



Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Morski i Rybacki



***XLIV Szkolenie – Konferencja Hodowców Ryb  
Łososiowatych  
17-18 października 2019, Gdynia***

**Sposoby na skuteczne przechowywanie  
nasienia ryb oraz użycia na skalę  
produkcyjną w warunkach wylęgarni**

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

# Jakość plemników oraz efektywność zapłodnienia

- zmiana temperatury
- wzrost tempa metabolizmu
- wystąpienie stresu oksydacyjnego
- powstawanie wolnych rodników

zmiana stabilności błon komórkowych plemników

zmiana właściwości fizykochemicznych plemników

upośledzenie funkcji plemników

**Apoptoza**



czas

procesy starzeniowe



**brak efektu zapłodnienia**

# Starzenie się plemników oraz metody kontroli

przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

Cel

## 1. Spowolnienie procesów starzeniowych

uszkodzenie błon komórkowych,  
degradacja białek,  
zużycie ATP,  
magazynowanie metabolitów

utrata zdolności do ruchu/zapłodnienia

Kiedy

- brak synchronizacji tarła samic i samców
  - usprawnienie prac hodowlanych,
  - zgrupowanie odpowiedniego zapasu nasienia
  - wykorzystanie nasienia w odpowiednim momencie



# Starzenie się plemników oraz metody kontroli

przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

Cel

## 2. Poprawa jakości nasienia

zmienność osobnicza,  
różna dojrzałość plemników



obniżona zdolności do ruchu/zapłodnienia

Kiedy

- zanieczyszczenie nasienia moczem
- obniżona jakość plemników
  - wzrost ruchliwości plemników,
  - poprawa wartości biologicznej plemników,
  - odbudowa i zmagazynowanie zapasów ATP



# Starzenie się plemników oraz metody kontroli

## sztuczna plazma nasienia - Artificial Seminal Plasma (ASP)

Fish Physiol Biochem (2018) 44:1435–1442  
<https://doi.org/10.1007/s10695-018-0491-3>



### Optimisation of sodium and potassium concentrations and pH in the artificial seminal plasma of common carp *Cyprinus carpio* L.

Beata Irena Cejko · Ákos Horváth · Tímea Kollár · Eszter Kása · Jelena Lujčić · Zoran Marinović · Béla Urbányi · Radosław Kajetan Kowalski

Received: 24 November 2017 / Accepted: 7 March 2018 / Published online: 21 March 2018  
© The Author(s) 2018

Aquaculture 506 (2019) 224–228

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

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



ELSEVIER

Short communication

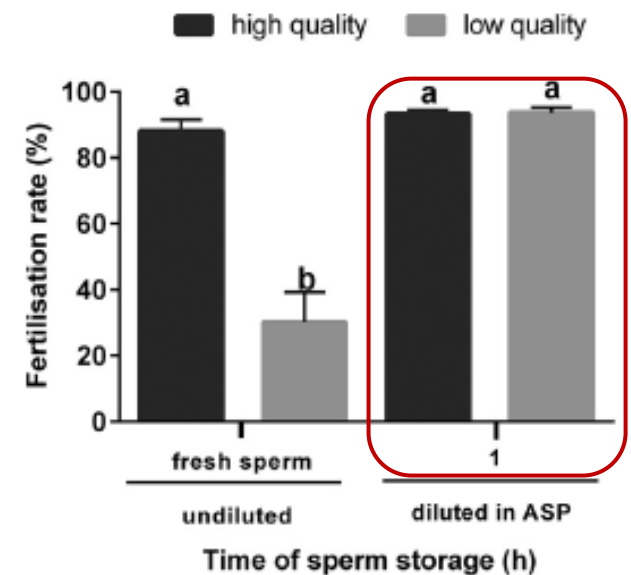
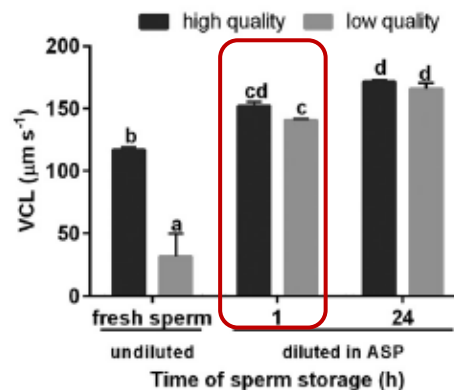
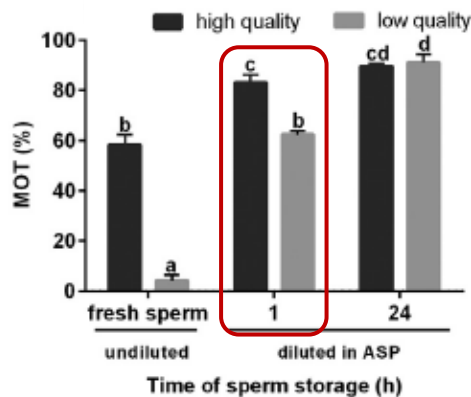
Artificial seminal plasma improves motility and fertilisation capacity of common carp *Cyprinus carpio* L. sperm during one hour of storage

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



**ASP dla karpia: 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris, 110 mM NaCl, 40 mM KCl**  
(osmolalność 310 mOsm/kg i pH 7,5)



# Starzenie się plemników oraz metody kontroli

## przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

### Cel

#### 3. Ograniczenie manipulacji z tarlakami

dbałość o kondycję i zdrowotność tarlaków  
krzyżowanie osobników odległych od siebie genetycznie  
możliwość uzyskania efektu heterozji

#### 4. Restytucja gatunków zagrożonych

ochrona populacji przed wystąpieniem imbredu  
wzrost jakości podchowyanego materiału  
zachowanie zmienności genetycznej rozradzanych ryb

#### 5. Zarządzanie stadem tarłowym

możliwość produkcji krzyżówek  
efektywne wykorzystanie nasienia (neosamce)  
wzrost ekonomiki produkcji

### Kiedy

➤ **wzrost efektywności rozrodu**



# Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

## przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

### Bufory i dodatki



## zdeponowanie porcji nasienia w warunkach *in vitro* - poza organizmem tarlaka



- gatunkowo specyficzne (w oparciu o skład plazmy nasienia danego gatunku)
- zapewnienie plemnikom substancji odżywczych (białka, cukry, antyoksydanty)
- wydłużenie czasu przechowywania (kofeina, antybiotyki)
- ograniczenie sedymentacji plemników oraz mechanicznych uszkodzeń (alginian sodu)

### Krioprotektory

- zabezpieczenie błon komórkowych plemników przed zmianami warunków przechowywania (metanol, glicerol, DMSO, DMA, cukry: glukoza, sacharoza, trehaloza)

# Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

## przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

### Bufory i dodatki

**Tabela 1.** Wybrane bufory oraz ich składniki stosowane do przechowywania nasienia ryb łososiowatych. A – Morisawa i Morisawa (1988), B – Baynes (1999), C – Kobayashi i in. (2004).

Składniki (g/l)	Bufory		
	A	B	C
NaCl	5,52	2,35	7,60
KCl	2,00	9,00	2,98
CaCl <sub>2</sub>	1,60	0,29	0,37
MgCl <sub>2</sub>	0,30	-	0,31
NaHCO <sub>3</sub>	-	5,00*	0,21
Tris	2,42	-	-
Glicyna	3,75	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,51	-
MgSO <sub>4</sub>	-	0,29	-
Glukoza	-	5,00*	-
pH	8,20	nie podano	8,50 - 9,90

\* składniki należy przygotować jako oddzielny roztwór po czym zmieszać z roztworem zawierającym pozostałe komponenty w stosunku 1:4 tuż przed użyciem. W przeciwnym wypadku w roztworze wytrąci się osad uniemożliwiający właściwe przechowanie prób.



# Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

## przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

### Temperatura



- odmienny skład lipidowy błon komórkowych plemników

### wielonienasycone kwasy tłuszczowe



- zapewnienie płynności
- wydalanie metabolitów
- absorpcja nutrientów
- wymiana tlenowa

+4°C



większy udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych

+8°C



mniejszy udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych

### wpływ temperatury otoczenia - spermatogeneza

słabsza dynamika procesów oksydacyjnych

silniejsza dynamika procesów oksydacyjnych

łatwiejsze zachowanie żywotności w warunkach *in vitro*

trudniejsze zachowanie żywotności w warunkach *in vitro*

# Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

## przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

### Rozrzedzenie



### podtrzymanie bazowego metabolizmu

- rozrzedzenie szkodliwych metabolitów oddychania komórkowego
- zapewnienie plemnikom lepszego dostępu do tlenu



**ogranicza negatywny wpływ kumulowania się produktów przemiany materii**

### rozrzedzenie nasienia (10x)



1 porcja nasienia (1 ml)

9 porcji ASP (9 ml)



### rozrzedzenie nasienia (30x)



1 porcja nasienia (1 ml)

29 porcji ASP (29 ml)



# Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

## techniki przechowywania nasienia

### Cienka warstwa



**mieszanie nasienia 1x dziennie**

# Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

## transport nasienia

### Skuteczność przechowywania nasienia



- właściwy sposób pozyskania nasienia
- wstępna ocena jakości nasienia
- wybór prób które cechuje najlepsza jakość

### Czas



zoptimalizowany do możliwości zastosowanej metody i warunków przechowywania



**nasienie < 30% nie daje zadowalających efektów zapłodnienia i nie należy go wykorzystywać do celów produkcyjnych**

## Opracowanie i opatentowanie rozrzedzalników do przechowywania nasienia kilku gatunków ryb



**Tabela 2.** Rozrzedzalniki do przechowywania nasienia ryb oraz ich parametry techniczne.

Rozrzedzalnik fishpreser	Gatunki	Zakres obsługi (mieszanie)	Stopień rozrzedzenia nasienia	Maksymalny czas przechowywania (temp. +4°C)
Salmo	Łososiowate	2x dziennie	10x	21 dni
Salmo trip		1x co 5 dni	10x	10 dni
SalmoXX	Łososiowate <i>nasienie gonadalne</i>	2x dziennie	30x	10 dni
SalmoXX trip		1x co 5 dni	30x	5 dni
Carp	Karpowate	2x dziennie	10x	10 dni
Carp trip		1x co 5 dni	10x	10 dni
Acipenser	Jesiotrowate	2x dziennie	3x	21 dni
Acipenser trip		1x co 5 dni	3x	15 dni
Esox	Szczupak	2x dziennie	5x	7 dni