



Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Jakość nasienia – wyznaczniki i ich wpływ na efektywność procesu kriokonserwacji

Sylwia Judycka

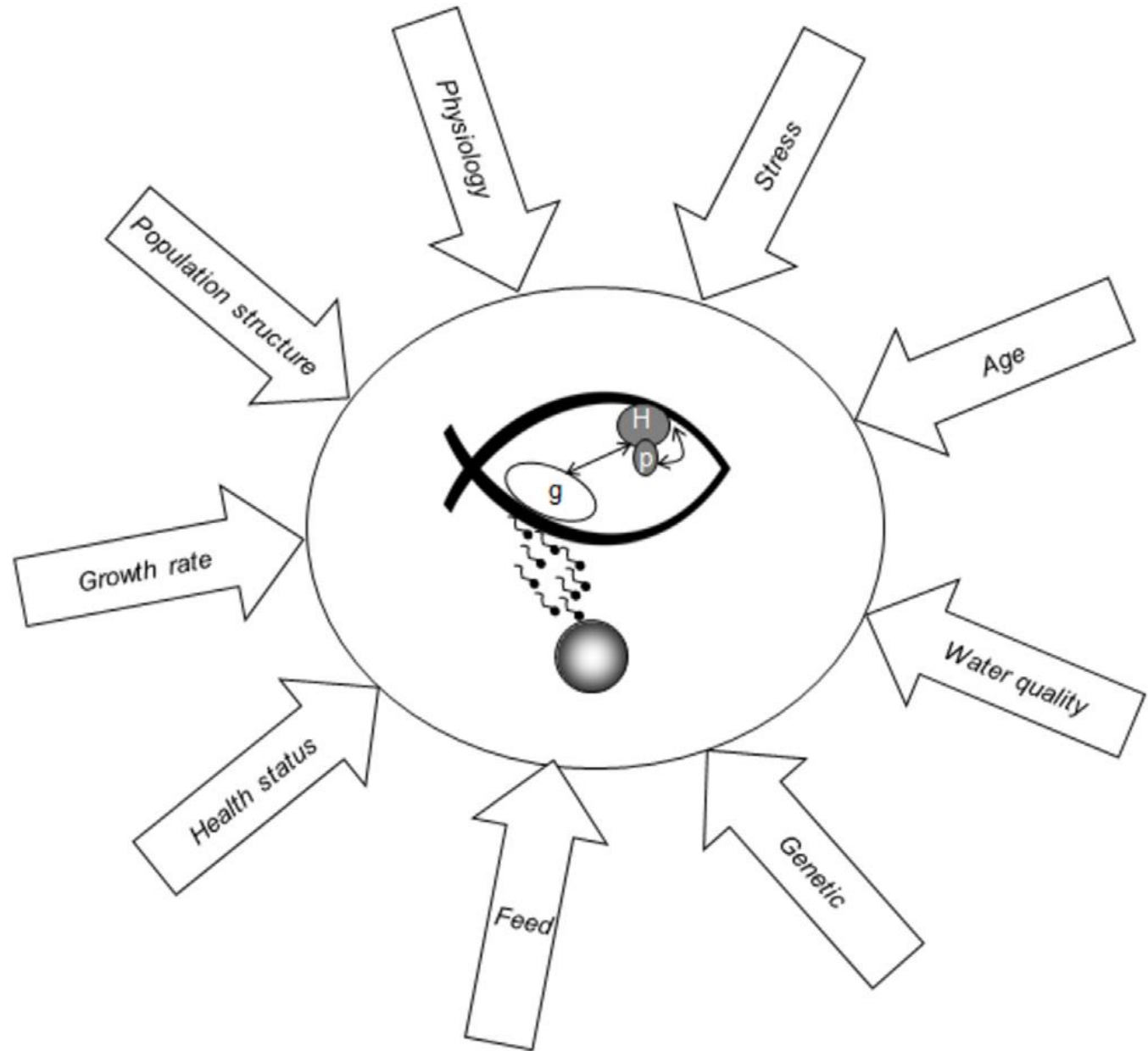


Ta działalność została sfinansowana przez EIT Food, Wspólnotę Innowacji ds. Żywności Instytutu Innowacji i Technologii (EIT), organu UE w ramach programu „Horyzont 2020”, programu ramowego UE w zakresie badań i innowacji.

Jakość nasienia

- zdolność do zapłodnienia jaja, a tym samym umożliwienia rozwoju normalnego zarodka,
- jakość nasienia może być bardzo zmienna, dlatego jego ocena jest warunkiem wstępnym do przeprowadzenia prób zapłodnienia,
- uzyskanie nasienia dobrej jakości jest niezbędne do przeprowadzenia kontrolowanego rozrodu w warunkach wylęgarni.

Z tego powodu, ostatecznym testem jakości nasienia jest pomiar zdolności zapładniającej plemników.



Kowalski R. K. , Cejko B. I. 2019. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135, 94-108.

Ocena makroskopowa

- objętość,
- kolor,
- jednorodność,
- brak zanieczyszczeń (mocz, krew, kał),
- gęstość.



Pobranie nasienia

masaż powłok brzusznych



użycie katetera



post-mortem od
neosamców

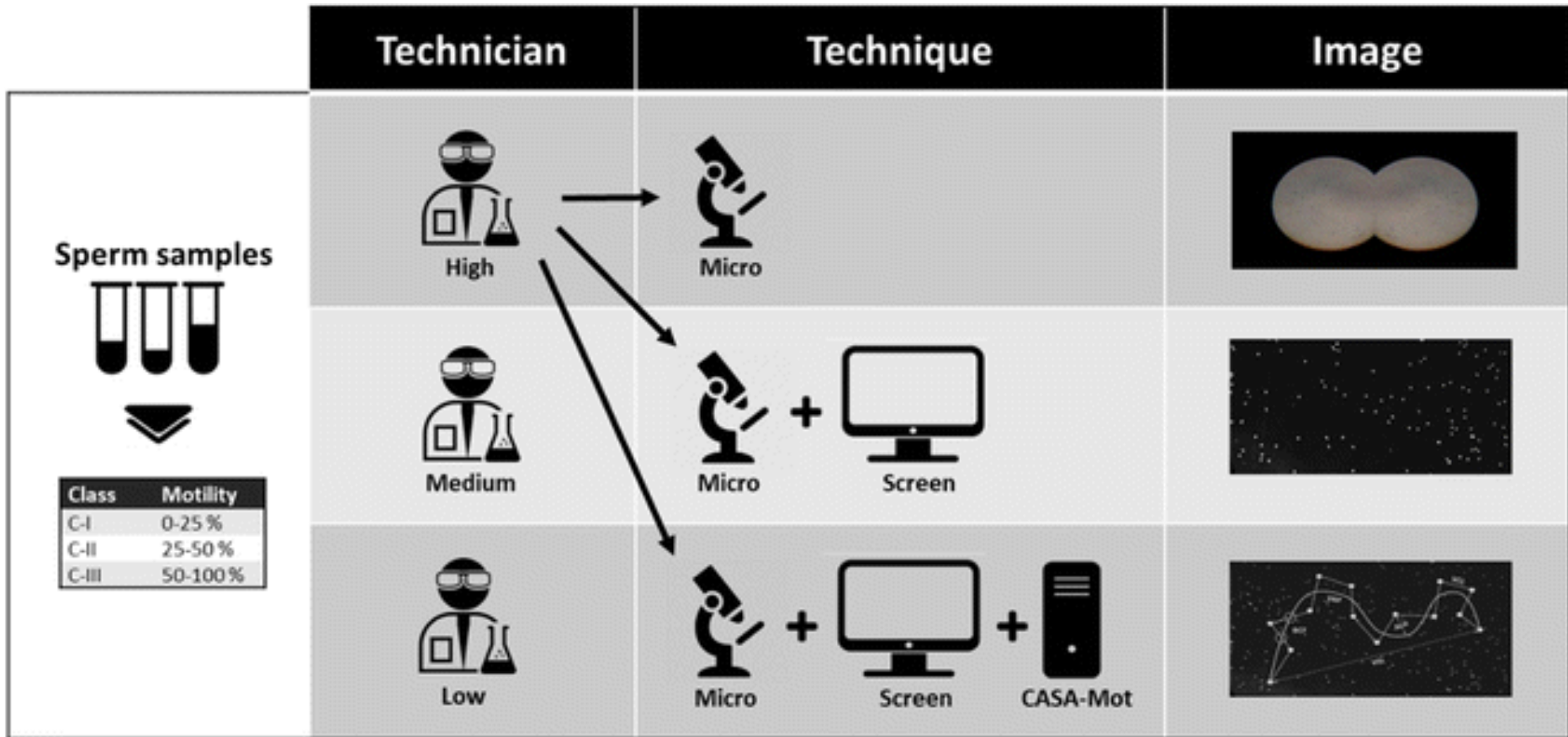


Ocena mikroskopowa

- ruchliwość plemników,
- koncentracja plemników,
- żywotność plemników,
- fragmentacja DNA.



Ruchliwość plemników



Gallego, V., Herranz-Jusado, J. G., Rozenfeld, C., Pérez, L., Asturiano, Juan F. 2018. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44, 1457-1467.

Aktywacja ruchu plemników

2. $1\mu\text{l}$ nasienia

3. Mix

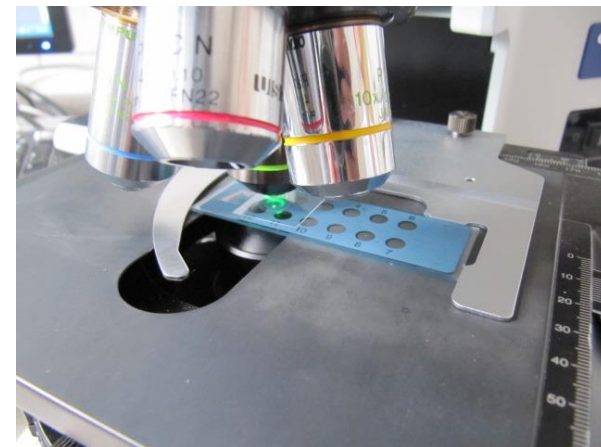
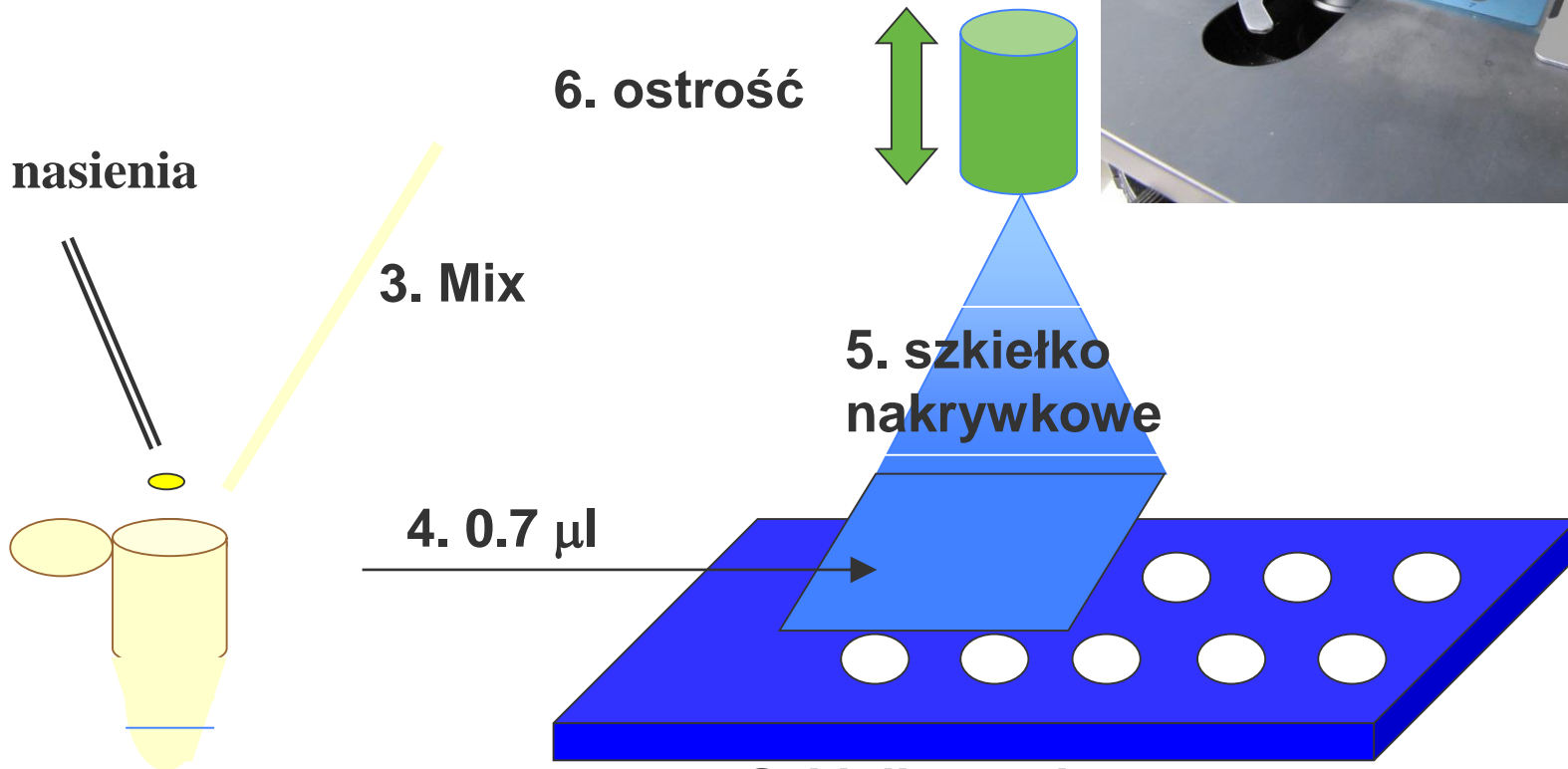
4. $0.7\mu\text{l}$

6. ostrość

5. szkiełko nakrywkowe

Szkiełko podstawowe

1. $500\mu\text{l}$ buforu aktywującego



Parametry ruchliwości plemników

MOT – ruchliwość plemników,

VCL – prędkość ruchu krzywoliniowego,

VSL - prędkość ruchu prostoliniowego,

VAP – prędkość całkowita ruchu,

ALH – amplituda odchyień główki,

LIN- liniowość ruchu.

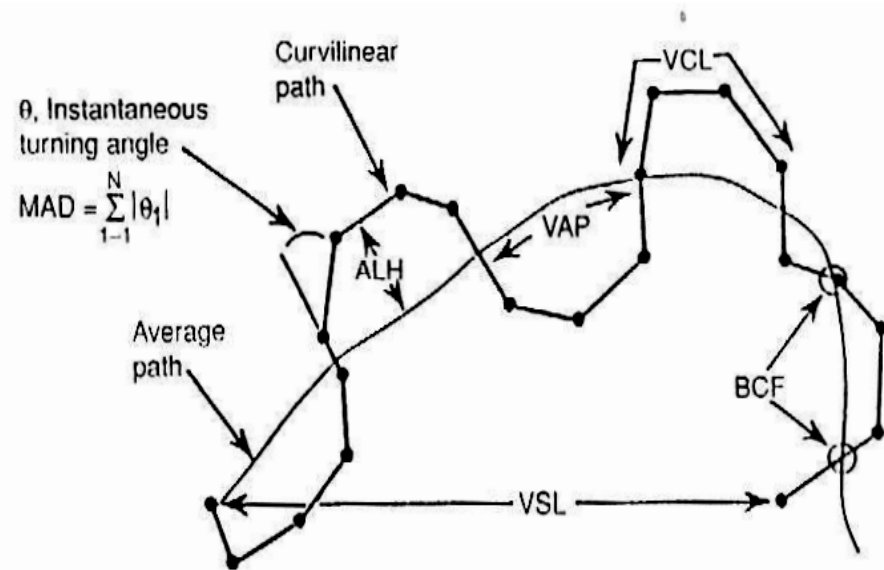
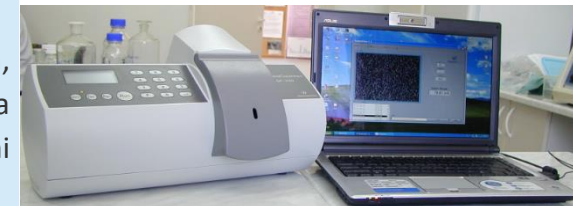


Fig. 1. Schematic diagram of sperm kinematic measures.

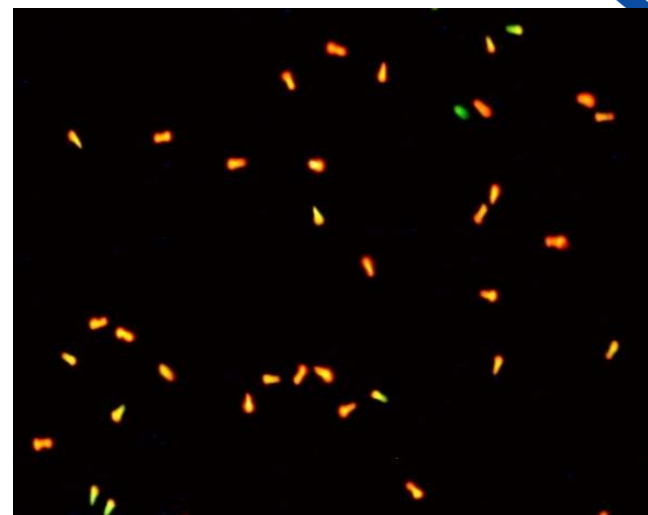
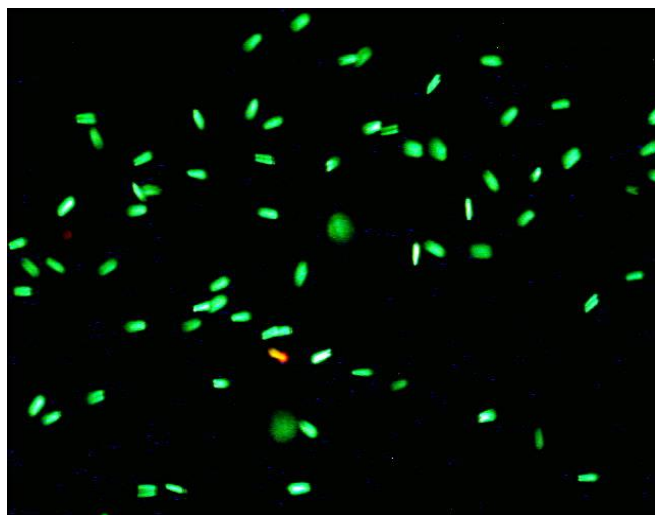
Koncentracja plemników

Metoda	Zalety	Wady
Komora Bürkera	Wiarygodne, tanie	Czasochłonne, podatne na stroniczość obserwatora, nieodpowiednie dla analizy wielu próbek, różnice między różnymi typami hemocytometrów
Spektrofotometr	Wiarygodne, szybki pomiar, tanie	Wstępne przygotowanie krzywej standardowej wymaga czasu, możliwość niedokładnego przygotowania w przypadku próbek, które zawierają nadmierne zanieczyszczenia lub cząstki stałe lub są zanieczyszczone komórkami innymi niż plemniki
NucleoCounter	Niezawodne, szybkie, standaryzacja nie jest wymagana, powtarzalne, jednoczesne określenie żywotności, można zastosować do nasienia kriokonserwowanego.	Koszt urządzenia i kasetek jednorazowych, możliwość nadmiernego zanieczyszczenia innymi komórkami jądrazastymi skutkującymi niespecyficzną fluorescencją
Cytometr przepływowy	Wiarygodne, powtarzalne, można stosować do nasienia kriokonserwowanego, jednocześnie określając inne parametry nasienia, np. żywotność, potencjał mitochondrialny, stres oksydacyjny	Koszt urządzenia i jego utrzymania, wymaga wysoko wykwalifikowanego personelu



Żywotność plemników

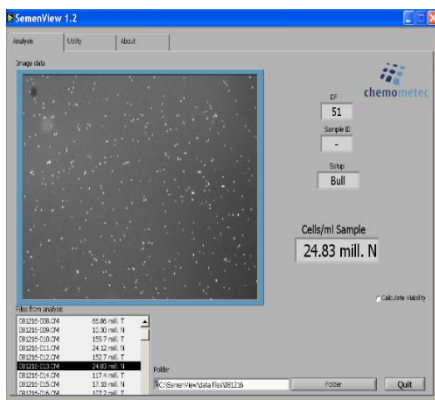
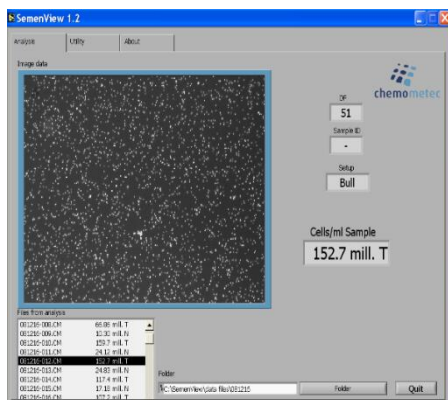
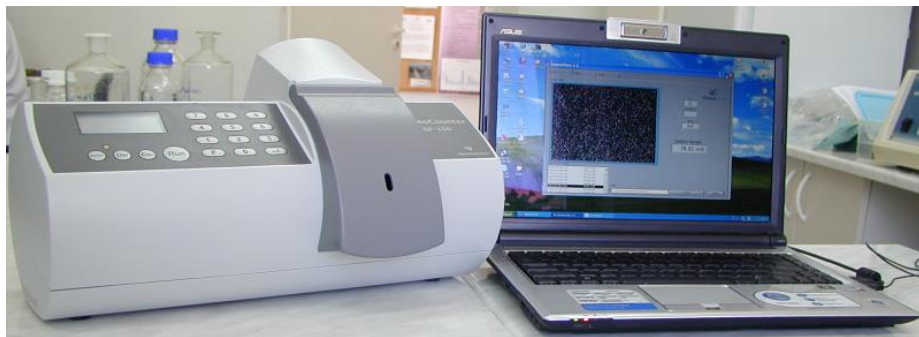
mikroskop fluorescencyjny



SYBR® 14 – plemniki żywe,
jodek propidyny – plemniki martwe.

Żywotność plemników

aparat NucleoCounter SP-100



cytometr przepływowy



Parametry cytometryczne

- integralność błon cytoplazmatycznych (żywołność),
- płynność błon cytoplazmatycznych,
- potencjał mitochondrialny,
- stres oksydacyjny,
- apoptoza,
- uszkodzenie DNA,
- peroksydacja lipidów.



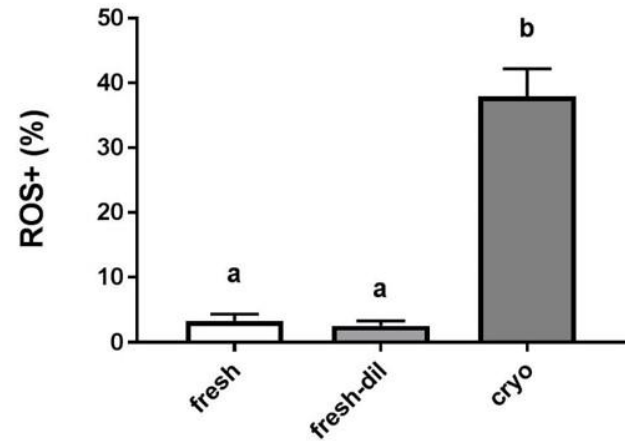
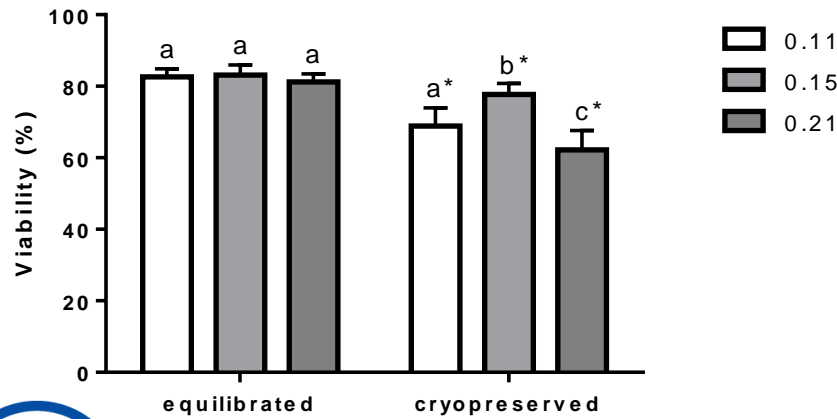
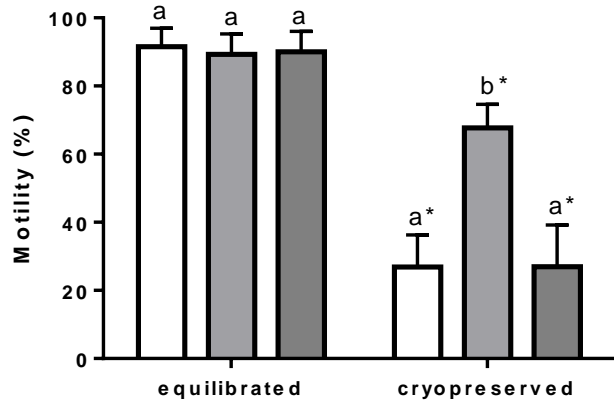
Kriokonserwacja

- polega na zamrożeniu i przechowywaniu materiału biologicznego (komórek, tkanek, embrionów) w niskich temperaturach (-196°C), z zapewnieniem utrzymania żywotności po rozmrożeniu,
- jest potencjalną metodą umożliwiającą zredukowanie stada tarłowego,
- zapewnia hodowcy całoroczną dostępność nasienia, możliwość zachowania nasienia pożądanych wyselekcjonowanych linii hodowlanych w banku nasienia oraz ułatwienie w transporcie mlecza,
- umożliwia również przeprowadzenie krzyżówek pomiędzy liniami lub pokrewnymi gatunkami charakteryzującymi się odległymi terminami tarła.

Ocena jakości nasienia po rozmrożeniu

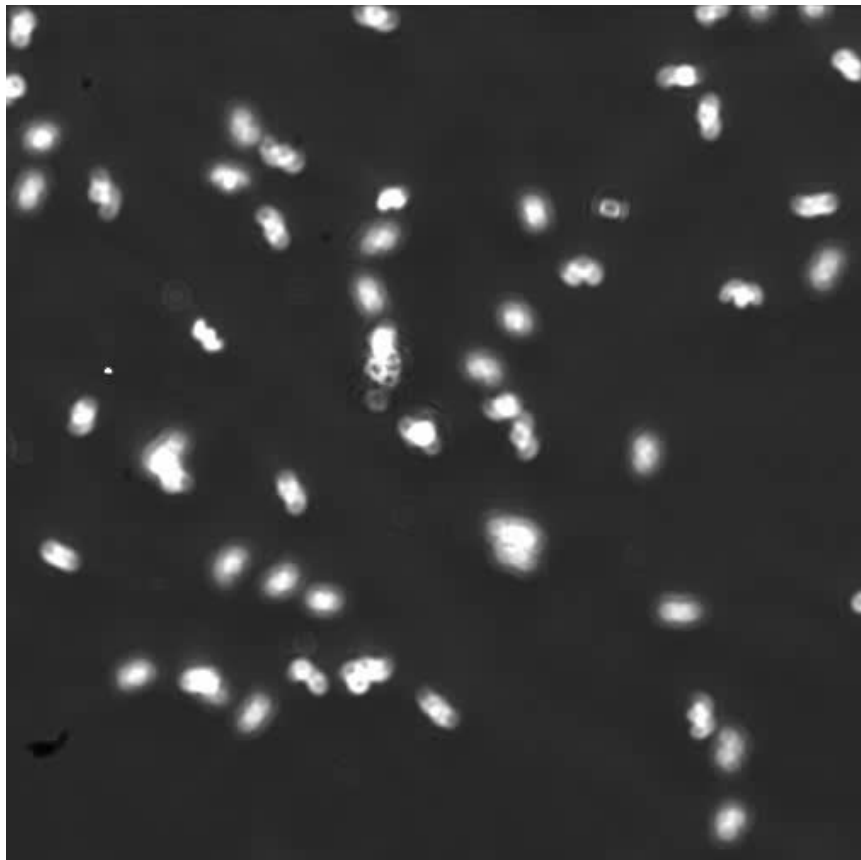
- odsetek ruchliwych plemników (CASA),
- żywotność,
- ROS,
- zdolność zapładniająca rozmrożonego nasienia (próba biologiczna).

Wpływ kriokonserwacji na jakość nasienia po rozmrożeniu

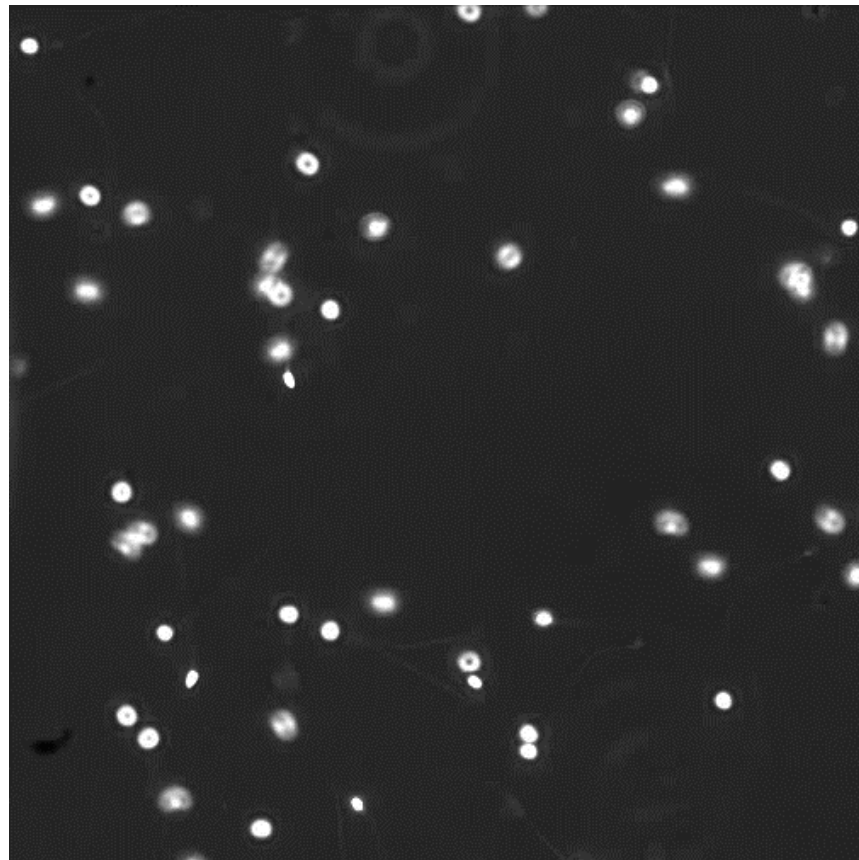


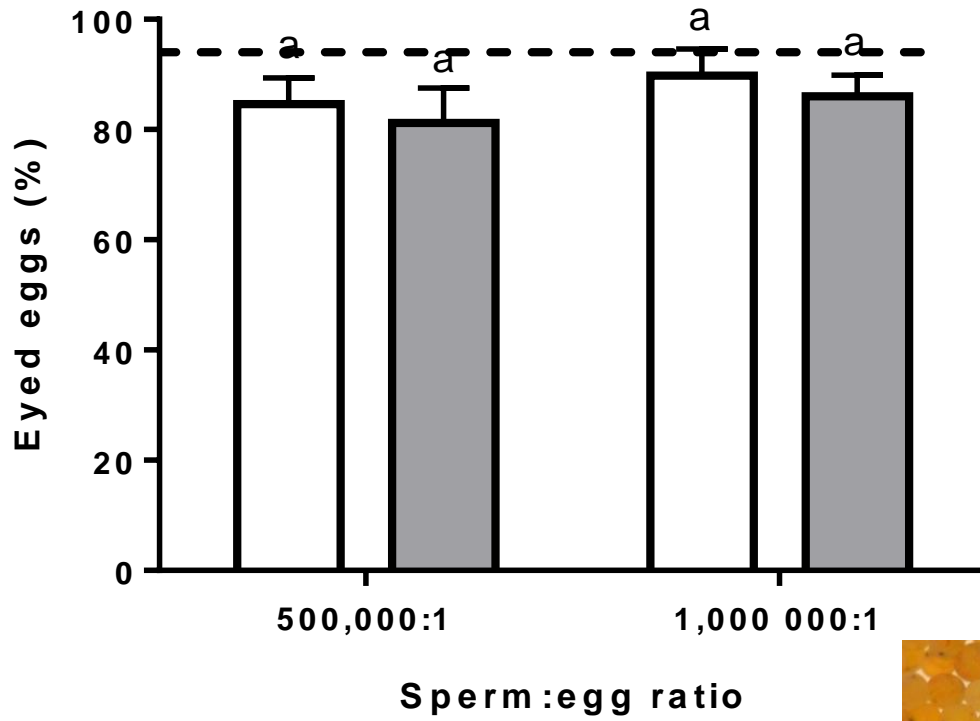
Wpływ kriokonserwacji na jakość nasienia po rozmrożeniu

Nasienie świeże



Nasienie kriokonserwowane







Dziękuję za uwagę!

