



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



*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*

Przechowywanie nasienia ryb karpowatych



Wprowadzenie

Nasienie samców ryb traci swoją biologiczną wartość czyli zdolność plemników do ruchu oraz zapłodnienia w relatywnie krótkim czasie od pozyskania. Taki stan rzeczy wynika ze zmian warunków w jakich dotychczas znajdowały się plemniki w warunkach *in vivo* tj. w nasieniowodach. Zmiana temperatury otoczenia w jakiej plemniki przebywały doprowadza do wzrostu tempa metabolizmu, który wpływa m.in. na wystąpienie stresu oksydacyjnego wynikiem którego jest powstawanie wolnych rodników, reaktywnych form tlenu oraz azotu. Produkty uboczne tlenowego metabolizmu komórkowego modyfikują niekorzystnie związki białkowe odpowiedzialne m.in. za utrzymanie stabilności błon komórkowych plemników ograniczając tym samym ich właściwości fizyko-chemiczne. Konsekwencją takiego stanu rzeczy jest upośledzenie funkcji plemników, ich starzenie się oraz apoptoza. Niekorzystne zmiany do jakich dochodzi w nasieniu wraz z upływem czasu po jego pozyskaniu można w pewnych granicach niwelować stosując krótkookresowe przechowywanie w warunkach obniżonego metabolizmu. Zachowanie właściwej ruchliwości plemników, a więc tym samym ich zdolności do ruchu, w czasie dłuższym niż kilka godzin, wymaga spełnienia kilku kryteriów, które w warunkach kontrolowanych są możliwe do osiągnięcia.

Cel przechowywanie nasienia krótkookresowo

Brak synchronizacji rozrodu

Praktycznym celem stosowania techniki przechowywania nasienia krótkookresowo jest przede wszystkim spowolnienie procesów starzeniowych, które doprowadzają do degradacji białek plemników, a w konsekwencji utraty przez nie zdolności do ruchu oraz możliwości zapładniającej. Strategia taka może być pomocna przede wszystkim w sytuacji braku synchronizacji tarła samic i samców. W warunkach kontrolowanych brak spontanicznej synchronizacji rozrodu np. u samic i samców karpia zmusza do stosowania technik, które na wystąpienie tego aktu wpływają. Dlatego też powszechnie stosuje się stymulację termiczną lub/ oraz hormonalną umożliwiającą pozyskanie dojrzałych gamet ryb w dogodnym dla hodowcy terminie. Pozyskanie z kolei dojrzałej ikry oraz nasienia gwarantuje możliwość dalszej produkcji ryb na żądanym przez hodowcę poziomie. Niejednokrotnie pomimo stosowania preparatów wspomagających wystąpienie spermacji czy też owulacji nie daje to stu procentowej gwarancji na wystąpienie tej drugiej. W przypadku owulacji zdarza się, że przeciąga się ona w czasie od kilku do kilkunastu godzin. Z reguły nie ma natomiast kłopotów

z pozyskaniem nasienia od samców karpia, które z reguły są dojrzałe dużo wcześniej od samic. Dlatego w sytuacji kiedy okres ten różni się między samicami a samcami, nasienie można po pobraniu przechować i wykorzystać wówczas kiedy dostępna będzie ikra. Przechowywanie takie usprawnia prace hodowlane, gdyż umożliwia zgromadzenie niezbędnego nasienia od samców przed pobieraniem ikry. Taka praktyka może mieć niebagatelne znaczenie zwłaszcza w przypadku ryb, których ikra w krótkim czasie po pobraniu traci zdolność do zapłodnienia co obserwuje się przede wszystkim u ryb karpiowatych tj. jaź czy karp.

Poprawa jakości nasienia

Przechowywanie nasienia krótkookresowo daje także możliwość poprawy jakości pozyskanego nasienia. Dojrzałość samców jest cechą osobniczą i różni się między sobą. Zmienność ta rzutuje na skuteczność zapłodnienia, a co za tym idzie efektywność rozrodu. Wiadomym jest, że w warunkach kontrolowanych nasienie traci swoją biologiczną wartość w ciągu kilku godzin od pobrania. W związku z tym jego wykorzystanie w późniejszym czasie jest ryzykowne jeśli chodzi o zapłodnienie ikry. Co więcej podczas pozyskania nasienia za pomocą masażu powłok brzusznych dochodzi czasem do jego zanieczyszczenia moczem, który ze względu na swoje niskie ciśnienie osmotyczne aktywuje przedwcześnie plemniki, czego konsekwencją jest ich obniżona ruchliwość. Dlatego też każdorazowy pobór nasienia winien być poprzedzony osuszaniem powłok brzusznych za pomocą suchych ściereczek. Aby poprawić także jakość pozyskanego nasienia można zastosować technikę rozrzedzenia pozyskanych prób w odpowiednio przygotowanych wcześniej buforach do krótkookresowego przechowywania nasienia.

Ograniczenie manipulacji z tarlakami

Stosując w warunkach wylęgarni technikę krótkookresowego przechowywania nasienia ograniczyć można także stresującą i czasochłonną manipulację tarlakami, która często rzutuje na ich kondycję oraz zdrowotność. Co więcej, stosowanie do zapłodnienia ikry nasienia przechowywanego *in vitro* daje możliwość wyboru prób, które cechuje najlepsza jakość tj. ruchliwość oraz prędkość plemników. Kontrolę taką można przeprowadzić po pozyskaniu odpowiedniej ilości nasienia, przed jego wykorzystaniem do zapłodnienia.

Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo

Bufory i dodatki

Metoda przechowywania nasienia krótkookresowo polega na zmagazynowaniu (w odpowiednich pojemnikach) porcji pozyskanego wcześniej nasienia w warunkach *in vitro* to znaczy poza organizmem tarlaka. Aby nasienie przechować w sposób właściwy, zapewniając mu warunki zbliżone do panujących w nasieniowodach, wykorzystuje się do tego celu bufor o odpowiednim składzie oraz pH. U ryb karpiojących zaleca się stosowanie kilku buforów o różnych składach (Tabela 1).

Tabela 1. Składniki buforów stosowanych do przechowywania nasienia krótkookresowo u ryb karpiojących 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	75,0	4,38	100	5,84	94,0	5,4	110	6,42
KCl	70,0	5,22	3,1	0,23	27,0	2,0	40,0	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	-	-	25,0	2,10	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	0,3	0,05	-	-	-	-
Glicyna	-	-	-	-	50,0	3,7	-	-
Tris	20,0	2,43	-	-	15,0	1,8	20,0	2,42
pH	8,0		8,6		7,5		7,5	

Bufory do przechowywania nasienia krótkookresowo są gatunkowo specyficzne ze względu na różnice w składzie nasienia poszczególnych gatunków ryb. Co więcej w buforach takich plemniki pozostają nieruchliwe, a ich wzbogacenie o komponenty tj. białka, cukry czy antyoksydanty dostarczają plemnikom substancji odżywczych potrzebnych do ich prawidłowego funkcjonowania. Dotychczasowe badania wskazują, że w przypadku karpia najbardziej odpowiednim buforem do przechowywania nasienia jest bufor C.

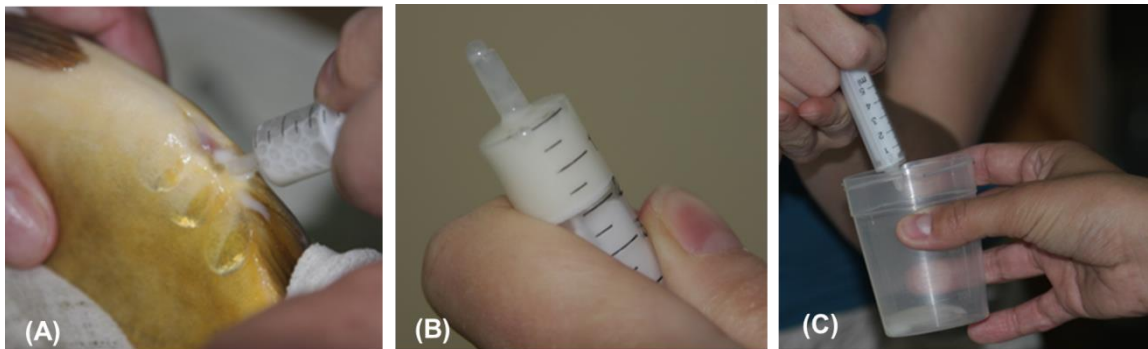
Temperatura

W celu stosowania metody krótkookresowego przechowywania nasienia uwzględniona musi być także właściwa temperatura otoczenia. W przypadku ryb łososiowatych nasienie przechowywać należy w temperaturze +4°C, podczas gdy dla ryb karpiojących temperatura

przechowywania może być nieco wyższa tj. $+8^{\circ}\text{C}$. Głównym komponentem błon komórkowych plemników są lipidy (tłuszcze), dlatego różnice między tolerancją na temperaturę otoczenia wynikają z odmiennego składu lipidowego błon komórkowych plemników u obu tych gatunków. U ryb łososiowatych w błonach komórkowych plemników dominują wielonienasycone kwasy tłuszczowe, podczas kiedy w błonach komórkowych plemników karpia jest ich zdecydowanie mniej. Wynika to stąd, że temperatura otoczenia w jakiej ryby przebywają ma wpływ na metabolizm i zmiany oksydacyjne do jakich dochodzi w strukturach plemników w czasie spermatogenezy. W wyższych temperaturach procesy oksydacji są silniejsze, stąd mniejszy udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (łatwo ulegają zmianom oksydacyjnym) w błonach komórkowych. Ich obecność w błonach komórkowych jest istotna, ze względu na zapewnienie płynności błony umożliwiając wydalanie metabolitów oraz absorpcję nutrientów czy tlenu. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe zapewniają zachowanie półprzepuszczalności nawet w niskich temperaturach w odróżnieniu od kwasów tłuszczowych nasyconych. Dlatego w przypadku ryb zimnolubnych takich jak pstrąg tęczowy, gdzie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest dużo, łatwiej jest zachować ich żywotność w niskiej temperaturze w warunkach *in vitro*. Zapewnienie przechowywanym próbom nasienia właściwej temperatury jest możliwe dzięki wykorzystaniu do tego celu lodówek bądź pojemników termicznych wyposażonych w chłodzące wkładki.

Stopień rozrzedzenia

Innym warunkiem jaki winien być spełniony podczas przechowywania nasienia krótkookresowo jest odpowiedni stopień rozrzedzenia nasienia. Rozrzedzone plemniki zdecydowanie lepiej znoszą warunki przechowywania aniżeli plemniki nierozrzedzone. Jest to spowodowane dwoma czynnikami: rozrzedzeniem szkodliwych metabolitów oddychania komórkowego oraz zapewnieniem plemnikom lepszego dostępu do tlenu niezbędnego dla podtrzymania ich bazowego metabolizmu. Z prowadzonych przez nas badań wynika, że najbardziej odpowiednim stosunkiem rozrzedzenia nasienia ryb karpiovatych jest 10-krotne rozrzedzenie (1 : 9), czyli jedna porcja nasienia tj. 1 ml i dziewięć porcji buforu tj. 9 ml. Zaproponowaną ilość można zwiększyć lub zmniejszyć, zachowując 10-cio krotny stosunek rozrzedzenia, w zależności od potrzeb hodowcy.



Fot. 1. Pobór nasienia karpia do strzykawki (A,B) oraz jego rozrzedzenie w moczwówce (C).

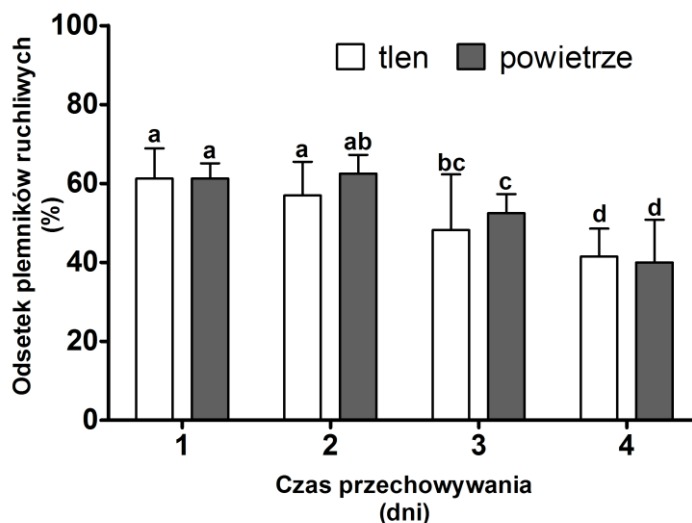
Dziesięciokrotne rozrzedzenie nasienia zapewnia właściwe zagęszczenie plemników (umożliwiający im prawidłową wymianę gazową) oraz ogranicza negatywny wpływ kumulowania się produktów przemiany materii i może być zastosowane dla ryb karpiowatych. Po pozyskaniu zatem nasienia należy odmierzyć jego ilość po czym rozrzedzić je w buforze do przechowywania w odpowiednim stosunku (Fot. 1A-C).

Cienka warstwa

Przechowując nasienie krótkookresowo należy także unikać efektu przyduszania plemników, dlatego najlepiej zdeponować nasienie w pojemnikach zapewniających utrzymanie cienkiej warstwy nieprzekraczającej 0,5 cm oraz możliwie jak największej objętości. Im większy stosunek średnicy pojemnika, w którym przechowywano nasienie, do jego głębokości, tym lepsze wyniki przechowywania.

Tlen

Warto pamiętać, że do przechowywania nasienia ryb karpiowatych nie wymagane jest stosowanie atmosfery czystego tlenu. Obserwacje nasze wskazują, że środowisko tlenu nie jest niezbędne dla utrzymania metabolizmu plemników na właściwym poziomie. W czasie 4 dni przechowywania nasienia w atmosferze tlenu nie stwierdziliśmy różnic w ruchliwości plemników przechowywanych z i bez tlenu (Rys. 1).

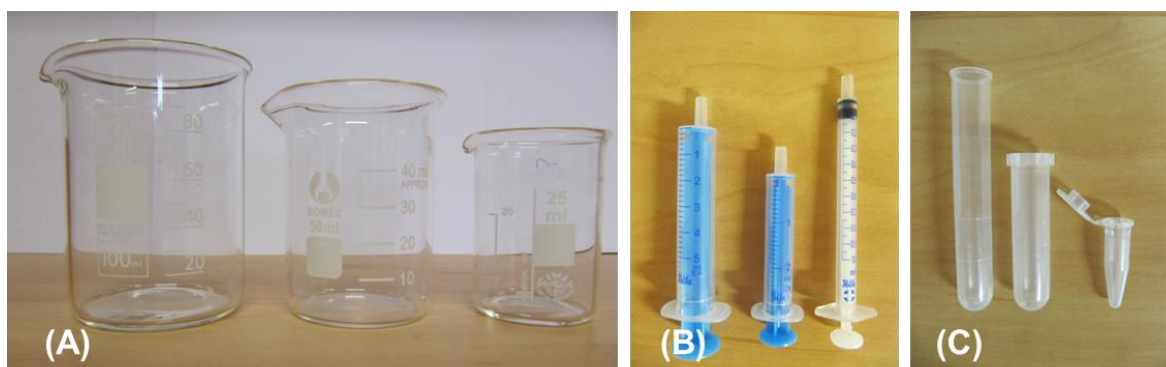


Rys 1. Odsetek plemników ruchliwych w nasieniu karpia przechowywanym w czasie 4 dni w atmosferze czystego tlenu oraz powietrza. Różne indeksy literowe wskazują na różnice istotne statystycznie między wariantami oraz czasem przechowywania ($P < 0.05$).

Techniki krótkookresowego przechowywania nasienia

Pojemniki

W celu pozyskania nasienia karpia zastosować można zlewki, strzykawki oraz próbówki o różnej objętości (Fot. 2A-C). W celu dalszego przechowywania nasienia ryb lepiej wykorzystać pojemniki zabezpieczone korkami tj. moczówki lub butelki (Fot. 3A,B). Umożliwia to transport nasienia z miejsca poboru do miejsca gdzie ma być przeprowadzone zapłodnienie bez ryzyka utraty (wylania) pozyskanych prób.



Fot. 2. Zlewki (A), strzykawki (B) oraz próbówki (C) o różnej objętości wykorzystywane do pozyskania nasienia ryb karpiozawodnych w warunkach kontrolowanych.

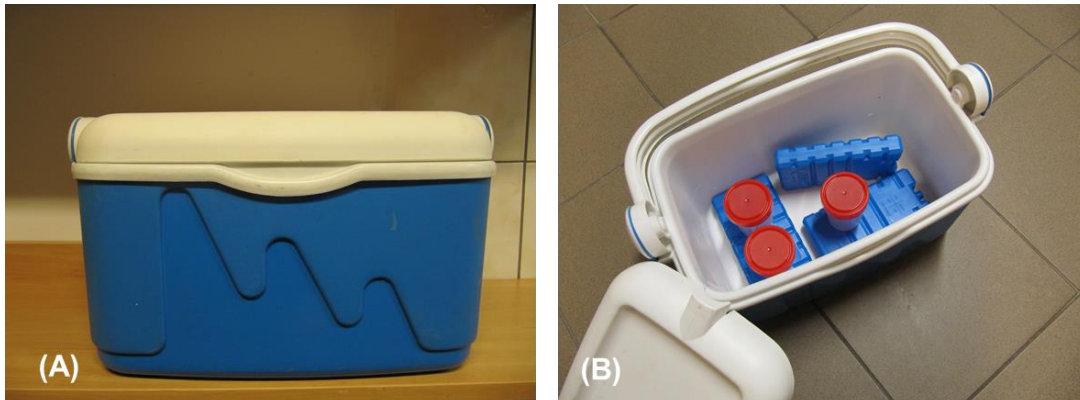
Z naszych badań wynika także, że do przechowywania nasienia karpia doskonale nadają się pojemniki do hodowli komórkowych. Pojemniki do hodowli komórkowych wyposażone są w korki wentylacyjne umożliwiające wymianę gazową z otoczeniem, a dzięki swojej konstrukcji, umieszczone w nich nasienie można także przechowywać z zachowaniem cienkiej warstwy co zapobiega przyduszeniu się plemników (Fot. 3C). Ponadto, w celu ograniczenia negatywnego wpływu sedymentacji plemników oraz zapewnienia wszystkim plemnikom dostępu do tlenu, należy rozrzedzone nasienie mieszać dwa razy dziennie.



Fot. 3. Butelki (A), moczówka (B) oraz pojemniki do hodowli komórkowej (C) wykorzystywane do przechowywania nasienia ryb karpiowatych w warunkach kontrolowanych.

Transport

Przechowywanemu nasieniu należy również zapewnić (do czasu jego wykorzystania w zapłodnieniu) warunki obniżonego metabolizmu ($+4^{\circ}\text{C}$), a więc trzymać je w warunkach chłodniczych (lodówka, chłodnia). Dzięki temu dynamika procesów degradacyjnych, zachodzących w nasieniu w wyniku starzenia się plemników, zostanie spowolniona. Zdeponowane w taki sposób nasienie można transportować na większe odległości wykorzystując do tego celu pojemnik termiczny wypełniony lodem bądź wyposażony w tzw. wkładki chłodzące (Fot. 4A,B). Tak zabezpieczone nasienie można pozostawić w dowolnie wybranym miejscu do czasu jego wykorzystania.



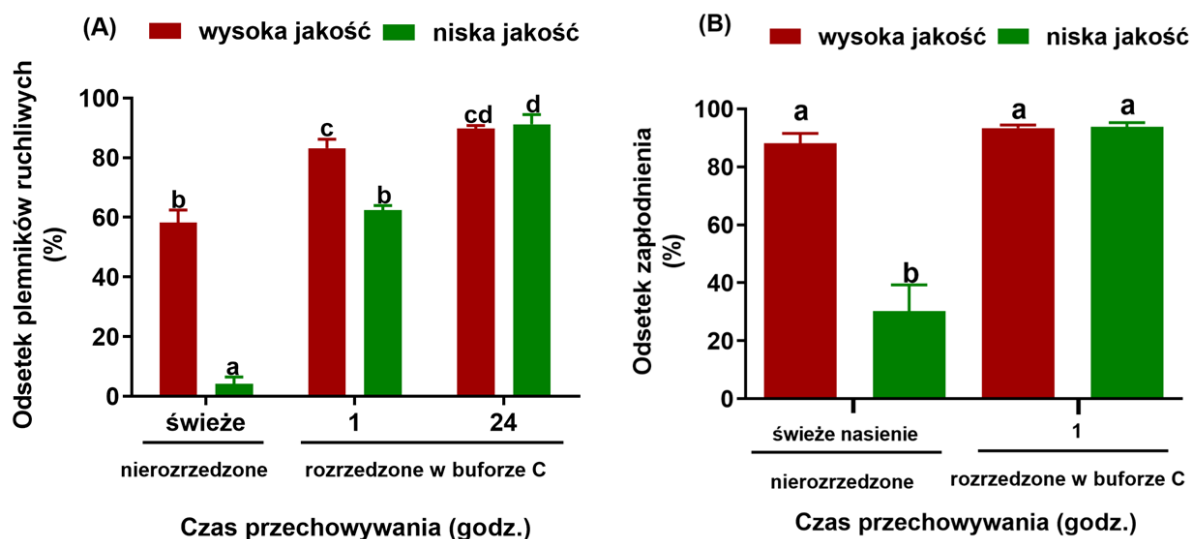
Fot. 4. Pojemnik termiczny (A) wyposażony w chłodzące wkładki (B) jako zestaw wykorzystywany do transportu nasienia przechowywanego krótkookresowo np. w moczówkach.

Skuteczność przechowywania nasienia krótkookresowo

Podczas rozrodu karpia w warunkach kontrolowanych ikra lub nasienie pozyskane od poszczególnych osobników może różnić się jakością, co rzutuje na efektywność zapłodnienia. Taki stan rzeczy może wynikać ze zmienności indywidualnej w osiągnięciu przez tarlaki dojrzałości płciowej. W przypadku samców, różnice te mogą być także spowodowane zanieczyszczeniem nasienia (najczęściej mocz) podczas tradycyjnej metody jego pobierania (masaż partii brzusznych). Wykorzystanie nasienia o złej jakości, a więc słabej ruchliwości, nie gwarantuje sukcesu w zapłodnieniu. Kontrola ruchliwości pozyskanego od samców karpia nasienia nie jest także praktyką szeroko stosowaną w wylęgarnictwie, co tym bardziej zwiększa ryzyko wykorzystania do zapłodnienia nasienia o obniżonej jakości.

W ostatnio prowadzonych przez nas badaniach od samców karpia pozyskano nasienie, którego ruchliwość kształtowała się na poziomie od 5-10% i 55-65%. W związku z tym próby nasienia podzielono na dwie grupy; próby o wysokiej jakości (ruchliwość na poziomie 55-65%, $n = 4$) oraz próby o niskiej jakości (ruchliwość na poziomie 5-10%, $n = 4$). Następnie, nasienie z obu grup rozrzedzono w buforze C (2 mM CaCl_2 , 1m M Mg_2SO_4 , 20 mM Tris, 110 mM NaCl, 40 mM KCl (pH 7.5 and 310 mOsm kg^{-1}) i poddano kontroli na ruchliwość plemników po upływie 1 oraz 24 godzinach. Grupę kontrolną stanowiło nasienie nierozrzedzone (świeże). Stwierdzono, że już po 1 godz. przechowywania nasienia w buforze C ruchliwość plemników w nasieniu niskiej jakości istotnie wzrosła do 60% w porównaniu do ruchliwości plemników w tych samych próbach których nie rozrzedzono w buforze C (świeże

– 5%). Również ruchliwość plemników w nasieniu wysokiej jakości wzrosła z 60% do 80% (Rys. 2A).



Rys. 2. 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 ($P < 0,05$).

Dłuższe przechowywanie prób tj. w czasie 24 godzin w buforze C nie doprowadziło do obniżenia ruchliwości plemników, co daje możliwość wykorzystania nasienia na drugi dzień jeśli zajdzie taka potrzeba. Stwierdzono także, że nasienie przechowywane krótkookresowo w buforze C można wykorzystać do zapłodnienia ikry, zwłaszcza w odniesieniu do prób, które cechowała obniżona jakość (Rys. 2B).

Podsumowanie

Skuteczność przechowywania nasienia ryb karpiovatych uzależniona jest od wielu czynników. Najważniejszy jest właściwy sposób pozyskania materiału biologicznego, jego wstępna ocena i wybór prób które cechuje najlepsza jakość. Niezwykle istotny jest również czas przechowywania, który winien być zoptymalizowany do możliwości zastosowanej metody i warunków przechowywania. Ze względu na znaczne różnice osobnicze, nasienie przechowywane w rozrzedzonych próbach należy monitorować pod względem jego



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



ruchliwości. Nasienie charakteryzujące się ruchliwością poniżej 30% nie zapewnia już zadowalających efektów zapłodnienia i uznawać należy takie próby za nienadające się do celów produkcyjnych.