



Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Morski i Rybacki



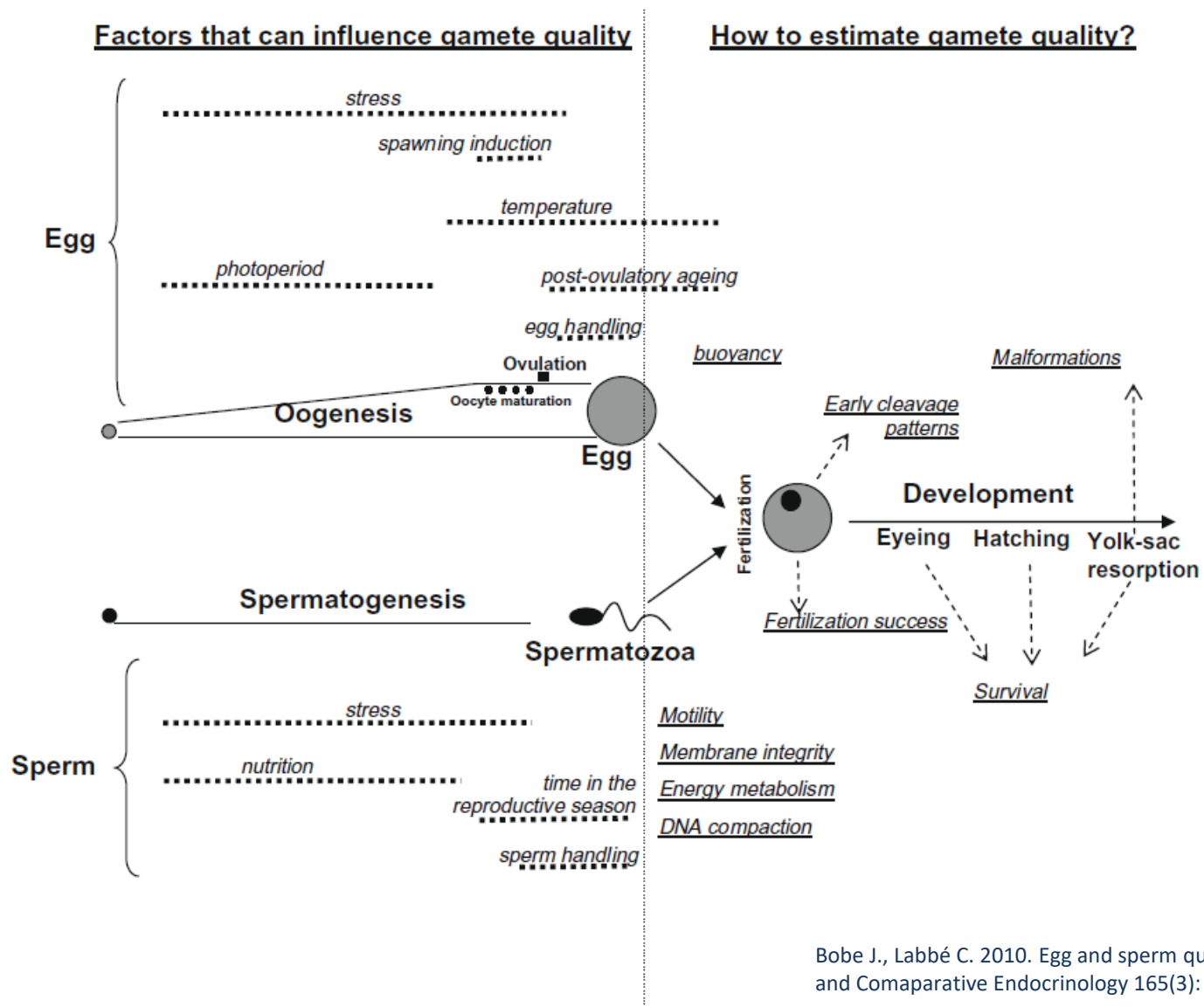
## ***Konferencja Wylęgarnia 11-13 września 2019, Białowieża***

# **Wpływ buforów aktywujących na parametry ruchu plemników i odsetek zapłodnionej ikry sandacza (*Sander lucioperca* L.)**

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

# Wstęp

## Czynniki mające wpływ na sukces zapłodnienia u ryb



## **Cel pracy:**

- Opracowanie składu optymalnego buforu do aktywacji ruchu plemników i przeprowadzenia zapłodnienia sandacza

# Materiał i metody



Stymulacja hCG (500U/kg)



Usypianie w MS-222  
(150mg/l)



Pobranie nasienia



Pobranie ikry

# Materiały i metody

## Określenie wpływu wybranych buforów na parametry ruchu plemników sandacza

Ruchliwość plemników analizowano z wykorzystaniem systemu CASA Crimas. Ruchliwość plemników dokumentowano po ok. 5-7s oraz 14s od aktywacji odpowiednim buforem.

Analizowano poniższe parametry ruchu plemników:

**VCL** (całkowita prędkość plemników,  $\mu\text{m/s}$ ),

**MOT** (odsetek plemników ruchliwych, %),

**PRG** (odsetek plemników o ruchu postępowym, %).



CASA Crimas (IH Medical)

# Materiał i metody

## Procedura zapłodnienia

**Pobranie nasienia**

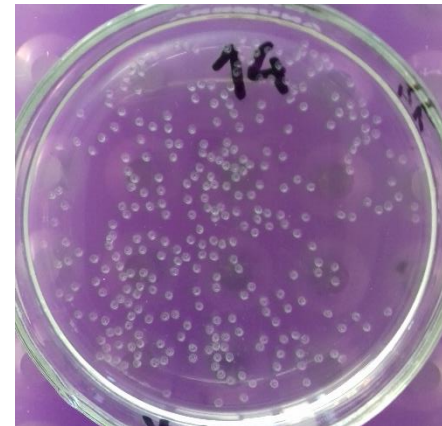
**Pobranie ikry**



Zapłodnienie na szalkach Petriego: 0.02ml nasienia dodano do około 100 jaj w każdym z wariantów, następnie dodano 5 ml buforu aktywującego, zawartość szalki mieszano ok. 30s po czym odstawiano na 30min w temperaturze 14°C w celu doprowadzenia przywarcia jaj do szalki. Po tym czasie każdą szalkę przepłukano odpowiednim płynem aktywującym, po czym zalano wodą wylęgarnią.



**Odsetek zapłodnienia policzono po 72h inkubacji ikry w temperaturze 14°C.**



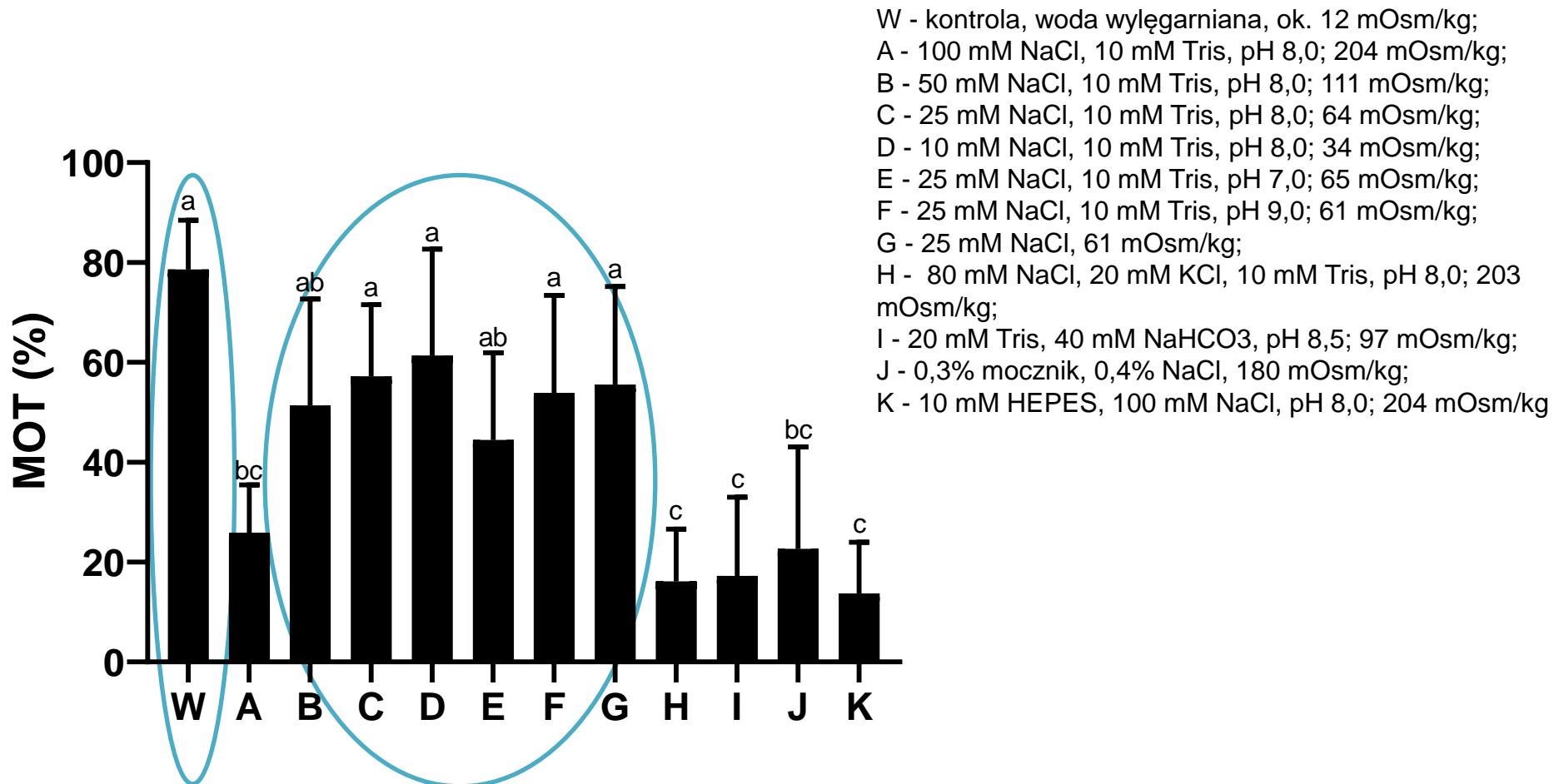
# Materiał i metody

## Płyny wykorzystane w doświadczeniach:

- W - kontrola, woda wylęgarniana, ok. 12 mOsm/kg;
- A - bufor "Lahnsteiner'a" (100 mM NaCl, 10 mM Tris), pH 8,0; 204 mOsm/kg;
- B - 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 111 mOsm/kg;
- C - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 64 mOsm/kg;
- D - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 34 mOsm/kg;
- E - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,0; 65 mOsm/kg;
- F - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 9,0; 61 mOsm/kg;
- G - 25 mM NaCl, 61 mOsm/kg;
- H - 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 203 mOsm/kg;
- I - 20 mM Tris, 40 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5; 97 mOsm/kg;
- J - płyn "Woynarovich'a", 0,3% mocznik, 0,4% NaCl, 180 mOsm/kg;
- K - 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0; 204 mOsm/kg

# Wyniki

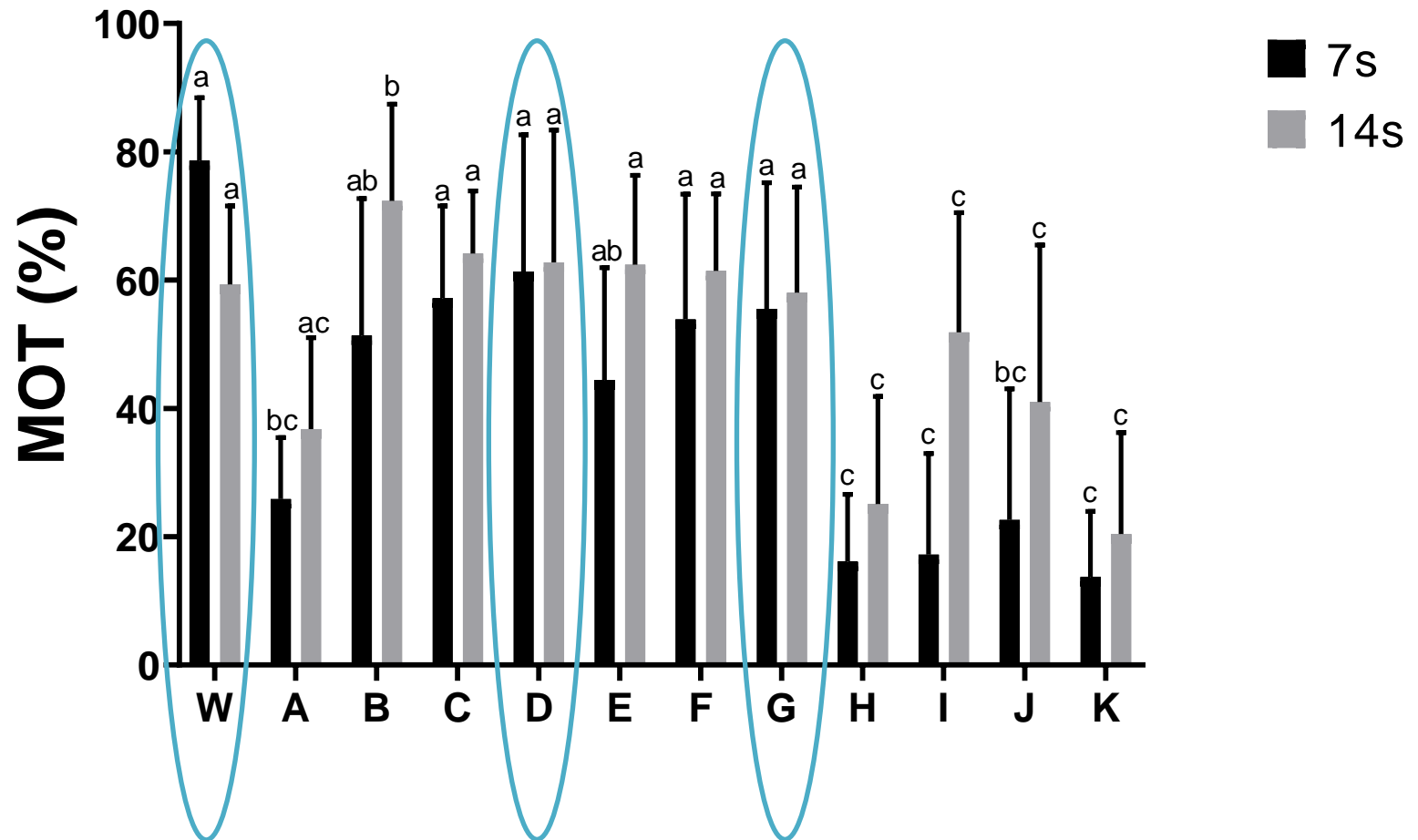
## Wpływ buforów aktywujących na odsetek ruchliwych plemników sandacza





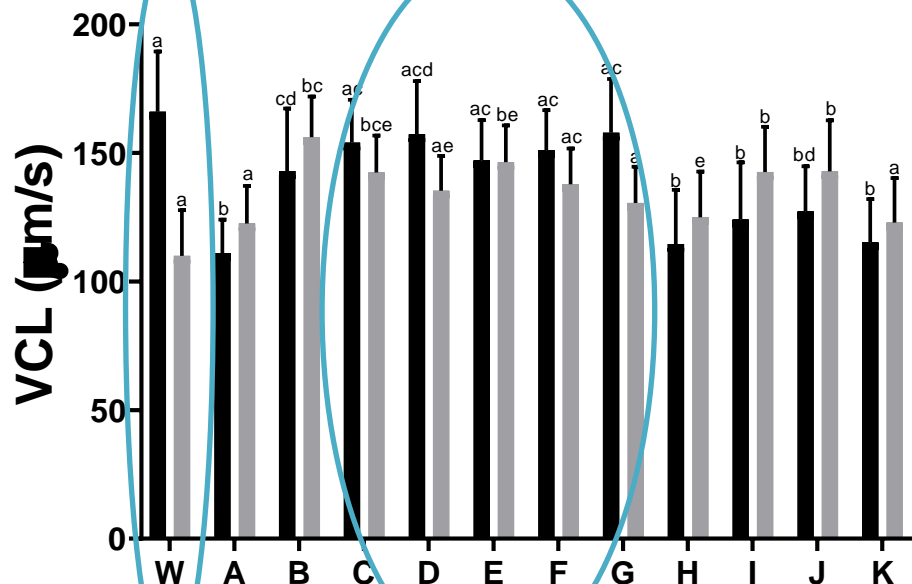
# Wyniki

## Opóźniona aktywacja ruchu plemników

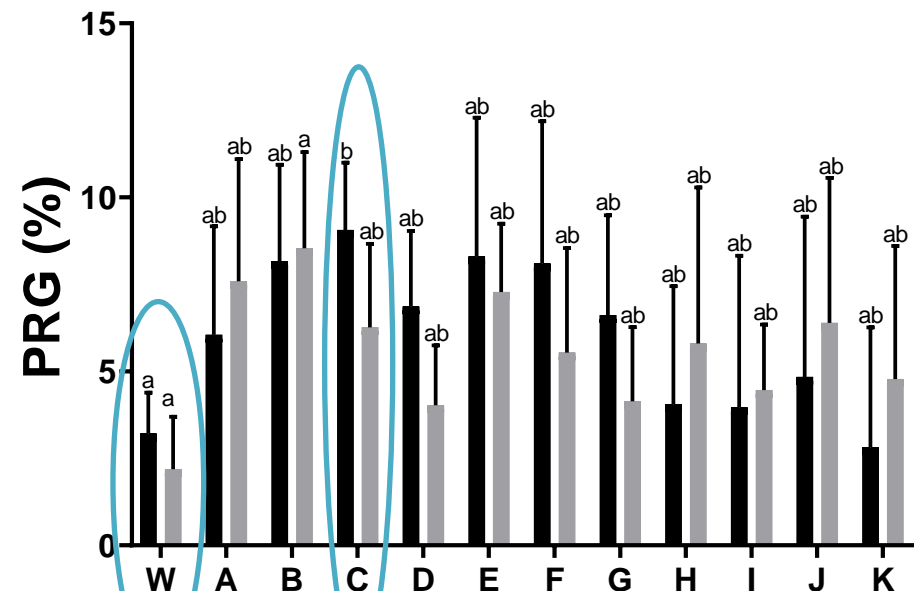


# Wyniki

## Wpływ buforów aktywujących na parametry ruchu plemników sandacza



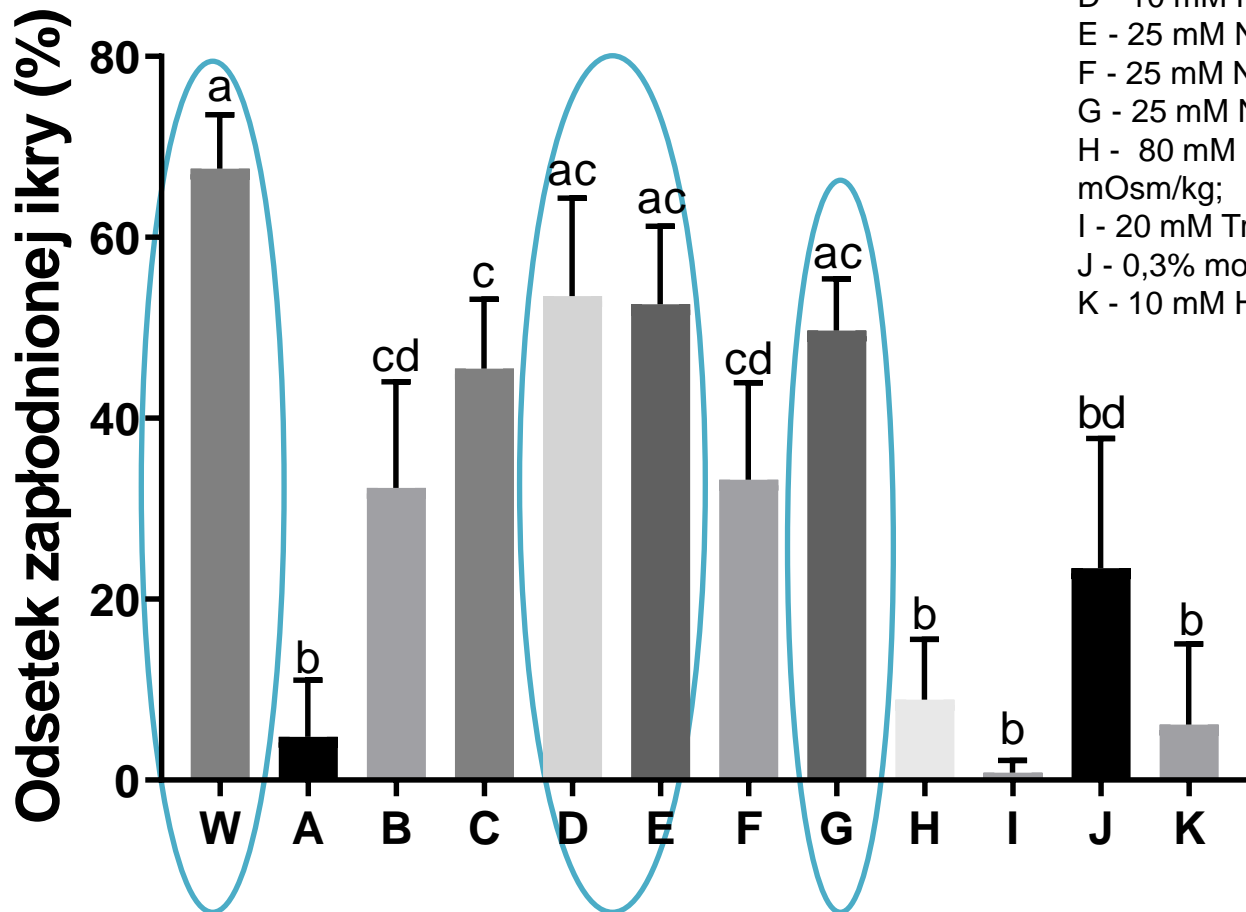
■ 7s  
■ 14s



# Wyniki

## Wpływ buforów aktywujących na odsetek zapłodnionej ikry sandacza

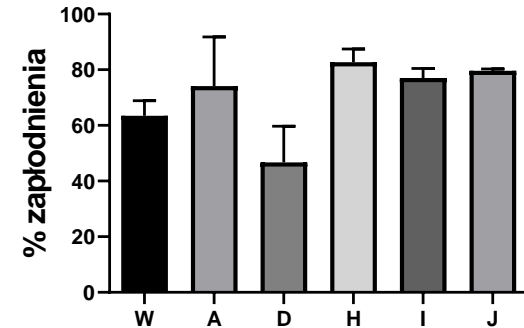
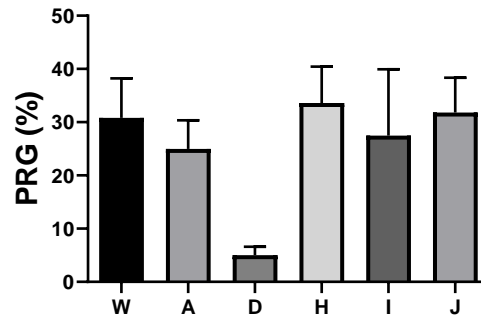
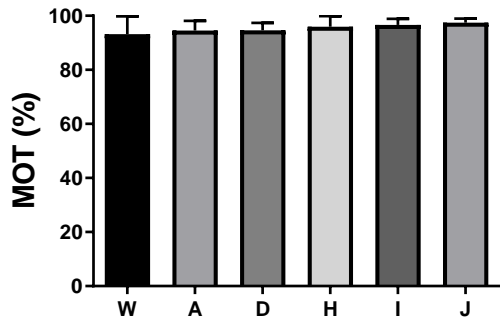
W - kontrola, woda wylęgarniana,  
A - 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 204 mOsm/kg;  
B - 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 111 mOsm/kg;  
C - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 64 mOsm/kg;  
D - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 34 mOsm/kg;  
E - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,0; 65 mOsm/kg;  
F - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 9,0; 61 mOsm/kg;  
G - 25 mM NaCl, 61 mOsm/kg;  
H - 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 203 mOsm/kg;  
I - 20 mM Tris, 40 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5; 97 mOsm/kg;  
J - 0,3% mocznik, 0,4% NaCl, 180 mOsm/kg;  
K - 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0; 204 mOsm/kg



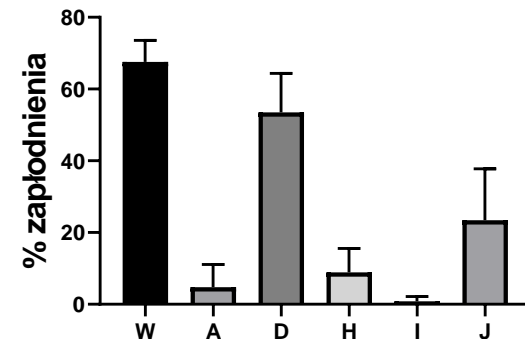
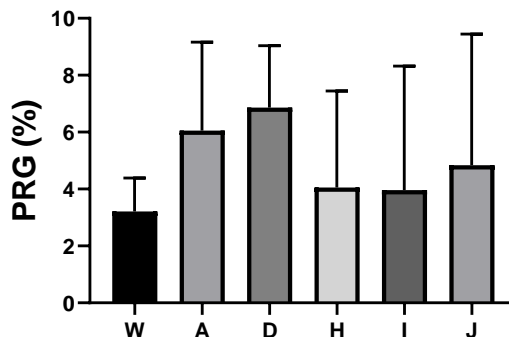
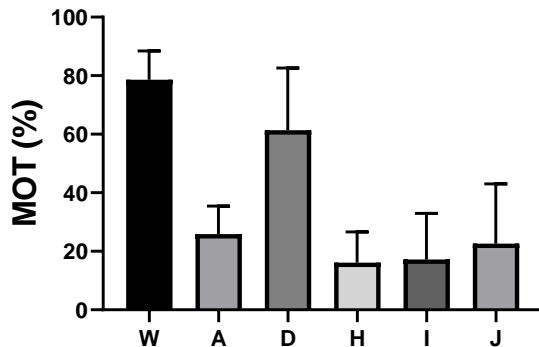
# Wyniki

## Porównanie wpływu buforów aktywujących na parametry ruchu i odsetek zapłodnionej ikry okonia i sandacza

okoń



sandacz



# Podsumowanie

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że do aktywacji plemników sandacza najlepiej jest użyć:

- W** - woda wylęgarniana,
- C** - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 64 mOsm/kg;
- D** - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 34 mOsm/kg;
- F** - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 9,0; 61 mOsm/kg;
- G** - 25 mM NaCl, 61 mOsm/kg;

Natomiast do zapłodnienia najlepsze są:

- W** - woda wylęgarniana,
- D** - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 34 mOsm/kg;
- E** - 25 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,0; 65 mOsm/kg;
- G** - 25 mM NaCl, 61 mOsm/kg;

Zwiększanie osmolalności podczas aktywacji gamet sandacza powyżej 65 mOsm/kg jest niekorzystne.

Opóźniona aktywacja ruchu plemników sandacza ma negatywny wpływ na efektywność zapłodnienia.