



Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Morski i Rybacki



*IV Ogólnopolska Konferencja Hodowców Ryb  
w Obiegach Zamkniętych  
26-27 września 2019, Mądrzechowo*

# **Optymalizacja rozrodu szczupaka Część II: Jakość nasienia oraz konfekcjonowanie gamet**

*Zakład Biologii Gamet i Zarodka,  
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności  
Polska Akademia Nauk, Olsztyn*

# Wprowadzenie

## Manipulacje z tarlakami

- odłów
- przeglądanie tarlaków
- transport
- inne manipulacje



<http://www.gminaslawa.pl/2235-w-wodach-slaskiego-jeziora-przybedzie-szczupakow.html>

## Zmienność osobnicza

## Samice



- brak owulacji
- obniżona jakość ikry  
(przejrzwanie ikry)

## Samce



- niewielka objętość nasienia
- obniżona jakość nasienia  
(zanieczyszczenie nasienia)

## Strategia działania

### Tarlaki

- minimalizowanie stresu
- właściwy czas pozyskiwania nasienia
- właściwy sposób pozyskiwania nasienia



### Gamety

- właściwa diagnostyka nasienia
- przechowywanie krótkookresowe
- kriokonserwacja

#### Metody tradycyjne

- wykorzystanie stymulacji hormonalnej
- wykorzystanie nasienia gonadalnego  
(obniżona jakość plemników)

#### Metody innowacyjne

- wykorzystanie różnych buforów
- wykorzystanie sztucznej plazmy nasienia

#### Metody tradycyjne

- ocena makroskopowa  
(subiektywność oceny)

#### Metody innowacyjne

- wykorzystanie pH-metrów
- wykorzystanie systemu CASA
- wykorzystanie cytometru

**Gamety**

**jakość plemników**



**zdolność do zapłodnienia czego efektem jest rozwój funkcjonalnych embrionów**



**ocena jakości nasienia**

- jeden z ważniejszych etapów kontrolowanego rozrodu
- moment podejmowania decyzji o przeznaczeniu konkretnej partii nasienia do dalszych procedur hodowlanych (tj. zapłodnienia, przechowywania, kriokonserwacji)

**przeżywalność embrionów**

- **informacja o tym jakiej jakości nasienia użyto do zapłodnienia**

# Strategia działania

## Objętość nasienia i ilości plemników

- całkowita objętość nasienia
- koncentracja plemników
- całkowita ilość plemników

## Ruchliwość plemników

- MOT (%): odsetek plemników ruchliwych
- PRG (%): odsetek plemników o ruchu progresywnym
- VCL ( $\mu\text{m/s}$ ): całkowita prędkość plemnika
- VSL ( $\mu\text{m/s}$ ): prostoliniowa prędkość plemnika
- ALH ( $\mu\text{m}$ ): amplituda bocznych wychyleń główki
- BCF (Hz): częstotliwość uderzeń witki
- LIN ( $\text{VSL} \times \text{VCL}^{-1} \times 100\%$ ): liniowość ruchu
- STR ( $\text{VSL} \times \text{VAP}^{-1} \times 100\%$ ): kierunkowość ruchu
- BCF (Hz): częstotliwość uderzeń witki

## Jakość nasienia

- pH nasienia
- pH plazmy nasienia
- ciśnienie osmotyczne plazmy nasienia

## Żywotność plemników

- odsetek plemników żywych
- odsetek plemników martwych
- odsetek plemników apoptotycznych

## Integralność plemników

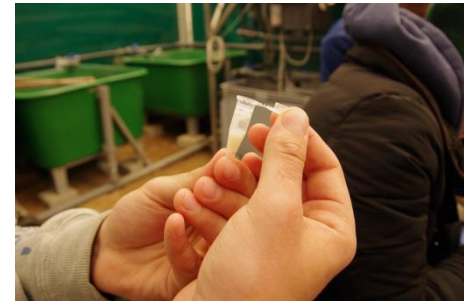
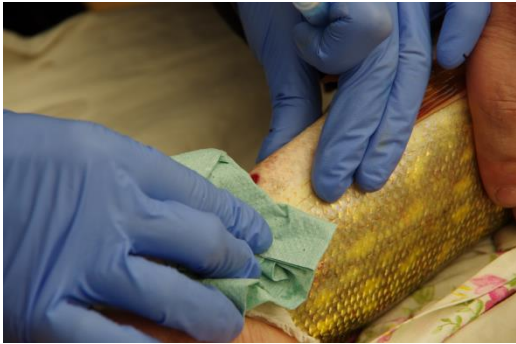
- aktywność AS
- aktywność B-NAG
- aktywność AcP
- aktywność LDH

## Pozyskiwanie nasienia szczupaka

### metoda tradycyjna

### masaż partii brzusznych

- stosowana powszechnie w warunkach kontrolowanych



### konsekwencje



- ryzyko zanieczyszczenia
- zmienność otrzymywanych wyników

### niewielka objętość pozyskanego nasienia



# Pozyskiwanie nasienia szczupaka

## metoda post-mortem

### uśmiercenie samców

- w sytuacji braku możliwości pozyskania nasienia tradycyjnie
- w sytuacji niewielkiej ilości nasienia jaką się dysponuje
- w sytuacji braku wystarczającej ilości samców



## konsekwencje

- obniżona jakość (**nasienie dojrzewa w nasieniowodach**)
- brak sukcesu w zapłodnieniu
- obniżona efektywność rozrodu



# Poprawa jakości nasienia

metoda tradycyjna

metoda innowacyjna

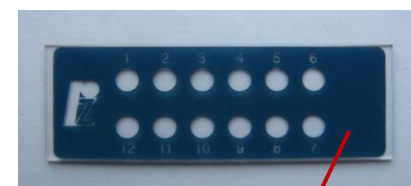
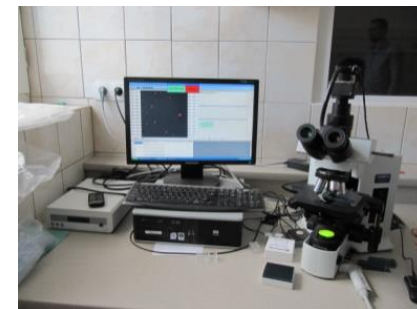
płyны aktywujące

jakość nasienia determinuje efektywność zapłodnienia

wybór optymalnego płynu do aktywacji

Tabela 1. Płyны aktywujące o odmiennym składzie, pH oraz osmolalności wykorzystywane do aktywacji plemników szczupaka w warunkach kontrolowanych. \* Każdy płyn aktywujący zawiera 0.5% albuminę surowicy bydlęcej (BSA).

Płyны aktywujące	Skład płynów aktywujących	Osmolalność (mOsm kg <sup>-1</sup> )	pH	Autor
AS 1	40 mM NaHCO <sub>3</sub> and 20 mM Tris	100	8.5	Sarosiek i in. 2012
AS 2	100 mM NaCl and 10 mM Tris	200	9.0	Lahnsteiner i in. 1998
AS 3	68 mM NaCl and 50 mM urea	180	7.7	Woynarovich i Woynarovich 1980
AS 4	125 mM NaCl, 20 mM Tris, 30 mM glycine, 1 mM CaCl <sub>2</sub>	345	9.0	Billard 1986
AS 5	120 mM NaCl	225	7.2	Babiak i in. 1997
AS 6	Woda wylęgarniana	10	7.4	Szabó 2003





## Poprawa jakości nasienia

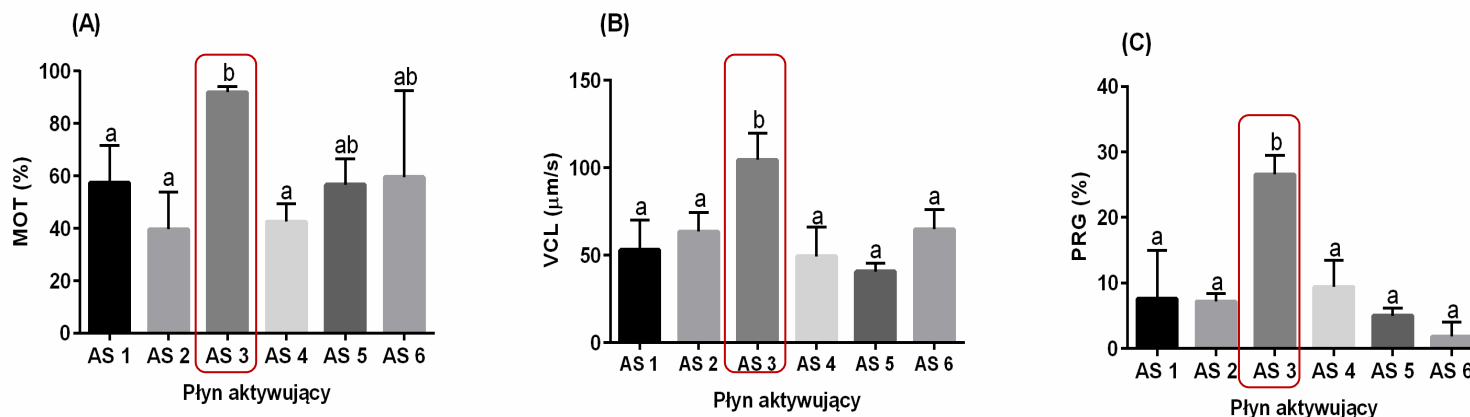
metoda tradycyjna

metoda innowacyjna

płyiny aktywujące

**jakość nasienia determinuje efektywność zapłodnienia**

**wybór optymalnego płynu do aktywacji**



Rys. 1. Odsetek plemników ruchliwych (A), prędkość krzywoliniowa plemników (B) oraz odsetek plemników o ruchu progresywnym (C) po aktywacji plemników za pomocą wybranych płynów aktywujących (AS). Różne indeksy literowe wskazują na istotności różnic w wartościach analizowanych parametrów ( $P < 0,05$ ).

**Roztwór Woynarovicha – rekomendowany do aktywacji plemników szczupaka**

## Poprawa jakości nasienia

metoda tradycyjna

metoda innowacyjna

stymulacja hormonalna



konsekwencje

- zwiększenie wydajności reprodukcyjnej samców
- poprawa jakości gamet (**ruchliwość plemników**)
- stymulacja dojrzałości plemników
- synchronizacja tarła

naturalne

- homogenat (ekstrakt) przysadki mózgowej karpia
- homogenat przysadki mózgowej leszcza
- hCG



syntetyczne

- Ovopel (mGnRHa)
- Ovaprim (sGnRHa)
- Ovaplant
- Kobarelin
- Lecirelin
- Gonazon

# Poprawa jakości nasienia

metoda tradycyjna

metoda innowacyjna

stymulacja hormonalna



Animal Reproduction Science 193 (2018) 217–225

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)



Effect of carp pituitary homogenate (CPH) and sGnRH $\alpha$  (Ovaprim) on northern pike (*Esox lucius*) spermiation stimulation and its effect on quantity and quality of sperm



Beata Irena Cejko<sup>a,\*</sup>, Sławomir Krejszef<sup>b</sup>, Daniel Źarski<sup>a</sup>, Sylwia Judycka<sup>a</sup>, Katarzyna Targońska<sup>c</sup>, Dariusz Kucharczyk<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Gamete and Embryo Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olaszyn, Poland

<sup>b</sup> Department of Aquaculture, The Stanisław Sokolowicz Inland Fisheries Institute, Olaszyn, Poland

<sup>c</sup> Department of Lake and River Fisheries, Faculty of Environmental Sciences, University of Warmia and Mazury, Olaszyn, Poland

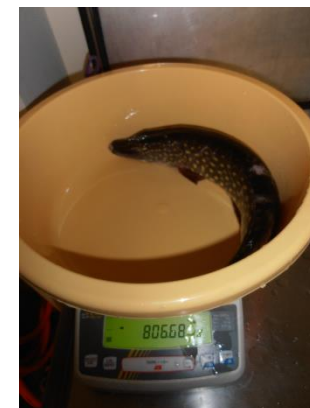


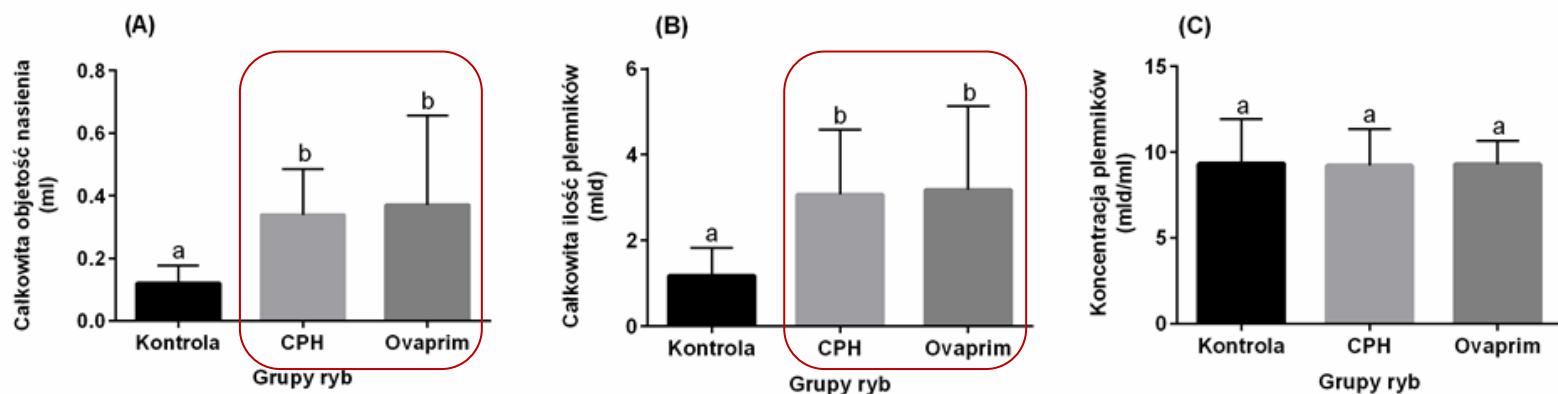
Table 1

Selected preparations used for stimulation of northern pike (*Esox lucius*) males under artificial conditions.

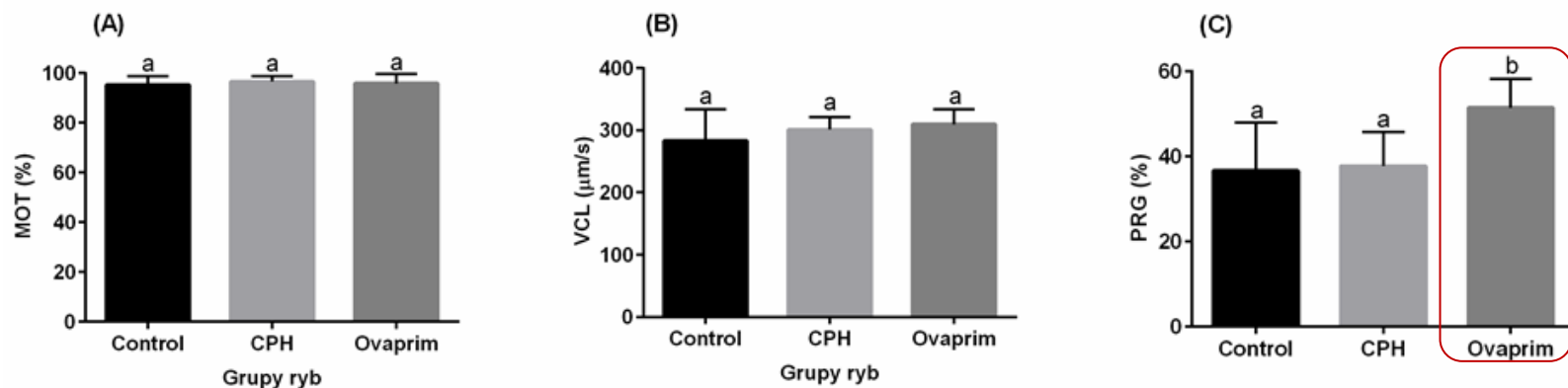
Selected preparations	Commercial names	Number of fish	Dose (b.w.)	Commercial availability
0.9% NaCl	Control	7	1.0 ml kg <sup>-1</sup>	Sigma-Aldrich (Germany)
Carp pituitary homogenate	CPH	7	2.0 mg kg <sup>-1</sup>	Argent (USA)
[(D-Arg <sup>6</sup> , Pro <sup>9</sup> NET)-sGnRH + domperidone	Ovaprim <sup>a</sup>	7	0.5 ml kg <sup>-1</sup>	Syndel (Canada)

<sup>a</sup> One ml of Ovaprim contained 20  $\mu$ g sGnRH $\alpha$  and 10 mg domperidone (Peter et al. 1993).

## stymulacja hormonalna



**Rys. 2.** Całkowita objętość nasienia (A), ilość plemników (B) oraz ich koncentracja (C) po stymulacji hormonalnej samców szczupaka za pomocą homogenatu przysadki mózgu karpia (CPH, n = 7), sGnRHa (Ovaprim, n = 7) oraz w grupie kontrolnej (Kontrola, n = 7). Różne indeksy literowe wskazują na istotności różnic w wartościach analizowanych parametrów (P < 0,05).



**Rys. 3.** Odsetek plemników ruchliwych (A), prędkość krzywoliniowa plemników (B) oraz odsetek plemników o ruchu progresywnym (C) po stymulacji hormonalnej samców szczupaka za pomocą homogenatu przysadki mózgu karpia (CPH, n = 7), sGnRHa (Ovaprim, n = 7) oraz w grupie kontrolnej (Kontrola, n = 7). Różne indeksy literowe wskazują na istotności różnic w wartościach analizowanych parametrów (P < 0,05).

## *Poprawa jakości nasienia*

metoda innowacyjna

konfekcjonowanie nasienia



**Artificial Seminal Plasma (ASP)** = środowisko imitujące naturalną plazmę nasienia

Sztuczna plazma nasienia

**Wykorzystywana w celu:**

- zatrzymanie procesów starzeniowych (degradacyjnych) plemników
- przechowywanie plemników poza ich naturalnym środowiskiem (jądra) do czasu wykorzystania (zapłodnienie)

**Brak synchronizacji owulacji/spermacji**

- transportu nasienia z miejsca poboru (stawy hodowlane) do miejsca wykorzystania (wylęgarnia)
- wyboru najlepszych prób nasienia

## Poprawa jakości nasienia

metoda innowacyjna

konfekcjonowanie nasienia



spowolnienie dynamiki procesów starzeniowych

temp. przechowywania 4°C





## metoda innowacyjna

## konfekcjonowanie nasienia

Aquaculture 506 (2019) 224–228

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquaculture](http://www.elsevier.com/locate/aquaculture)

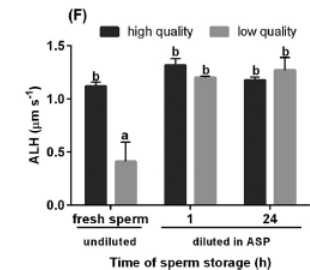
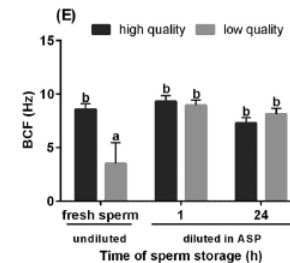
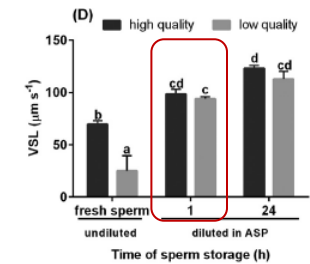
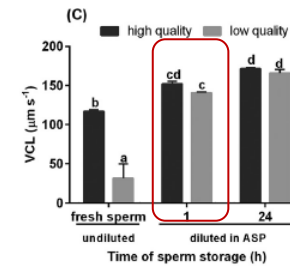
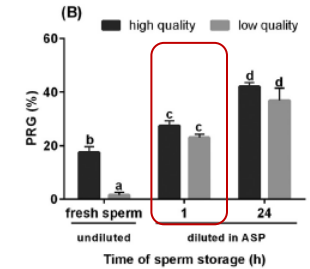
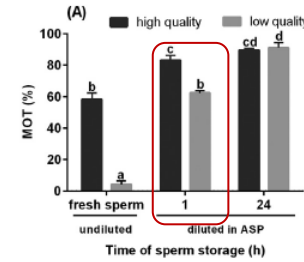
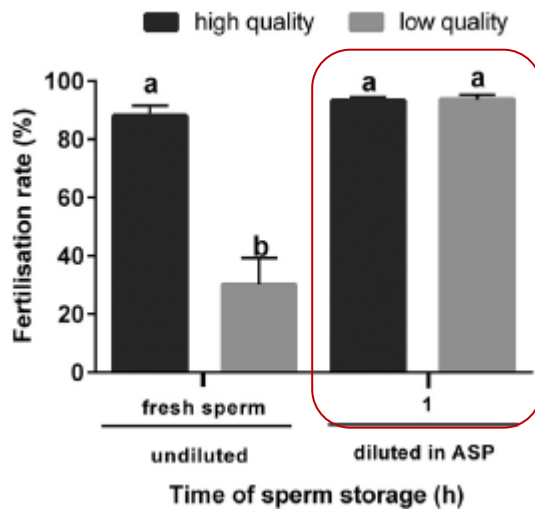


Short communication

Artificial seminal plasma improves motility and fertilisation capacity of common carp *Cyprinus carpio* L. sperm during one hour of storage

Beata Irena Cejko<sup>a,\*</sup>, Daniel Źarski<sup>a</sup>, Katarzyna Palińska-Źarska<sup>b</sup>, Mariola Słowińska<sup>a</sup>, Radosław Kajetan Kowalski<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Gamete and Embryo Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Science, Olsztyn, Poland  
<sup>b</sup> Department of Ichthyology, Faculty of Environmental Sciences, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland



## Poprawa jakości nasienia

metoda innowacyjna

konfekcjonowanie nasienia

130 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 40 mM KCl, 20 mM Tris, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O



- rozrzedzeniem szkodliwych metabolitów oddychania komórkowego
- zapewnieniem plemnikom lepszego dostępu do tlenu niezbędnego dla podtrzymania ich bazowego metabolizmu

rozrzedzone nasienie (5x)



1 porcja nasienia  
(1 ml)



9 porcji ASP  
(4 ml)

# Poprawa jakości nasienia

## metoda innowacyjna

## konfekcjonowanie nasienia

<https://www.bionovo.pl/k/>

The screenshot shows the Bionovo website with the logo circled in red. The page title is 'Butelki z PS do hodowli komórkowych'. A search bar on the left lists various laboratory equipment categories. The main content area features a 3D rendering of a stack of white plastic bottles with blue caps. Below the rendering is a table of product specifications.

Mililitra	No-ART	Nazwa	Zamknięcie	Prw. wzrostu	Pojemność	Poj. maks.	Sat./Dp.	Cena netto	Ilość
	B-4250	Butelka z PS do hodowli komórkowych z zawleczką z filtrem	z zawleczką z filtrem	25 cm <sup>2</sup>	7 ml	60 ml	200 sat.	384,84 zł	1
	B-4251	Butelka z PS do hodowli komórkowych z zawleczką z filtrem	z zawleczką z filtrem	75 cm <sup>2</sup>	23 ml	250 ml	100 sat.	433,77 zł	1
	B-4252	Butelka z PS do hodowli komórkowych z zawleczką z filtrem	z zawleczką z filtrem	175 cm <sup>2</sup>	50 ml	650 ml	40 sat.	352,29 zł	1
	B-4255	Butelka z PS do hodowli komórkowych ze szklaną zawleczką	ze szklaną zawleczką	25 cm <sup>2</sup>	7 ml	60 ml	200 sat.	360,24 zł	1
	B-4256	Butelka z PS do hodowli komórkowych ze szklaną zawleczką	ze szklaną zawleczką	75 cm <sup>2</sup>	23 ml	250 ml	100 sat.	397,58 zł	1
	B-4257	Butelka z PS do hodowli komórkowych ze szklaną zawleczką	ze szklaną zawleczką	175 cm <sup>2</sup>	50 ml	650 ml	40 sat.	342,57 zł	1

<http://www.biokom.com.pl/>

The screenshot shows the Biokom website with the logo circled in red. The page title is 'PLASTIK • PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT • PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT • BUTELKI DO HODOWLI KOMÓRKOWEJ'. The main content area features three images: a stack of white plastic bottles, a petri dish with pink cells, and a rack of test tubes. Below the images is a search bar and a table of product specifications.

Wyszukaj	Butelki do hodowli komórkowej
plastik	Przechowywanie i T
Przechowywanie i T	Przechowywanie i T
Przechowywanie i T	Przechowywanie i T

NIE ZNALEZIONO SZUKANEJ FRAZY

WYBIERZ SWÓJ REGION

Biokom działa na polskim rynku od 1995 jako dystrybutor, reprezentując ponad 50 renomowanych firm z całego świata. Nasza oferta obejmuje mikroskopy i aparaturę do badania oraz naukowe bioreaktory i bioreaktorzy.

Oddział Warszawa  
@ Dorota Polowinski  
Przedstawiciel regionalny  
tel. 489 527 979  
e-mail: ruskowski@biokom.pl

## Zabezpieczenie puli genowej

metoda innowacyjna

kriokonserwacja



Krioprotektory przenikające (np. metanol)  
oraz nieprzenikające (np. cukry)

Gatunkowo specyficzne rozrzedzalniki

### Wykorzystywana w celu

- zabezpieczenia puli genowej gatunków zagrożonych wyginięciem lub gatunków cennych z gospodarczego punktu widzenia
- ograniczenie stresującej i czasochłonnej manipulacji tarlakami
- w restytucji zagrożonych dzikich populacji ryb
- optymalne zarządzanie stadem tarłowym
- transportu nasienia z miejsca poboru (stawy hodowlane) do miejsca wykorzystania (wylęgarnia)

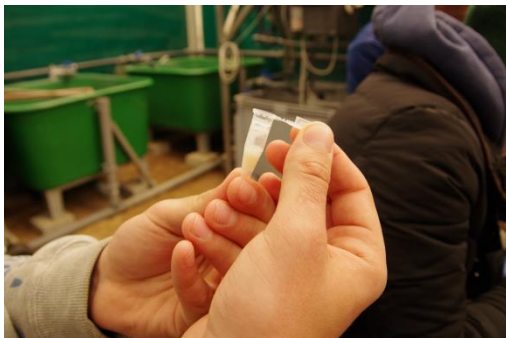


# Zabezpieczenie puli genowej

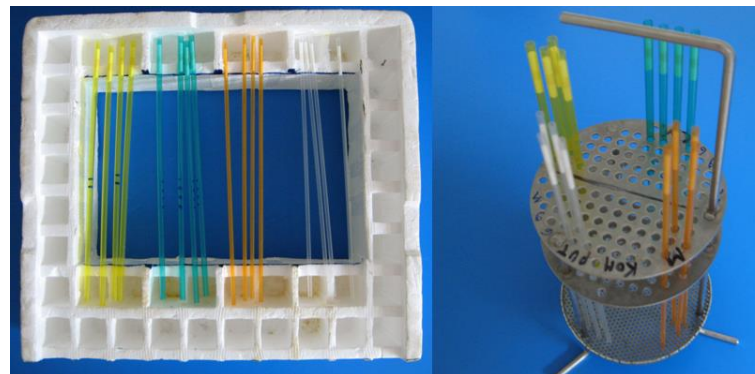
metoda innowacyjna

kriokonserwacja

mrożenie w kulkach - dawniej

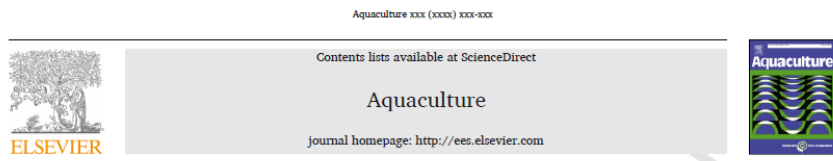


mrożenie w słórkach - obecnie



# Zabezpieczenie puli genowej

## metoda innowacyjna kriokonserwacja



The effect of cryopreservation extender on sperm motility and hatch success in northern pike (*Esox lucius*)

Beata Irena Cejko<sup>a</sup>, Beata Sarosiek<sup>a</sup>, Katarzyna Dryl<sup>a</sup>, Sylwia Judycka<sup>a</sup>, Bożena Szczepkowska<sup>b</sup>, Mirosław Szczepkowski<sup>b</sup>, Radosław Kajetan Kowalski<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Gamete and Embryo Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland  
<sup>b</sup> Department of Sturgeon Fish Breeding, The Stanisław Sakowicz Inland Fisheries Institute, Olsztyn, Poland

Rozrzedzalnik (CE) do mrożenia szczupaka

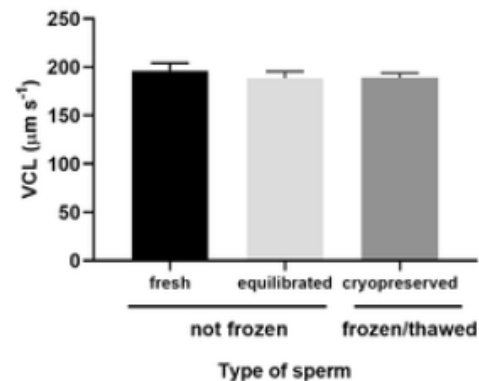
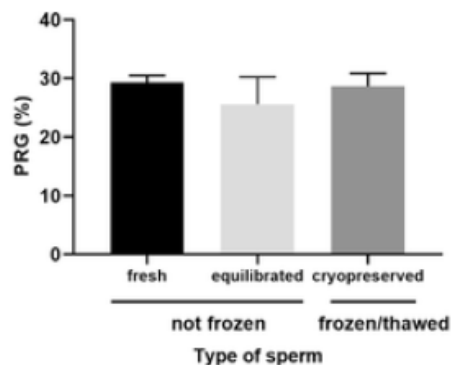
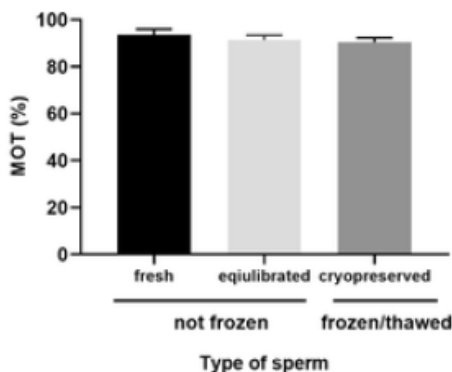


185 mM trehaloza, 40 mM KCl, 20 mM Tris, 10% metanol (pH 8,5)

Rozrzedzenie 1:9 (nasienie : CE)

Ekwilibracja – schłodzenie (+4°C)

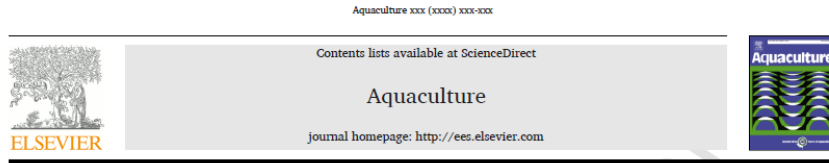
Kriokonserwacja – mrożenie (-196°C)





## metoda innowacyjna

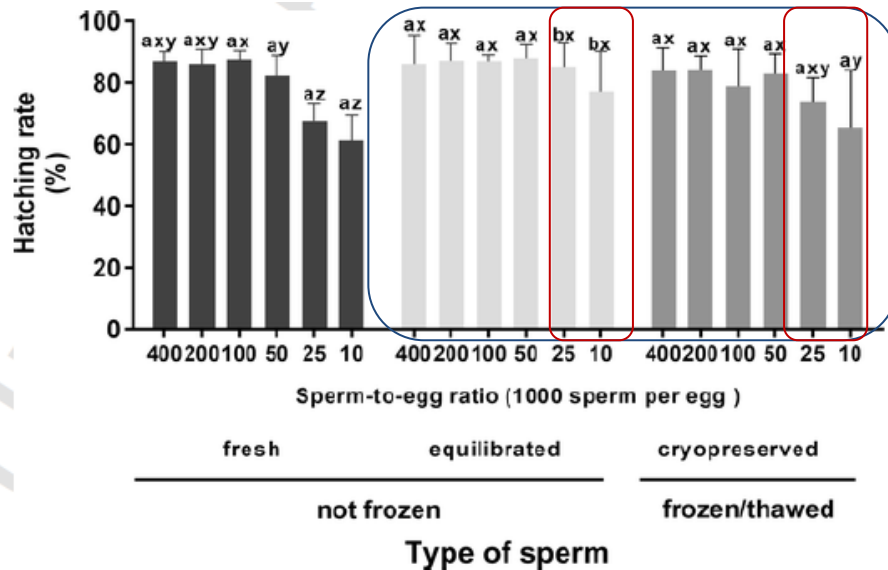
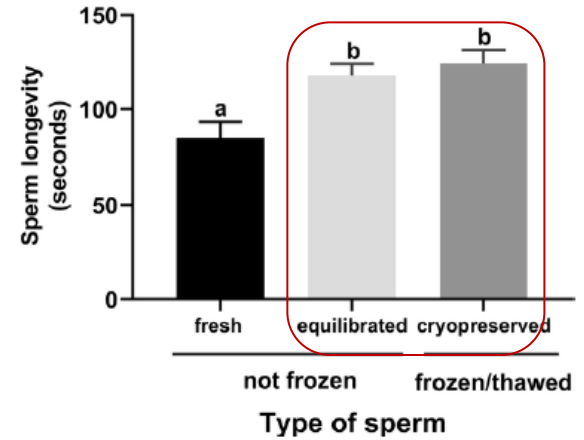
## kriokonserwacja



The effect of cryopreservation extender on sperm motility and hatch success in northern pike (*Esox lucius*)

Beata Irena Cejko<sup>a</sup>, Beata Sarosiek<sup>a</sup>, Katarzyna Dryl<sup>a</sup>, Sylwia Judycka<sup>a</sup>, Bożena Szczepkowska<sup>b</sup>, Mirosław Szczepkowski<sup>b</sup>, Radosław Kajetan Kowalski<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Gamete and Embryo Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland  
<sup>b</sup> Department of Sturgeon Fish Breeding, The Stanisław Sakowicz Inland Fisheries Institute, Olsztyn, Poland



## ***Wnioski***

pozyskanie zadawalającej ilości nasienia o najwyższej jakości determinuje efektywność rozrodu, zwłaszcza gatunków o wysokim znaczeniu gospodarczym tj. szczupak

wszelkie zabiegi hodowlane mające wpływ na zachowanie dobrostanu tarlaków oraz wzrostu ich pogłowia w warunkach naturalnych są uzasadnione i jako takie winny być wspierane



- zastosowanie do aktywacji plemników płynu Woynarovicha w porównaniu do powszechnie stosowanego płynu Billarda daje lepsze efekty w postaci ruchliwości plemników
- technika rozrodu szczupaka w oparciu o stymulację hormonalną (Ovaprim) daje dobre wyniki w odniesieniu do jakości nasienia.
- wykorzystanie w rozrodzie szczupaków techniki konfekcjonowania nasienia stwarza możliwość racjonalnego gospodarowania stadem tarłowym samców