



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Temat przewodni

*Możliwości wykorzystania nowatorskich rozwiązań
w akwakulturze ryb słodkowodnych*

Konfekcjonowanie nasienia ryb – możliwości, sposoby oraz efektywność stosowania w praktyce rybackiej

dr hab. inż. Beata I. Cejko
b.cejko@pan.olsztyn.pl

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

Gatunki dominujące w polskiej akwakulturze

karp



pstrąg tęczowy



szybkie tempo wzrostu

dobre wykorzystanie pokarmu

tworzenie gospodarczo cennych

linii hodowlanych

krzyżówek hodowlanych

odporność na manipulacje

**tolerancja na zmienne
warunki środowiskowe**

**możliwość produkcji stad
jednopłciowych**

wysoka wartość odżywcza mięsa

Sukces rozrodu

jakość ikry



jakość nasienia



Efektywność zapłodnienia

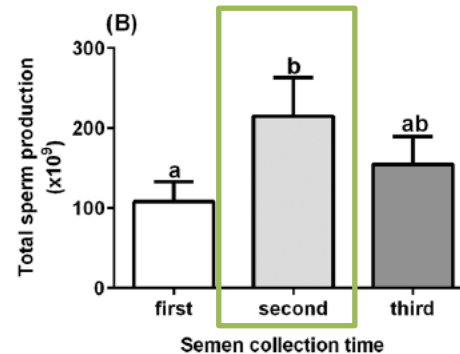
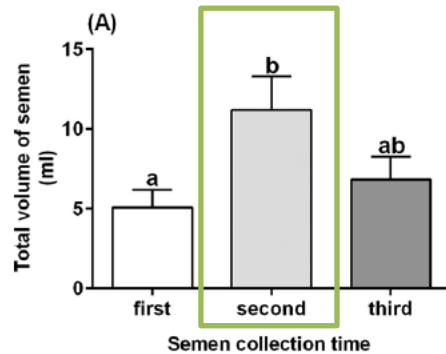
ikrę i nasienie wykorzystuje się w celu przeprowadzenia zapłodnienia bezpośrednio po pozyskaniu

Potencjał rozrodczy a efektywność zapłodnienia

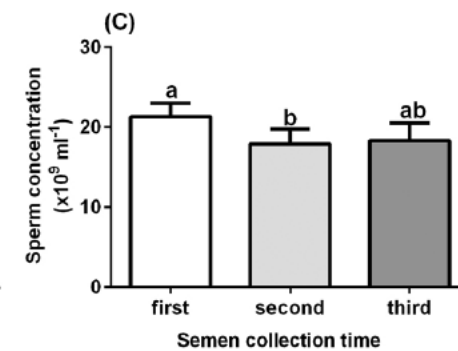
➤ wydajność rozrodcza uwarunkowana okresem w sezonie tarłowym

first: 01.07; second: 12.07; third 19.07

B.I. Cejko et al.

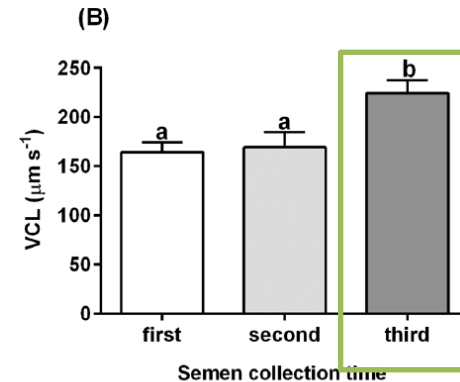
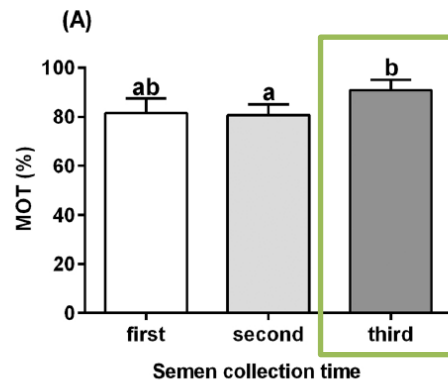


Animal Reproduction Science 188 (2018) 178–188



B.I. Cejko et al.

Animal Reproduction Science 188 (2018) 178–188

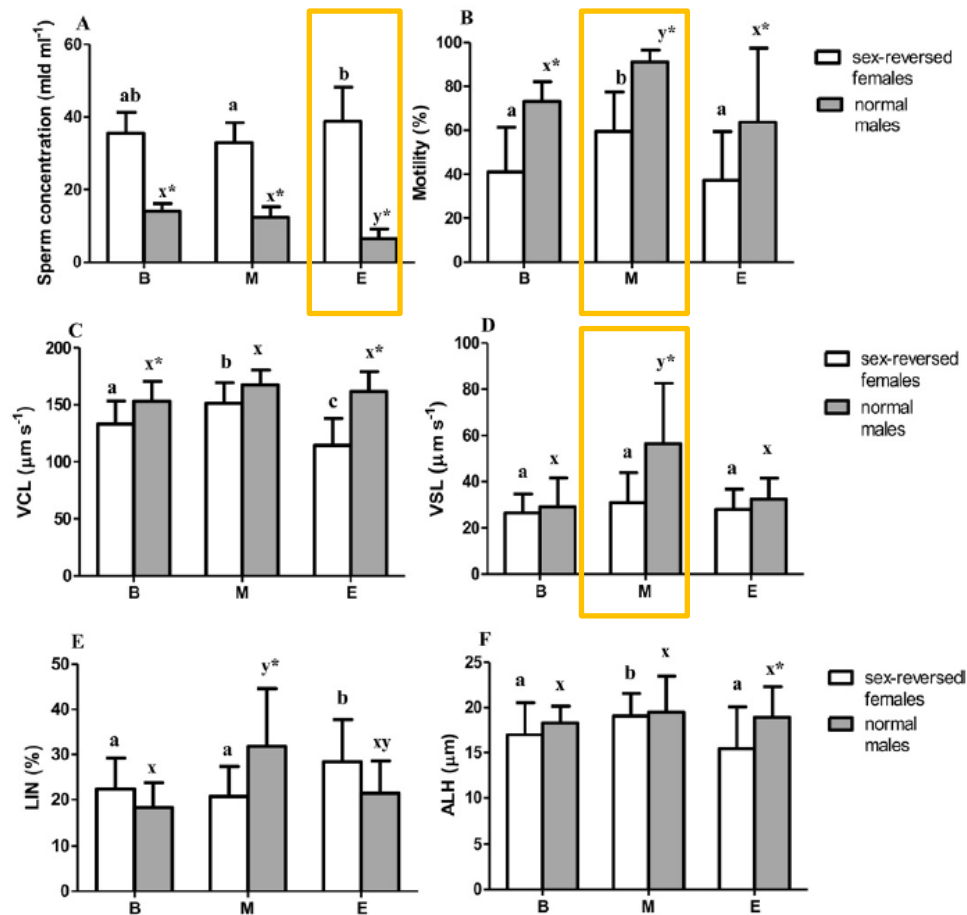


Potencjał rozrodczy a efektywność zapłodnienia

➤ wydajność rozrodcza uwarunkowana okresem w sezonie tarłowym

beginning (B): 19.02; middle (M): 01.04; end (E) 29.04

J. Nynca et al. / Theriogenology 77 (2012) 1381–1389

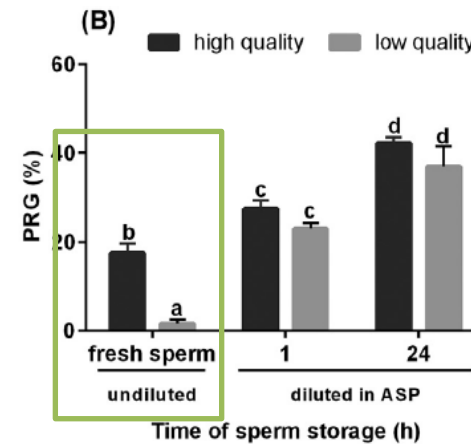
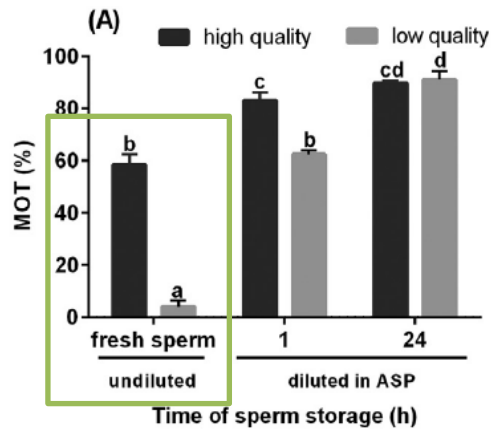


Potencjał rozrodczy a efektywność zapłodnienia

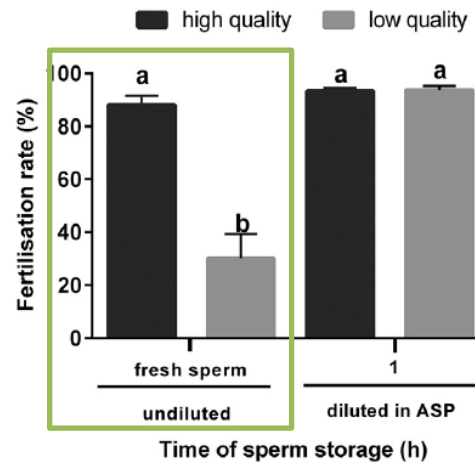
- zmienność jakości pozyskanego nasienia między osobnikami

B.I. Cejko, et al.

Aquaculture 506 (2019) 224–228



B.I. Cejko, et al.



Potencjał rozrodczy a efektywność zapłodnienia

➤ brak synchronizacji rozrodu

Table 1

Total volume of milt (TVM), volume of milt per kg of body weight (VOM), sperm concentration and total sperm production (TSP) determined for Control^a (n = 4) and Ovopel^b (n = 9) treated common carp *Cyprinus carpio* L. males. Mean values marked with different letters are significantly different (P < 0.05)

Group of fish	Milt and sperm parameters			
	TVM ml	VOM ml kg ⁻¹	Sperm concentration ×10 ⁹ ml ⁻¹	TSP ×10 ⁹
Control	0.6 ^a	0.37 ^a	32.05 ^a	25.47 ^a
	±0.6	±0.33	±1.63	±13.79
Ovopel	6.5 ^b	5.1 ^b	22.30 ^b	133.80 ^b
	±6.8	±5.0	±2.76	±128.90

^a0.7% NaCl.

^b1 pellet of Ovopel contained 18–20 µg mGnRH_a (mammalian analogue) and 8–10 mg metoclopramide.



➤ manipulacje z tarlakami

➤ relatywnie krótka żywotność i zdolność plemników do zapłodnienia

Konfekcjonowanie nasienia - dane historyczne

Wiek XIX

- Przechowywanie nasienia łososia (*Salmo salar*) w otwartym naczyniu przez 4 dni (*Atkins 1874*)
- Przechowywanie nasienia czawyczy (*Oncorhynchus tshawytscha*) w otwartym naczyniu przez 2 dni – plemniki zachowywały zdolność do ruchu (*Rutter 1902*)

Wiek XX

- Przechowywanie nasienia mazu (*Oncorhynchus masou*) w temp. 5-13°C - plemniki zachowywały zdolność do ruchu po 4 dniach (*Nakano i Nozawa 1925*)
- Przechowywanie nasienia pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) w atmosferze tlenu (0°C) - plemniki zachowywały zdolność do ruchu po 4 dniach (*Scheuring 1925*)
- Przechowywanie nasienia mazu (*Oncorhynchus mason*) przez 4 dni (1°C) - zapłodnienie ikry (*Kawajiri 1927*)

Konfekcjonowanie nasienia - cele

- **zabezpieczenie nasienia o najlepszej jakości**
 - zgromadzenie odpowiedniego zapasu nasienia
 - wykorzystanie nasienia w odpowiednim momencie
- **poprawa jakości nasienia**
 - rewitalizacja plemników
 - poprawa wartości biologicznej plemników,
 - odbudowa i zmagazynowanie zapasów ATP
- **ograniczenie manipulacji z tarlakami**
 - dbałość o kondycję i zdrowotność tarlaków
 - krzyżowanie osobników odległych od siebie genetycznie
 - możliwość uzyskania efektu heterozji
- **restytucja gatunków zagrożonych**
 - ochrona populacji przed wystąpieniem imbredu
 - wzrost jakości podchowyanego materiału
 - zachowanie zmienności genetycznej rozradzanych ryb
- **zarządzanie stadem tarłowym**
 - możliwość produkcji krzyżówek
 - efektywne wykorzystanie nasienia (neosamce)
 - wzrost ekonomiki produkcji

Konfekcjonowanie nasienia – warunki przechowywania

przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro*

Bufory i dodatki

zdeponowanie porcji nasienia poza organizmem
tarlaka

- gatunkowo specyficzne (w oparciu o skład plazmy nasienia danego gatunku)
- zapewnienie plemnikom substancji odżywczych (białka, cukry, antyoksydanty)
- wydłużenie czasu przechowywania (kofeina, antybiotyki)
- ograniczenie sedymentacji plemników oraz mechanicznych uszkodzeń (alginian sodu)

Krioprotektory

- zabezpieczenie błon komórkowych plemników przed zmianami warunków przechowywania (metanol, glicerol, DMSO, DMA, cukry: glukoza, sacharoza, trehaloza)

Konfekcjonowanie nasienia – warunki przechowywania

Bufory i dodatki

Tabela 1. Skład oraz pH buforów wykorzystywanych do krótkookresowego przechowywania nasienia ryb karpiowatych.

Składniki (g/l)	Bufory do przechowywania				
	TLP	MORK	RURANGWA	ASP	ASPR
	Bavister i in. 1989	Morisawa i in. 1983	Rurangwa i in. 2004	Cejko i in. 2019	Kowalski i in. dn
NaCl	5,84	4,38	5,4	6,43	5,84
KCl	0,23	5,22	2,0	2,98	2,98
CaCl ₂	0,22	0,22	-	0,22	0,22
MgCl ₂	0,08	0,12	-	-	-
MgSO ₄	-	-	-	0,25	0,49
NaHCO ₃	2,10	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄	0,05	-	-	-	-
Glicyna	-	-	3,7	-	3,00
Kw. moczowy	-	-	-	-	0,17
Glukoza	-	-	-	-	1,80
Tris	-	2,43	1,8	2,42	2,42
pH	8,6	8,0	7,5	7,5	8,2



Konfekcjonowanie nasienia – warunki przechowywania

Bufory i dodatki

Tabela 2. Skład oraz pH buforów wykorzystywanych do krótkookresowego przechowywania nasienia ryb łososiowatych.

Składniki (g/l)	Bufory do przechowywania		
	MORISAWA	BAYNES	KOBAYASHI
	Morisawa i Morisawa (1988)	Baynes (1999)	Kobayashi i in. (2004).
NaCl	5,52	2,35	7,60
KCl	2,00	9,00	2,98
CaCl ₂	1,60	0,29	0,37
MgCl ₂	0,30	-	0,31
NaHCO ₃	-	5,00*	0,21
Tris	2,42	-	-
Glicyna	3,75	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	0,51	-
MgSO ₄	-	0,29	-
Glukoza	-	5,00*	-
pH	8,20	nie podano	8,50 - 9,90

* 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.



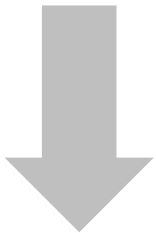
Konfekcjonowanie nasienia – warunki przechowywania

Temperatura



- odmienny skład lipidowy błon komórkowych plemników

wielonienasycone kwasy tłuszczowe



- zapewnienie płynności
- wydalanie metabolitów
- absorbcja nutrientów
- wymiana tlenowa

+4°C



większy udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych

+8°C



mniejszy udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych

wpływ temperatury otoczenia - spermatogeneza

słabsza dynamika procesów oksydacyjnych

silniejsza dynamika procesów oksydacyjnych

łatwiejsze zachowanie żywotności w warunkach *in vitro*

trudniejsze zachowanie żywotności w warunkach *in vitro*

Konfekcjonowanie nasienia – warunki przechowywania

Rozrzedzenie



podtrzymanie
bazowego
metabolizmu

- rozrzedzenie szkodliwych metabolitów oddychania komórkowego
- zapewnienie plemnikom lepszego dostępu do tlenu



ogranicza negatywny
wpływ kumulowania się
produktów przemiany
materii

rozrzedzenie nasienia
(10x)



1 porcja nasienia
(1 ml)



9 porcji
ASP (9 ml)

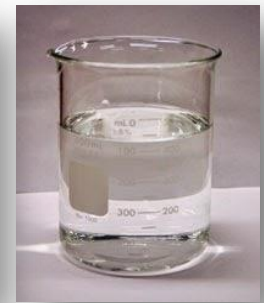


rozrzedzenie nasienia
(30x)



1 porcja
nasienia (1 ml)

29 porcji
ASP (29 ml)



Konfekcjonowanie nasienia – warunki przechowywania

Cienka warstwa



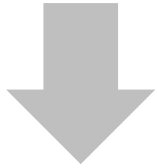
podtrzymanie
bazowego
metabolizmu

- ograniczenie przyduszania plemników



Konfekcjonowanie nasienia – warunki przechowywania

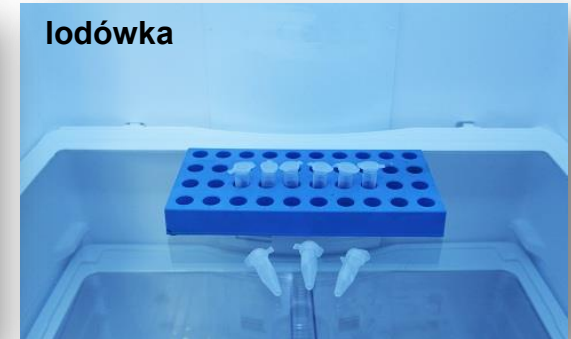
Przechowywania



podtrzymanie
bazowego
metabolizmu

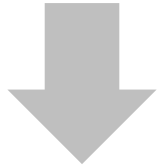
- zachowanie stałej temperatury przechowywania
- zmagazynowanie pozyskanego materiału do czasu wykorzystania

stała temperatura

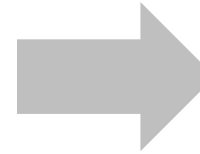


Konfekcjonowanie nasienia – warunki przechowywania

Transport



Ekonomika produkcji



- możliwość transportu na dalsze odległości
- łatwa dostępność
- swobodna manipulacja
- relatywnie niski koszt przechowywania materiału



Konfekcjonowanie nasienia – efektywność

Tabela 3. Efektywność stosowania buforów oraz parametry techniczne procedury krótkookresowego przechowywania nasienia ryb karpiowatych (dn – dane niepublikowane; bd – brak danych).

Gatunek	Bufory do przechowywania	Stopień rozrzedzenia	Temp. przechowywania	Czas przechowywania (dni)		Źródło
				maksymalny	optimalny	
BRZANA	RURANGWA	x10	4°C	1	1	dn
CERTA	ASPR	x10	4°C	7	5	dn
JAŻ	TLP	x10	4°C	17	7	Cejko i in. 2011c
	TLP	x10	4°C	bd	1	Sarosiek i in. 2020
JELEC	MORK	x10	4°C	bd	1	dn
KARAŚ POSPOLITY	TLP	x10	4°C	14	5	dn
KARP	TLP	x30	4°C	4	2	Kowalski i in. 2014
	RURANGWA	x10	4°C	5	2	Dietrich i in. 2021
	ASP	x10	10°C	14	9	Cejko 2021
KLEŃ	ASP	x10	4°C	7	2	dn
LIN	b.d.	bd	bd	bd	bd	bd
ORFA	TLP	x10	4°C	5	1	Sarosiek i in. 2012



Konfekcjonowanie nasienia – efektywność

Tabela 4. Efektywność stosowania buforów oraz parametry techniczne procedury krótkookresowego przechowywania nasienia ryb łososiowatych.

Rozrzedzalnik fishpreser	Gatunki	Zakres obsługi (mieszanie)	Stopień rozrzedzenia nasienia	Maksymalny czas przechowywania (temp. +4°C)
SALMO	Łososiowate	2x dziennie	10x	21 dni
SALMO trip		1x co 5 dni	10x	10 dni
SALMO XX	Łososiowate	2x dziennie	30x	10 dni
SALMO XX trip	<i>nasienie gonadalne</i>	1x co 5 dni	30x	5 dni



Konfekcjonowanie nasienia – efektywność

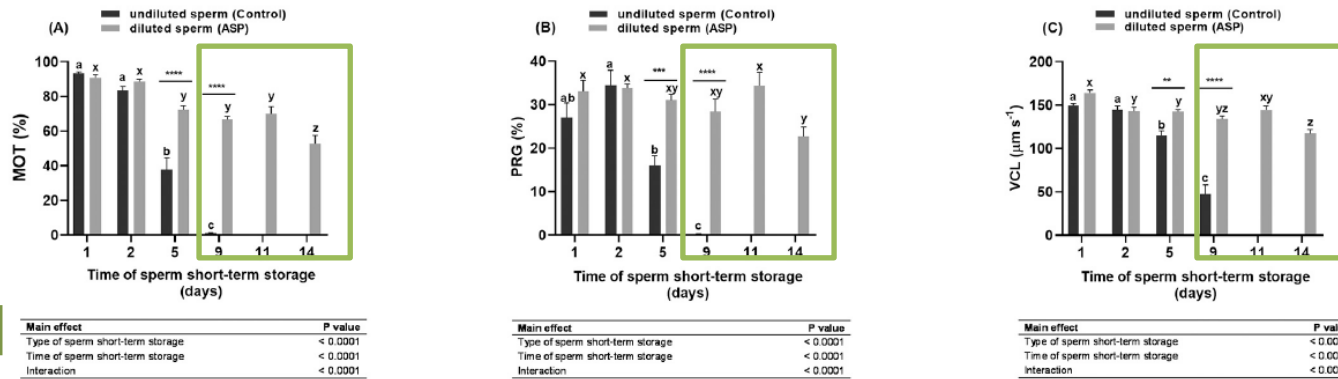


Fig. 3. Sperm motility (A), progressive motile sperm (B) and curvilinear velocity (C) of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm after short-term storage in artificial seminal plasma (ASP, $n = 5$) under controlled conditions for two weeks at 10 °C. Undiluted sperm (Control, $n = 5$) were not preserved in ASP. Boxes marked with various small letters (a - c) indicate significant differences between the time of sperm storage among fresh sperm, whereas boxes marked with various small letters (x - z) indicate significant differences between the time of sperm storage among sperm diluted in ASP ($P < 0.05$). An asterisk indicates significant differences between the Control and ASP groups within a specific time during storage. The results were presented as the mean \pm SEM (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

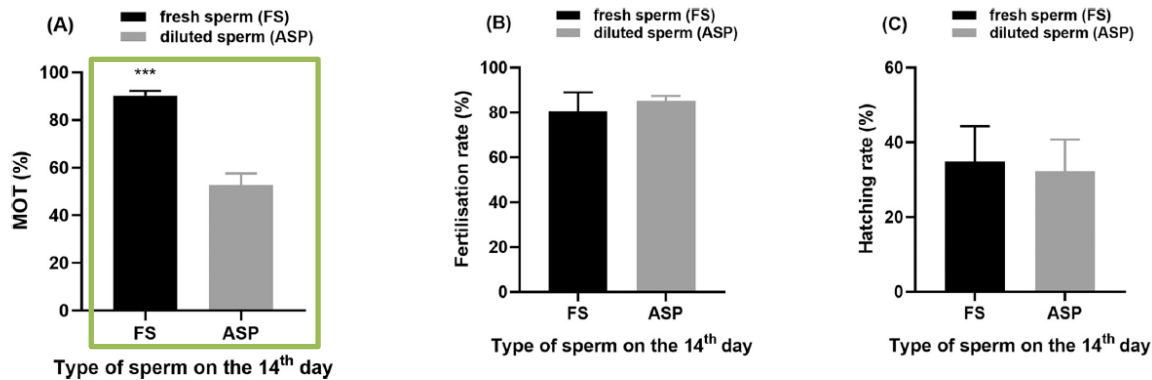
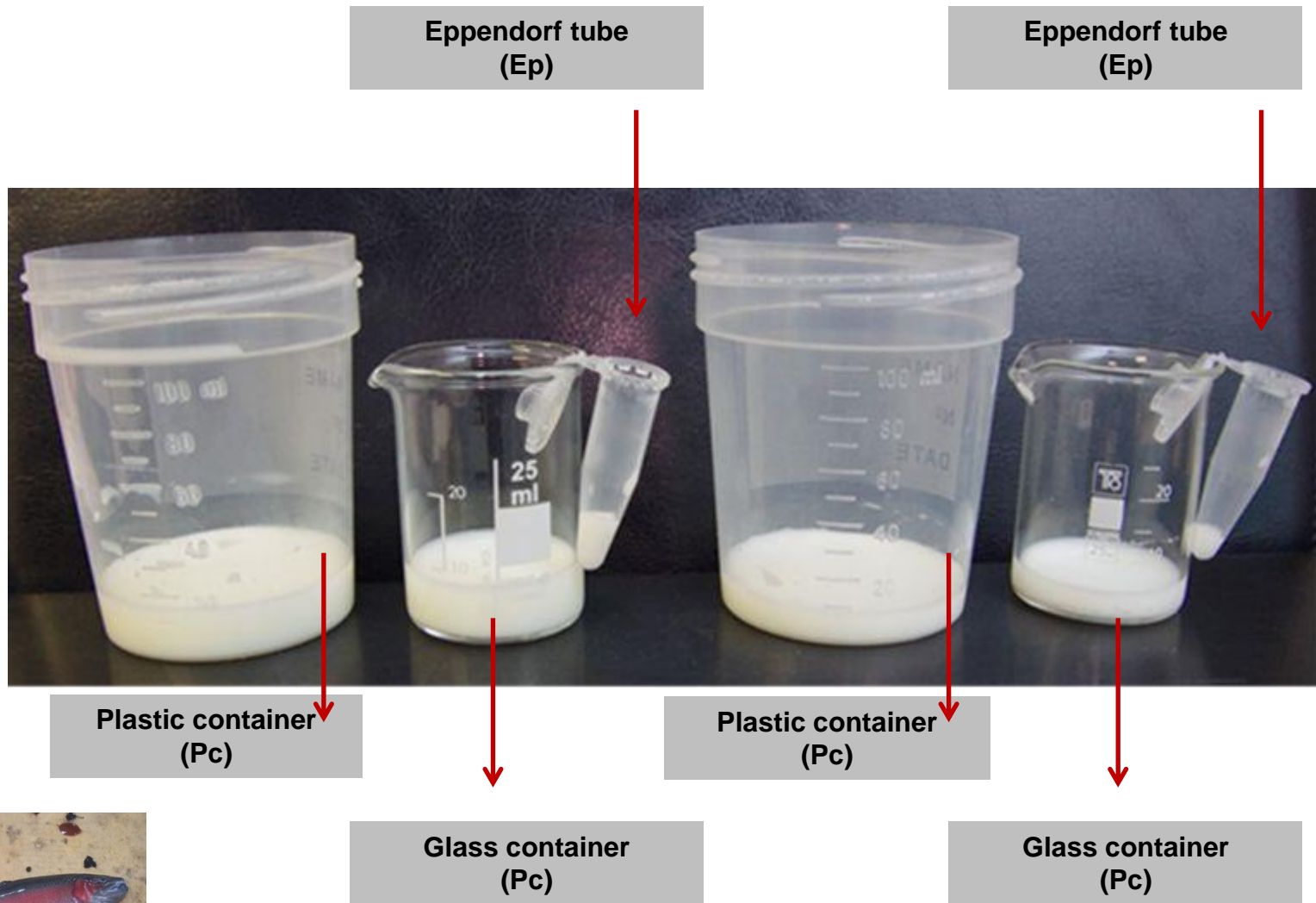


Fig. 4. Sperm motility (A), fertilization (B) and hatching (C) rate after using fresh sperm (FS, $n = 5$) and sperm diluted in artificial seminal plasma (ASP, $n = 5$) of common carp (*Cyprinus carpio*) after the 14th day of sperm short-term storage at 10 °C. The results were presented as the mean \pm SEM ($P < 0.001$).



Konfekcjonowanie nasienia – efektywność



Konfekcjonowanie nasienia – efektywność

Table 1. Different sperm column heights used: 0.5 cm (sperm storage volume: 180 μ l, 4 ml and 9 ml) and 1.0 cm (sperm storage volume: 200 μ l, 8 ml and 18 ml) for short-term sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) testicular sperm (TS) storage for 12 days in Morisawa solution (MS) with addition of 0.8% sodium alginate (alginate) and MS without addition of alginate (control) in different containers, i.e., an Eppendorf tube (Et), a glass container (Gc) and a plastic container (Pc).

Solution used*	MS		MS + sodium alginate	
Shortcut	Control		Alginate	
Sperm column heights (hSC)	0.5	1.0	0.5	1.0
Containers capacity and diameter	Volume of sperm storage			
Ep: 500 μ l; 0.45 and 0.6cm**	180 μ l	200 μ l	180 μ l	200 μ l
Gc: 25 ml; 3cm	4 ml	8 ml	4 ml	8 ml
Pc: 120 ml; 4.5cm	9 ml	18 ml	9 ml	18 ml

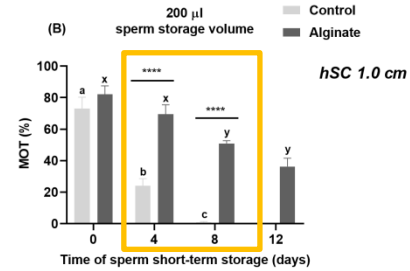
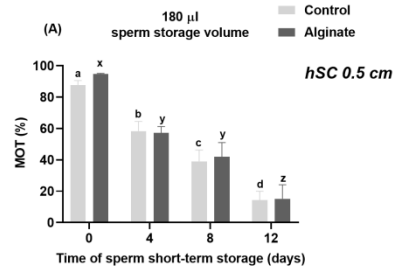
* Morisawa solution (MS) containing 100 mM NaCl, 40 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂ and 50 mM Tris, with the addition of an antibiotic (10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin per mL in 0.9%) at pH 8.5.

** Eppendorf tubes are conical; therefore, when the height was 0.5 ml, the diameter was 0.45 cm, and when it was 1 cm, the diameter was 0.6 cm.

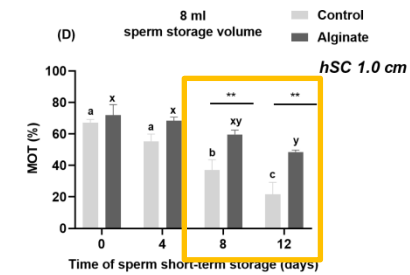
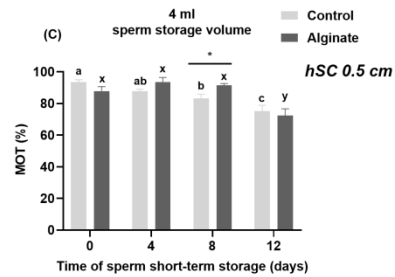


Konfekcjonowanie nasienia – efektywność

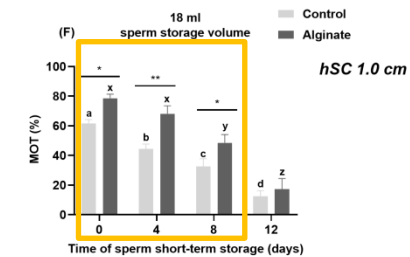
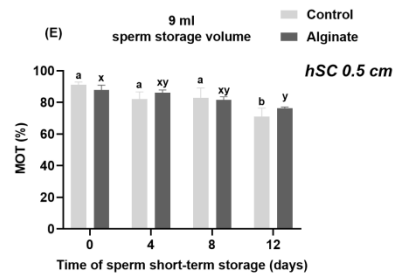
Eppendorf tube (capacity of 500 μ l)



Glass container (capacity of 25 ml)



Plastic container (capacity of 120 ml)





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 hab. inż. Beata I. Cejko
b.cejko@pan.olsztyn.pl

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