



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Temat przewodni:

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

Możliwości i sposoby poprawy efektywności rozrodu ryb okoniowatych w warunkach kontrolowanych

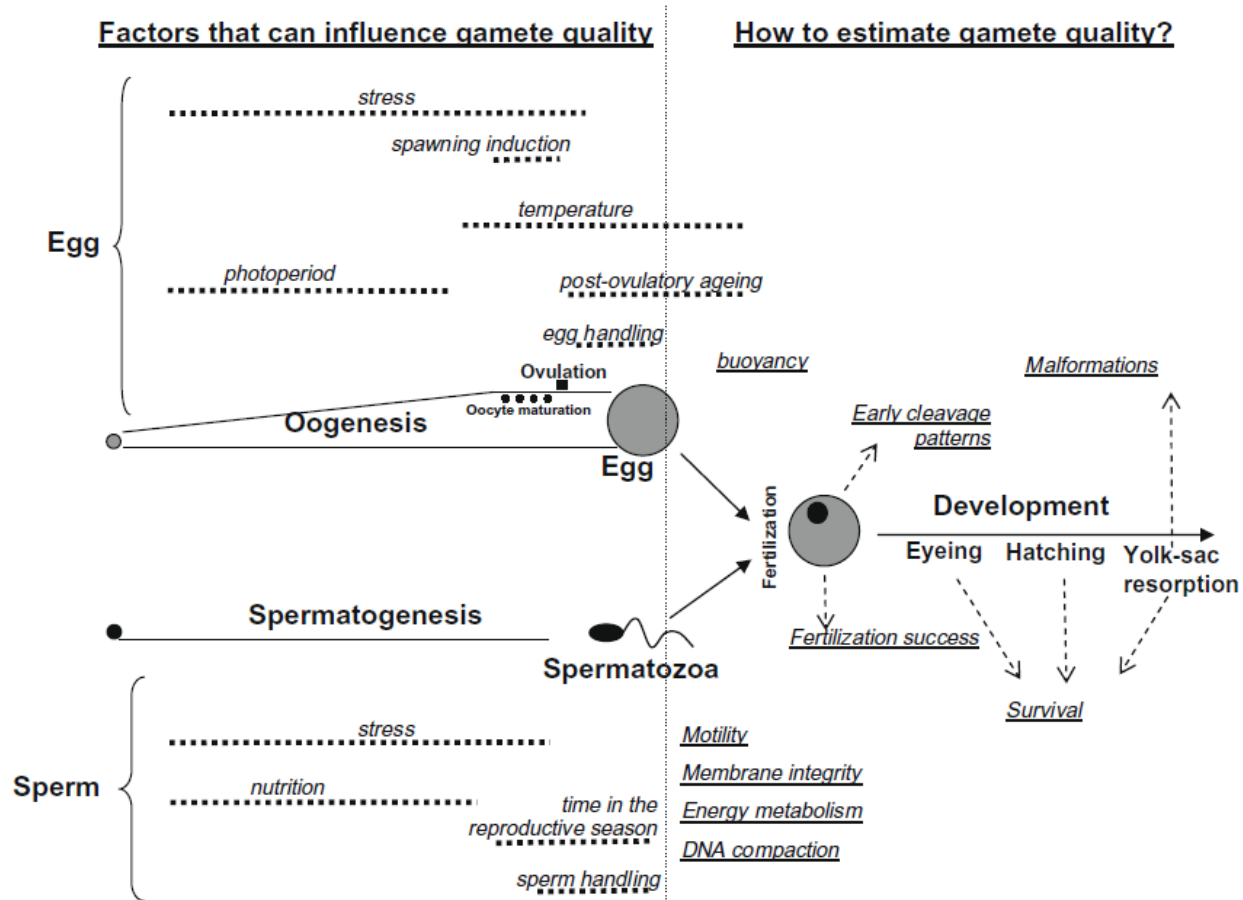
dr Beata Sarosiek

b.sarosiek@pan.olsztyn.pl

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

Wstęp

Czynniki mające wpływ na sukces zapłodnienia u ryb



Bobe J., Labbé C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165(3): 535-548

Cele pracy:

- Sprawdzenie wpływu sposobu pobierania gamet na ich jakość
- Opracowanie składu buforu do krótkookresowego przechowywania nasienia okonia
- Opracowanie składu optymalnego buforu aktywującego gamety ryb okoniowatych

Materiał i metody



Stymulacja hCG (500U/kg)



Usypianie w MS-222
(150mg/l)



Pobranie nasienia



Pobranie ikry

Materiały i metody c.d.

Ruchliwość plemników analizowano z wykorzystaniem systemu CASA Crismas. Ruchliwość plemników dokumentowano po ok. 5-7s od aktywacji odpowiednim buforem.

Analizowano poniższe parametry ruchu plemników:

VCL (całkowita prędkość plemników, $\mu\text{m/s}$),

VSL (prędkość prostoliniowa plemników, $\mu\text{m/s}$)

MOT (odsetek plemników ruchliwych, %),

PRG (odsetek plemników o ruchu postępowym, %).



CASA Crismas (IH Medical)

Materiał i metody c.d.

Procedura zapłodnienia

Pobranie nasienia

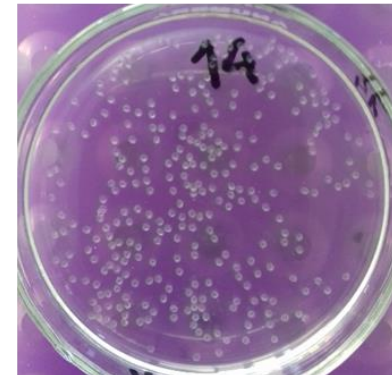
Pobranie ikry



Zapłodnienie na szalkach Petriego: 0.02ml nasienia dodano do około 100 jaj w każdym z wariantów, następnie dodano 5 ml buforu aktywującego, zawartość szalki mieszano ok. 30s po czym odstawiano na 30min w temperaturze 14°C w celu doprowadzenia przywarcia jaj do szalki. Po tym czasie każdą szalkę przepłukano odpowiednim płynem aktywującym, po czym zalano wodą wylęgarnianą.



Odsetek zapłodnienia policzono po 72h inkubacji ikry w temperaturze 14°C.



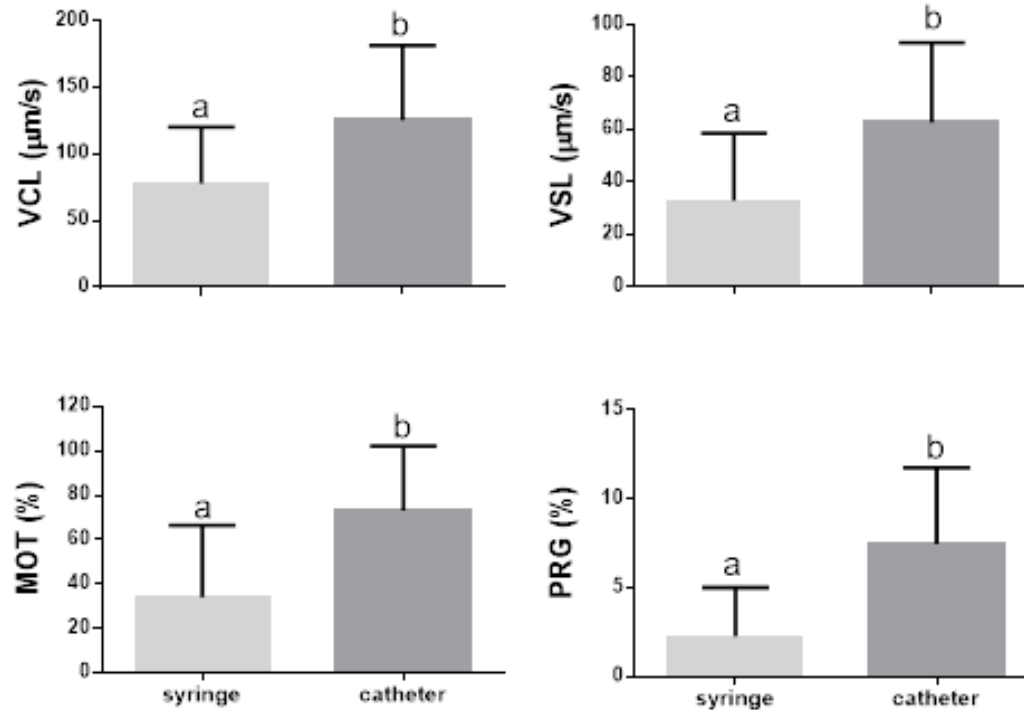
Wyniki

Koncentracja plemników, pH oraz wartość osmolalności plazmy nasienia sandacza po pobraniu strzykawką oraz z użyciem kateteru (n=12, t-test, $p \leq 0,05$ dla wartości pH, $p \leq 0,001$ dla wartości koncentracji nasienia i osmolalności)

Parameters	Milt collected by a	
	syringe (mean \pm SD)	catheter (mean \pm SD)
Milt concentration ($\times 10^9 \text{ ml}^{-1}$)	8.05 \pm 3.04^a	12.31 \pm 3.81^b
Range ($\times 10^9 \text{ ml}^{-1}$)	4.04 – 14.73	6.77 – 17.58
pH	8.93 \pm 0.09^a	9.04 \pm 0.07^b
Range	8.78 – 9.08	8.91 – 9.10
Osmolality (mOsm kg^{-1})	228 \pm 51^a	311 \pm 16^b
Range (mOsm kg^{-1})	129 – 301	289 – 342

Wyniki c.d.

Parametry ruchu plemników sandacza po pobraniu strzykawką oraz z wykorzystaniem kateteru (n=12, t-test, $p \leq 0,01$)



Wyniki c.d.

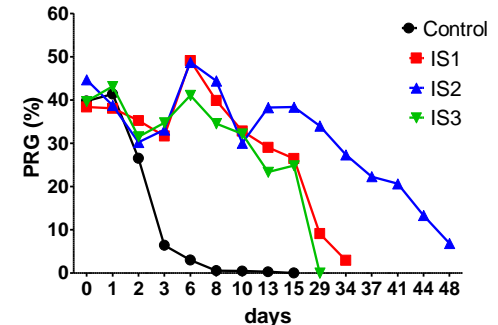
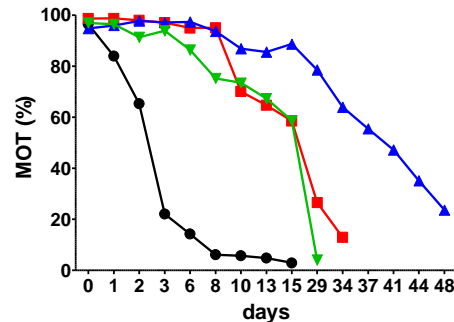
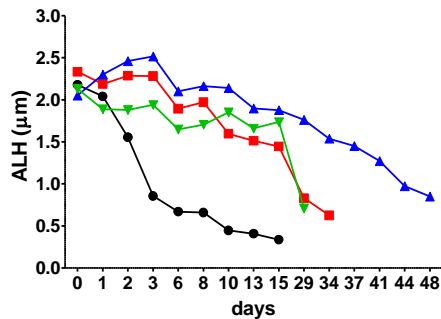
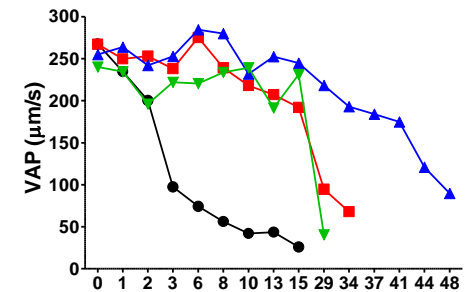
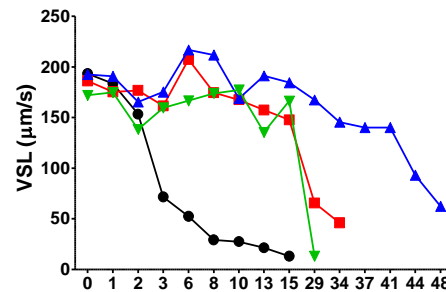
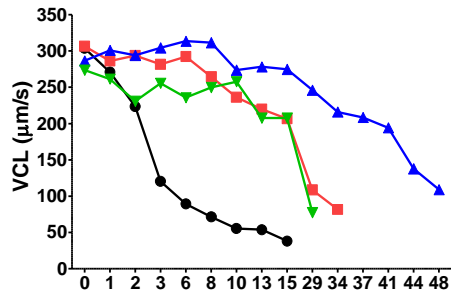
Możliwości krótkookresowego przechowywania nasienia okonia w warunkach chłodniczych (+4°C), w buforach immobilizujących o składzie, (rozrzedzenie 1:9):

IS1: 200mM NaCl, 50mM glicyna, 30mM KCl, 20mM Tris, pH 8,5

IS2: 130mM NaCl, 40mM KCl, 2,5mM CaCl₂, 1,5mM MgCl₂, 2,5mM NaHCO₃, pH 9,5

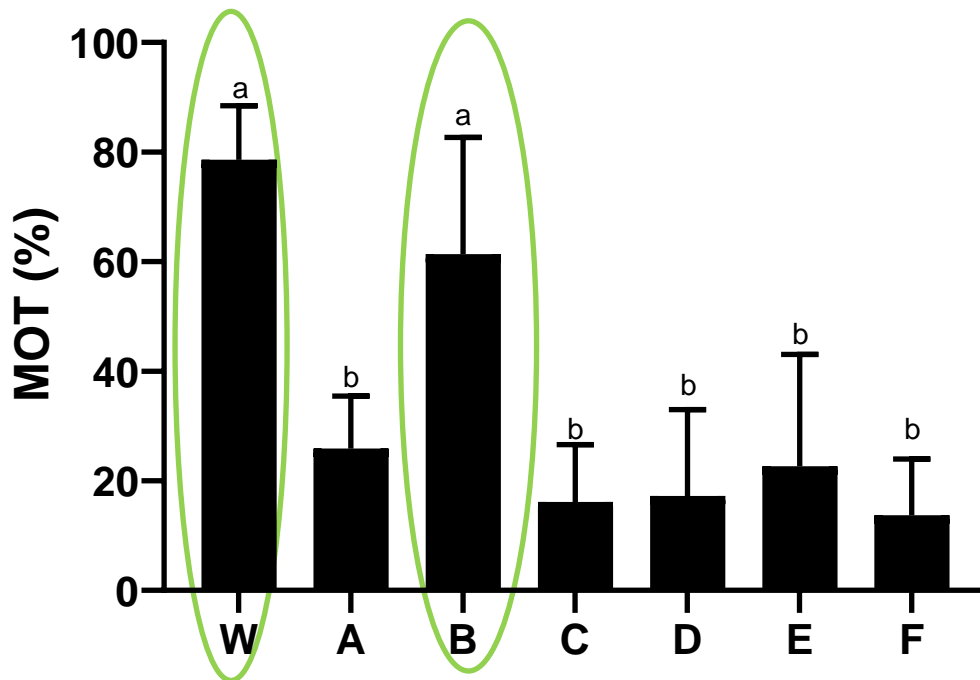
IS3: 200mM NaCl, 40mM KCl, 25mM Tris, 5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,5mM NaH₂PO₄, pH 9,5

Próbę kontrolną stanowiło nasienie nie rozrzedzone.



Wyniki c.d.

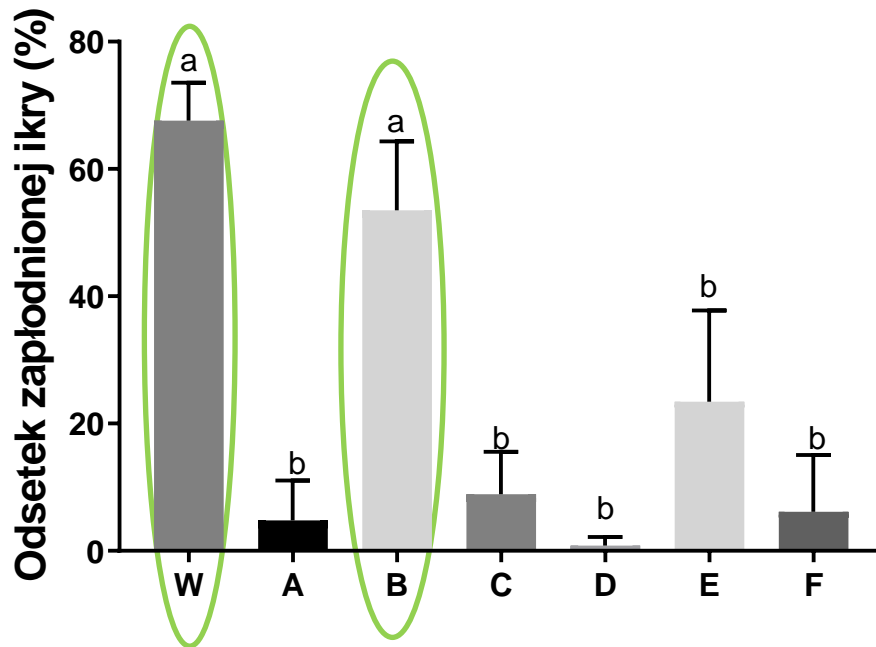
Wpływ buforów aktywujących na odsetek ruchliwych plemników sandacza



W - kontrola, woda wylęgarniana, ok. 12 mOsm/kg;
A - 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 204 mOsm/kg;
B - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 34 mOsm/kg;
C - 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 203 mOsm/kg;
D - 20 mM Tris, 40 mM NaHCO₃, pH 8,5; 97 mOsm/kg;
E - 0,3% mocznik, 0,4% NaCl, 180 mOsm/kg;
F - 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0; 204 mOsm/kg

Wyniki c.d.

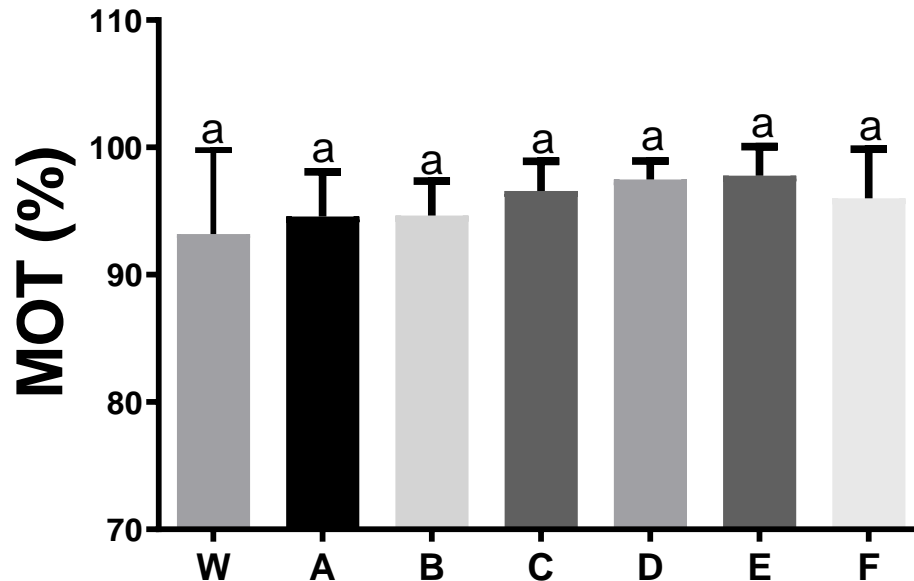
Wpływ buforów aktywujących na odsetek zapłodnionej ikry sandacza



W - kontrola, woda wylęgarniana, ok. 12 mOsm/kg;
A - 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 204 mOsm/kg;
B - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 34 mOsm/kg;
C - 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 203 mOsm/kg;
D - 20 mM Tris, 40 mM NaHCO₃, pH 8,5; 97 mOsm/kg;
E - 0,3% mocznik, 0,4% NaCl, 180 mOsm/kg;
F - 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0; 204 mOsm/kg

Wyniki c.d.

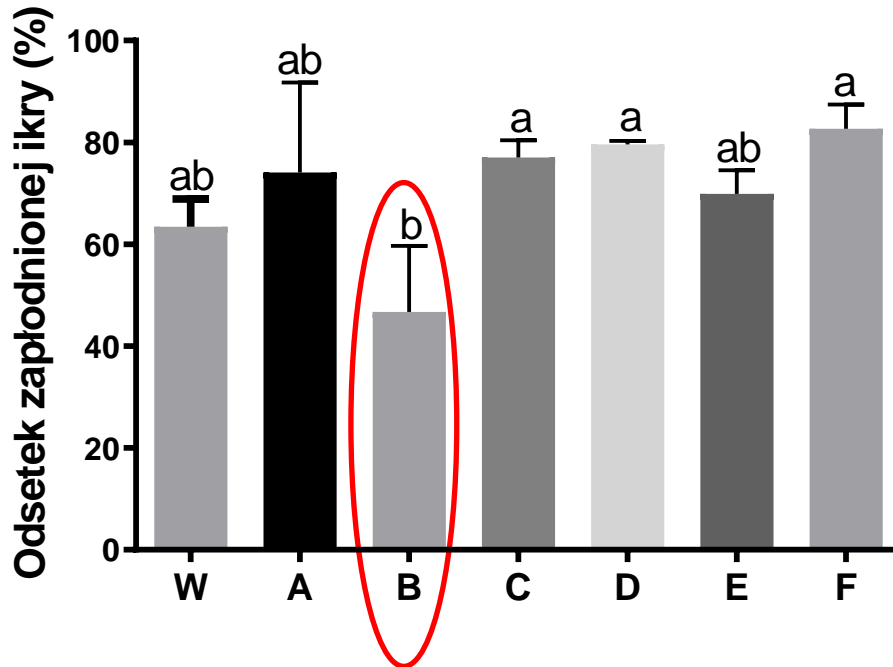
Wpływ buforów aktywujących na odsetek ruchliwych plemników okonia



W - kontrola, woda wylęgarniana,
A - 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,0; 204 mOsm/kg;
B - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,5; 34 mOsm/kg;
C - 20 mM Tris, 40 mM NaHCO₃, pH 8,5; 97 mOsm/kg;
D - 0,3% mocznik, 0,4% NaCl, 180 mOsm/kg;
E - 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0; 204 mOsm/kg;
F - 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 203 mOsm/kg;

Wyniki c.d.

Wpływ buforów aktywujących na odsetek zapłodnionej ikry okonia

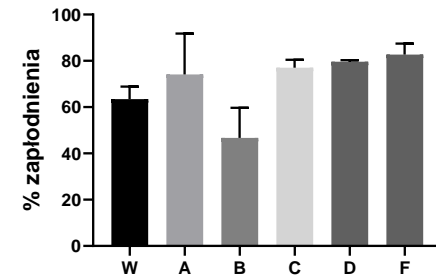
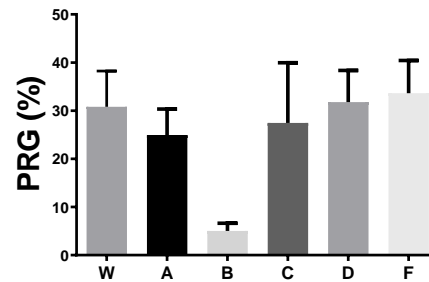
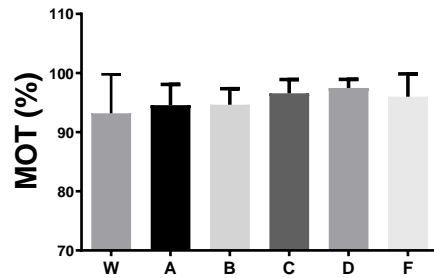


W - kontrola, woda wylęgarniana,
A - 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,0; 204 mOsm/kg;
B - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,5; 34 mOsm/kg;
C - 20 mM Tris, 40 mM NaHCO₃, pH 8,5; 97 mOsm/kg;
D - 0,3% mocznik, 0,4% NaCl, 180 mOsm/kg;
E - 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8,0; 204 mOsm/kg;
F - 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 203 mOsm/kg;

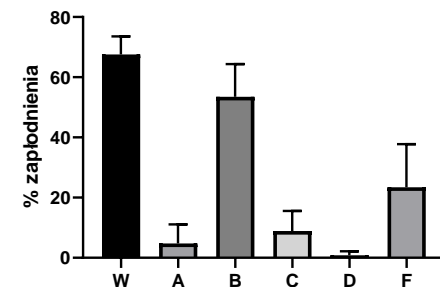
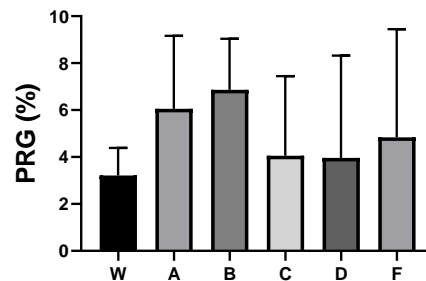
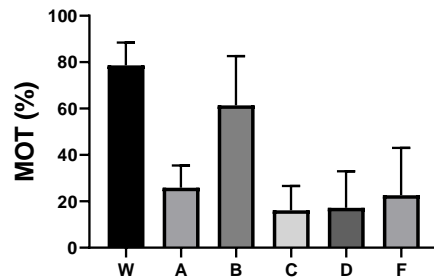
Wyniki c.d.

Porównanie wpływu buforów aktywujących na parametry ruchu i odsetek zapłodnionej ikry okonia i sandacza

okoń



sandacz



Podsumowanie

- Użycie kateteru podczas pobierania nasienia sandacza, podnosi znacząco jego jakość.
- Do zapłodnienia ikry sandacza najlepsze są:

W - woda wylęgarniana,

B - 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 34 mOsm/kg;

Podczas zapłodnienia ikry okonia najlepsze bufory to:

C - 20 mM Tris, 40 mM NaHCO₃, pH 8,5; 97 mOsm/kg,

D - płyn Woynarovicha (0,3% mocznik, 0,4% NaCl), 180 mOsm/kg,

F - 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,0; 203 mOsm/kg.

- Zwiększanie osmolalności podczas aktywacji gamet sandacza powyżej 65 mOsm/kg jest niekorzystne w przeciwieństwie do aktywacji gamet okonia.



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

dr Beata Sarosiek
b.sarosiek@pan.olsztyn.pl

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