



Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Morski i Rybacki



***Temat przewodni:***

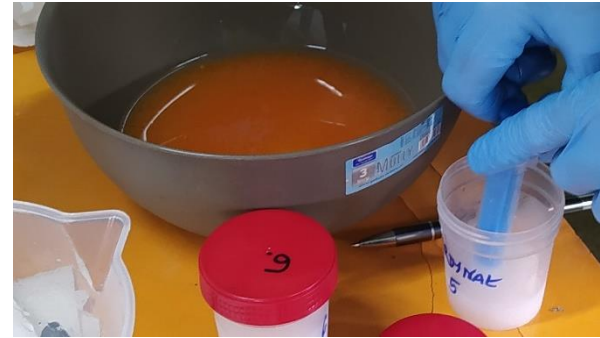
*Zalecenia oraz rozwiązania praktyczne w rozrodzie ryb:  
łososiowatych, karpowatych, okoniowatych oraz jesiotrowatych*

# **Zastosowanie wybranych narzędzi diagnostycznych w ocenie jakości nasienia ryb**

***mgr inż. Katarzyna Dryl***  
*k.dryl@pan.olsztyn.pl*

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

Jakość gamet



Efektywność  
zapłodnienia i wzrost  
form młodocianych



Sukces rozrodu i wzrost  
produkcji



## **Narzędzia diagnostyczne**

- Komputerowa analiza ruchu plemników CASA
- Cytometry
- Osmometr
- pH-metr

## **Ocena jakości nasienia**

- Ruchliwość plemników
- Parametry kinetyczne plemników
- Koncentracja plemników
- Stabilność błon komórkowych plemników
- Żywotność plemników
- Potencjał mitochondrialny
- Ciśnienie osmotyczne plazmy nasienia
- odczyn pH nasienia/plazmy

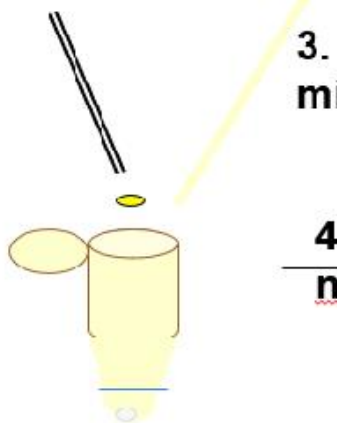
# Systemy do badania ruchliwości plemników i parametrów kinetycznych plemników

Metoda subiektywna – mikroskop świetlny



Aktywacja ruchu plemników

1. 0,1-1  $\mu$ l nasienia



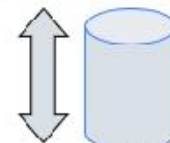
2. 25-500  $\mu$ l buforu aktywującego

3. mieszanie

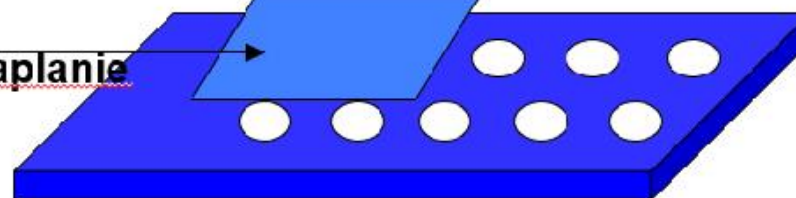
4. nakrapianie

7. analiza ruchliwości

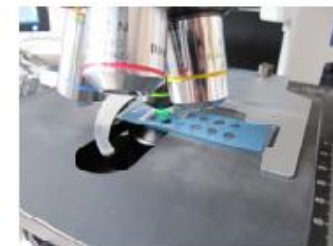
6. ostrość



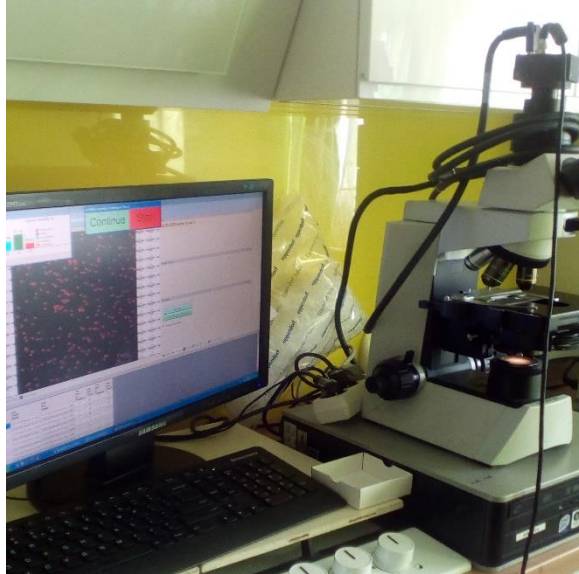
5. szkiełko nakrywkowe



Szkiełko podstawowe

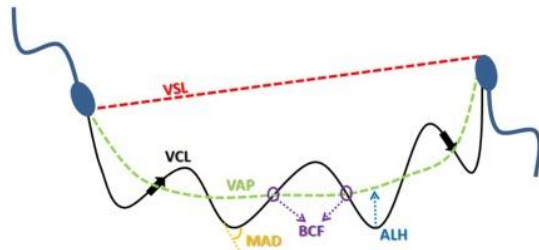
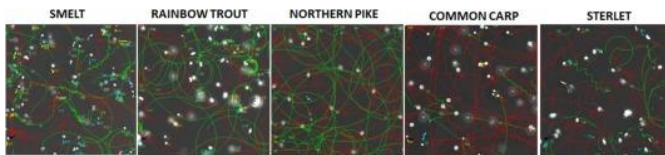


# Komputerowy system analizy ruchu plemników CASA

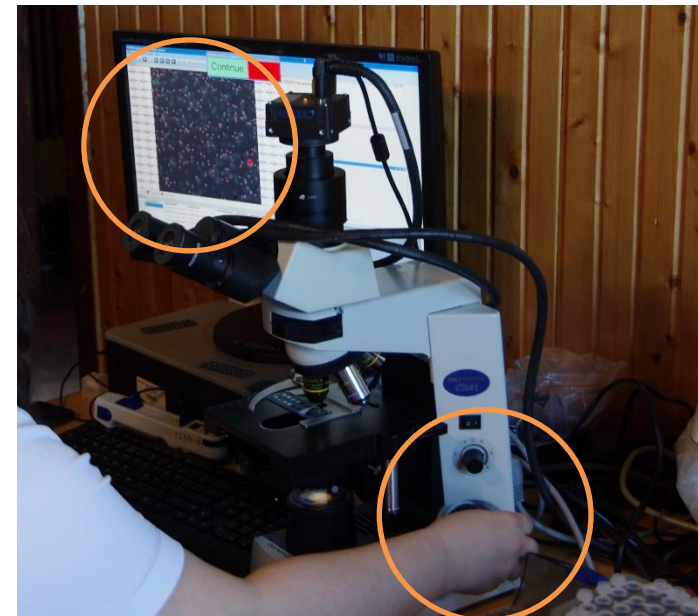
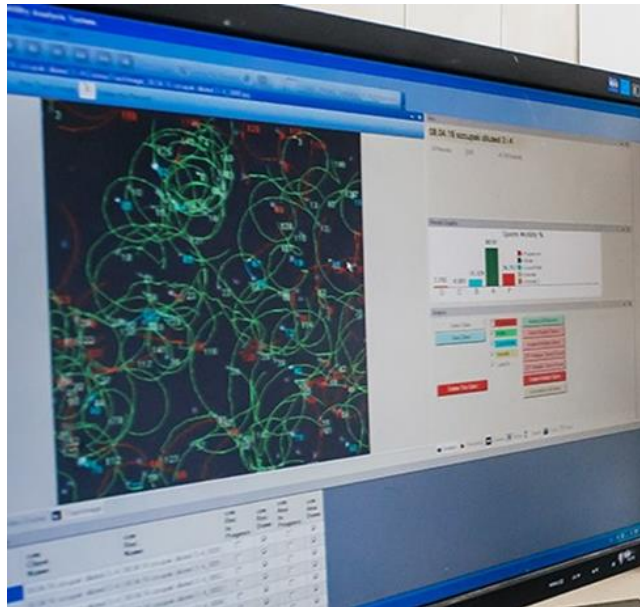
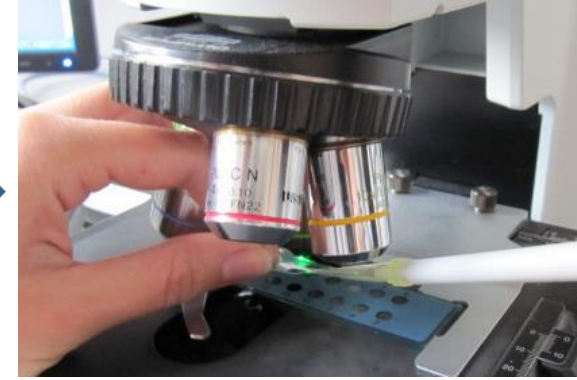


## Wybrane parametry:

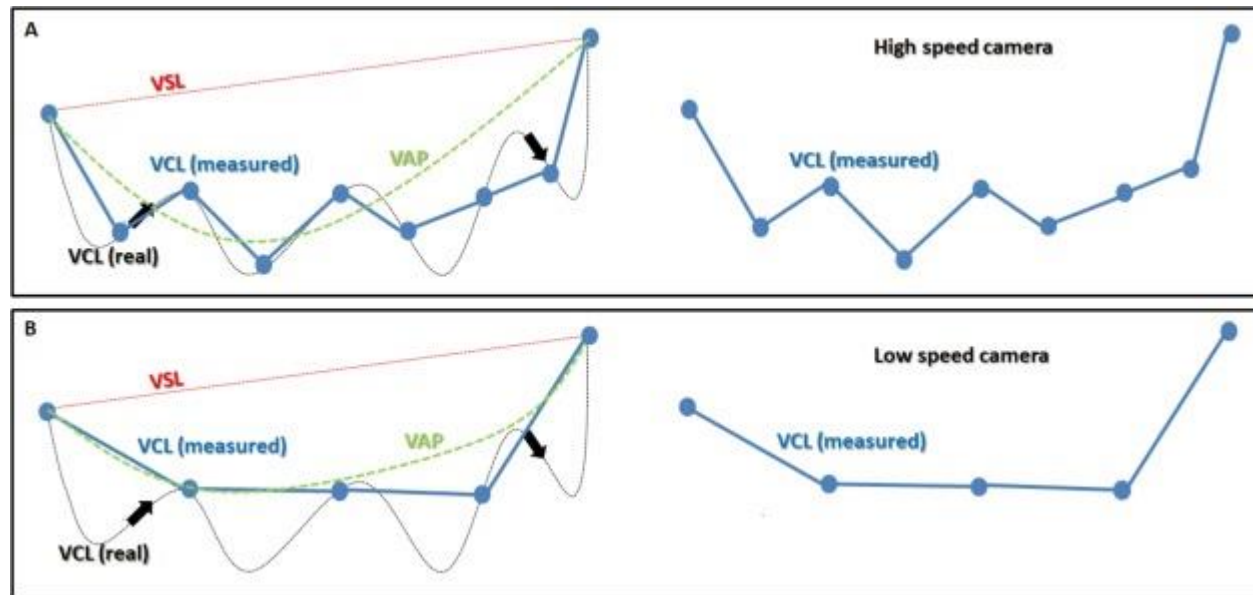
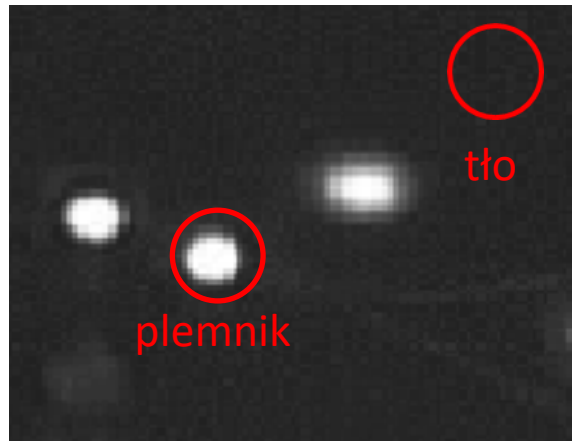
- MOT (%): odsetek plemników ruchliwych
- PRG (%): odsetek plemników o ruchu progresywnym
- VAP ( $\mu\text{m/s}$ ): średnia prędkość plemnika
- VCL ( $\mu\text{m/s}$ ): krzywoliniowa prędkość plemnika
- VSL ( $\mu\text{m/s}$ ): prostoliniowa prędkość plemnika
- ALH ( $\mu\text{m}$ ): amplituda bocznych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



# Komputerowy system analizy ruchu plemników CASA



## Komputerowy system analizy ruchu plemników CASA



- wskaźnik FPS (ilość klatek nagranych na sekundę) –wpływa na wynik analizy
- obiektywność i wysoka szczegółowość wyników
- wysoki koszt oprogramowania

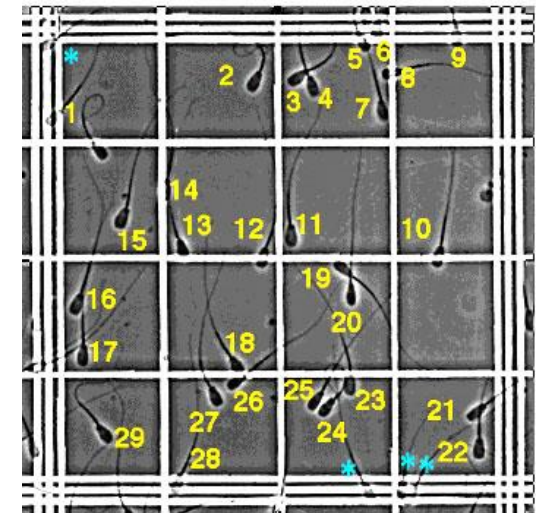
# Systemy cytometryczne

(cyto- komórka, -metr przyrząd do mierzenia)

Koncentracja plemników – cecha gatunkowa

**Metoda subiektywna** – komory hemocytometryczne

- tania
- czasochłonna
- brak możliwości precyzyjnego zliczania
- dokładne mieszanie – kluczowe





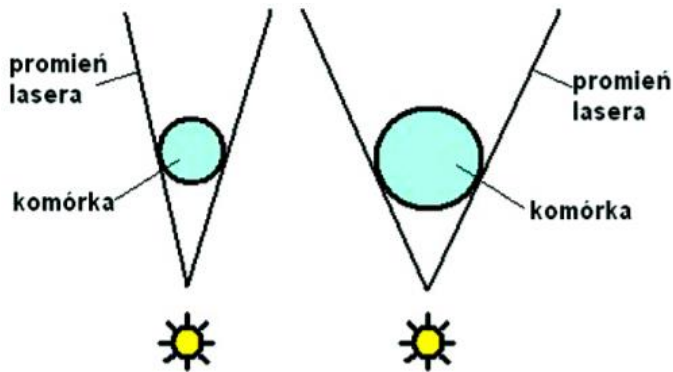
## Systemy cytometryczne

Metoda obiektywna – mariaż mikroskopu fluorescencyjnego ze spektrofotometrem UV – cytometr typu np. NucleoCounter

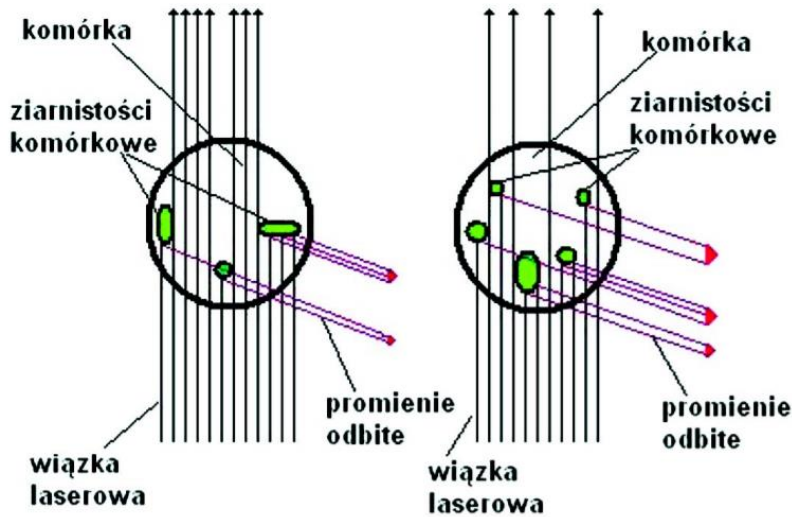


- precyzyjne i szybkie zliczanie
- obiektywny pomiar
- mobilność urządzenia
- wysoka cena kasetek, konieczność utylizowania

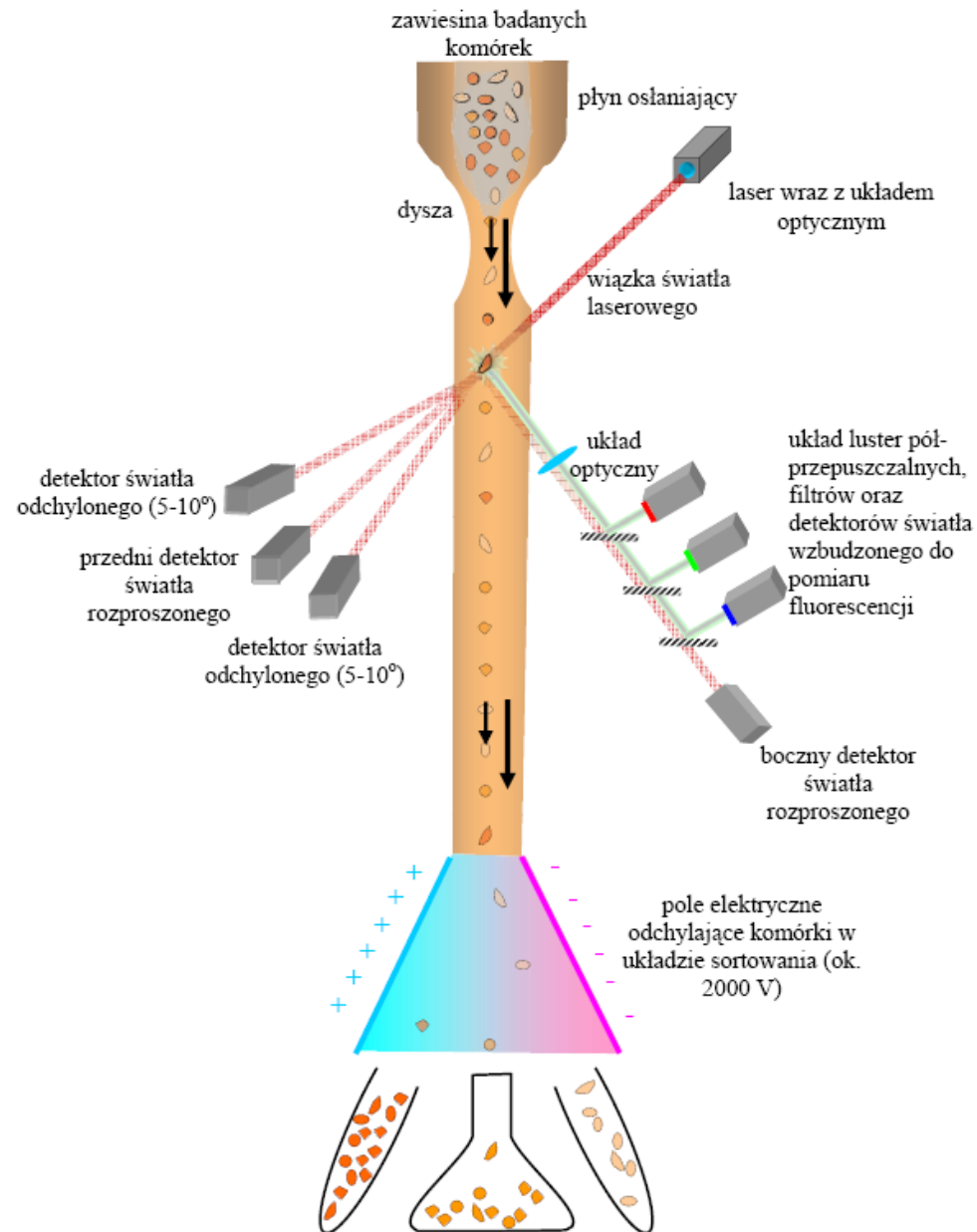
# Systemy cytometryczne – cytometr przepływowy



Schemat rozpraszania światła do przodu (Forward Scatter)



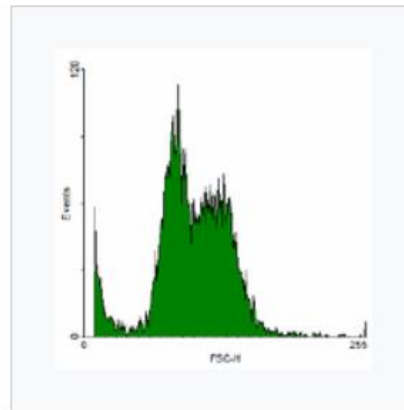
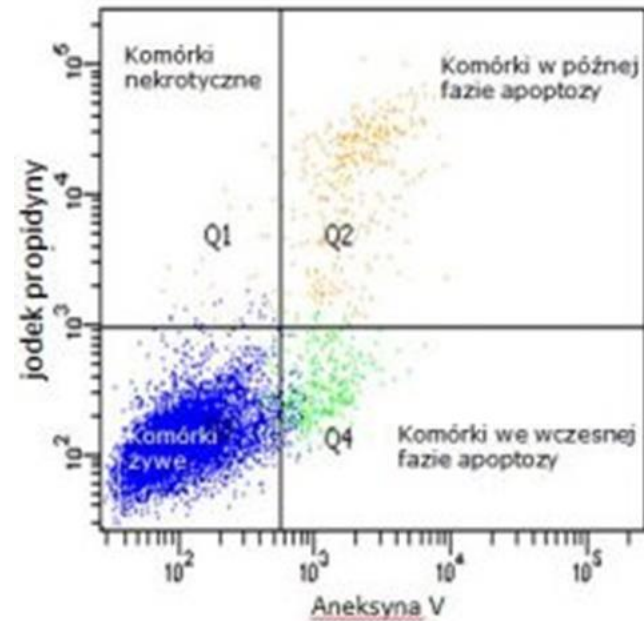
Schemat rozpraszania światła w bok (Side Scatter)



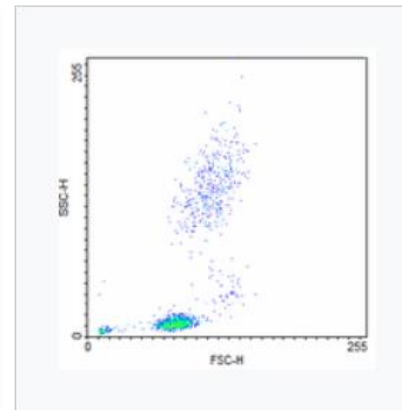
## Systemy cytometryczne

Cytometr przepływowy:

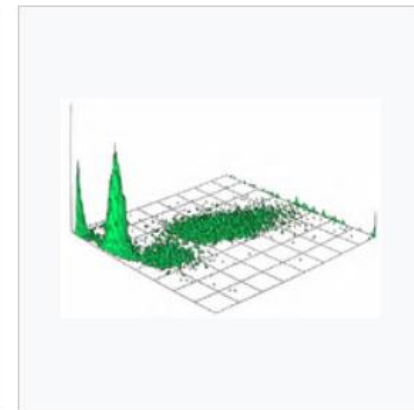
- Koncentracja
- Żywotność plemników
- Stabilność błon komórkowych



Histogram  
jednowymiarowy



Wykres rozproszenia

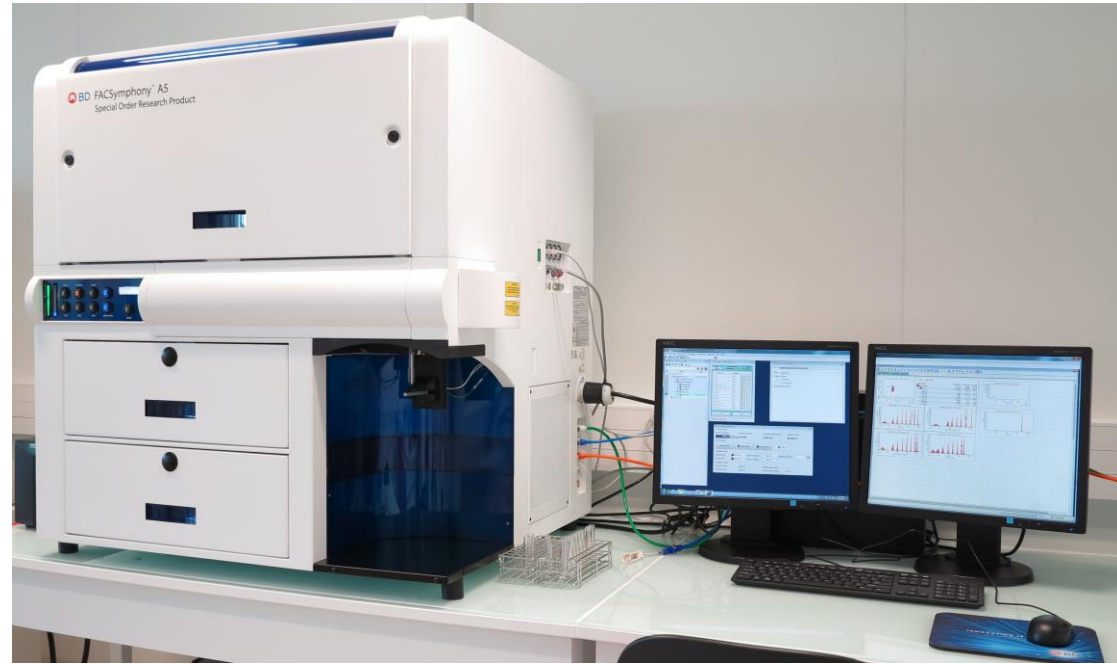


Histogram trójwymiarowy

## Systemy cytometryczne

### Cytometr przepływowy

- wymaga specjalistycznej wiedzy i doświadczenia



# pH-metr



szklana obudowa całego układu elektrod

elektroda wzorcowa – wykonana ze srebra i zanurzona w roztworze wzorcowym

membrana łącząca roztwór wzorcowy z roztworem, którego pH się mierzy

wewnętrzny roztwór wzorcowy

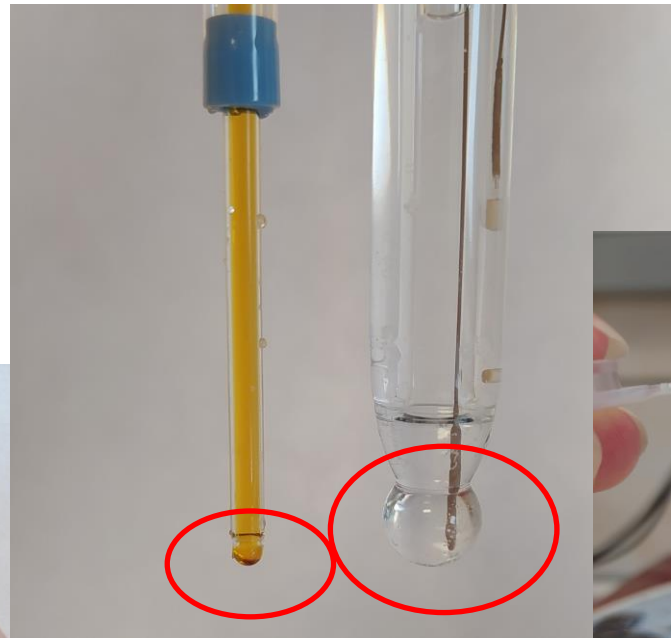
elektroda pomiarowa

roztwór wewnętrzny

bańka ze szkła



## pH-metr



### pHmetr **przenośny**

- mała średnica elektrody - pomiar próbek o małych objętościach, nawet  $20\mu\text{l}$
- zasilany bateriami/akumulatorami

### pHmetr **stacjonarny**

- duża średnica elektrody – wymagana objętość próbek 2ml
- wymaga podłączenia do prądu

## Osmometr

- niewielkie rozmiary

## Osmolalność plazmy

- wskazuje na potencjalne zanieczyszczenie nasienia moczem

## Użycie osmometru

- wymaga uprzedniego przygotowania próby, która polega na otrzymaniu plazmy nasienia (wirowanie 8000g)



## Podsumowanie

- Jakość nasienia – oddaje zdolność plemników do zapłodnienia
- Narzędzia diagnostyczne – ułatwiają ocenę potencjału biologicznego samców
- Większość narzędzi diagnostycznych – zastosowanie w laboratoriach
- Proste narzędzia dostępne komercyjnie – mikroskop, pHmetr, NucleoCounter







Unia Europejska  
Europejski Fundusz  
Morski i Rybacki



**Badania sfinansowano ze środków Unii Europejskiej z Funduszu Strukturalnego w ramach realizacji Programu Doradztwa Rybackiego „Pozyskiwanie, przechowywanie i zapładnianie gamet ryb” akronim ReProFish**  
**Program Operacyjny „Rybnactwo i Morze” na lata 2014-2020**  
**umowa o nr rej. OR14-6521.2-OR1400004/18**

***Dziękuję za uwagę***

***mgr inż. Katarzyna Dryl***  
***k.dryl@pan.olsztyn.pl***

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