



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



**Program Doradztwa Rybackiego „Pozyskiwanie, przechowywanie
i zapładnianie gamet ryb” akronim Fish-RePro**
Program Operacyjny „Rybactwo i Morze” na lata 2014-2020

**Biotechnika rozrodu ryb karpiowatych –
aktualny stan wiedzy oraz innowacje
w rozrodzie**

dr inż. Beata I. Cejko
b.cejko@pan.olsztyn.pl

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

Program Doradztwa Rybackiego

Podjęmowane działania



**Działania doradcze
w zakresie pozyskiwania
oocytów**



**Działania doradcze
w zakresie przechowywania
gamet**



**Działania doradcze
w zakresie zapładniania
gamet**



Charakterystyka gatunku oraz znaczenie gospodarcze

Karp – pochodzenie i domestykacja

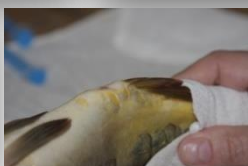
stanowisko systematyczne:

- rząd: karpiokształtne, *Cypriniformes* Goodrich, 1909
- rodzina: karpowate, *Cyprinidae* Bonaparte, 1932
- rodzaj: *Cyprinus* Jarocki, 1822
- gatunek: *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

znaczenie gospodarcze i środowiskowe:

- dobre wykorzystanie pokarmu naturalnego
- szybkie tempo wzrostu
- wysoka odporność na manipulacje
- wysoka wartość odżywcza mięsa

produkcja (UE: 70 tys. ton; Polska 20 tys. ton)

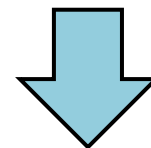


tradycja i rozwój technik hodowli



Ograniczenia wzrostu produkcji karpia

- deficyty wody (susze)
 - choroby (KHV i inne)
 - presja zwierząt rybożernych
 - inne
- niepowodzenia w rozrodzie

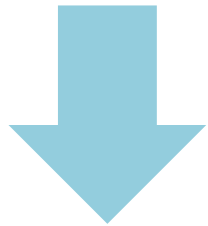


kondycja tarlaków i jakość gamet

Charakterystyka gatunku oraz znaczenie gospodarcze

Czynniki determinujące rozród karpia

- zmienność otrzymywanych wyników (sezon rozrodczy)
- stymulacja hormonalna (niewłaściwa dawka/czas)
- właściwe użytkowanie tarlaków



**poprawa efektywności
rozrodu**



- innowacje w rozrodzie



Brak danych dotyczących efektywności stosowania w rozrodzie ryb karpiowatych metody pneumatycznej



„Pneumatyczna metoda pozyskiwania ikry ryb - możliwości aplikacyjne oraz wpływ na parametry jakościowe i ilościowe gamet oraz dobrostan tarlaków” (akronim: PNEUFISH).

Stan wiedzy i innowacje w rozrodzie ryb
dziko żyjących



Operacja współfinansowana przez Unię Europejską ze środków finansowych Europejskiego Funduszu Rybackiego zapewniająca inwestycje w zrównoważone rybołówstwo

Stan wiedzy i innowacje w rozrodzie ryb
łososiowatych



Operacja współfinansowana przez Unię Europejską ze środków finansowych Europejskiego Funduszu Rybackiego zapewniająca inwestycje w zrównoważone rybołówstwo

Stan wiedzy i innowacje w rozrodzie ryb
jesiotrowatych



Operacja współfinansowana przez Unię Europejską ze środków finansowych Europejskiego Funduszu Rybackiego zapewniająca inwestycje w zrównoważone rybołówstwo

więcej informacji : <http://pan.olsztyn.pl/granty/fundusze-strukturalne/pneufish/>

Manipulacje z tarlakami (dobra praktyka rybacka)

- właściwy czas odłowu tarlaków
- anestezja (MS-222)
- osuszanie powłok brzusznych
- **unikanie obecności skrzepów** (ikra „złej” jakości)



przechowywanie ikry do czasu
zapłodnienia nie dłużej niż 1h



poprawa efektywności
rozrodu

Manipulacje z tarlakami (dobra praktyka rybacka)

- właściwy czas odłowu tarlaków
- anestezja (MS-222)
- osuszanie powłok brzusznych
- **unikanie zanieczyszczenia moczem** (nasienie „złej” jakości)



przechowywanie nasienia do czasu
zapłodnienia dłużej niż 1h

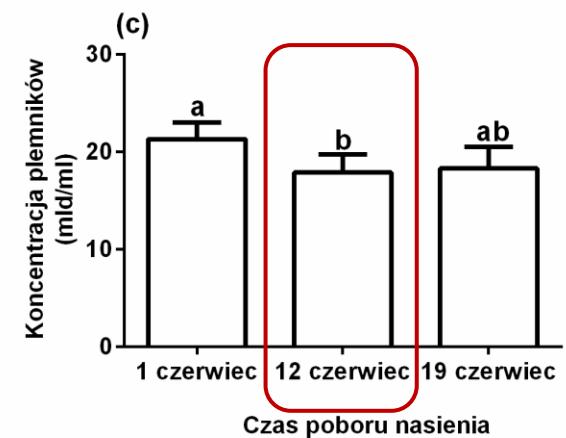
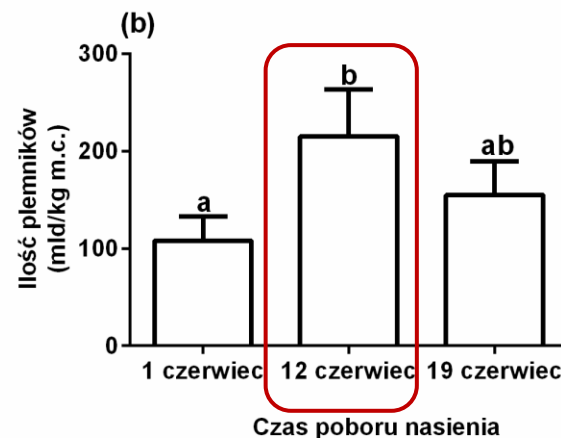
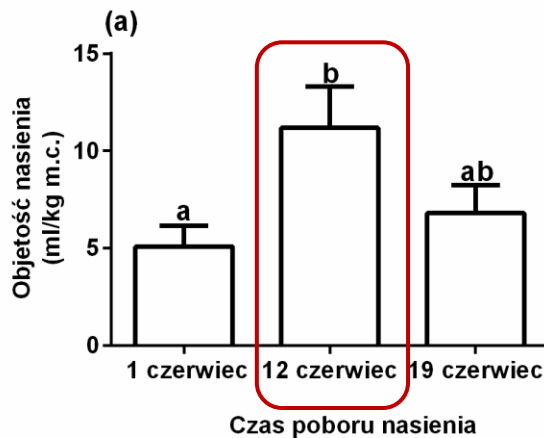
poprawa efektywności
rozrodu



Manipulacje z tarlakami (dobra praktyka rybacka)

sezon rozrodczy

Efektywność rozrodu:



Rys. 1. Całkowita objętość nasienia (a), ilość plemników (b) oraz koncentracja plemników (c) karpia pozyskana w różnym okresie w sezonie tarłowym. Różne indeksy literowe wskazują na istotne różnice w wartościach analizowanych parametrów ($P < 0,05$).

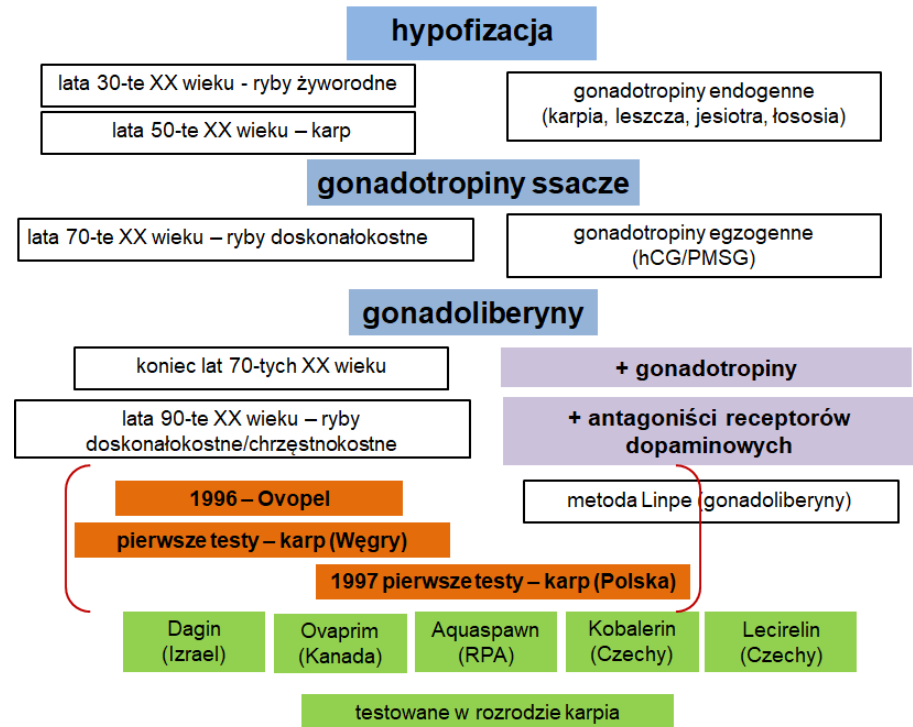
Manipulacje z tarlakami (dobra praktyka rybacka)

Stymulacja hormonalna

Efektywność rozrodu:



- regulacja procesów rozrodczych
- synchronizacja owulacji/spermacji
- stymulacja dojrzałości oocytów/plemników
- wzrost ilości i jakości gamet



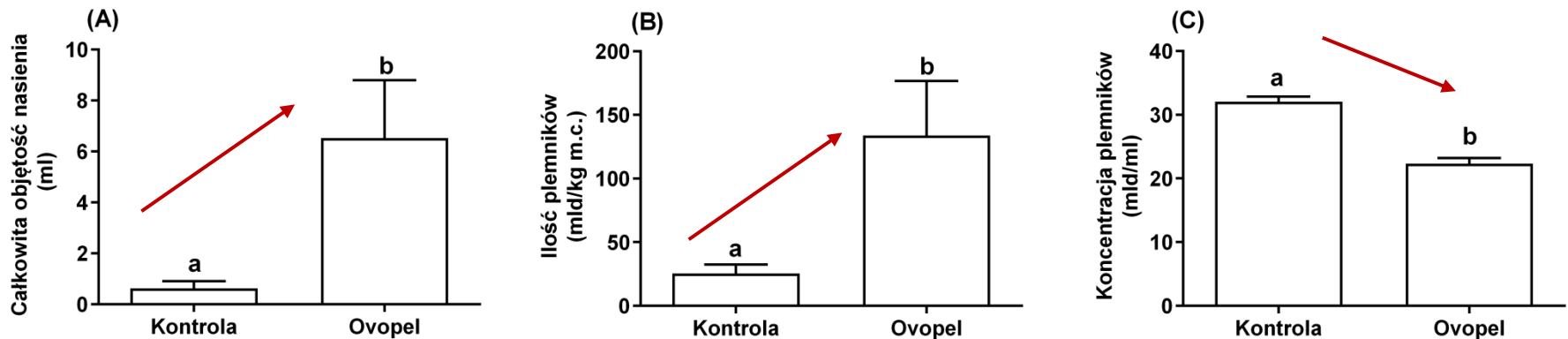
Manipulacje z tarlakami (dobra praktyka rybacka)

dawka: 1 granula/kg m.c.

Efektywność rozrodu:

Kontrola 40%

Ovopel 90%

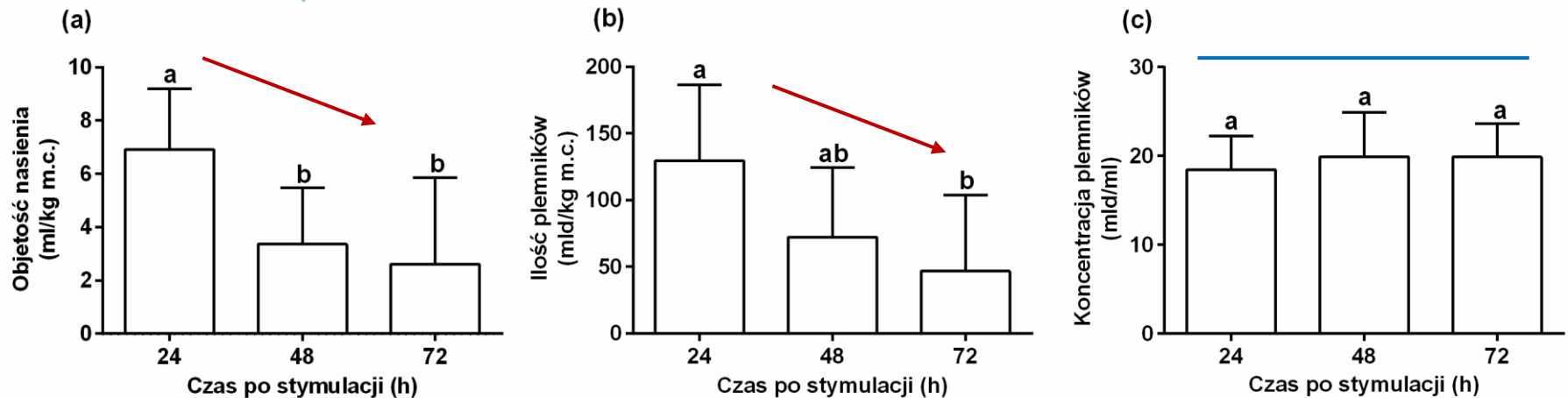


Rys. 2. Całkowita objętość nasienia (A), ilość plemników (B) oraz koncentracja plemników (C) w nasieniu karpia po stymulacji hormonalnej za pomocą Ovopelu oraz w grupie kontrolnej. Słupki oznaczone różnymi indeksami literowymi wskazują na istotności różnic w wartościach analizowanych parametrów ($P < 0,05$).

Manipulacje z tarlakami (dobra praktyka rybacka)

czas latencji: 24h

Efektywność rozrodu:



Rys. 3. Całkowita objętość nasienia (A), ilość plemników (B) oraz koncentracja plemników (C) w nasieniu karpia po stymulacji hormonalnej za pomocą Ovopelu w czasie 24, 48 i 72 godz. Słupki oznaczone różnymi indeksami literowymi wskazują na istotności różnic w wartościach analizowanych parametrów ($P < 0,05$).

Płyny aktywujące/zapładniające, a efektywność rozrodu

Płyn Woynarovicha

Płyn Lahnsteinera

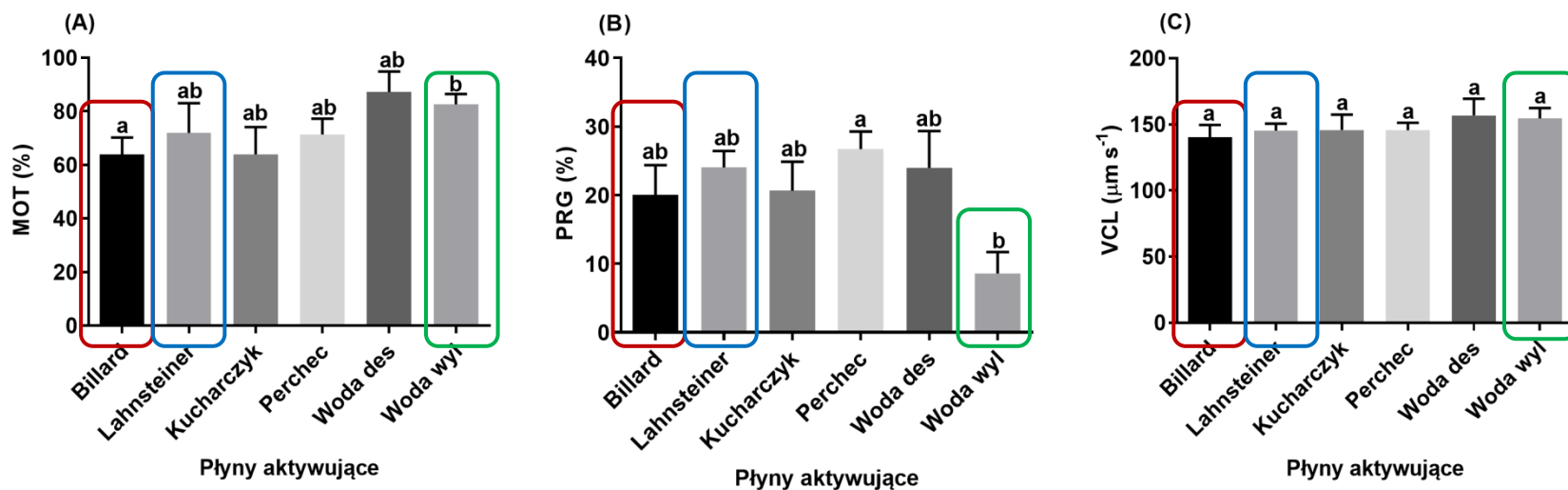
Woda wylęgarniana

Tabela 1. Wybrane płyny aktywujące (AS) o różnym składzie (mM), pH oraz osmolalności wykorzystane do aktywacji plemników karpia oraz zapłodnienia ikry w warunkach kontrolowanych. * Każdy płyn aktywujący zawiera 0.5% albuminę surowicy bydlęcej (BSA).

Płyny aktywujące						
Skład	AS 1	AS 2	AS 3	AS 4	AS 5	AS 6
NaCl	68	100	86	45		
KCl	-	-	-	5		
Tris	-	10	-	30		
Mocznik	50	-	-	-		
pH	7.7	9.0	7.4	8.0	7.3	7.0
Osmolalność	180	200	167	160	3.0	8.0
Cytacja	Billard i in. (1995)	Lahnsteiner i in. (1996)	Kucharczyk i in. (2008)	Perchec i in. (1996)	Woda destylowana	Woda wylęgarniana

Płyny aktywujące/zapładniające, a efektywność rozrodu

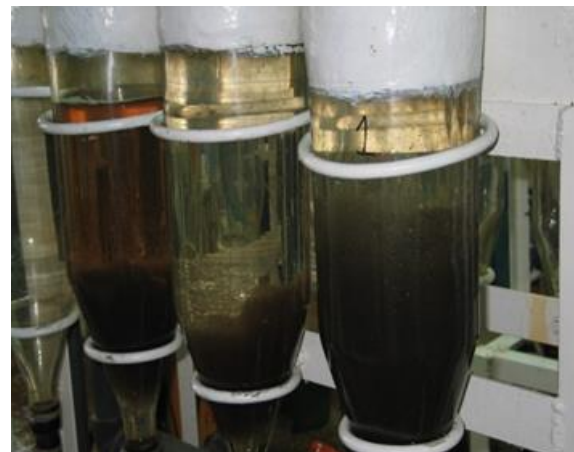
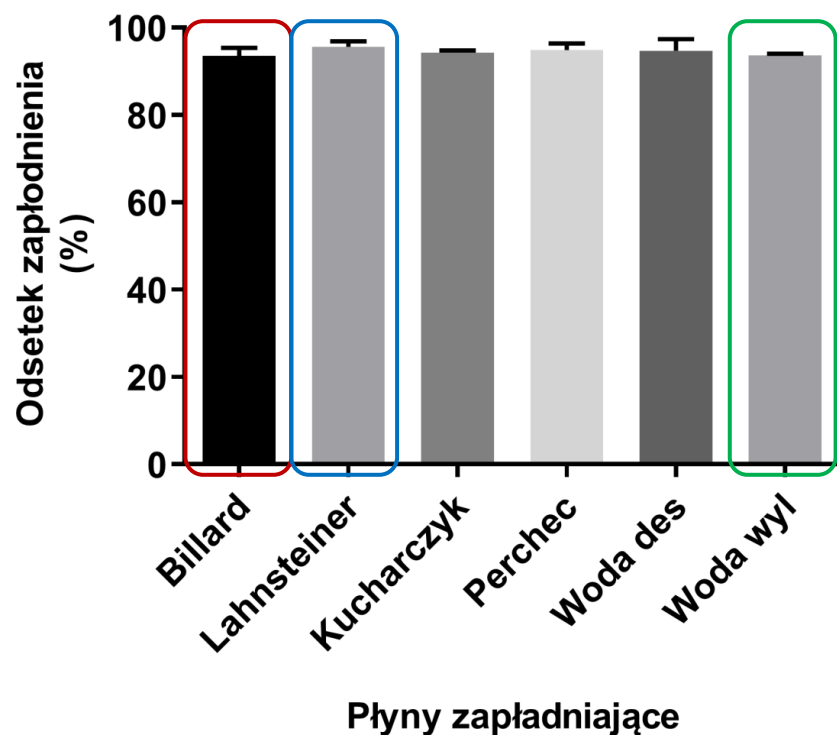
Plemniki karpia można aktywować buforami o pH w zakresie 7.4 – 9.0 i osmolalnością w zakresie 190 – 200 mOsm/kg



Rys. 4. Odsetek plemników ruchliwych (A), ruch progresywny (B) oraz prędkość krzywoliniowa (C) plemników karpia po aktywacji wybranymi płynami. Słupki oznaczone różnymi indeksami literowymi wskazują na istotności różnic w wartościach analizowanych parametrów ($P < 0,05$).

Płyny aktywujące/zapładniające, a efektywność rozrodu

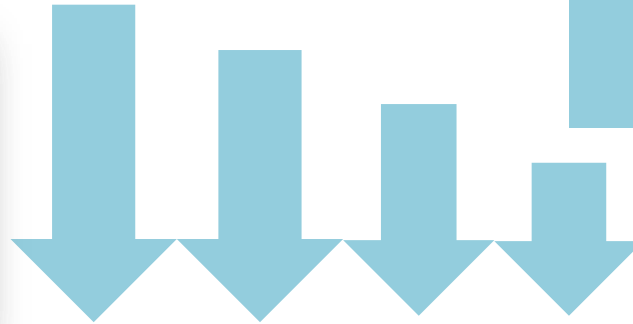
Bufory do aktywacji plemników karpia można wykorzystać do zapłodnienia ikry



Rys. 5. Odsetek zapłodnienia ikry karpia po aktywacji wybranymi płynami ($P > 0,05$).

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

- a) uszkodzenie błon komórkowych,
- b) degradacja białek,
- c) zużycie ATP,
- d) magazynowanie metabolitów

Kiedy:



➤ **brak synchronizacji tarła samic i samców**

usprawnienie prac hodowlanych,

zgromadzenie 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/Rewitalizacja plemników

- a) zmienność osobnicza,
- b) różna dojrzałość plemników

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

przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

Cel:

3. Ograniczenie manipulacji z tarlakami

- a) dbałość o kondycję i zdrowotność tarlaków
- b) krzyżowanie osobników odległych od siebie genetycznie
- c) możliwość uzyskania efektu heterozji

Kiedy:



- **wzrost efektywności rozrodu**



Starzenie się plemników oraz metody kontroli

przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

Cel:

4. Restytucja gatunków zagrożonych

- a) ochrona populacji przed wystąpieniem imbredu,
- b) wzrost jakości podchowyanego materiału,
- c) zachowanie zmienności genetycznej rozradzanych ryb

Kiedy:



- ochrona rodzimych populacji



Starzenie się plemników oraz metody kontroli

przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

Cel:

5. Zarządzanie stadem tarłowym

- a) możliwość produkcji krzyżówek
- b) efektywne wykorzystanie nasienia (neosamce)
- c) wzrost ekonomiki produkcji



Kiedy:

- **wzrost efektywności rozrodu**



Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Sposoby konfencjonowania



Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

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

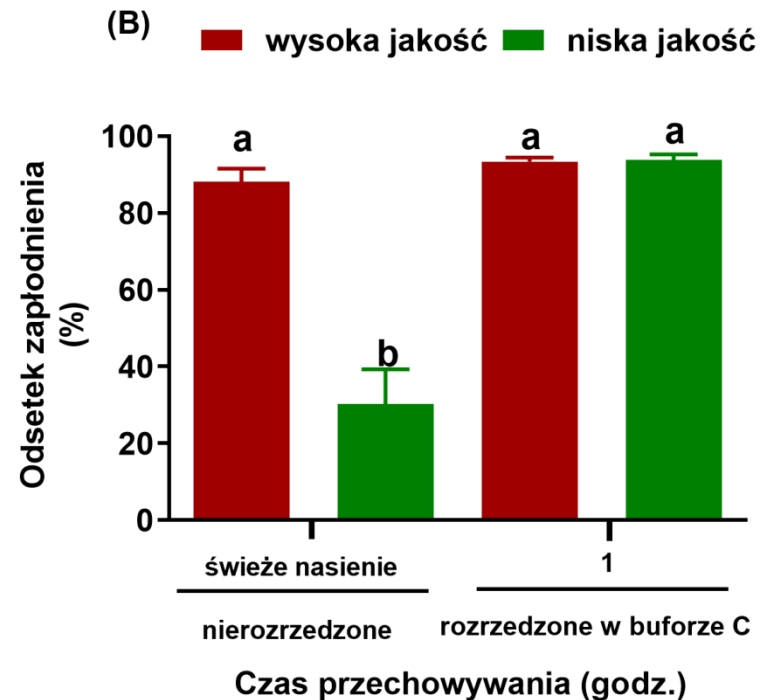
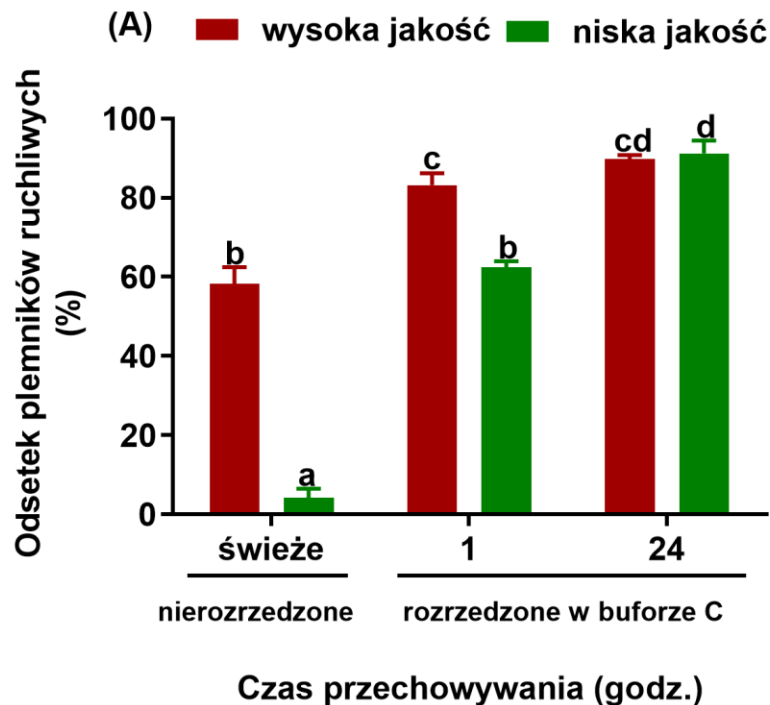
Bufory i dodatki

Tabela 2. Składniki buforów stosowanych do przechowywania nasienia karpia krótkookresowo w warunkach obniżonego metabolizmu.

Składniki	Bufory do przechowywania							
	Bufor M		Bufor B		Bufor R		Bufor C	
	mM	g/l	mM	g/l	mM	g/l	mM	g/l
NaCl	75	4,38	100	5,84	94	5,4	110	6,42
KCl	70	5,22	3,1	0,23	27	2,0	40	2,98
CaCl ₂	2,0	0,22	2,0	0,22	-	-	2,0	0,22
MgCl ₂	1,0	0,12	0,4	0,08	-	-	-	-
Mg ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	1,0	0,25
NaHCO ₃	-	-	25	2,10	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	0,3	0,05	-	-	-	-
Glicyna	-	-	-	-	50	3,7	-	-
Tris	20	2,43	-	-	15	1,8	20	2,42
Osmolalność	311		236		297		310	
pH	8,0		8,6		7,5		7,5	

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Bufory i dodatki



Rys. 6. Ruchliwość plemników (A) oraz odsetek zapłodnienia ikry karpia (B) w próbach wysokiej oraz niskiej jakości rozrzedzonych w buforze C (2 mM CaCl₂, 1m M Mg₂SO₄, 20 mM Tris, 110 mM NaCl, 40 mM KCl (pH 7.5 and 310 mOsm kg⁻¹) i przechowywanych w czasie 1 i 24 godzin. Nasienie świeże stanowiły próby nierozrzedzone w buforze C. Słupki oznaczone różnymi indeksami literowymi wskazują na istotności różnic w wartościach analizowanych parametrów (P < 0,05).

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

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)



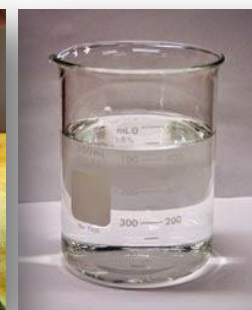
rozrzedzenie nasienia (30x)



1 porcja nasienia (1 ml)



29 porcji ASP (29 ml)



Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Temperatura



- odmienny skład lipidowy błon komórkowych plemników

wielonienasycone kwasy tłuszczowe



- zapewnienie płynności
- wydalanie metabolitów
- absorbcja 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

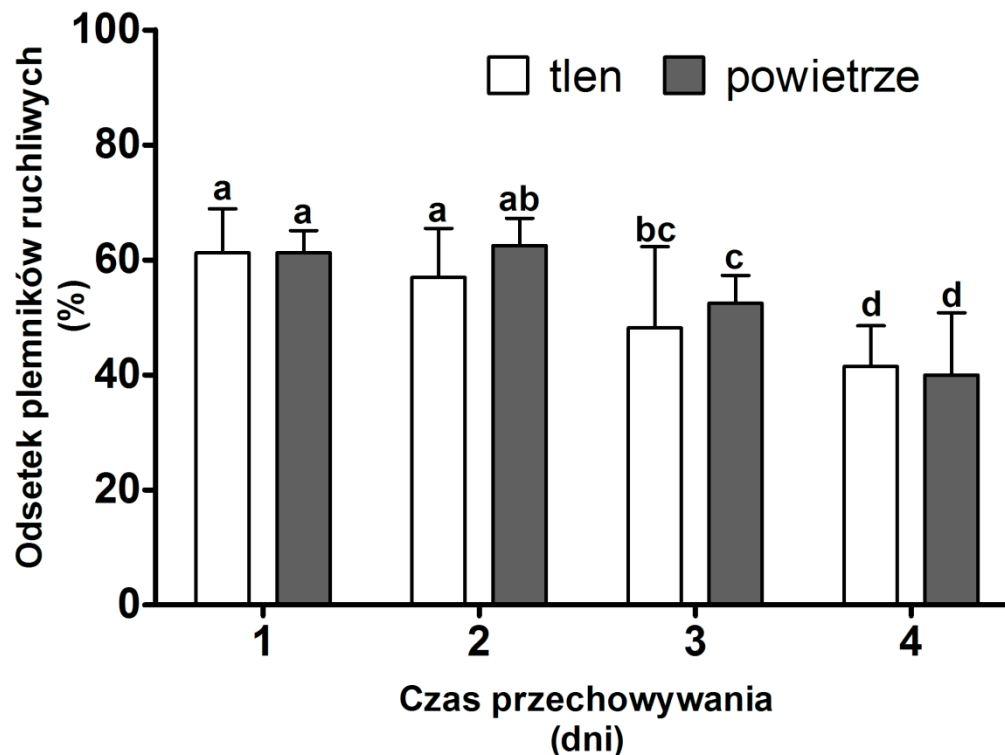
silniejsza
dynamika procesów oksydacyjnych

łatwiejsze
zachowanie żywotności w warunkach *in vitro*

trudniejsze
zachowanie żywotności w warunkach *in vitro*

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Tlen



brak rekomendacji

Rys. 7. Odsetek plemników ruchliwych w nasieniu karpia przechowywanym w czasie 4 dni w atmosferze czystego tlenu oraz powietrza. Różne indeksy literowe wskazują na różnice istotne statystycznie między wariantami oraz czasem przechowywania ($P < 0.05$).

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Tlen

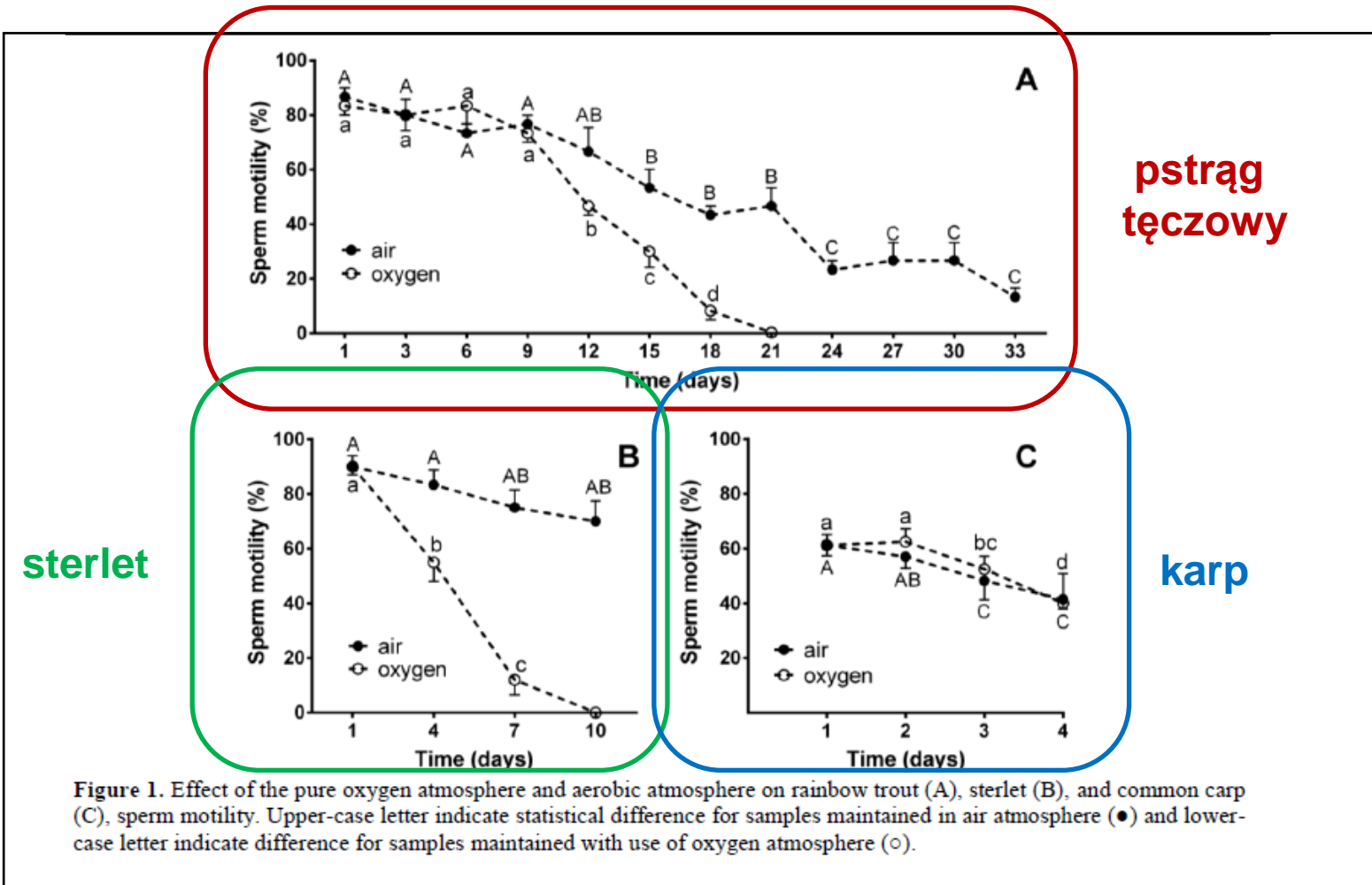


Figure 1. Effect of the pure oxygen atmosphere and aerobic atmosphere on rainbow trout (A), sterlet (B), and common carp (C), sperm motility. Upper-case letter indicate statistical difference for samples maintained in air atmosphere (●) and lower-case letter indicate difference for samples maintained with use of oxygen atmosphere (○).

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Cienka warstwa



mieszanie nasienia 1x dziennie

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Dostępność

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

The screenshot shows the Bionovo website interface. The browser address bar displays the URL <https://www.bionovo.pl/p/butelki-z-ps-do-hodowli-komorkowych/>. The Bionovo logo, consisting of a green circle and the text 'bionovo' with 'BIORESEARCH EQUIPMENT BIOCHEMICALS' below it, is circled in red. The navigation menu includes 'ARTYKUŁY LABORATORYJNE', 'ODCZYNNIKI', 'PROMOCJE', 'NOWOŚCI', 'O FIRMIE', and 'KONTAKT'. The breadcrumb trail reads: 'Strona główna / Mikrobiologia, hodowla tkankowa / Butelki, probówki, kolby / Butelki do hodowli / Butelki do hodowli plastikowe / Butelki z PS do hodowli komórkowych'. A search bar on the left contains the text 'Wyszukaj produkt ...'. Below it is a vertical list of categories such as 'Szkło i porcelana', 'Plastiki laboratoryjne', 'Mikrobiologia, hodowla tkankowa', etc. The main content area features a product image of three clear plastic bottles with blue caps. To the right of the image, the product title is 'Butelki z PS do hodowli komórkowych' with a price range of '342,57 zł – 433,77 zł'. Below the image, there is a description: 'Butelki przeznaczone do hodowli komórkowych. Wykonane z klarownego polistyrenu. Powierzchnia obrabiana próżniowo zapewnia doskonałą adhezję komórek. Pakowane po 5 szt.' and a link to 'Zobacz inne produkty w tej kategorii: Butelki do hodowli plastikowe'. At the bottom, a table lists various bottle models with their specifications.

Miniatura	Nr-Art.	Nazwa	Zamknięcie	Pow. wzrostu	Pojemność	Poj. maks.	Szt./Op.	Cena netto	Ilość
	B-4250	Butelka z PS do hodowli komórkowych	z zakrętką z filtrem	25 cm ²	7 ml	60 ml	200 szt.	384,86 zł	- 1 +
	B-4251	Butelka z PS do hodowli komórkowych	z zakrętką z filtrem	75 cm ²	25 ml	250 ml	100 szt.	433,77 zł	- 1 +
	B-4252	Butelka z PS do hodowli komórkowych	z zakrętką z filtrem	175 cm ²	50 ml	650 ml	40 szt.	352,26 zł	- 1 +
	B-4255	Butelka z PS do hodowli komórkowych	ze szczelną zakrętką	25 cm ²	7 ml	60 ml	200 szt.	360,24 zł	- 1 +
	B-4256	Butelka z PS do hodowli komórkowych	ze szczelną zakrętką	75 cm ²	25 ml	250 ml	100 szt.	397,86 zł	- 1 +
	B-4257	Butelka z PS do hodowli komórkowych	ze szczelną zakrętką	175 cm ²	50 ml	650 ml	40 szt.	342,57 zł	- 1 +

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Dostępność

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

The screenshot shows the Biokom website interface. At the top, the Biokom logo is circled in red. The navigation menu includes: STRONA GŁÓWNA, NEWSLETTERY, AKTUALNOŚCI, O NAS, FIRMY, and KONTAKT. The breadcrumb trail reads: PLASTIK » PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT » PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT » "BUTELKI DO HODOWLI KOMÓRKOWEJ". Below this, there are three images: 1) A stack of clear plastic cell culture bottles with blue caps. 2) A multi-well plate with pink liquid in the wells. 3) A rack of Thermo Scientific Nunc cryovials containing pink liquid. Below the images are three columns of text:
 - The first column describes a highly modified and advanced surface for cell culture.
 - The second column describes ThinCert™ inserts with porous membranes for creating multi-compartment structures.
 - The third column describes a new generation of Thermo Scientific Nunc cryovials for better organization and management of stored material.
 Below the text is a search bar with the text "WYSZUKAJ" and "butelki do hodowli komórkowej". Below the search bar are dropdown menus for "plastik", "Przechowywanie i Tr...", "Przechowywanie i Tr...", and "trwa wczytywanie ...", followed by an "ok" button. Below the search bar, the text "NIE ZNALEZIONO SZUKANEJ FRAZY" is displayed. At the bottom of the page, there is a section titled "WYBIERZ SWÓJ REGION" with a map of Poland and contact information for the Warsaw office: dr Dariusz Rutkowski, Przedstawiciel regionalny, tel. 609 527 979, e-mail: rutkowski@biokom.com.pl.

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Transport



- prosty i łatwy sposób transportu
- reatywnie niski koszt transportu
- możliwość wykorzystania nasienia kilkakrotnie
- oszczędność czasu
- ograniczenie manipulacji z tarlakami
- lepsza organizacja pracy



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

Podmioty zgłoszone do PDR



**Gospodarstwo Rybackie Ostróda,
Warlity Wielkie
(woj. warmińsko-mazurskie)**

karp



**Gospodarstwo Rybackie Samokłęski
(woj. lubelskie)**
amur, tołpyga



**Ośrodek Zarybieniowo-Rybacki
„Żurawia”
(woj. łódzkie)**
amur, tołpyga



dr inż. Beata I. Cejko
b.cejko@pan.olsztyn.pl

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

Dziękuję za uwagę