



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Przechowywanie nasienia ryb

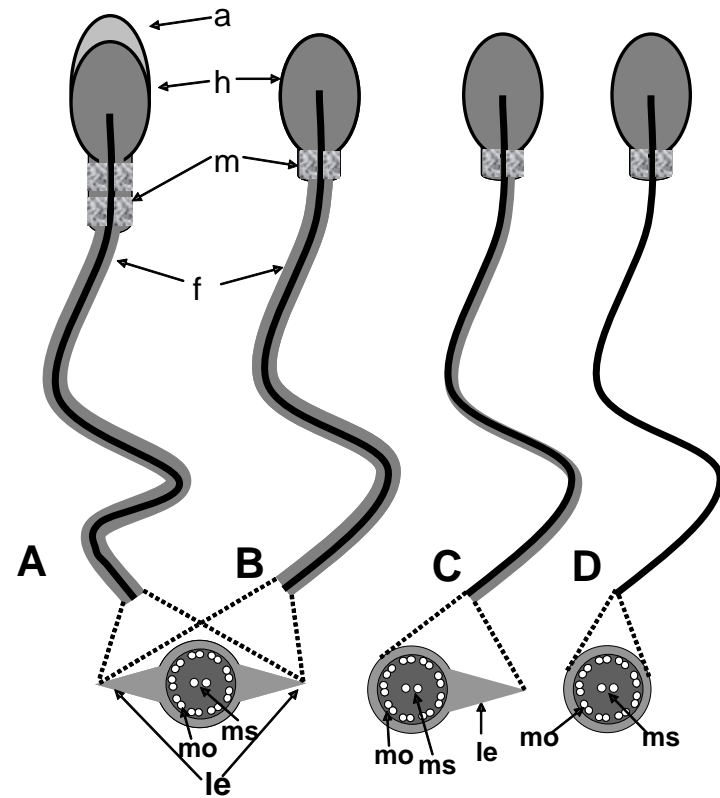
PRZEGLĄD STOSOWANYCH METOD I ICH PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE W WYLĘGARNIACH

dr hab. inż. Radosław Kowalski
r.kowalski@pan.olsztyn.pl

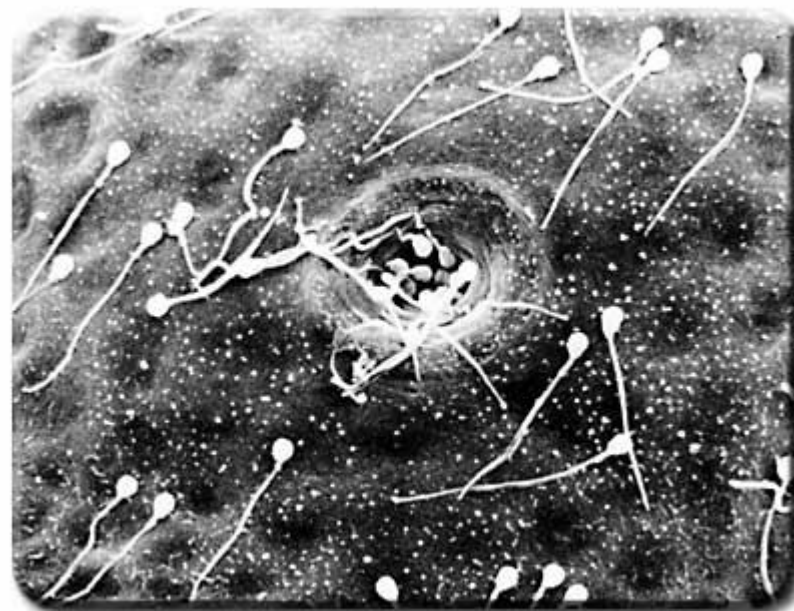
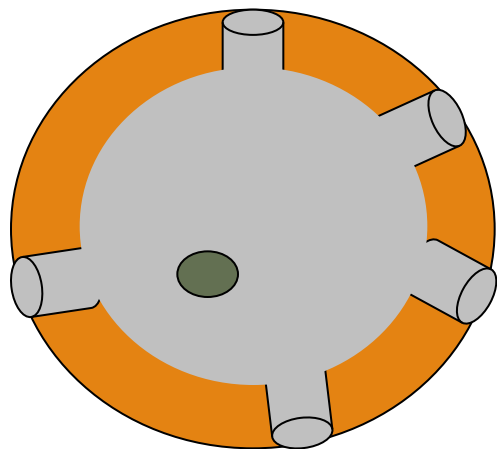
*Zakład Biologii Gamet i Zarodka,
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polska Akademia Nauk, Olsztyn*

Plemniki ryb doskonałokostnych - morfologia

- A – Chrzęstnokostne
- B – Większość rzędów ryb
- C – Szczupakokształtne
- D - Karpiokształtne

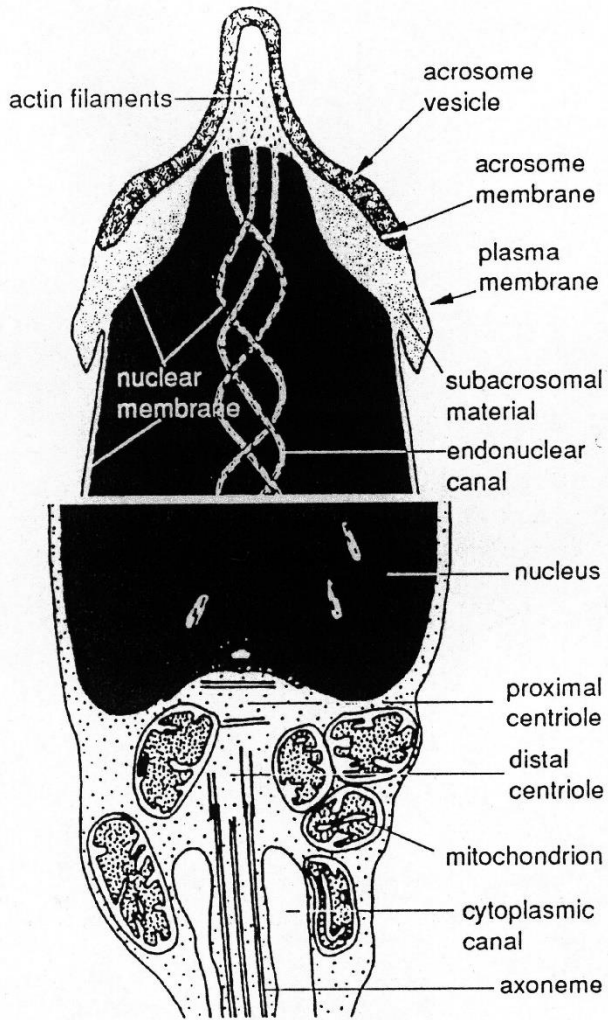


Dlaczego ryby nie potrzebują akrosomu?

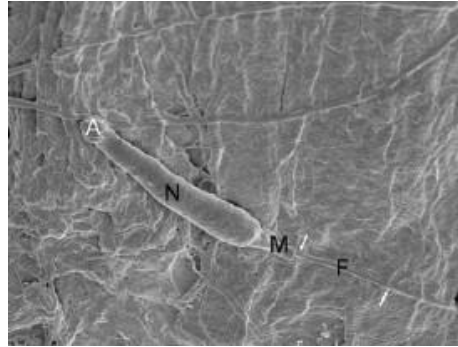


Ryby jesiotrowate – wyjątek – plemniki tych ryb posiadają akrosom.

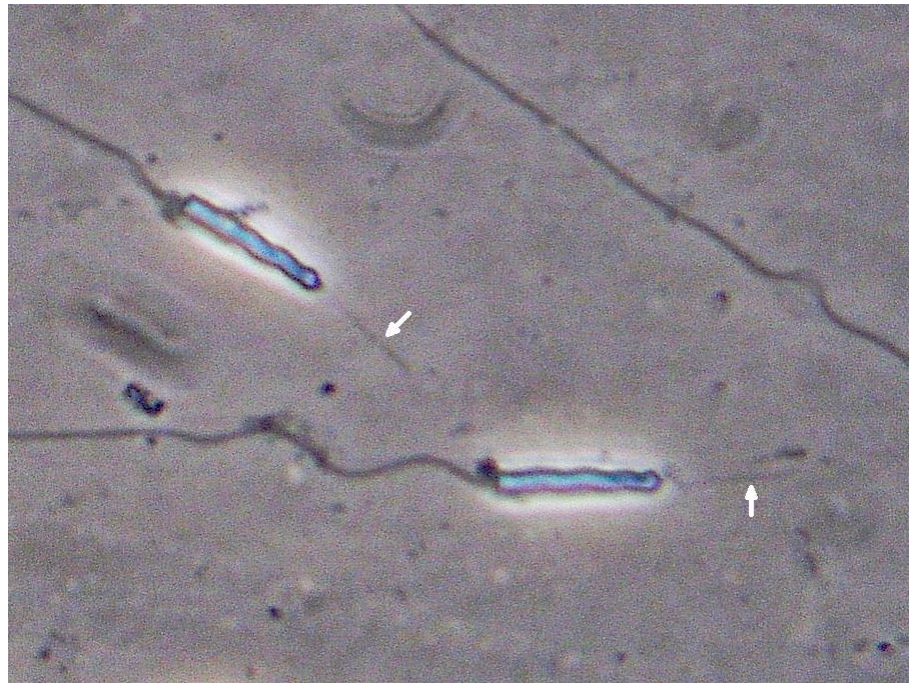
Budowa plemników ryb jesiotrowatych



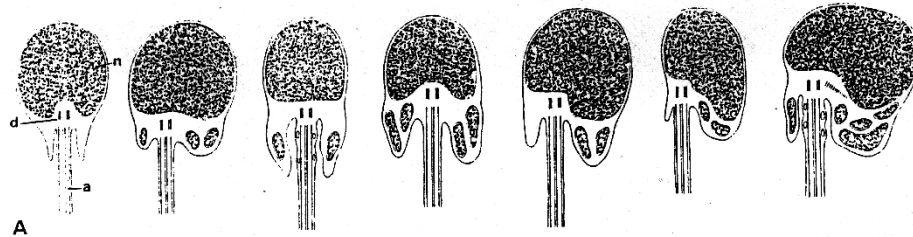
Cher i Clark (1984)



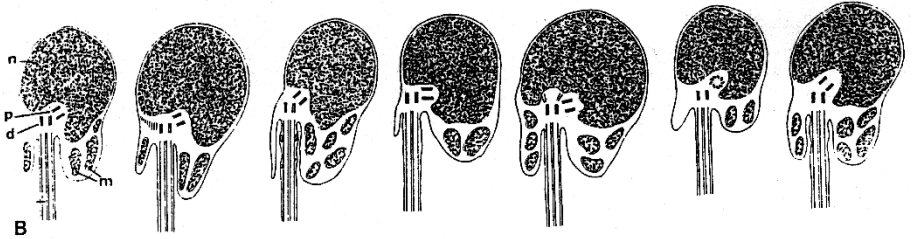
Wei i in. 2007



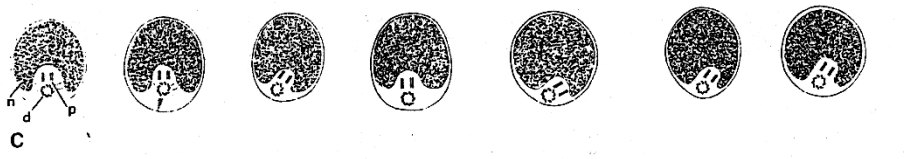
Budowa plemników ryb karpiowatych



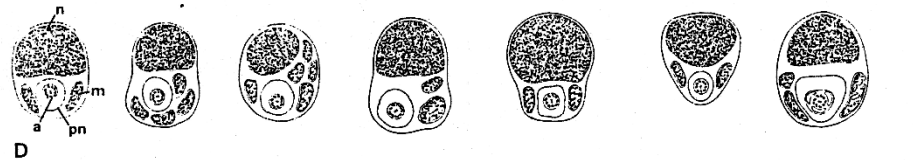
A



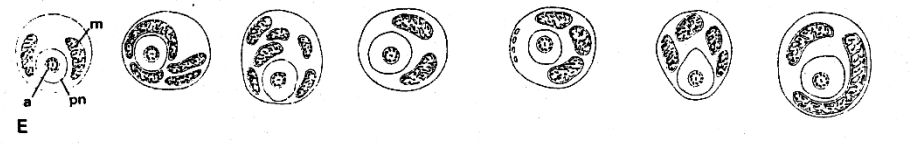
B



C



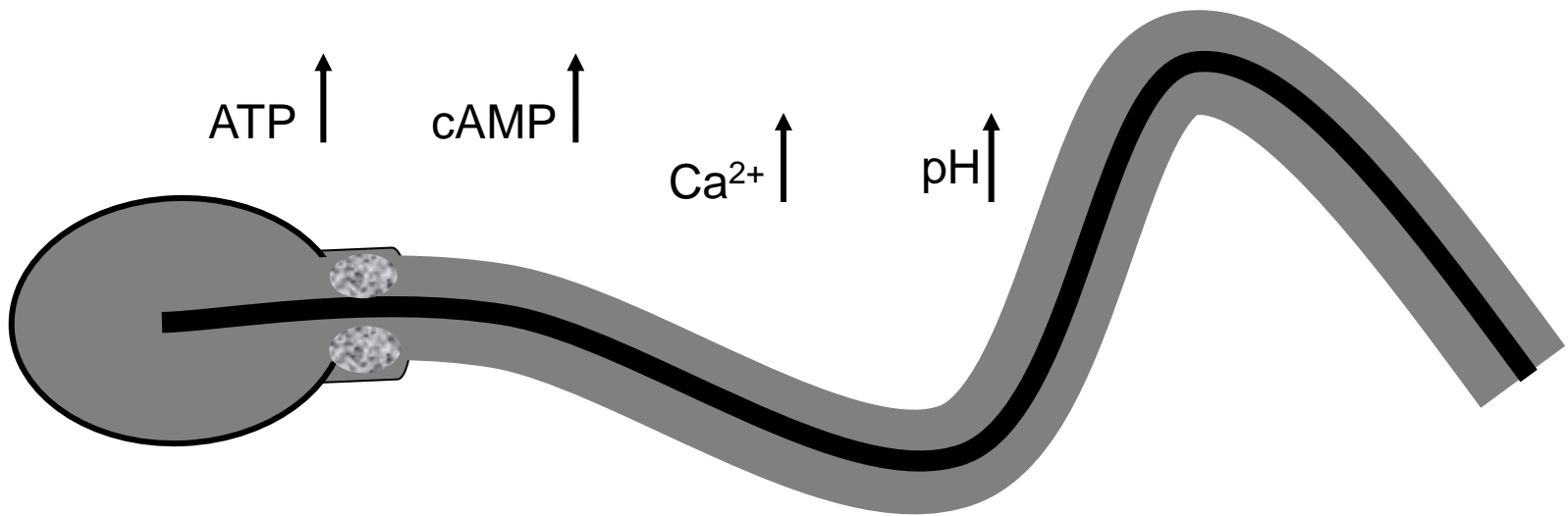
D

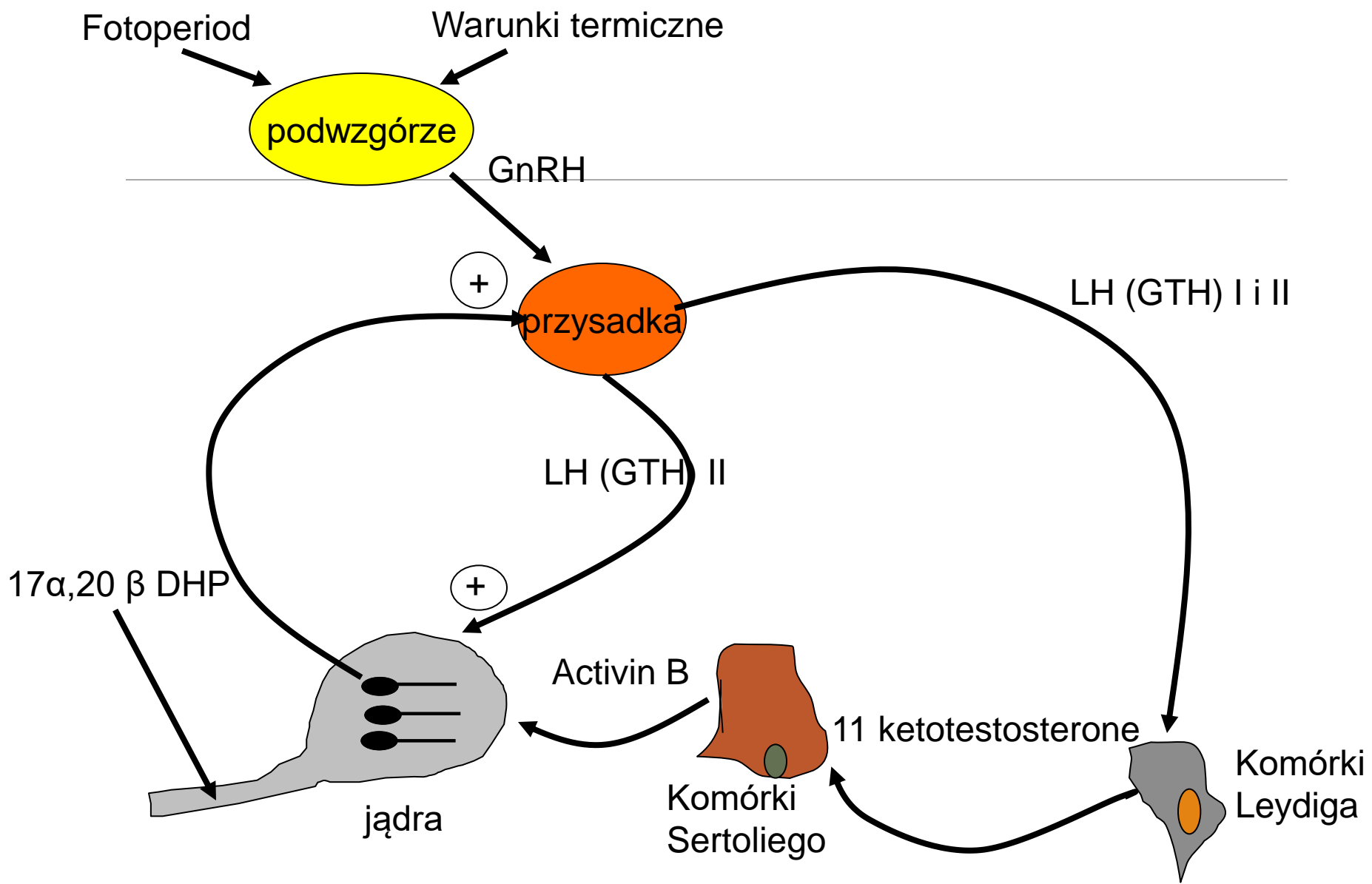


E

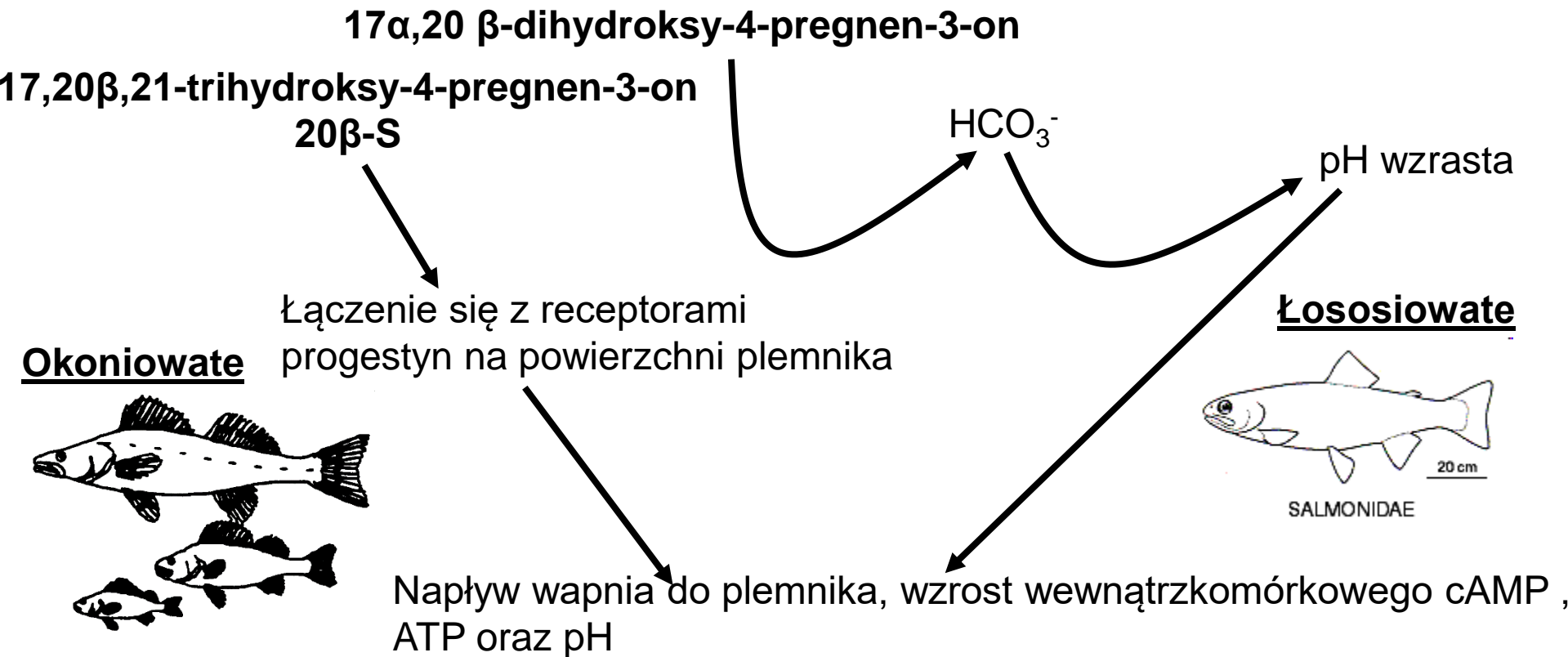
Leuciscus cephalus *Leuciscus souffia* *Rutilus rubilio* *Alburnus alburnus alborella* *Chondrostoma toxostoma* *Barbus barbus plebejus* *Carassius auratus*

Czego plemnik potrzebuje do ruchu? Czynniki wewnątrzkomórkowe

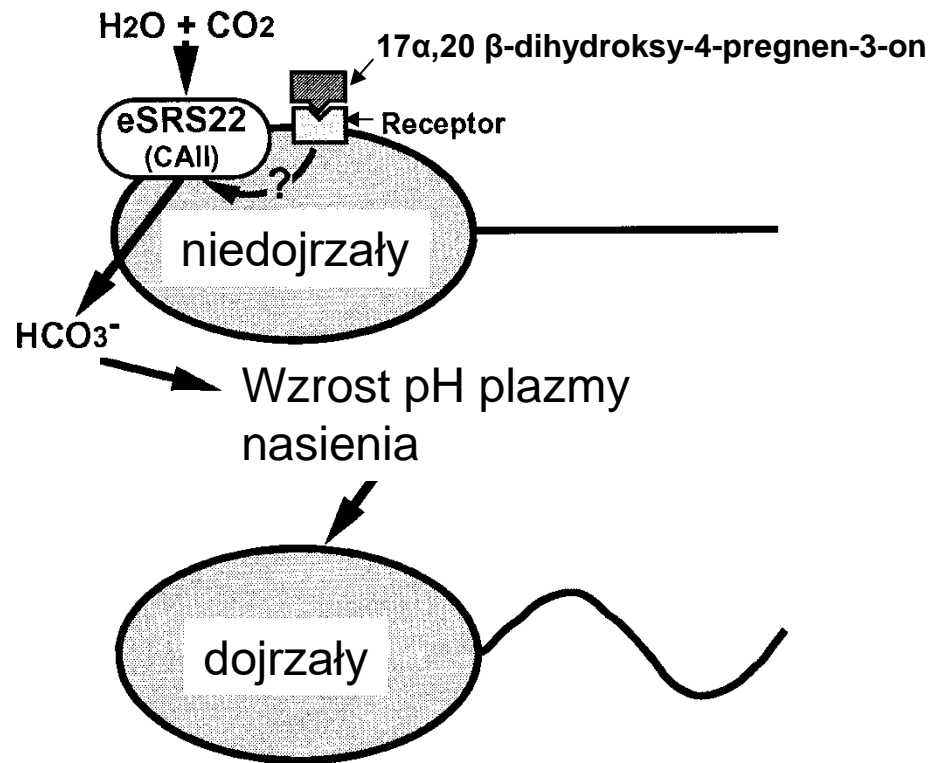




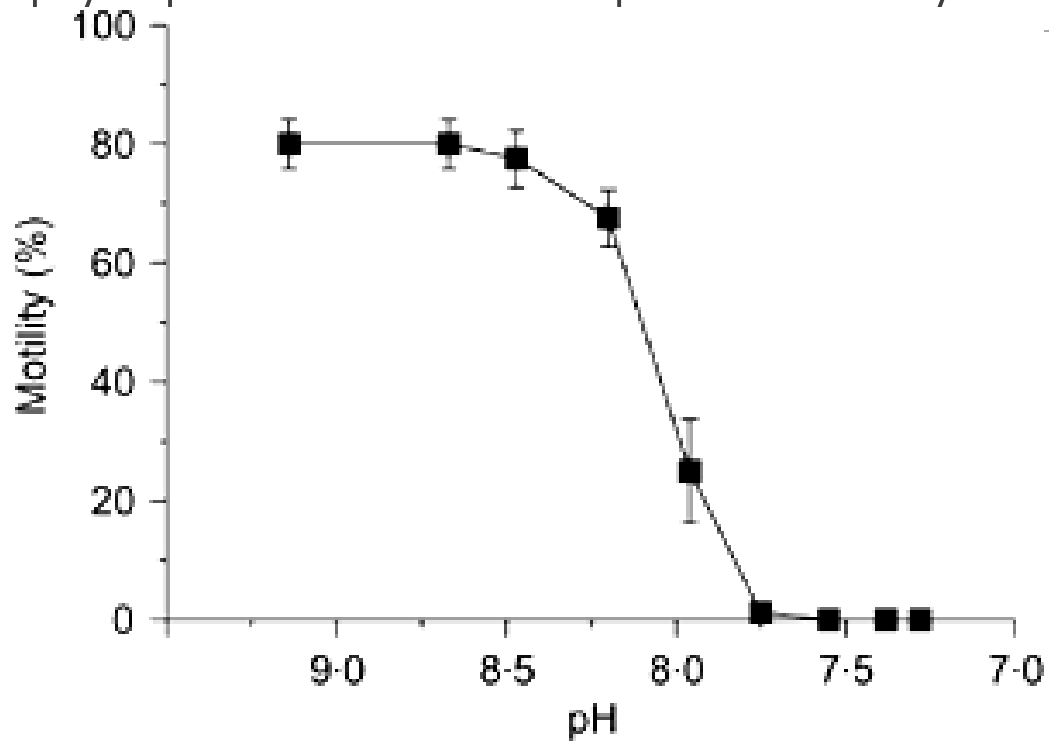
Zewnątrzkomórkowe czynniki warunkujące dojrzewanie plemników ryb



Skąd bierze się HCO_3^- w plazmie nasienia?



Wpływ pH na ruchliwość plemników ryb łososiowatych



Ruchliwość plemników niedojrzałych i dojrzałych pstrąga tęczowego

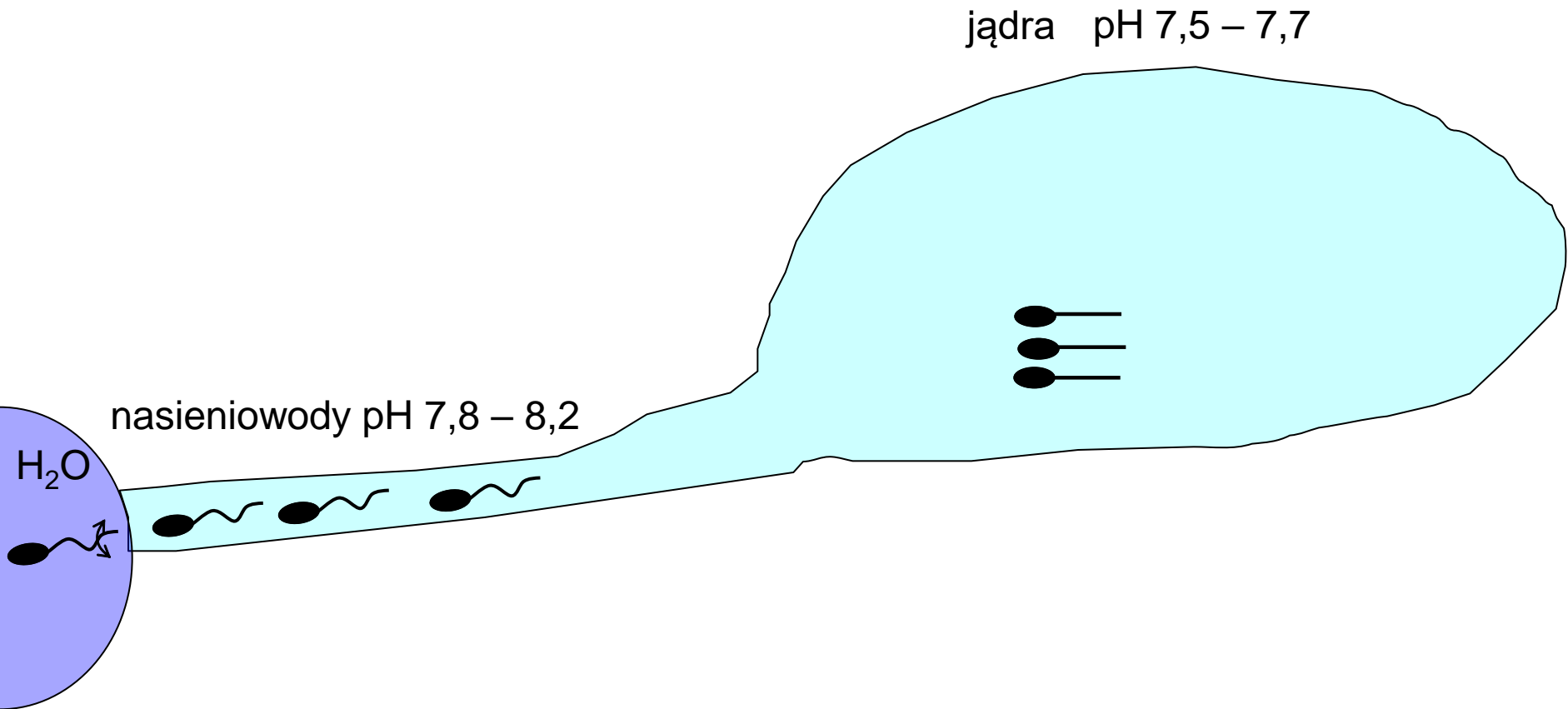


Niedojrzałe

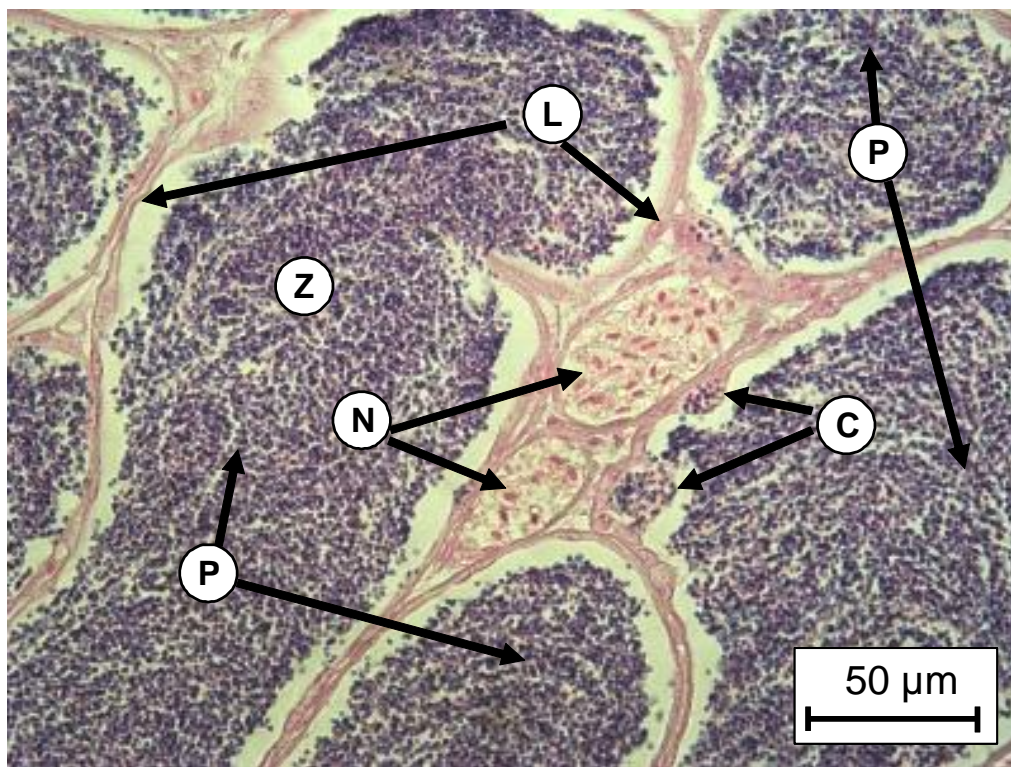


Dojrzałe

Gdzie to się dzieje?

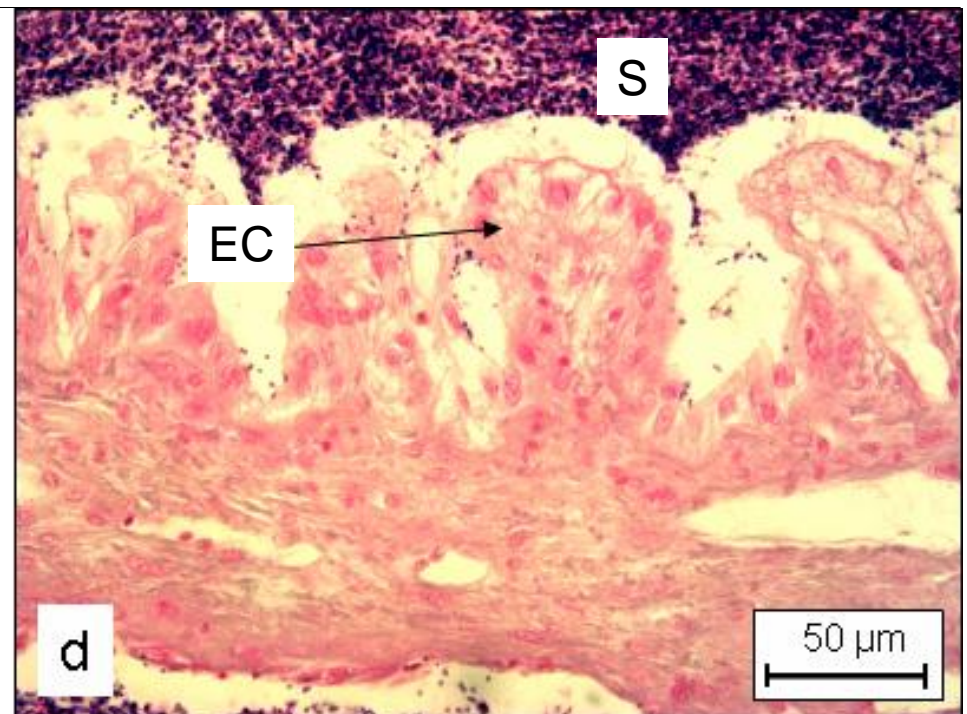
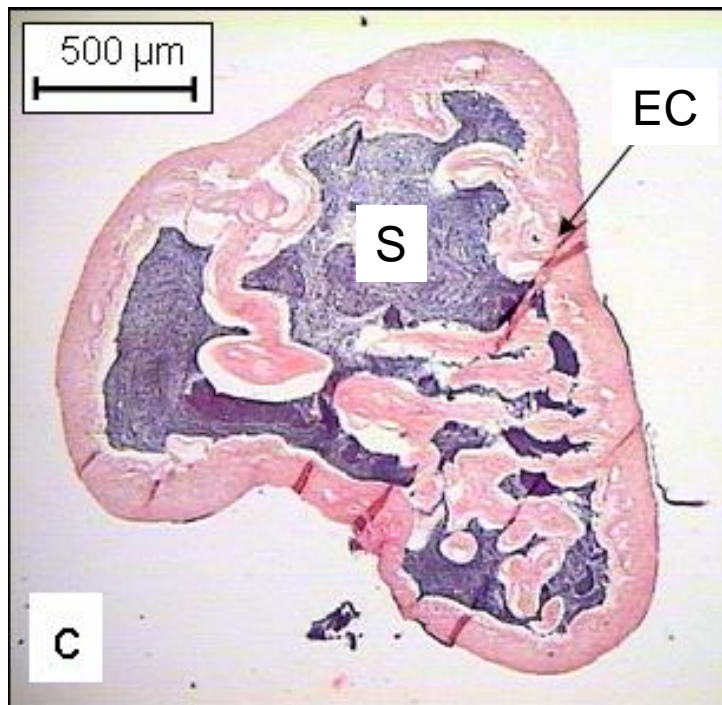


Jądra – fabryka plemników



Budowa histologiczna dojrzałej gonady pstrąga tęczowego.
Z – światło zrazika,
L- łącznotkankowa ściana komórkowa zrazika,
N – naczynia krwionośne,
C – dojrzewające cysty plemnikotwórcze,
P – dojrzałe plemniki.

Nasieniowody – nabłonek który daje życie

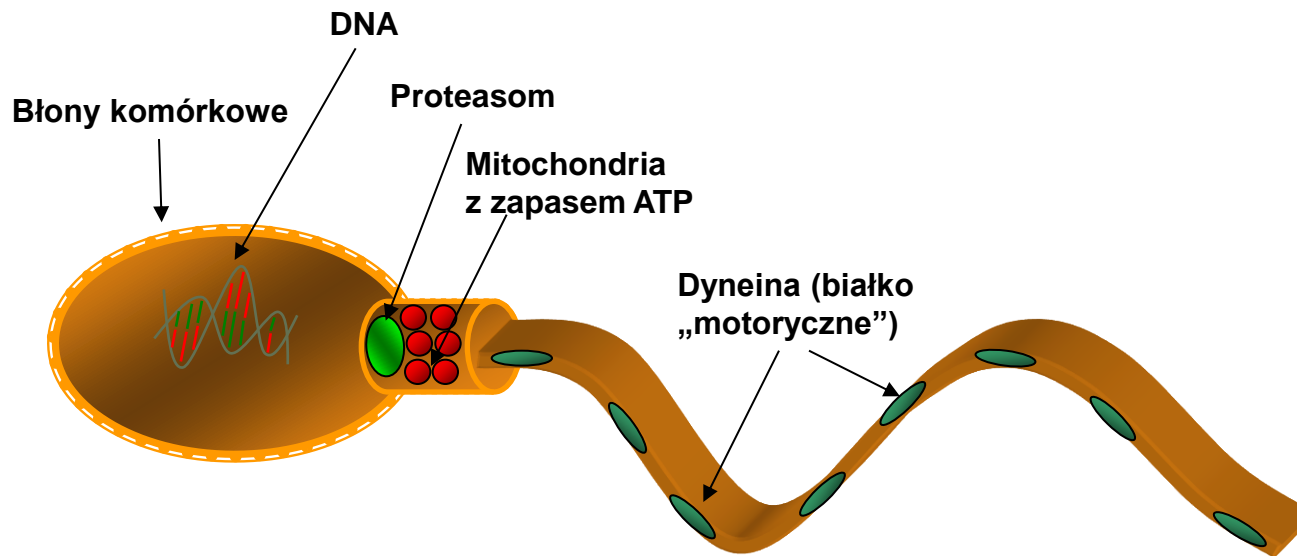


EC – komórki epitelialne
S - plemniki

Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - czyli... co czyha na plemnika?

Wróg nr 1 – wolne rodniki:

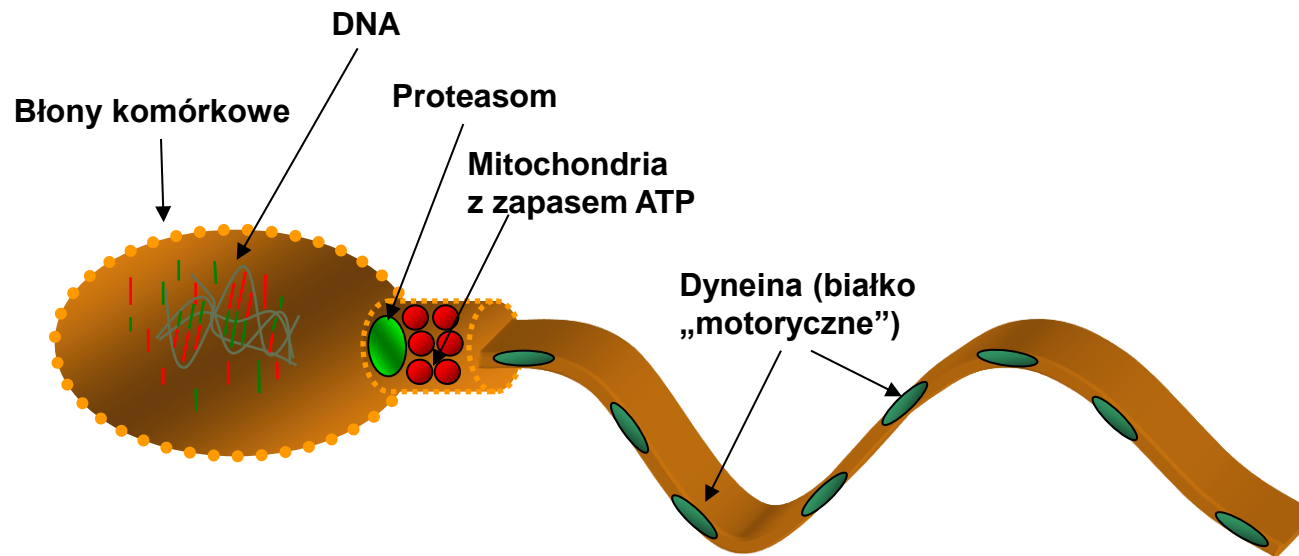
- Utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych błon komórkowych



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - czyli... co czyha na plemnika?

Wróg nr 1 – wolne rodniki:

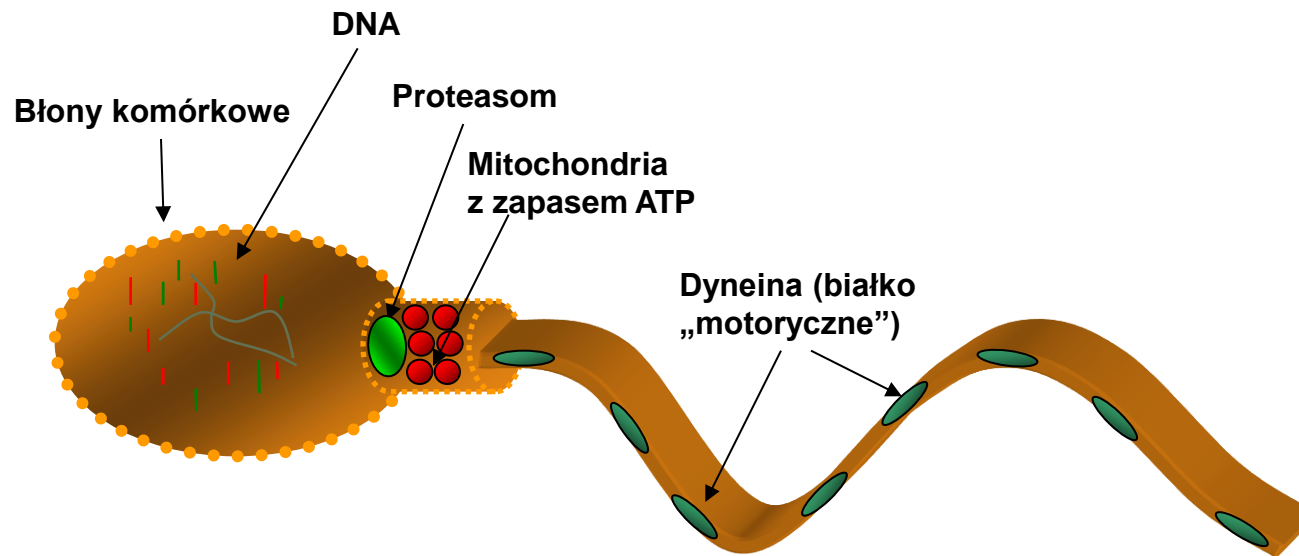
- Zmiany oksydacyjne materiału genetycznego – fragmentacja DNA



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - czyli... co czyha na plemnika?

Wróg nr 2 – **proteiny (natywne i bakteryjne):**

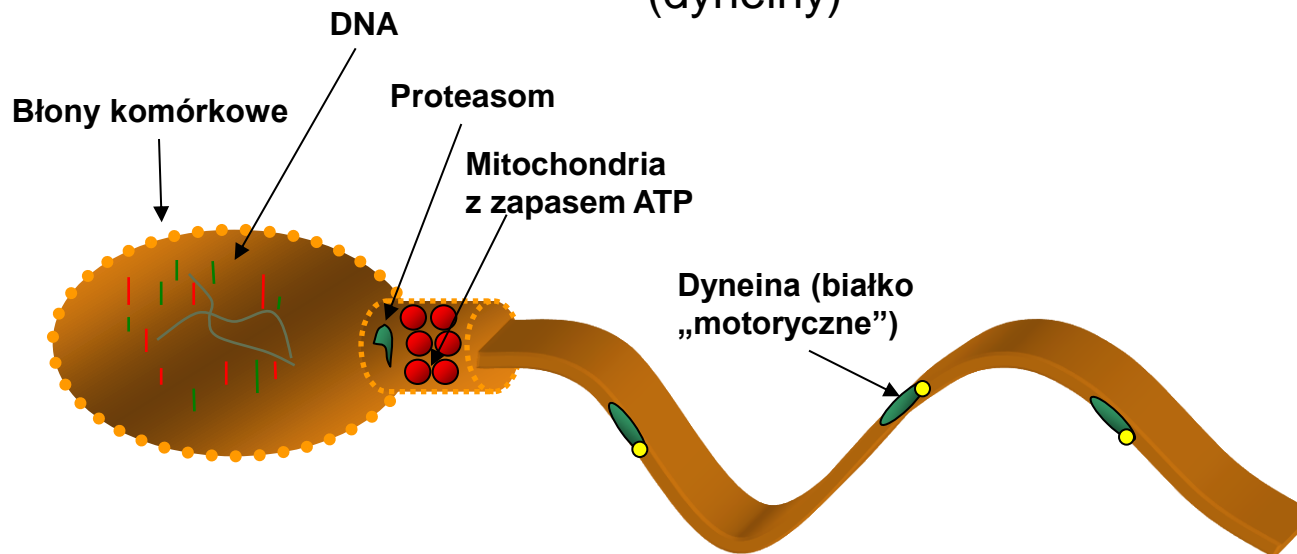
- degradacja białek plemnika



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - czyli... co czyha na plemnika?

Wróg nr 3 – **kinazy białkowe**:

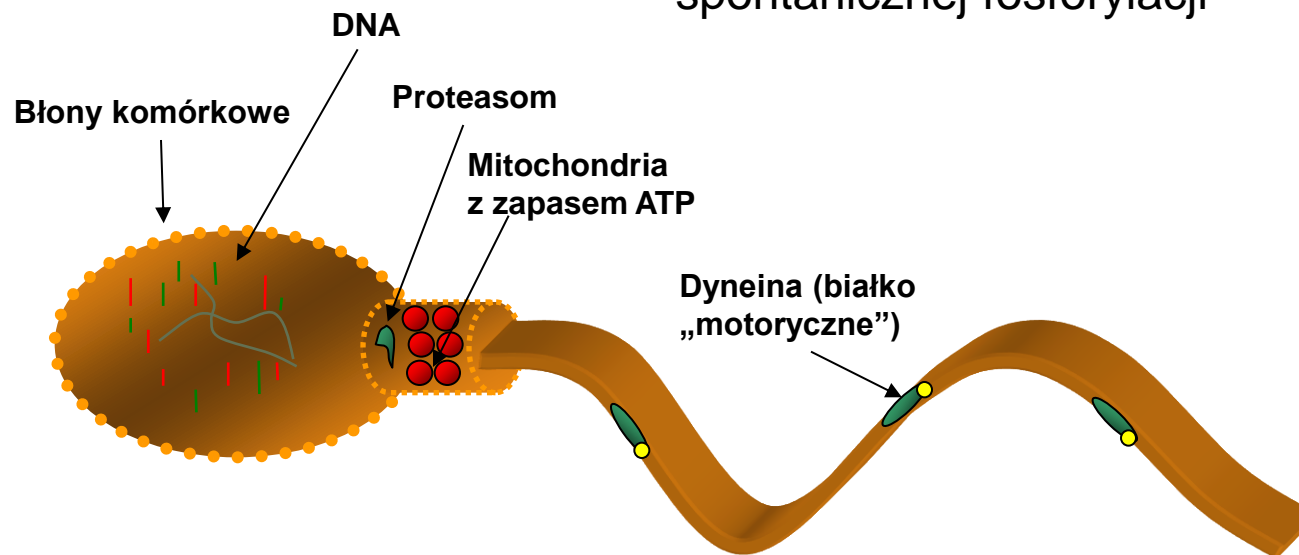
- „przedwczesna” spontaniczna fosforylacja kluczowych dla motoryki plemnika białek (dyneiny)



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - czyli... co czyha na plemnika?

Wróg nr 3 – **kinazy białkowe**:

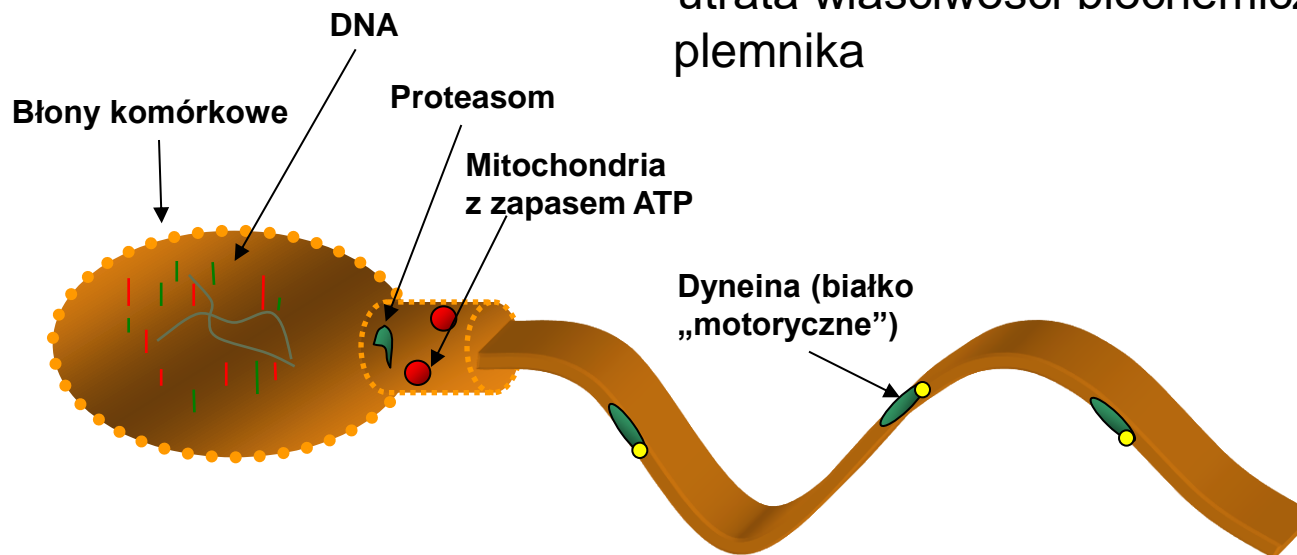
- utrata, kluczowych dla motoryki plemników zapasów ATP oraz cAMP podczas procesów spontanicznej fosforylacji



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - czyli... co czyha na plemnika?

Wróg nr 4 – **CO₂ (obniżenie się pH otoczenia):**

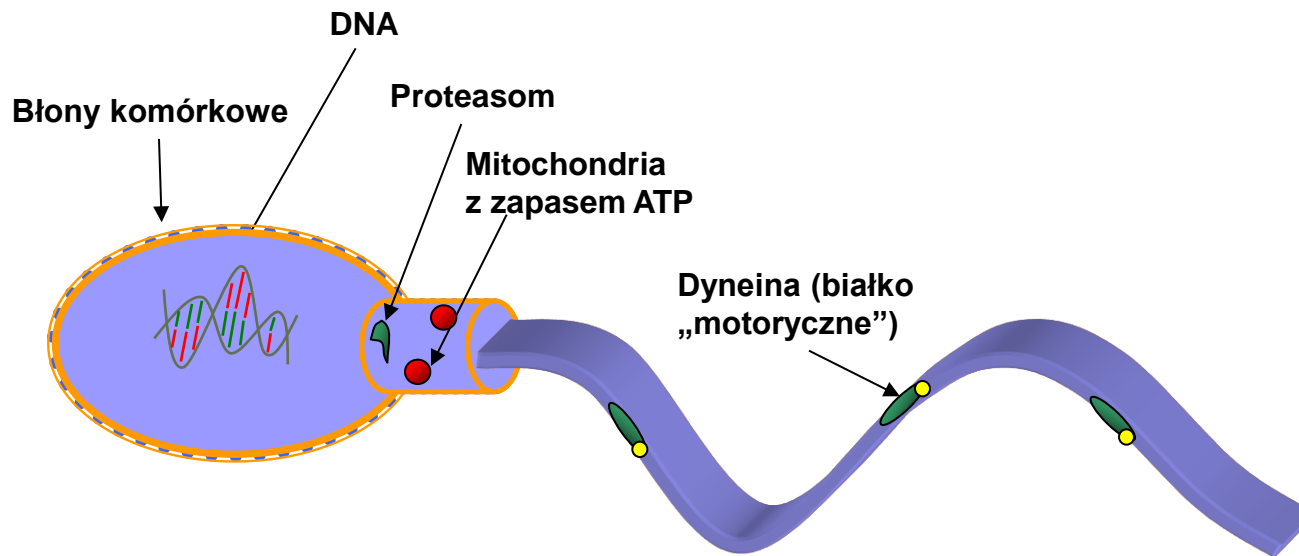
- utrata wapnia wewnątrzkomórkowego,
- zahamowanie syntezy ATP
- utrata właściwości biochemicznych przez białka plemnika



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - jak z nimi walczyć?

Przyjaciel nr 1 – **antyoksydanty**:

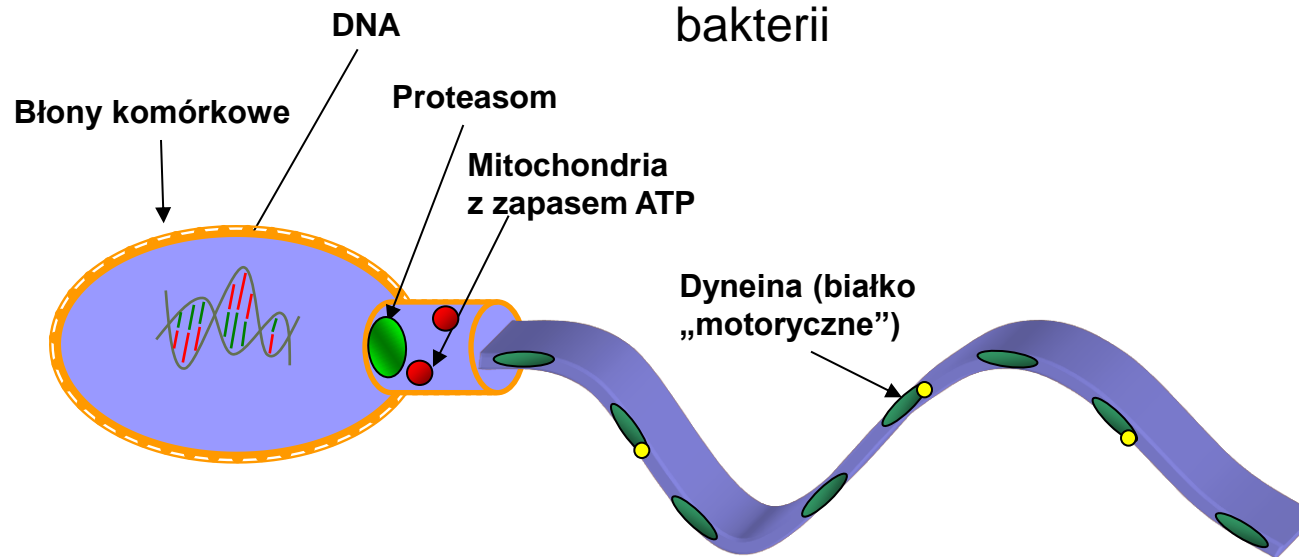
- zabezpieczają kwasy tłuszczowe błon komórkowych oraz DNA przed utlenianiem



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - jak z nimi walczyć?

Przyjaciel nr 2 i 3 – **inhibitory proteinaz**
oraz antybiotyki:

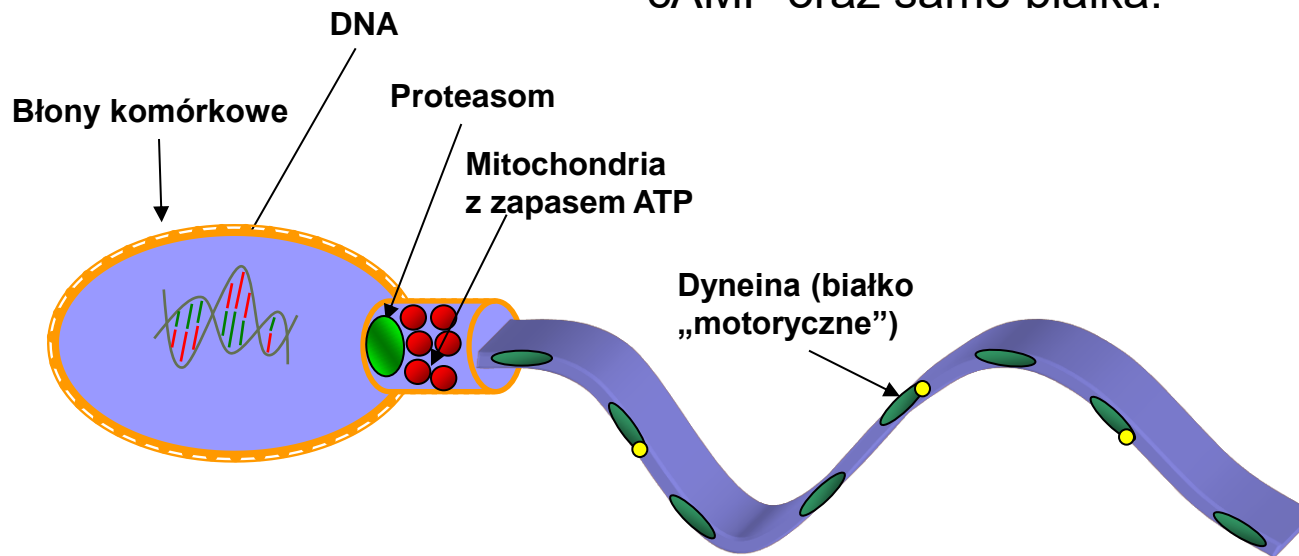
- hamują potencjalnie niebezpieczne dla białek plemnika proteinazy, uniemożliwiają rozwój bakterii



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - jak z nimi walczyć?

Przyjaciel nr 4 – **inhibitory kinaz:**

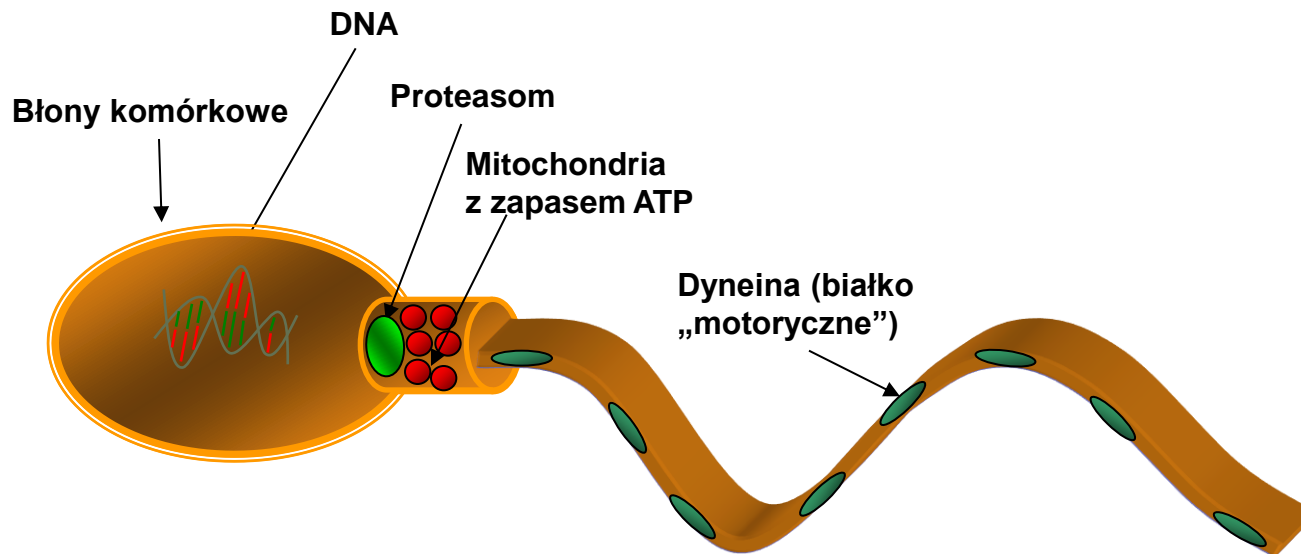
- uniemożliwiają zachodzenie spontanicznej fosforylacji, przez co zabezpieczają zapasy ATP i cAMP oraz same białka.



Wrogowie plemników ryb w warunkach *in vitro* - jak z nimi walczyć?

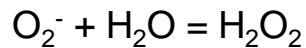
Przyjaciel nr 5 – **związki buforujące**:

- nawet przy wysokim stężeniu CO₂ nie następuje obniżenie pH środowiska.

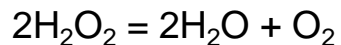


Ochrona plemników ryb: in vivo – naturalne związki antyoksydacyjne

- **Dysmutaza ponadtlenkowa** (Cu, Zn, Mn, Ni zależna)



- **Katalazy**



- **Witaminy A,E,C** - łańcuch reakcji redoks, ochrona PUFA poprzez konkutowanie z wolnymi rodnikami

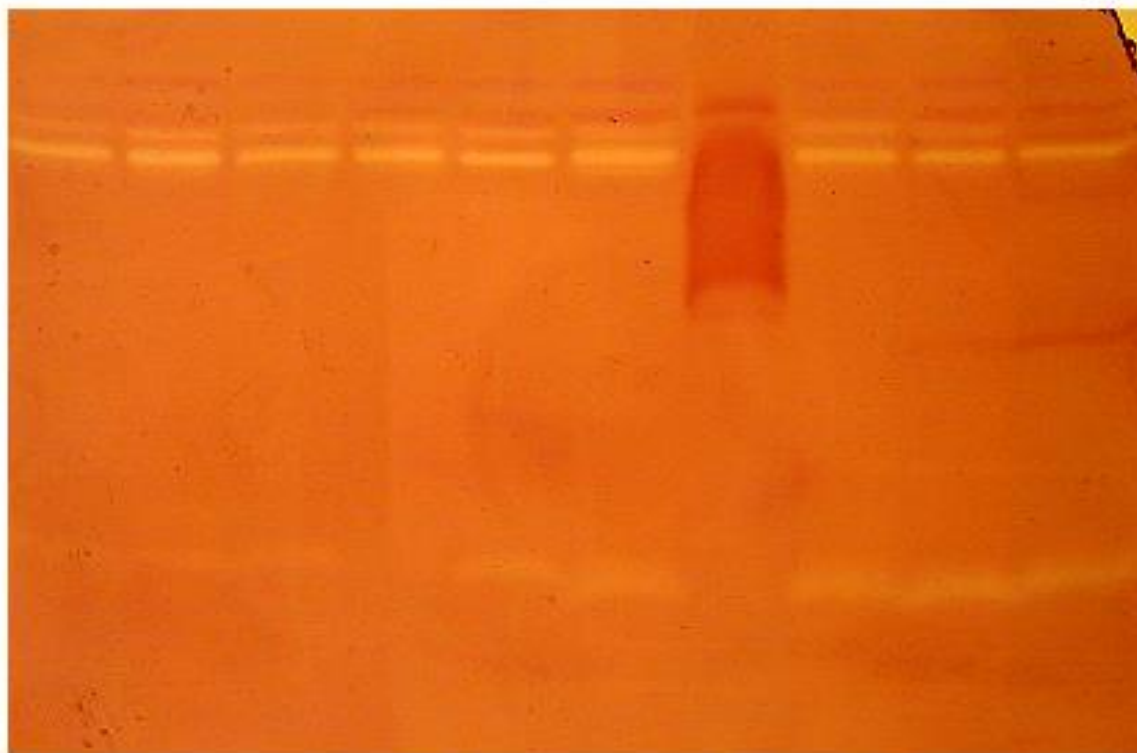
- **Transferyna, Apotransferyna**

Reakcje Fentona



- **Glutation (GSH)** - łańcuch reakcji redoks
- **Peroksydaza glutationowa (Gpx)** enzym zależny od selenu
Konwersja utlenionego do zredukowanego GSH

Ochrona plemników ryb in vivo – naturalne inhibitory proteinaz



Aktywność
antyproteolityczna
plazmy nasienia
pstrąga tęczowego

Inhibitory proteinaz należą do głównych białek plazmy nasienia ryb

Czynniki wpływające na skuteczność przechowywania mlecza:

1. odpowiednia jakość pozyskanego materiału:

- ruchliwość plemników
- koncentracja plemników
- brak zanieczyszczeń mlecza (krew, fekalia)

2. właściwa temperatura przechowywania

3. zapewniona wymiana gazowa

4. zachowane warunki sterylności

Odpowiedni skład roztworów immobilizujących ruch plemników:

- **pH (powyżej 7.5 – zasadowe)**
- **skład jonowy dostosowany do specyfiki fizjologii gatunku**
 - ŁOSOSIOWATE** – immobilizujące stężenie jonów potasu
 - KARPIOWATE** – immobilizujące – wysokie ciśnienie osmotyczne plazmy nasienia

Ochrona plemników ryb in vitro – czyli jak przedłużyć okres przydatności do zapłodnienia

1. Antyoksydanty:

- witamina C i glutation, zabezpieczenie DNA
- witamina E i flawonoidy (np. kwercytyna), zabezpieczenie kwasów tłuszczowych błon komórkowych
- białko albumina może działać również antyoksydacyjnie

2. Inhibitory proteinaz:

- głównie inhibitory metaloproteinaz

3. Antybiotyki:

- streptomycyna i penicilina

4. Inhibitory kinaz

- syntetyczne związki takie jak H89

5. Związki buforujące

- Tris-Tricine, Tris-HCl, HEPES, MES itp.



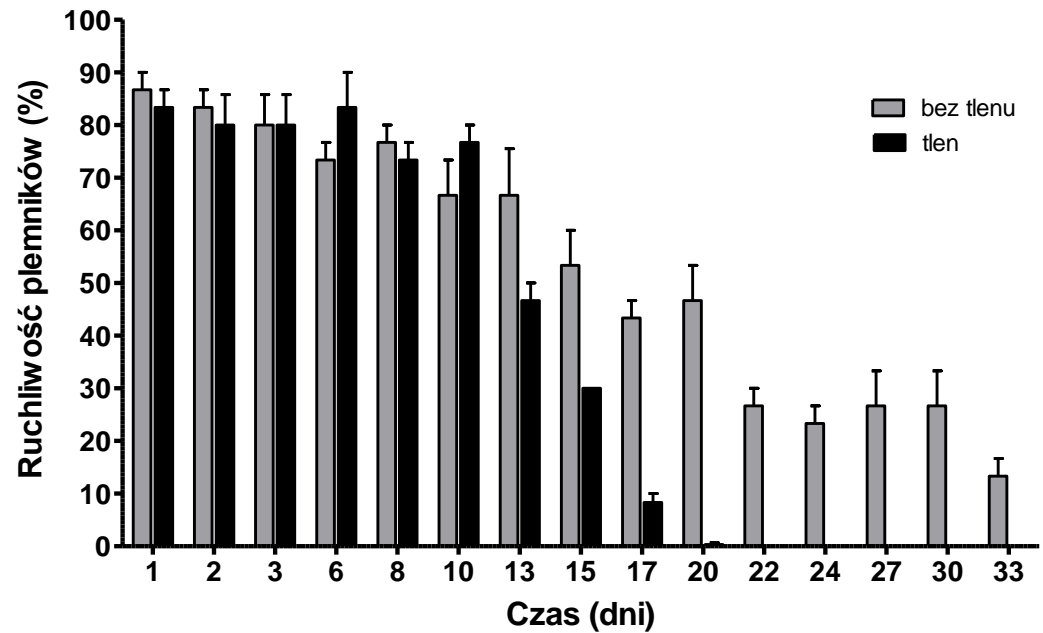
Przechowywanie nasienia ryb w warunkach *in vitro* - ciemna strona tlenu



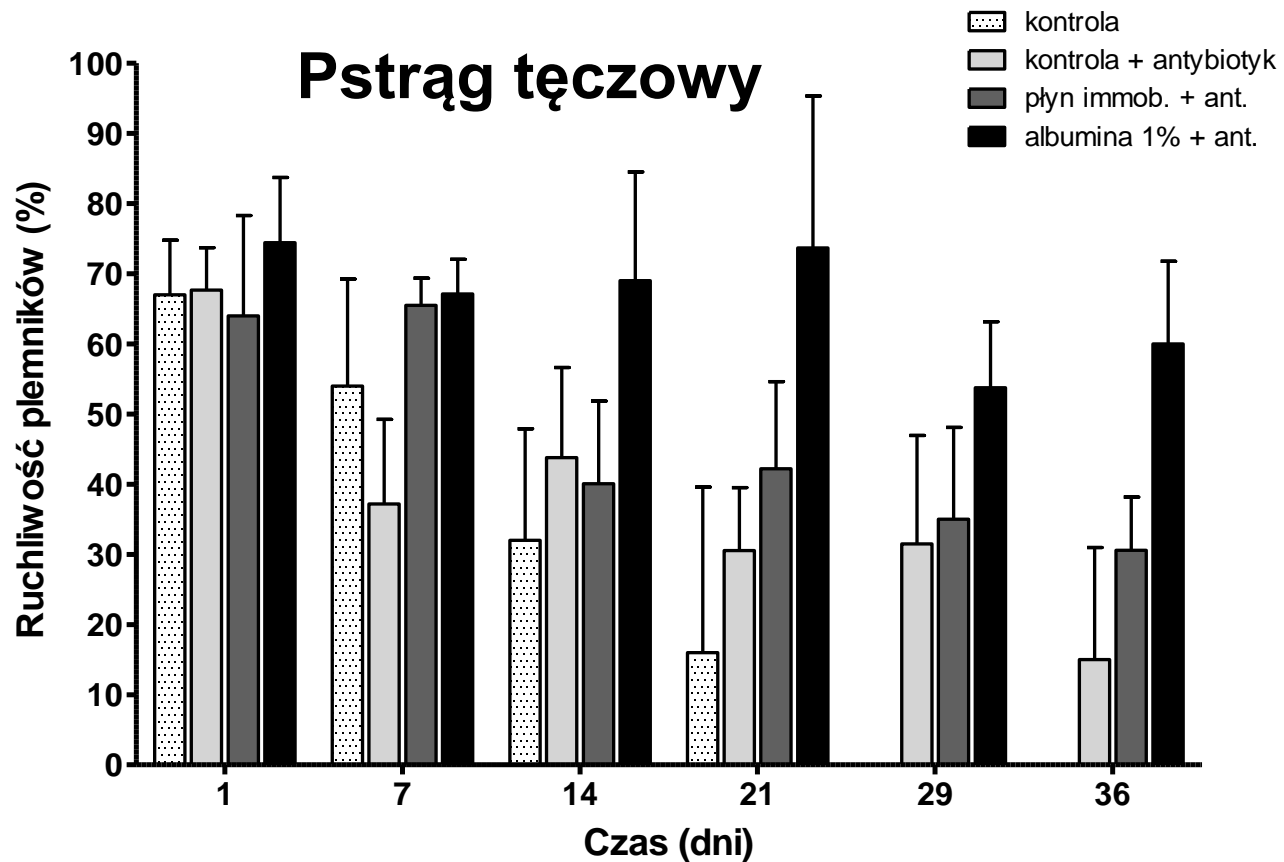
Worki kontra woreczki



Pstrąg tęczowy



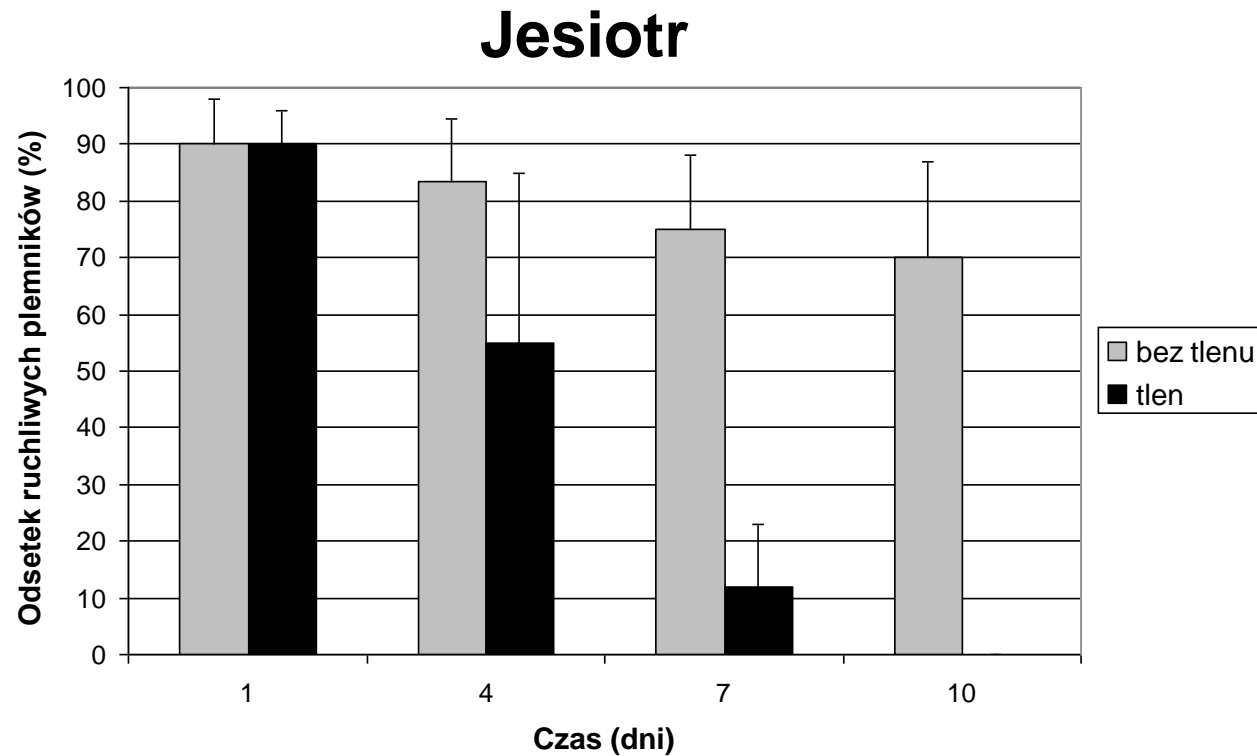
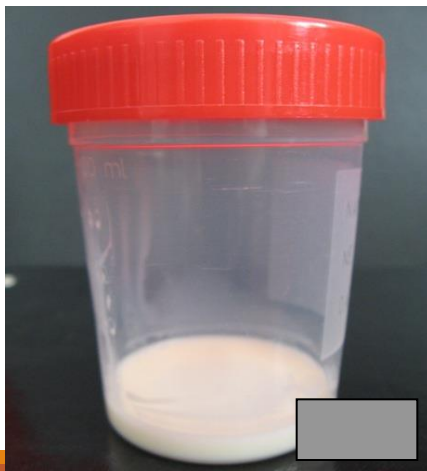
Przechowywanie nasienia ryb w warunkach *in vitro* - antybiotyki i białka w służbie plemnikom



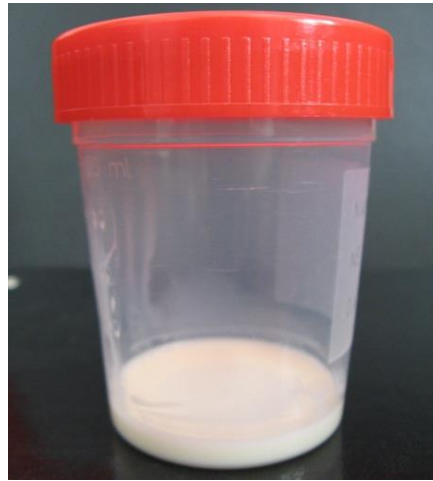
Przechowywanie nasienia ryb w warunkach *in vitro* - plemniki jesiotra – uniwersalna prawda o tlenie



Worki kontra kubki



Przechowywanie nasienia ryb w warunkach *in vitro* - przegląd sposobów konfekcjonowania



Przechowywanie nasienia ryb w warunkach *in vitro* - przyszłość metody



Zalety przechowywania nasienia w strzykawce:

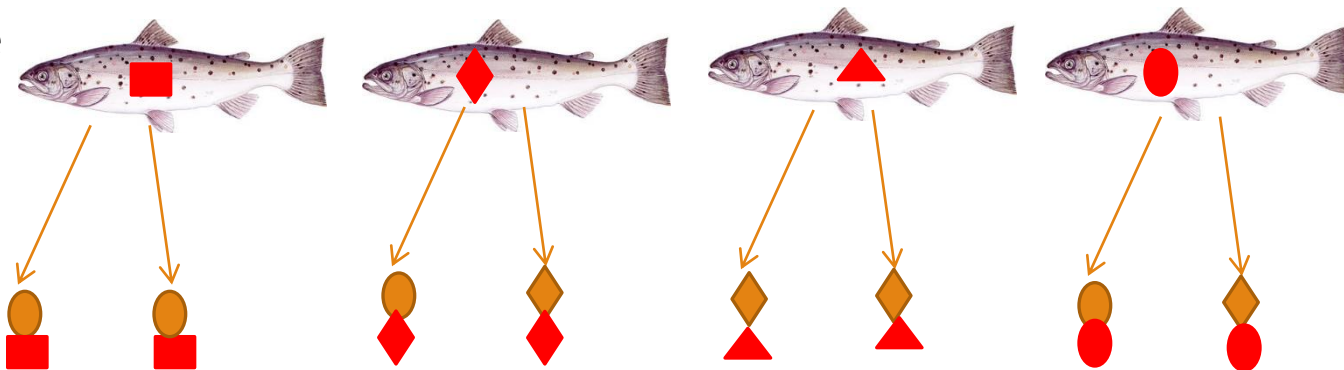
- znana objętość,
- możliwość obliczenia ilości niezbędnej do zapłodnienia określonej liczby ziaren ikry,
- prostota obsługi
- estetyczny wygląd

Naukowo wspierany dobór rozrodczy

Praktyka hodowlana



Samice



Ryzyko inbrodu, niska heterozygotyczność

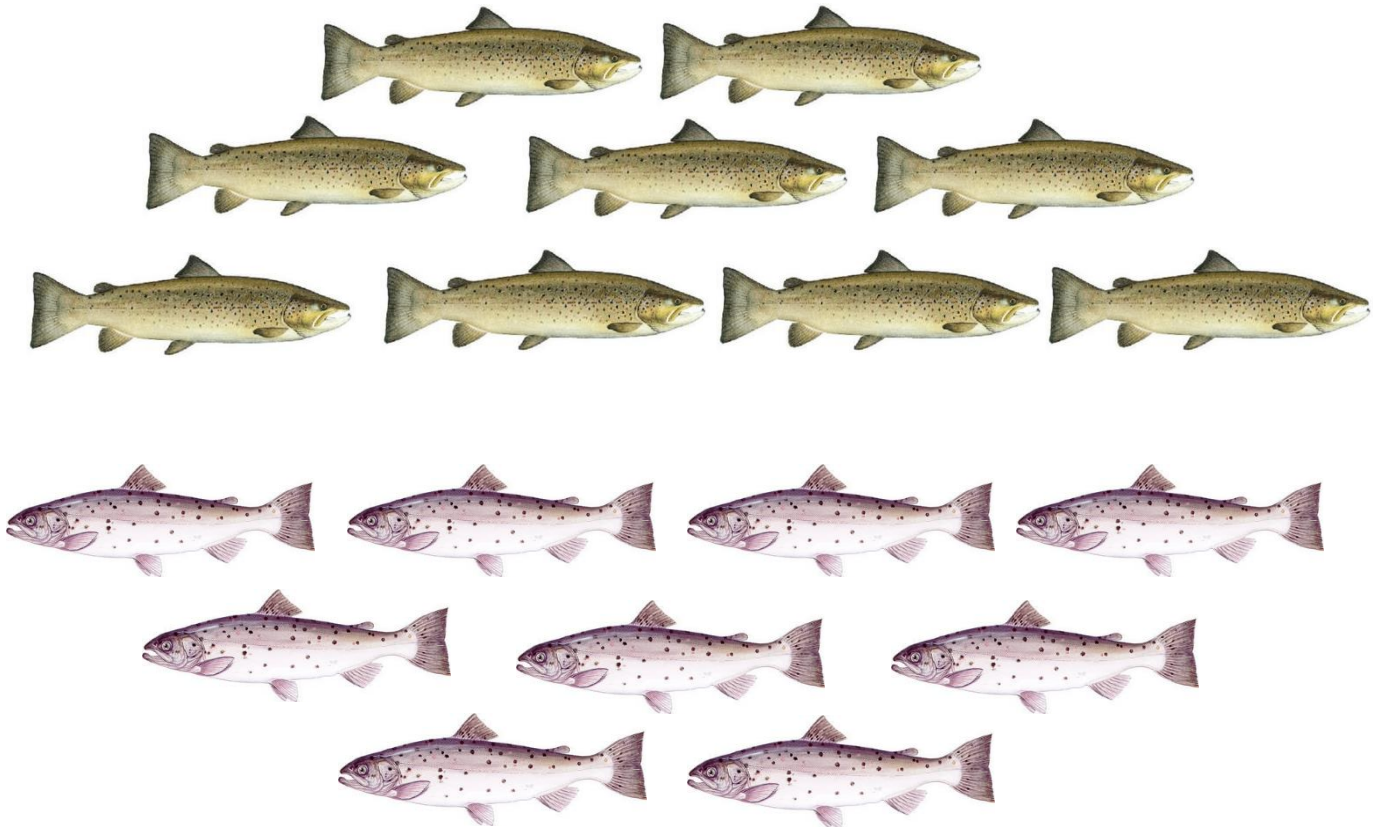
Naukowo wspierany dobór rozrodczy

Samce pierwsze na tarle
Wysoka śmiertelność przedtarłowa
Wysoka podatność na UDN



Kilka – kilkanaście samców stanowi
pulę genetyczną potomstwa
uzyskanego od kilkudziesięciu samic

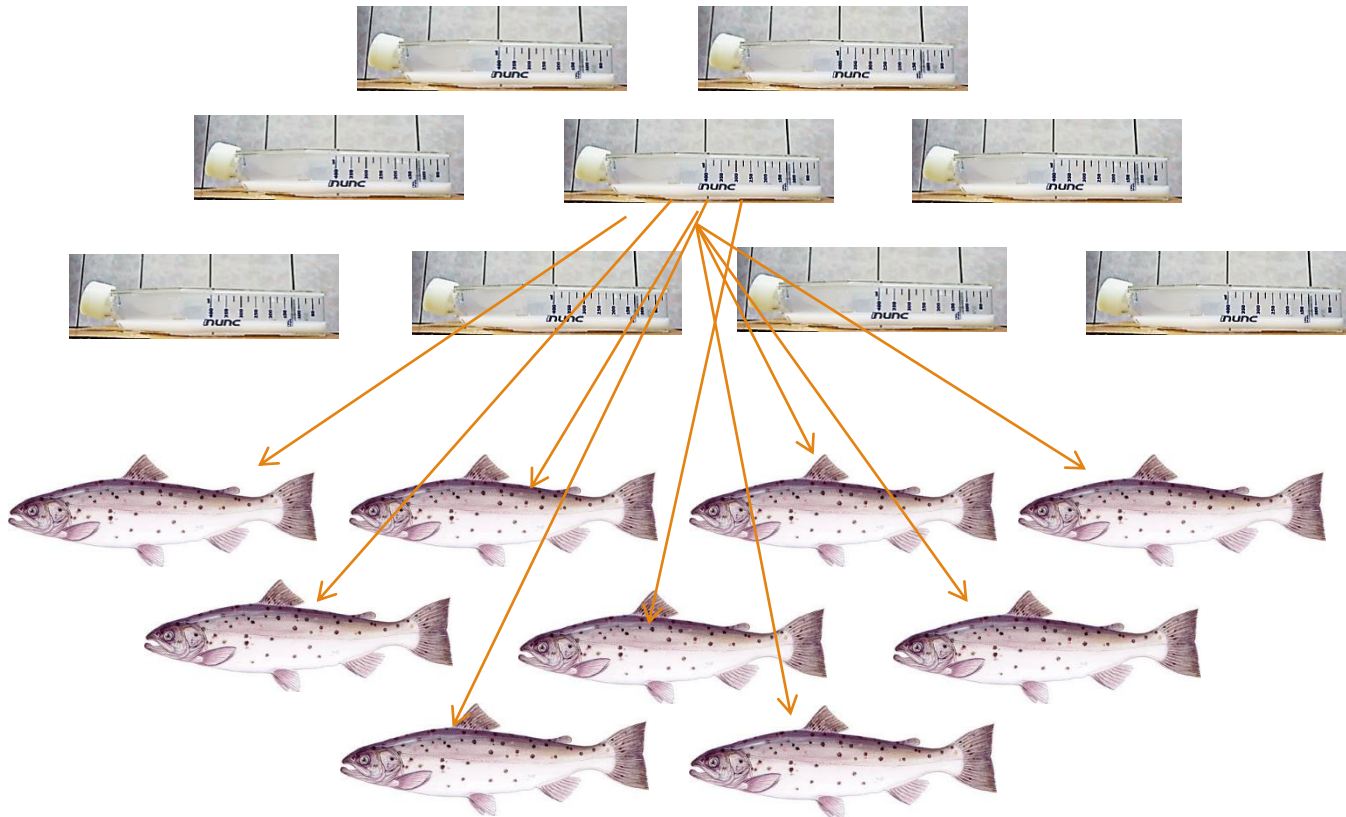
Naukowo wspierany dobór rozrodczy



Naukowo wspierany dobór rozrodczy



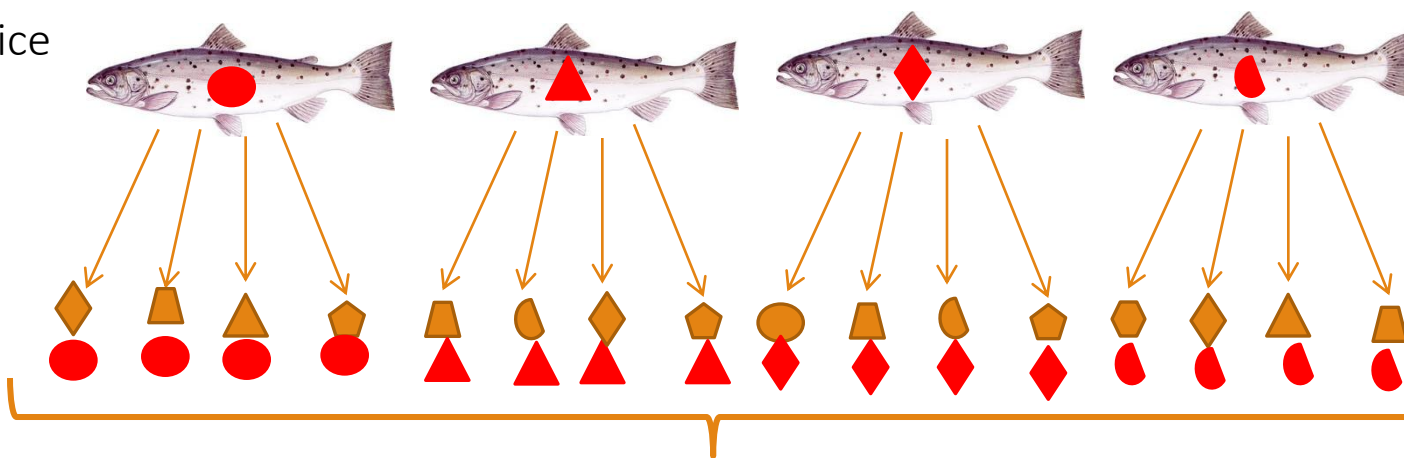
Naukowo wspierany dobór rozrodczy



Indywidualne próbki



Samice



Duży poziom heterozygotyczności

dr hab. inż. Radosław Kowalski
r.kowalski@pan.olsztyn.pl

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

Dziękuję za uwagę