného a testikulárního spermatu se posuzovaly následující parametry: počet spermií, spermatokrit, osmotická koncentrace semenné plazmy a moči a vybrané biometrické ukazatele samců. Koncentrace spermií po zředění byla počítána v Bürkerově komůrce pod mikroskopem (zvětšení 400x) podle metodiky Linharta a kol. (2003). Počet spermií na mlíčáka a počet spermií na 1 kg tělesné hmotnosti mlíčáka byly vyjadřovány v 10^9 spermií na mlíčáka. Motilita a rychlost pohybu vytřených a testikulárních spermií byla stanovena podle Linharta a kol. (2002). Rychlost pohybu, procento pohyblivých spermií a celková doba pohybu byla hodnocena pro vytřené (SPZs) a testikulární sperma (SPZt) aktivované destilovanou vodou s BSA či s močí. Osmotická koncentrace byla měřena pomocí osmometru Wescor 5520 a vyjádřena v mOsmol.kg^{-1} . Data byla statisticky vyhodnocována s použitím programu Statgraphics ver. 6.0 pod Windows. Hladina významnosti byla stanovena ($P < 0,05$).

Analýza spermatu štiky obecné prokázala signifikantně ($P < 0,05$) vyšší koncentraci iontů Na^+ ($122,6 \pm 8,9 \text{ mM}$), Cl^- ($126,7 \pm 6,6 \text{ mM}$), a K^+ ($34,5 \pm 5,2 \text{ mM}$) v seminální plazmě testikulárního spermatu (SPZt) v porovnání s vytřeným spermatem (SPZs). Signifikantně vyšší osmolalita seminální plazmy byla stanovena u testikulárního spermatu SPZt ($358,1 \pm 76,5 \text{ mOsmol kg}^{-1}$) ve srovnání s vytřeným spermatem $272,6 \pm 21,4 \text{ mOsmol kg}^{-1}$ a močí $67,9 \pm 35,5 \text{ mOsmol kg}^{-1}$. Signifikantně vyšší koncentrace spermií byla pozorována u testikulárního spermatu ($33,7 \pm 5,3 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$). Analýza procenta pohyblivých spermií a celkové doby pohybu spermií testikulárního a vytřeného spermatu prokázala signifikantně ($P < 0,05$) vyšší celkovou dobu pohyblivosti a procenta pohyblivých spermií při aktivaci spermatu močí (Obr.1, 2). Data získaná v prezentované studii budou využita ke zkvalitnění práce s gametami gamet štiky obecné a možnému vyvinutí imobilizačního roztoku.

Souhrn analyzovaných reprodukčních ukazatelů a základních biometrických parametrů je uveden v Tab. 1.

Poděkování

Práce byla podporována projekty MŠMT ČR č. MSM6007665809 a GAČR č. 524/06/0817.

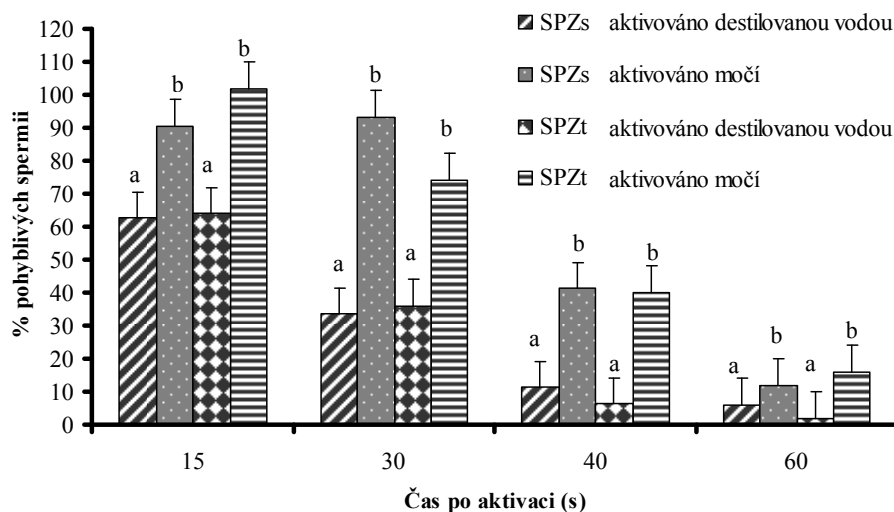
LITERATURA

- Billard, R., 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, 14: 187-198.
- Billard, R., Debruille, M., Gerard, J.P., Montalembert, G., 1976. L'insemination artificielle du brochet. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 262: 30-34.
- Linhart, O., Mims, S.D., Gomelsky, B., Hiott, A.E., Shelton, W.L., Cosson, J., Rodina, M., Gela, D., Bastl, J., 2003. Ionic composition and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula*, *Acipenserriformes*) seminal fluid. *Aquaculture International*, 11: 357-368.
- 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.

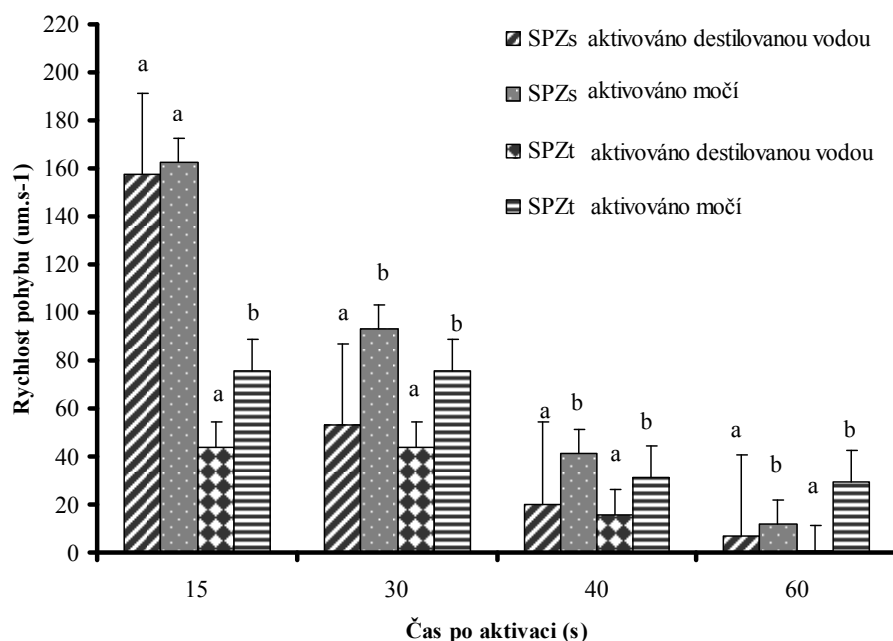
Tab. 1. Popisná statistika mlíčáků štiky obecné (n=37) a souhrn všech testovaných parametrů. Data jsou prezentována jako průměr ± SD. (SEM = standardní chyba průměru; SD = standardní odchylka; MIN = minimum; MAX = maximum; SPZs = vytřené sperma; SPZt = testikulární sperma; GSI = gonadosomatický index; Rf = relativní plodnost; TL = celková délka; BL = standardní délka; BW = hmotnost těla).

| Testované parametry | Měření | Průměr ± SD | SEM | MIN | MAX |
|---------------------|--|----------------|------|-------|------|
| Tělesné parametry | TL; mm | 613,2 ± 52,7 | 8,6 | 550 | 709 |
| | BL; mm | 540,1 ± 38,6 | 8,1 | 440 | 645 |
| | BW; g | 1547,3 ± 466,6 | 76,7 | 880 | 2600 |
| Testes | hmotnost (g) | 34,6 ± 34,6 | 1,9 | 6,6 | 61,7 |
| | GSI (%) | 2,3 ± 0,6 | 0,4 | 0,6 | 4,1 |
| Objem spermatu | SPZs (ml) | 1,2 ± 0,8 | 0,1 | 0,1 | 3,5 |
| | SPZs kg ⁻¹ .BW | 0,8 ± 0,5 | 0,1 | 0,1 | 2,5 |
| Objem moči | (ml) | 0,5 ± 0,5 | 0,1 | 0,1 | 1,6 |
| Koncentrace spermíí | SPZs (10 ⁹ ml ⁻¹) | 22,6 ± 3,5 | 0,6 | 15,63 | 29,4 |
| | SPZt (10 ⁹ ml ⁻¹) | 33,7 ± 5,3 | 12,6 | 21,9 | 42,7 |
| Osmolalita | SPZs (mOsmol kg ⁻¹) | 272,6 ± 21,4 | 3,5 | 204 | 314 |
| | SPZt (mOsmol kg ⁻¹) | 358,1 ± 76,5 | 12,5 | 288 | 596 |
| | moč (mOsmol kg ⁻¹) | 67,9 ± 35,5 | 6,8 | 27 | 191 |
| Počet spermíí | mlíčák ⁻¹ (10 ⁹) | 22,4 ± 16,9 | 12,5 | 8 | 26 |
| | kg ⁻¹ BW (10 ⁹ kg ⁻¹) | 17,7 ± 2 | 0,9 | 5 | 19 |
| Plodnost | Tf (10 ⁹) | 26,4 ± 16,9 | 2,8 | 2,9 | 76,6 |
| | Rf kg ⁻¹ BW (10 ⁹ kg ⁻¹) | 17,7 ± 12 | 1,9 | 1,9 | 55,1 |

Obr. 1. Vliv různých aktivačních médií (destilovaná voda + BSA a moč) na celkovou dobu pohybu spermií štky obecné. Vytřené (SPZs) a testikulární (SPZt) sperma ve vztahu k post-aktivačnímu času. Odlišné horní indexy indikují signifikantní rozdíly ($P < 0.05$) mezi skupinami SPZs a SPZt aktivovaných odlišnými aktivačními médii.



Obr. 2. Vliv různých aktivačních médií (destilovaná voda + BSA a moč) na vývoj rychlosti pohybu spermií štky obecné. Vytřené (SPZs) a testikulární (SPZt) sperma ve vztahu k post-aktivačnímu času. Odlišné horní indexy indikují signifikantní rozdíly ($P < 0.05$) mezi skupinami SPZs a SPZt aktivovaných odlišnými aktivačními médii.



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 rybníkářství, 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 uveřejnění předkládané práce

Autoři předkládají práce (především odborné a přehledové články) výhradně elektronicky bez tištěného originálu na emailovou adresu dvorakz@vurh.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. Všechny následná autorská práva jsou poté chráněna copyrightem vydavatele.

Technická úprava rukopisu

Text příspěvku bude zpracován 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 A5. Nepřehledné, barevné či jinak neodpovídající 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.

BULLETIN VÚRH VODŇANY č. 3/2008 – Vychází čtvrtletně jako účelový tisk Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech - © - JU VÚRH Vodňany 389 25 Vodňany – Registr. č. MK ČR E 12997. IČO 600 76 658. Šéfredaktor: Ing. T. Polícar, Ph.D. – Redakční rada Bulletinu VÚRH Vodňany: Ing. T. Polícar, Ph.D., doc. Ing. M. Flajšhans, Dr.rer.agr., prof. Ing. O. Linhart, DrSc., Ing. P. Kozák, Ph.D., Ing. T. Randák, Ph.D., Z. Dvořáková, prof. MVDr. Z. Svobodová, DrSc., doc. Dr. Ing. J. Mareš, prof. A. Ciereszko, Ph.D., Mgr. R. Grabič, Ph.D., A. Viveiros, Ph.D., Dr. V. P. Fedotov, Dr. G. J. Martín

Tisk: PTS Vodňany, s.r.o.

Toto číslo bylo předáno do tisku: 12. 12. 2008