



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 łososiowatych**



## **Wprowadzenie**

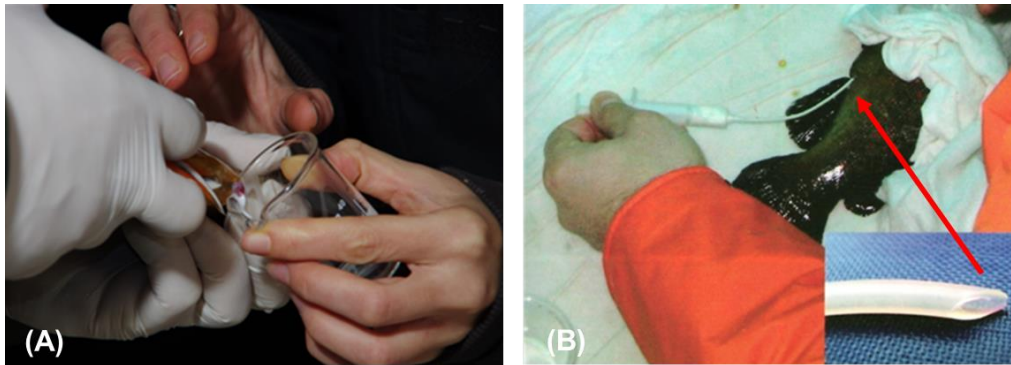
Nasienie samców ryb traci swoją biologiczną wartość czyli zdolność plemników do ruchu oraz zapłodnienia w relatywnie krótkim czasie od pozyskania. Taki stan rzeczy wynika ze zmian warunków w jakich dotychczas znajdowały się plemniki w warunkach *in vivo* tj. w nasieniowodach. Zmiana temperatury otoczenia 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. Zachowanie właściwej ruchliwości plemników, a więc tym samym ich zdolność do ruchu, w czasie dłuższym niż kilka godzin wymaga spełnienia kilku kryteriów, które w warunkach kontrolowanych są możliwe do osiągnięcia.

## **Cel przechowywanie nasienia krótkookresowo**

### Poprawa jakości nasienia

Przechowywanie nasienia krótkookresowo daje 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 (Fot. 1A) 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. U ryb łososiowatych w celu pozyskania nasienia można także zastosować kateter, minimalizując przy tym skutki zanieczyszczenia (Fot. 1B). W sytuacji wycierania znacznych ilości ryb lub braku możliwości zastosowania katetera (osobniki o niewielkich rozmiarach

ciała) można pozyskane nasienie rozrzedzić bezpośrednio po pobraniu w buforach do krótkookresowego przechowywania nasienia.



Fot. 1. Techniki pozyskiwania nasienia u ryb lososiowatych: A - masaż powłok brzusznych; B - kateter.

#### Ograniczenie manipulacji z tarlakami

Stosując w warunkach wylęgarni technikę przechowywania nasienia krótkookresowo ograniczyć można stresującą i czasochłonną manipulację z 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. Przed wykorzystaniem nasienia do zapłodnienia można bowiem jego jakość sprawdzić przy użyciu mikroskopu świetlnego lub jednosoczewkowego mikroskopu - Tenga Mens Loup. Wykorzystanie do analizy jakości przechowywanych prób nasienia dostępnych i tanich metod diagnostycznych poprawia efektywność rozrodu i wpływa na cały proces produkcji. Przechowywanie nasienia krótkookresowo pozwala także na krzyżowanie osobników odległych od siebie genetycznie w celu uzyskania efektu heterozji. Pozwala także na odnowienie puli genowej przez wymianę materiału genetycznego między hodowcami.

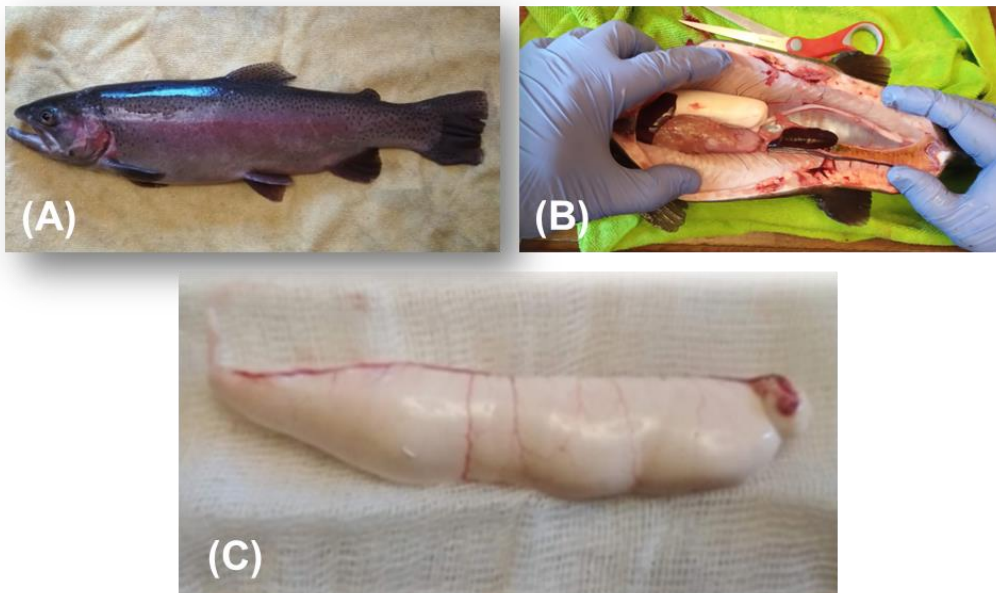
#### Restytucja zagrożonych populacji

Możliwość efektywnego przechowywania nasienia może także być doskonałym narzędziem wykorzystywanym w restytucji zagrożonych dzikich populacji ryb. Technika ta pozwala zgromadzić nasienie od wielu samców jeszcze przed akcją tarłową oraz wykorzystywać całą zdeponowaną pulę genetyczną (zmieszane nasienie wszystkich samców) do zapładniania kolejnych partii ikry. Zabiegi takie chronią populacje przed wystąpieniem

inbredu, który znacznie obniża jakość biologiczną podchowyanego materiału. Postępowanie takie w efekcie sprzyja zachowaniu zmienności genetycznej rozradzanych ryb.

### Zarządzanie stadem tarłowym

Przechowywanie nasienia może także w znaczący sposób ułatwić zarządzanie stadem maskulinizowanych samic ryb łososiowatych. Ryby takie tj. fenotypowe samce najczęściej nie posiadają nasieniowodów, dlatego aby pobrać nasienie, konieczne jest ich zabicie i wycięcie gonad (Fot. 2A-C). Przed uśmierceniem ryby trudno jest oszacować wielkość gonady i najczęściej w czasie takiego chirurgicznego zabiegu pozyskuje się nasienie w nadmiarze. Możliwość jego przechowania, pozwala na bardziej ekonomiczne wykorzystanie stad tarłowych, gdyż pozwala na powtórne użycie tej samej porcji nasienia w kolejnym tarle.



Fot. 2. Maskulinizowana samica pstrąga tęczowego (A), jej topografia narządów wewnętrznych (B) oraz gonada przygotowana do pozyskania nasienia (C)

### **Warunki przechowywania nasienia krótkookresowo**

#### Bufory i dodatki

Przechowywanie nasienia ryb w warunkach obniżonego metabolizmu jest metodą znaną i wykorzystywaną w akwakulturze w celu stosowania zapłodnienia ikry w warunkach kontrolowanych. Metoda ta 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 bufony o odpowiednim składzie oraz pH (Tabela 1). Bufory takie są gatunkowo specyficzne ze względu na różnice w składzie nasienia poszczególnych gatunków ryb. Co więcej w buforach takich plemniki pozostają nieruchliwe, a wchodzące w ich skład komponenty tj. białka, cukry czy antyoksydanty dostarczają plemnikom substancji odżywczych potrzebnych do ich prawidłowego funkcjonowania. Dodatek innych związków tj. kofeina, alginian sodu i antybiotyków pozwala z kolei na wydłużenie czasu przechowywanych prób. Ponadto dowiedziono, że dodatek alginianu sodu może stanowić skuteczny środek zapobiegający sedymentacji plemników oraz utraty przez nie zdolności do ruchu.

*Tabela 1. Składniki buforów stosowanych do przechowywania nasienia krótkookresowo u ryb łososiowatych w warunkach obniżonego metabolizmu.*

Składniki	Bufory do przechowywania					
	Bufor A		Bufor B		Bufor C	
	mM	g/l	mM	g/l	mM	g/l
NaCl	94,0	5,52	40,2	2,35	130,0	7,60
KCl	27,0	2,00	120,7	9,00	40,0	2,98
CaCl <sub>2</sub>	14,0	1,60	2,6	0,29	3,3	0,37
MgCl <sub>2</sub>	3,0	0,30	-	-	3,3	0,31
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	59,5	5,00*	2,5	0,21
Tris	20,0	2,42	-	-	-	-
Glicyna	-	3,75	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	4,3	0,51	-	-
MgSO <sub>4</sub>	-	-	1,2	0,29	-	-
Glukoza	-	-	27,8	5,00*	-	-
<b>pH</b>	<b>8,20</b>		<b>nie podano</b>		<b>8,50 - 9,90</b>	

\* 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.

Z danych literaturowych wynika, że w celu przechowywania nasienia ryb łososiowatych krótkookresowo stosuje się także bufony z dodatkiem krioprotektorów wykorzystywanych głównie do kriokonserwacji nasienia tych ryb. Krioprotektory zabezpieczają błony komórkowe plemników przed negatywnym wpływem szybkiego tempa schładzania ich środowiska zewnątrz oraz wewnątrzkomórkowego, a spośród wykorzystywanych do przechowywania nasienia wyróżnia się krioprotektory przenikające (np. glicerol, metanol, DMSO-dimetylosulfotlenek, DMA-dimetyloacetamid) oraz nieprzenikające (np. cukry tj.



glukoza, sacharoza, trehaloza). W celu przechowywania nasienia krótkookresowo często stosuje się bufory zawierające w swoim składzie zarówno krioprotektor przenikający np. DMSO oraz nieprzenikający np. glukozę w odpowiednim stężeniu oraz proporcji względem siebie.

### Temperatura

W celu stosowania metody krótkookresowego przechowywania nasienia uwzględniona musi być także właściwa temperatura otoczenia. W przypadku pstrąga tęczowego nasienie przechowywać należy w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$ , podczas gdy dla karpia temperatura przechowywania winna 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 (Labbe i Massie 1996), podczas kiedy w błonach komórkowych plemników karpia jest ich zdecydowanie mniej (Wiegand 1986). Temperatura otoczenia w jakiej ryby przebywają ma wpływ na metabolizm i zmiany oksydacyjne do jakich dochodzi w strukturach plemników w czasie przechowywania. Dlatego w przypadku ryb zimnolubnych tj. pstrąg tęczowy, gdzie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest więcej, łatwiej jest chronić plemniki przed zmianami do jakich dochodzi w środowisku *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 jest 10-krotne rozrzedzenie (1 : 9) czyli jedna porcja nasienia i dziewięć porcji buforu. Takie rozrzedzenie zapewnia właściwe zagęszczenie plemników (umożliwiające im prawidłową wymianę gazową) oraz ogranicza

negatywny wpływ kumulowania się produktów przemiany materii i może być zastosowane zarówno dla pstrąga tęczowego oraz karpia. W przypadku przechowywania nasienia gonadalnego (pozyskanego z jąder) np. od neosamców stopień rozrzedzenia należy zwiększyć do 30-krotnego rozrzedzenia. Schemat postępowania podczas rozrzedzenia nasienia nasieniowodowego oraz gonadalnego u ryb łososiowatych przedstawiono na Rys. 1.

#### 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. Najskuteczniejszym z kolei sposobem przechowywania rozrzedzonego nasienia neosamców pstrąga tęczowego jest jego umieszczenie w pojemnikach o średnicy co najmniej 3 cm i nie przekraczanie głębokości 0,5 cm przy jego wypełnianiu.

#### Tlen

Warto pamiętać, że do przechowywania nasienia ryb łososiowatych nie wymagane jest stosowanie atmosfery czystego tlenu. Obserwacje nasze wskazują, że środowisko tlenu nie jest niezbędne dla utrzymania metabolizmu plemników na właściwym poziomie.



Rys. 1. Schemat postępowania podczas rozrzedzenia nasienia nasieniowodowego oraz gonadalnego u ryb łososiowatych.

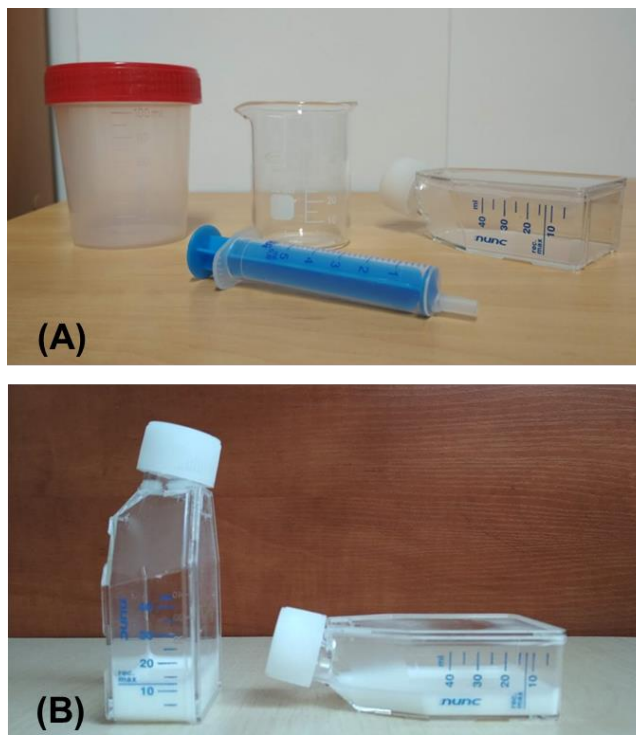
### Techniki przechowywania nasienia krótkookresowo

#### Pojemniki

Sposobów przechowywania nasienia krótkookresowo jest bardzo wiele i można do tego celu wykorzystać probówki, strzykawki, zlewki oraz woreczki. W takich warunkach objętość przechowywanego materiału jest jednak ograniczona, a brak odpowiedniego zabezpieczenia sprawia, że transport przechowywanych prób może być ryzykowny. Dlatego do przechowywania nasienia krótkookresowo lepiej wykorzystać pojemniki zabezpieczone korkami tj. butelki (Fot. 3A) czy moczówki. Z naszych ostatnich badań wynika także, że do przechowywania nasienia ryb, w tym ryb łososiowatych, doskonale nadają się pojemniki do hodowli komórkowych (Fot. 3B). Wyposażone są one 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



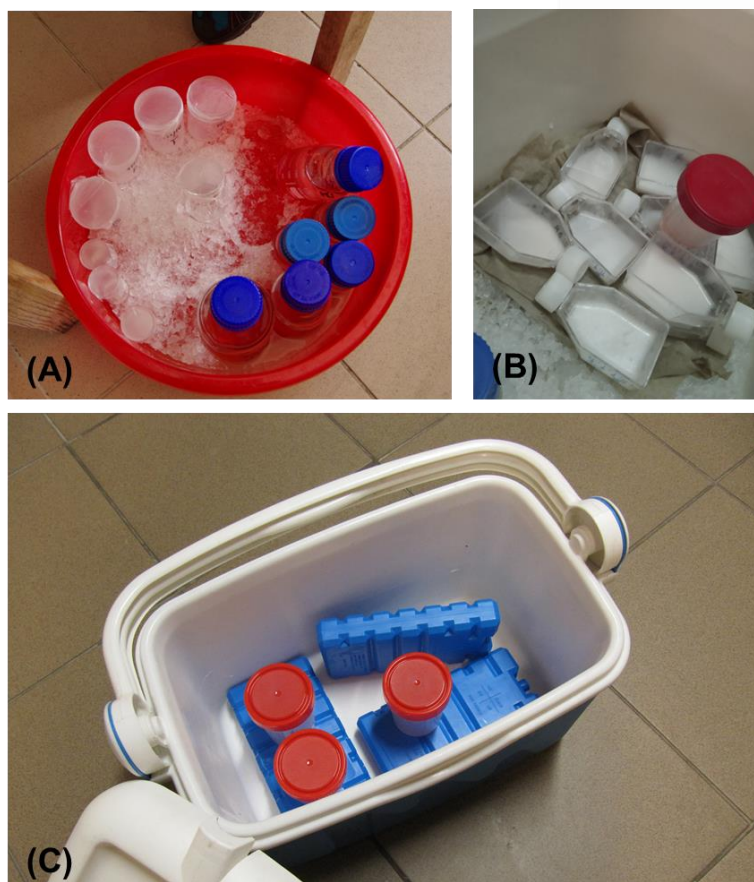
plemników. Koszt zakupu takich pojemników jest niewielki (od kilku do kilkudziesięciu złotych w zależności od pojemności), a dostępność bardzo łatwa (np. [www.biokom.com.pl](http://www.biokom.com.pl) lub [www.bionovo.pl](http://www.bionovo.pl)).



Fot. 3. Wybrane pojemniki do przechowywania nasienia ryb łososiowatych (A) oraz konfekcjonowanie nasienia przy wykorzystaniu pojemników do hodowli komórkowych (B).

### Transport

Należy również zapewnić przechowywanemu nasieniu (do czasu jego wykorzystania w zapłodnieniu) warunki obniżonego metabolizmu ( $+4^{\circ}\text{C}$ ), a więc trzymać je w warunkach chłodniczych (lód, lodówka, chłodnia). Dzięki temu dynamika procesów degradacyjnych, zachodzących w nasieniu w wyniku starzenia się plemników, zostanie spowolniona (Fot. 4A,B). 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. 4C). Tak zabezpieczone nasienie można pozostawić w dowolnie wybranym miejscu do czasu jego wykorzystania.



Fot. 4. Warunki chłodnicze stosowane w celu przechowywania nasienia (A) oraz pojemnik termiczny wyposażony w chłodzące wkładki (B) jako zestaw wykorzystywany do transportu nasienia przechowywanego krótkookresowo w moczówkach.

### **Skuteczność przechowywania nasienia krótkookresowo**

Podsumowując, skuteczność przechowywania nasienia ryb uzależniona jest od wielu czynników. Najważniejszy jest jednak właściwy sposób pozyskania materiału biologicznego (bez zanieczyszczeń) oraz jego wstępna ocena i wybór prób które cechuje najlepsza jakość. Najlepsze bowiem warunki przechowywania oraz najbardziej odpowiedni bufor jaki się zastosuje nie da zadowalających efektów końcowych jeśli próby będzie cechowała obniżona jakość (słaba ruchliwość). W przechowywanym nasieniu, wraz z upływem czasu, dochodzi do zmian jakości plemników obniżających istotnie ich ruchliwość. Zmiany te dotyczą głównie struktury plemników, w tym uszkodzeń główki, witki czy defragmentacji mitochondriów. Dlatego niezwykle istotny jest sam czas przechowywania, który winien być zoptymalizowany do możliwości zastosowanej metody i warunków przechowywania.