

*Temat przewodni:
Innowacje w rozrodzie ryb łososiowatych*

Kriokonserwacja nasienia ryb

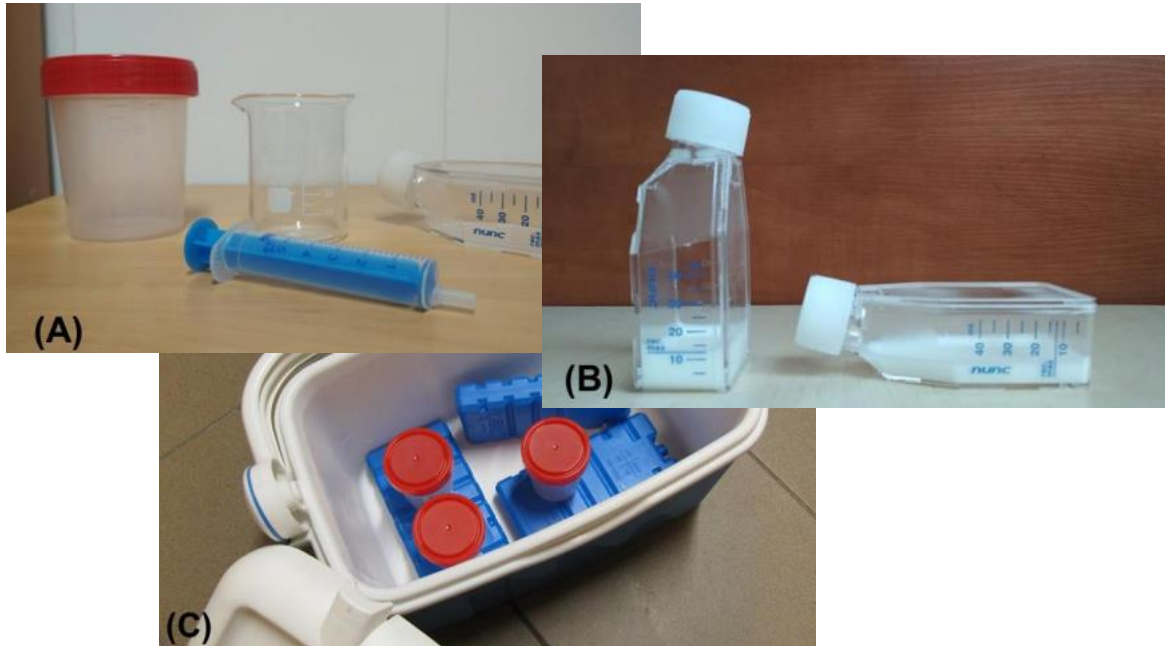
mgr inż. Agnieszka Brzyszc
a.brzyszc@pan.olsztyn.pl

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



Przechowywanie nasienia

Krótkookresowe



- w stanie płynnym w warunkach chłodniczych
- nasienie ryb łososiowatych nawet do 30 dni

Długookresowe



- w stanie zamrożonym
- przez bardzo długi okres czasu

Kriokonserwacja – cóż to jest?

- **kriobiologia** (*krio-* + gr. *bios* ‘życie’ i *logos* ‘nauka’) **biol.** dział zajmujący się badaniem wpływu niskich temperatur na życie organizmów.
- **Krioprezerwacja/kriokonserwacja** (od gr. κρύος, kryos, „zimno” i łac. praeservare lub conservare, „zachować”)

Kriokonserwacja to przechowywanie komórek w bardzo niskich temperaturach (zwykle w ciekłym azocie, -196oC) zatrzymuje wszystkie procesy biologiczne i utrzymuje komórki w stanie tzw. anabiozy (życia utajonego).
Dzięki temu komórki można bezpiecznie przechowywać przez dłuższy czas bez zmiany ich właściwości.



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Kriokonserwacja – cóż to jest?

- Kriokonserwacja – głębokie zamrażanie, które umożliwia przechowywanie materiału biologicznego przez bardzo długi okres czasu.
- Podczas przechowywania w temperaturze poniżej -139°C woda przechodzi w stan krystaliczny; jej cząsteczki drgają, lecz nie przemieszczają się, co uniemożliwia przebieg jakichkolwiek reakcji chemicznych (Farrant i Ashwood-Smith, 1980).
- Ze względów praktycznych (dostępność, stosunkowo niska cena) próby przechowuje się w ciekłym azocie (-196°C).
- W tej temperaturze jedynym zagrożeniem natywności materiału biologicznego jest promieniowanie tła oraz protony promieni kosmicznych powodujące jonizację, która akumuluje się z upływem czasu.
- Teoretycznie wyliczono, że takie oddziaływanie może uszkodzić zamrożone komórki po 3 000 do 20 000 latprzechowywania (Mazur, 1976), czy nawet dopiero po 32 000 lat (Ashwood-Smith, 1980).



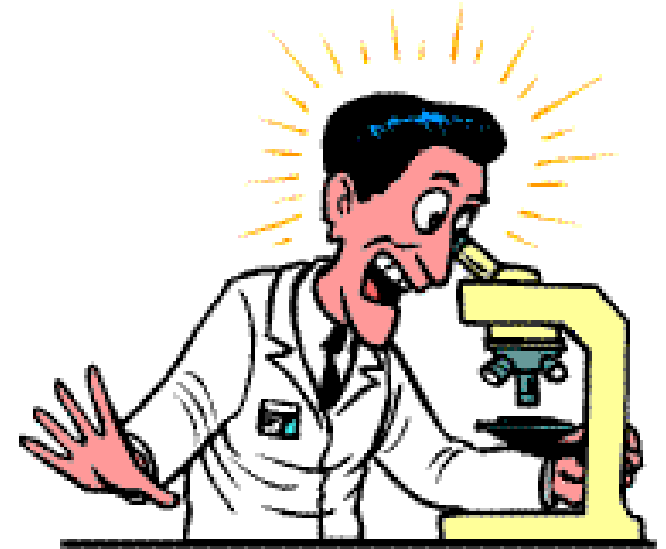
Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Kriokonserwacja – skąd to się wzięło?

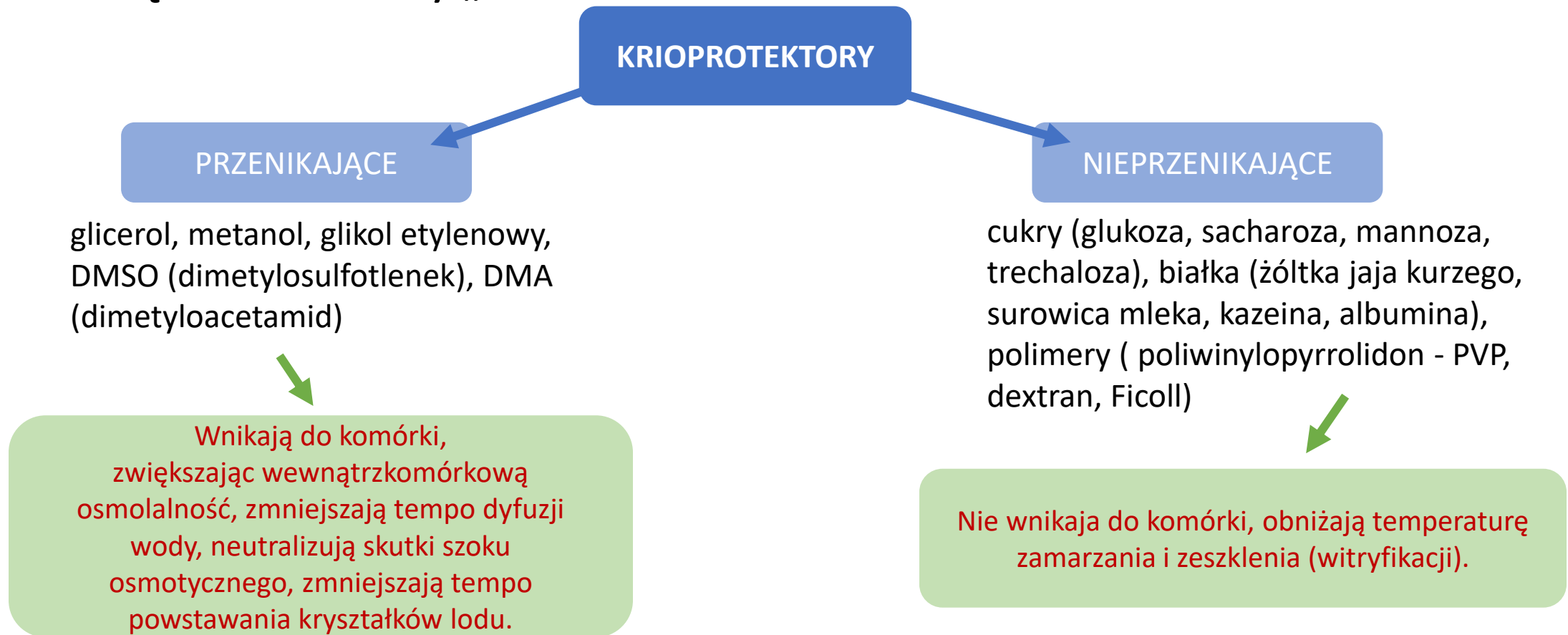
Historia kriokonserwacji sięga 1949 roku (Londyn, Anglia).

- Audrey **Smith** i Christopher **Polge** dodają kilka kropel gliceryny na szkiełko Petriego zawierające nasienie koguta. Gliceryna była używana do „spowalniania” ruchu plemników by łatwiej obserwować ruch plemników.
- Po eksperymencie pozostało dużo nasienia więc zdecydowano zamrozić materiał biologiczny do dalszych analiz enzymatycznych.
- Po rozmrożeniu, okazało się, że plemniki przeżyły zamrażanie.
- Wyniki opublikowano w Nature i był to krok milowy kriokonserwacji komórek i tkanek ssaków.



Krioprotektanty

Związki chemiczne, które posiadają właściwości krioprotekcyjne, czyli chroniące zamrażany „obiekt”.



Etapy kriokonserwacji nasienia ryb

I. Pozyskanie nasienia



Klasyczne wycieranie



Pobieranie nasienia
pstrąga z użyciem
katetera



Pobieranie mleczka przy
pomocy strzykawki

Etapy kriokonserwacji nasienia ryb

II. Ocena jakości mleczka

MAKROSKOPOWA

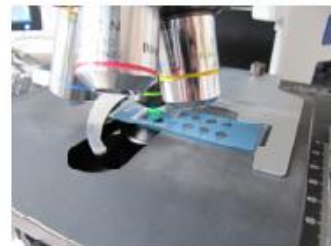
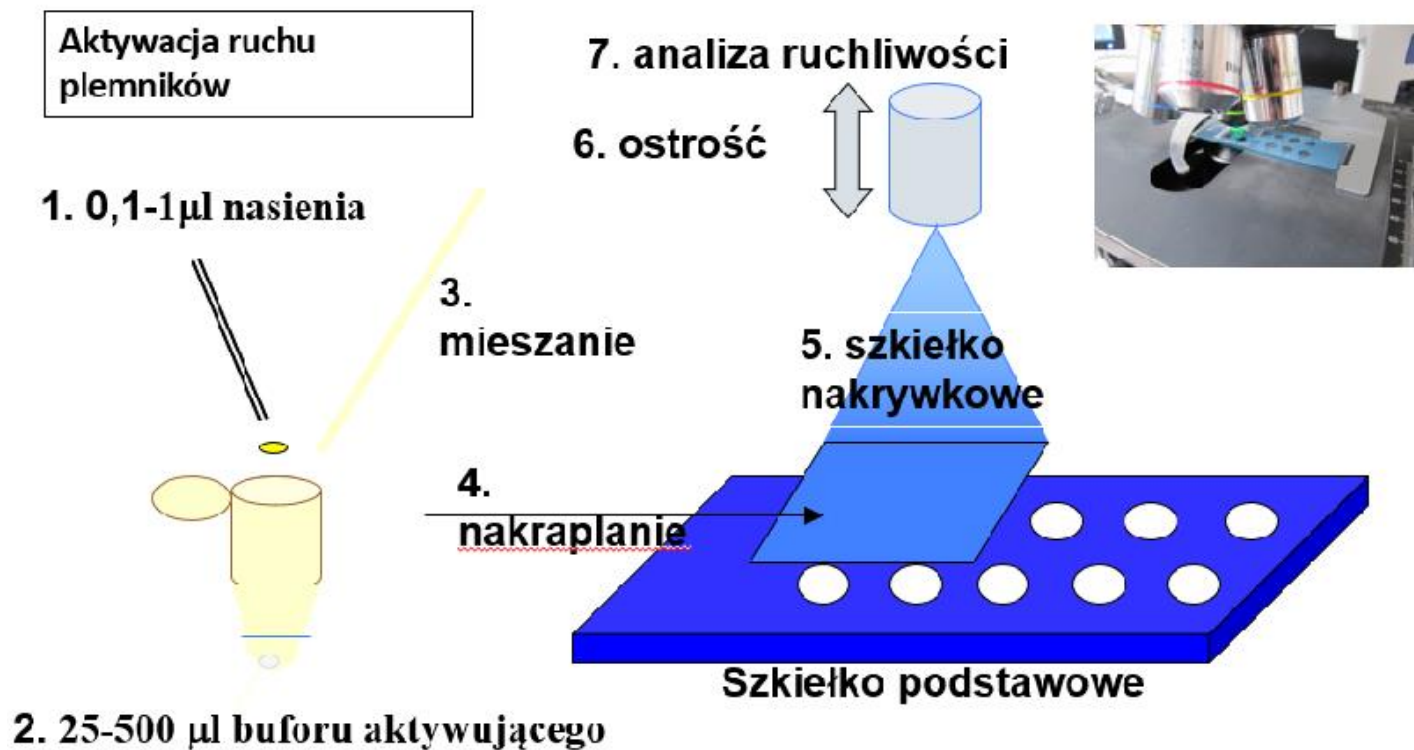
- objętość
- barwa
- jednorodność
- brak zanieczyszczeń
- wizualna gęstość

MIKROSKOPOWA

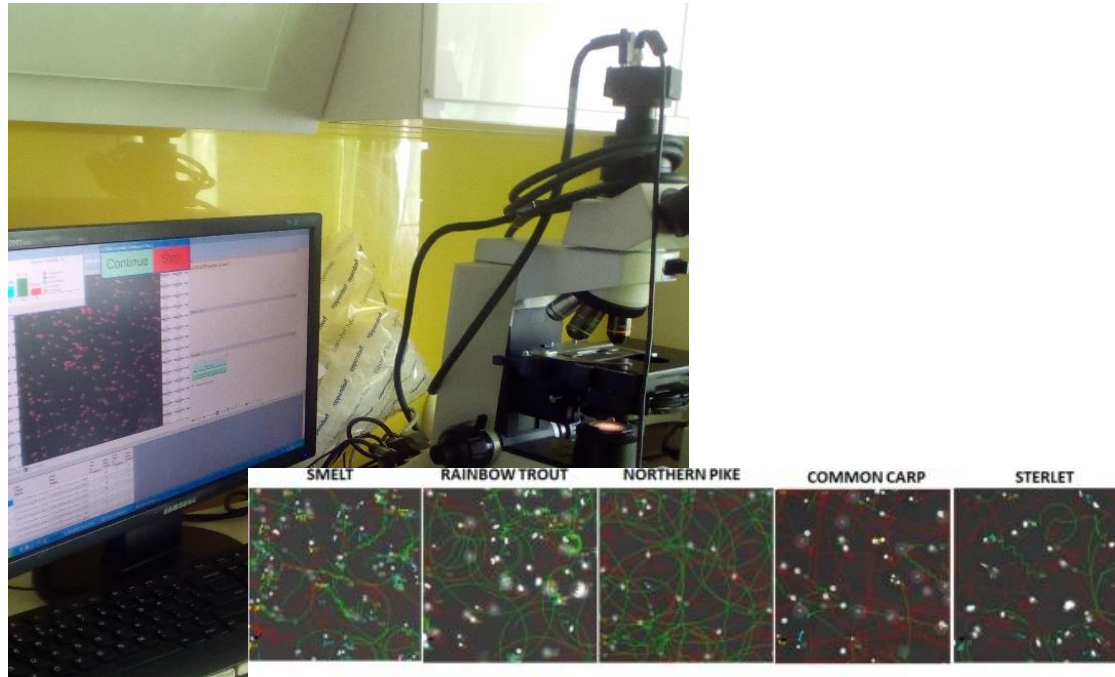
- **koncentracja plemników**
- **odsetek plemników o prawidłowym ruchu**
- odsetek plemników uszkodzonych (barwienie live-dead)
- **parametry ruchu plemników (system CASA)**
- analiza komet (defragmentacja DNA)

II. Ocena jakości mleczka - systemy do badania ruchliwości plemników i parametrów kinetycznych plemników

Metoda subiektywna – mikroskop świetlny

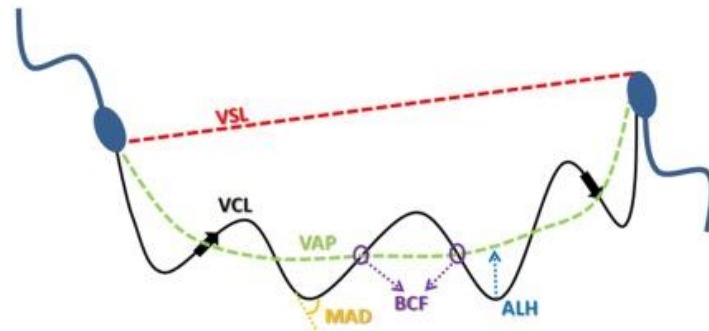


II. Ocena jakości mleczka – komputerowy system analizy ruchu plemników (CASA)

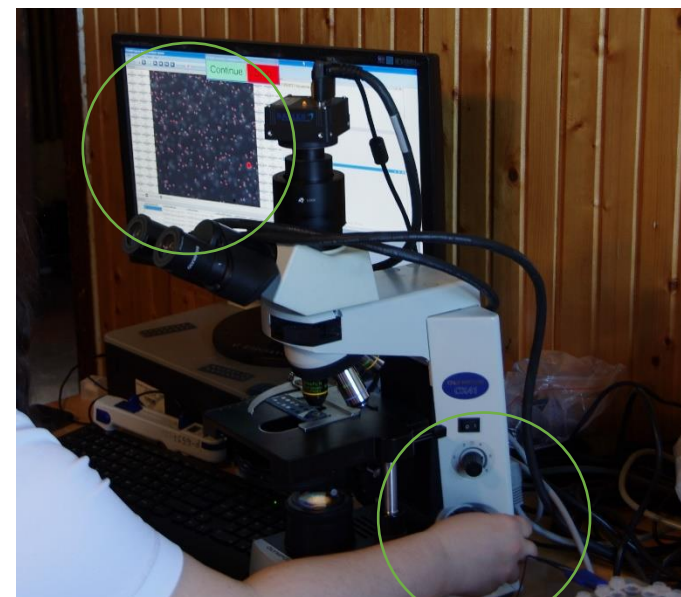
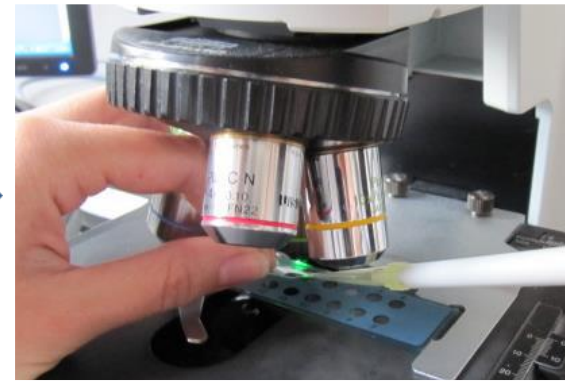


Wybrane parametry:

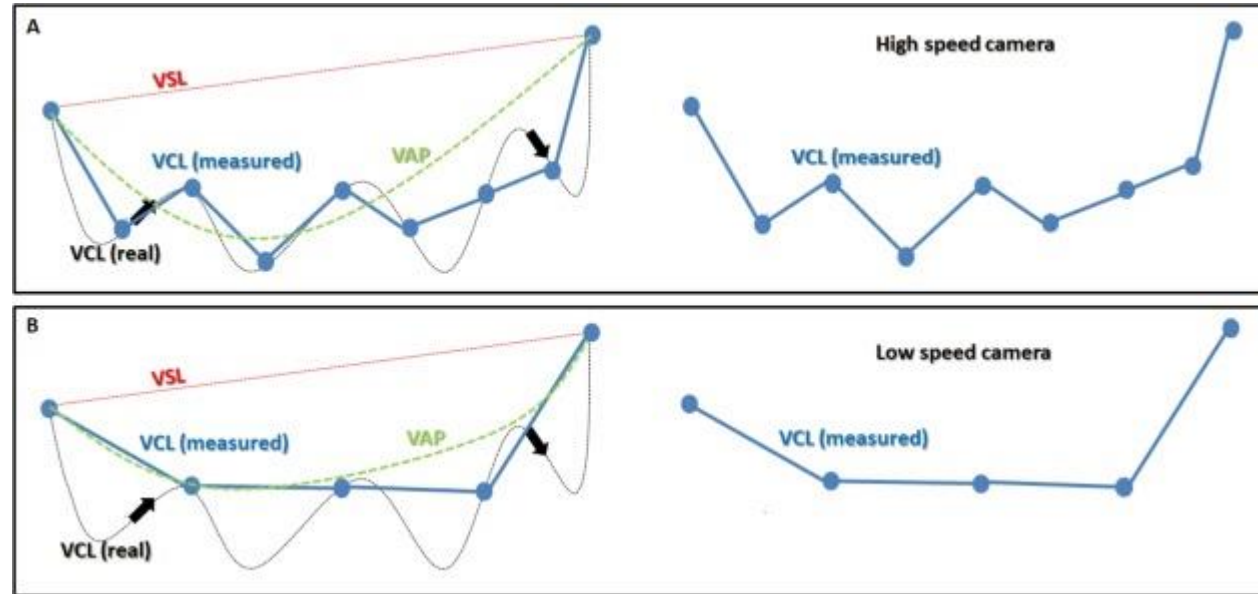
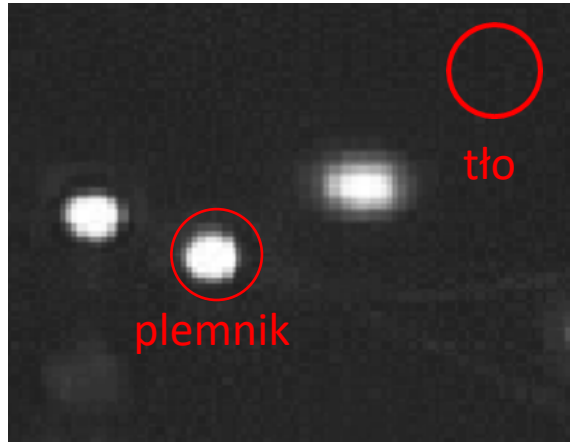
- **MOT (%)**: odsetek plemników ruchliwych
- **PRG (%)**: odsetek plemników o ruchu progresywnym
- **VAP ($\mu\text{m/s}$)**: średnia prędkość plemnika
- **VCL ($\mu\text{m/s}$)**: krzywoliniowa prędkość plemnika
- **VSL ($\mu\text{m/s}$)**: prostoliniowa prędkość plemnika
- **ALH (μm)**: amplituda bocznych wychyleń główki
- **BCF (Hz)**: częstotliwość uderzeń wtyki
- **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



II. Ocena jakości mlecza – komputerowy system analizy ruchu plemników (CASA)



II. Ocena jakości mlecza – 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

II. Ocena jakości mlecza – koncentracja plemników



Systemy cytometryczne

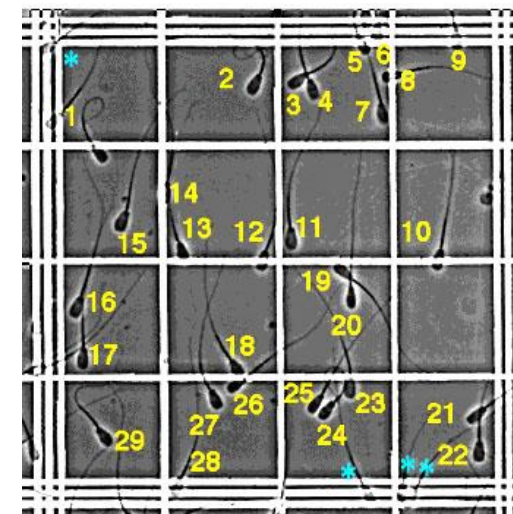
(cyto- komórka, -metr przyrząd do mierzenia)

Koncentracja plemników – cecha gatunkowa



Metoda subiektywna – komory hemocytometryczne

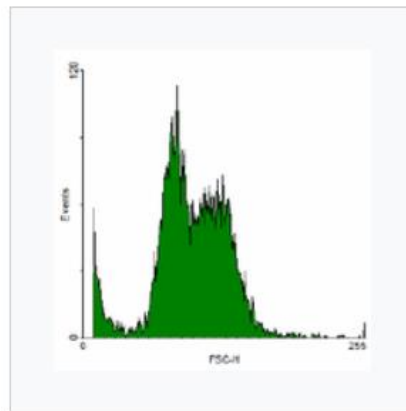
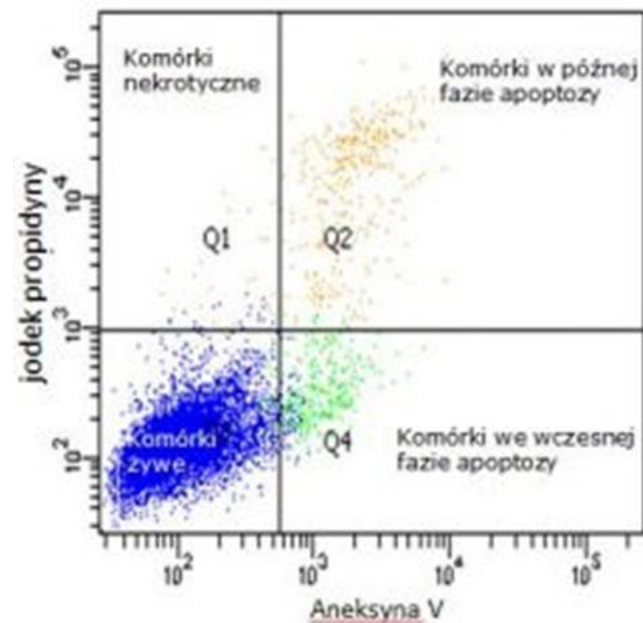
- tania
- czasochłonna
- brak możliwości precyzyjnego zliczania
- dokładne mieszanie – kluczowe



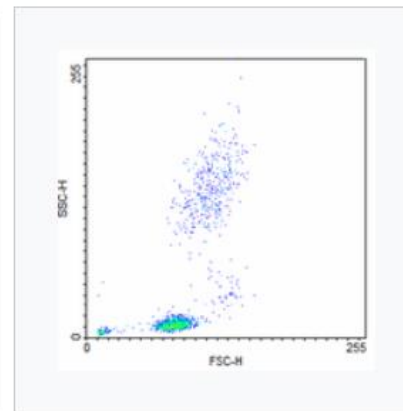
II. Ocena jakości mlecza – systemy cytometryczne

Cytometr przepływowy:

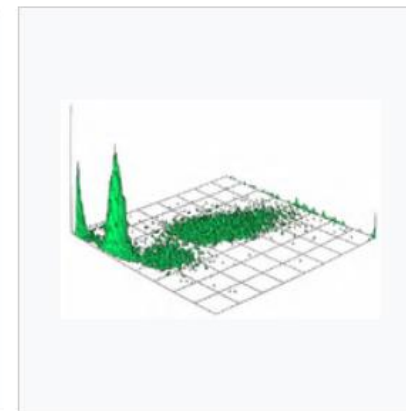
- Koncentracja
- Żywotność plemników
- Stabilność błon komórkowych



Histogram



Wykres rozproszenia



Histogram trójwymiarowy

Etapy kriokonserwacji nasienia ryb

III. Rozrzedzanie mleczka

- dobór rozcieńczalnika i stopień rozrzedzenia
- dobór krioprotektora
- warunki rozrzedzenia

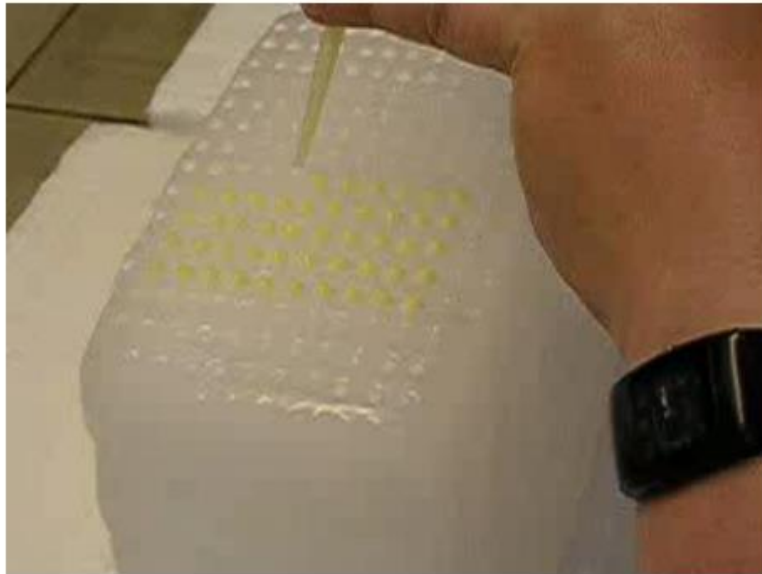
Wybrane rozrzedzalniki stosowane do mrożenia nasienia ryb łososiowatych:

- 0,6 M sacharoza + 10% DMSO
- 0,3 M glukoza + 10% żółtko + 20% glicerol
- 0,3 M glukoza + 10% żółtko + 10% metanol
- 0,2 M glukoza + 10% metanol



Etapy kriokonserwacji nasienia ryb

IV. Kriokonserwacja – na suchym lodzie



Przygotowanie kulek rozcieńczonego nasienia na kostkach suchego lodu

5 minut



Zsypywanie kulek zamrożonego na suchym lodzie nasienia do pojemnika zanurzonego w ciekłym azocie

Etapy kriokonserwacji nasienia ryb

IV. Kriokonserwacja – w parach azotu



3-6 minut

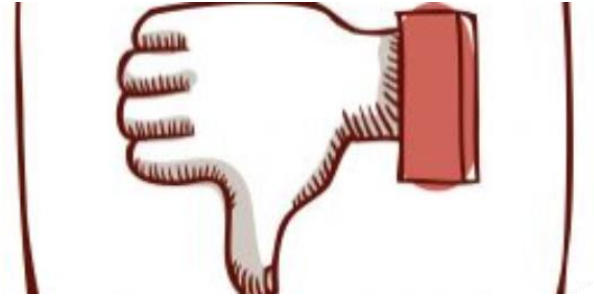


Etapy kriokonserwacji nasienia ryb

V. Przechowywanie nasienia – Bank Nasienia



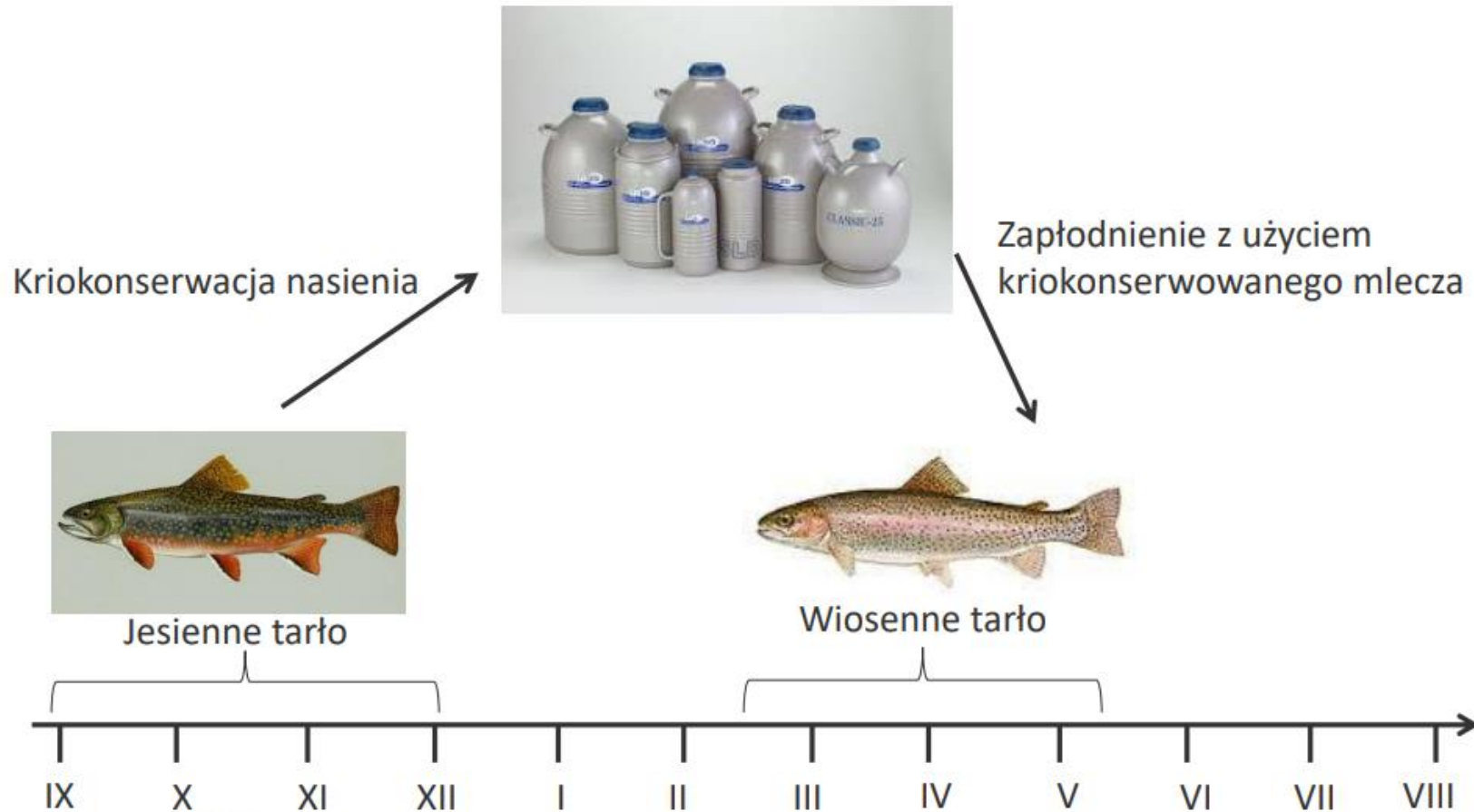
Perspektywy i ograniczenia



- ❖ Możliwość ochrony genomu gatunków/linii ryb zagrożonych
- ❖ Możliwość krzyżowania gatunków, które w naturze rozradzają się w innych terminach
- ❖ Transport nasienia praktycznie na każdą odległość (taniej i mniej ryzykowne niż transport tarlaków).
- ❖ Możliwość użycia nasienia w dowolnym czasie i miejscu, dostęp do mleczka przez cały rok.
- ❖ W pracach selekcyjnych możliwość sprawdzenia skuteczności selekcji poprzez użycie przechowywanego mleczka osobników wyjściowych.

- ❖ Kosztochłonność
- ❖ Konieczność posiadania specjalistycznego sprzętu i wiedzy
- ❖ Brak technologii pozwalającej na masowe zapładnianie ikry ryb nasieniem kriokonserwowanym

Przykład zastosowania – produkcja krzyżówek





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. Agnieszka Brzyszc
a.brzyszc@pan.olsztyn.pl