

Beata Irena Cejko<sup>1</sup>, Jan Glogowski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

<sup>2</sup>Katedra Ichtiologii, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, UWM w Olsztynie

## Charakterystyka porównawcza wybranych parametrów jakości mlecza czterech linii hodowlanych karpia *Cyprinus carpio* L.

### Wstęp

Karp *Cyprinus carpio* L. należy do ryb karpiowatych (Cyprinidae), najbardziej znanej i najliczniejszej pod względem liczby gatunków rodziny ryb słodkowodnych (Nelson 1994). Zaliczany jest do gatunków najwcześniej udomowionych, o czym świadczy obecnie szeroki zasięg występowania, obecność jego licznych podgatunków, lokalnych ras oraz linii hodowlanych (Bryliński 2000). Jest on głównym obiektem hodowlanym zarówno w Europie, jak i na świecie, będąc tym samym gatunkiem modelowym stale rozwijającej się akwakultury. Obecnie liczne rozwiązania biotechnologiczne pozwalają na doskonalenie metod hodowli zwierząt, w tym ryb, oraz umożliwiają wzrost ich produkcji w akwakulturze. Jednym ze sposobów zachowania istniejących zasobów genetycznych jest tworzenie banku genów, gdzie zgromadzony materiał (najczęściej w postaci zamrożonego nasienia) może służyć przyszłym pracom, mającym na celu odtworzenie gatunku lub zwiększenie puli genowej istniejących już populacji. Bank genów funkcjonuje w Polsce od dawna w Zakładzie Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej (ZliGR) PAN w Gołyszach, gdzie zgromadzony jest unikatowy zbiór linii hodowlanych, pochodzących z geograficznie odmiennych regionów Europy, a które ze względu na swoją wysoką wartość użytkową objęte były przez wiele lat programem ochrony zasobów genetycznych (Białowas 2003).

Linie hodowlane przeznacza się do produkcji karpia towarowego, tworząc krzyżówki dwulinowe. Wykorzystuje się w tym wypadku wystąpienie dodatniego efektu heterozji, pod względem istotnych cech gospodarczych, tj. przeżywalności i tempa wzrostu (Białowas 2008). Efektywność rozrodu takich krzyżówek, mierzona odsetkiem samic przystępujących do rozrodu oraz odsetkiem zapłodnienia ikry i żywych zarodków, nie odbiega istotnie od wyników uzyskanych od linii „czystych” (Brzuska i Grzywaczewski 1999, Brzuska i Białowas 2002). Taki materiał obsadowy cechuje również wyrównany fenotyp, co jest korzystne ze względu na ograniczenie czasochłonnych i pracochłonnych zabiegów związanych z sortowaniem narybku.

Spśród linii hodowlanych należących do ZliGR PAN w Gołyszach wysoką wartością użytkową cechują się przede

wszystkim linie polskie i węgierskie, w tym linia polska nr 6 i linia węgierska W. Karpie tych linii posiadają ustabilizowany fenotyp, wykształcony w wyniku wieloletniej selekcji i trafiający w oczekiwania konsumentów ryb. Linie te dają dobre wyniki produkcyjne w warunkach hodowli stawowej, dlatego wykorzystywane były w pierwszej kolejności do krzyżowań towarowych. Otrzymany w ten sposób materiał obsadowy cechuje pożądaný typ ułuszczenia, wygrzbiecienia oraz wysoka przeżywalność. Zaletą ryb należących do tych linii jest również łatwość, z jaką przystępują do rozrodu zarówno w warunkach naturalnych, jak i kontrolowanych (Białowas 2003), a do owulacji dochodzi zarówno po hypofizacji, jak i po stymulacji samic za pomocą związków syntetycznych (Brzuska 2000, 2003, 2005).

Karpie linii litewskiej bubiaiskiej B jako jedyne uniknęły przymusowej akcji krzyżowania lokalnych ras i odmian z sazanem amurskim, przeprowadzonej w latach 50. XX wieku na terenie byłego ZSRR, co doprowadziło do zaniku ich form pierwotnych. Na początku lat 60. XX wieku, po przeprowadzeniu inwentaryzacji w gospodarstwach karpiowych, linia bubiaiska została przyjęta jako materiał wyjściowy do przyszłych prac selekcyjnych na terenie Litwy (Białowas 2003). U samic tej linii nie obserwuje się trudności w przystępowaniu do tarła w warunkach kontrolowanych, a do stymulowania owulacji stosowano homogenat przysadki mózgowej karpia oraz syntetyczne analogi gonadoliberynu, tj. Ovopel, Aquaspawn czy Lecirelin (Brzuska 2001, 2006). Linia ukraińska Ur charakteryzuje się dobrymi wynikami produkcyjnymi w warunkach polskich gospodarstw stawowych, a do chwili obecnej przetestowano kilka krzyżówek powstałych z jej udziałem. W przypadku karpia litewskich i ukraińskich szczególną wartością stanowi również fakt, że linie te powstały w wyniku wieloletnich prac selekcyjnych, dzięki czemu cechują się wysokim tempem wzrostu i odpornością na niekorzystne warunki środowiskowe (Białowas 2003).

Charakterystyka genetyczna linii polskich i węgierskich opisana została przez Imazarowa i Białowas (1994, 1995), natomiast zagadnienia dotyczące efektywności rozrodu samic po stymulowaniu owulacji preparatami pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego zawarte są w licznych

opracowaniach Brzuskiej (2000, 2001, 2003, 2005, 2006). Nie analizowano dotychczas jakości mleczka samców karpia z uwzględnieniem ich przynależności do określonych linii, choć badania przeprowadzone przez Wojtczak i in. (2003) wskazują na istnienie takich różnic. Analiza jakości mleczka (ruchliwość plemników i koncentracja), uwzględniająca parametry biochemiczne plazmy nasienia, pozwala na szczegółową jego charakterystykę, co w konsekwencji umożliwia wybór prób o najlepszej jakości. Stanowi to cenną informację, ponieważ tylko mlecz o najlepszych parametrach przeznaczają się do zapłodnienia ikry, krótkookresowego jego przechowywania lub kriokonserwacji.

Wysoka wartość użytkowa linii polskiej nr 6, węgierskiej W, litewskiej bubiaiskiej B i ukraińskiej ramowej Ur oraz fakt, że przez wiele lat objęte były one programem ochrony zasobów genetycznych sprawił, że podjęto prace mające na celu porównanie jakości ich mleczka. Celem nadrzędnym badań było wykazanie, czy mlecz samców należących do różnych linii hodowlanych różni się pod względem ruchliwości i koncentracji plemników, zawartości białka ogólnego w plazmie nasienia, osmolalności plazmy nasienia i pod względem aktywności wybranych białek enzymatycznych, tj. fosfatazy kwaśnej (AcP), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz aktywności antyproteolitycznej (APA).

## **Materiały i metodyka**

### **Pochodzenie ryb, stymulacja hormonalna oraz pozyskiwanie mleczka**

Samce wszystkich badanych linii odłowiono ze stawów ziemnych ZliGR PAN w Gołyszku na początku sezonu rozrodczego, tj. w maju 2007 roku, kiedy temperatura wody osiągnęła 18°C. Oznakowane ryby (wymrożony ciekłym azotem symbol linii i numer identyfikacyjny) przewożono tego samego dnia do wylęgarni, gdzie umieszczono je w basenach o pojemności 3 m<sup>3</sup> w temperaturze wody 20-21°C. Były to samce 4-6-letnie należące do linii litewskiej bubiaiskiej B (n = 12), węgierskiej W (n = 16), ukraińskiej ramowej Ur (n = 16) oraz polskiej nr 6 (n = 14). Stymulację hormonalną przeprowadzono po dwóch dniach adaptacji stosując Ovopel [(D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup> NEt)-mGnRH + metoklopramid] (Horváth i in. 1997). Rybom aplikowano jedнокrotną dawkę preparatu w iniekcji dootrzewnowej w ilości 1 granulka/kg m.c. Mlecz pobierano poprzez masaż partii brzusznych po 24 godzinach od iniekcji, zwracając uwagę, aby jego prób nie zanieczyścić moczem, fekaliami czy krwią. Podczas manipulacji samce usypiano stosując 2-fenoksytanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) w ilości 0,5 ml/l wody.

### **Oznaczenie ruchliwości i koncentracji plemników w mleczu**

Bezpośrednio po pozyskaniu mleczka zbadano ruchliwość plemników. Wykorzystano do tego celu metodę subiektywną stosując mikroskop świetlny i powiększenie

400x. Do aktywacji ruchu plemników użyto roztworu Woynarowicza (Woynarovich i Woynarovich 1980) z dodatkiem 0,5% albuminy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a oznaczoną wartość ruchliwości podano z dokładnością do 10% (Glogowski i Cejko 2008). Po rozrzedzeniu mleczka 0,7% NaCl w stosunku 1:2000 oznaczono koncentrację plemników w oparciu o metodę opisaną przez Ciereszkę i Dąbrowskiego (1993). Absorbancję badanych prób mierzono na spektrofotometrze Beckman DU-640 (Analytical Instruments, LLS, USA) przy  $\lambda = 530$  nm. Wyniki pomiaru absorbancji podstawiono następnie do wzoru krzywej wzorcowej, sporządzonej wcześniej dla karpia z wykorzystaniem komory Bürkera (metoda cytometryczna) (Bielański 1979) i odczytano wartość koncentracji plemników.

### **Oznaczenie zawartości białka ogólnego oraz ciśnienia osmotycznego plazmy nasienia**

W celu pozyskania plazmy nasienia mlecz wirowano przez 10 minut, po czym otrzymaną plazmę nasienia zdekantowano do probówek i przechowywano do czasu rozpoczęcia analiz w temperaturze minus 80°C. Osmolalność plazmy nasienia (mOsm/kg) mierzono za pomocą aparatu Vapor Pressure Osmometer 5520 (WESCOR, Logan, UT, USA), natomiast stężenie białka ogólnego w plazmie nasienia oznaczono metodą Lowry i in. (1951).

### **Określenie aktywności wybranych białek enzymatycznych plazmy nasienia**

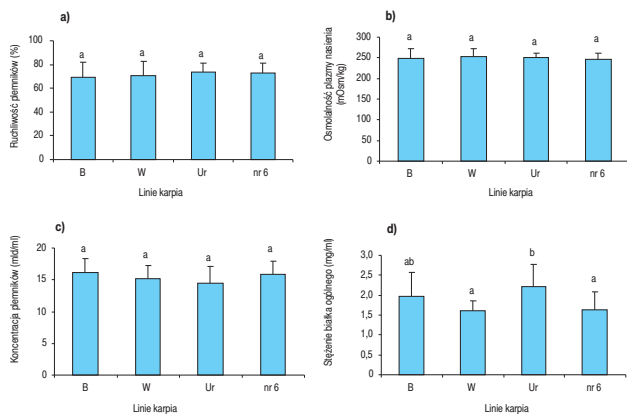
Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oznaczono metodą Vassault (1983), natomiast aktywność fosfatazy kwaśnej (AcP) metodą Bessey i in. (1946). Pomiaru aktywności antyproteolitycznej (APA) dokonano za pomocą spektrofotometru Beckman DU 640 (Analytical Instruments, LLS, USA), wykonując pomiar aktywności amidazowej trypsyny dorszowej (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) zgodnie z metodą opisaną przez Ciereszkę i in. (1996). Wyniki pomiaru aktywności wybranych białek enzymatycznych podano w U/l.

### **Analiza statystyczna**

Zebrane dane, skategoryzowane według przynależności samców do badanej linii hodowlanej, charakteryzowano za pomocą średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego ( $\pm$  SD). W celu wykazania zależności między analizowanymi parametrami mleczka w obrębie każdej linii przeprowadzono korelację prostoliniową Pearsona. Istotność różnic między liniami dla analizowanego parametru weryfikowano stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test post-hoc Tukeya ( $P < 0,05$ ). Wszystkie analizy przeprowadzono wykorzystując program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA).

## **Wyniki**

Średni odsetek ruchliwych plemników w mleczu karpia badanych linii kształtował się na wysokim poziomie



Rys. 1. Wartości ruchliwości plemników (a), osmolalności plazmy nasienia (b), koncentracji plemników w mleczu (c) oraz stężenia białka ogólnego w plazmie nasienia (d) samców czterech linii hodowlanych karpia *Cyprinus carpio* L.

(70-80%), nie różniąc się między sobą istotnie ( $P > 0,05$ ). Koncentracja plemników była zbliżona i przyjmowała wartości od 14 mld/ml dla ryb linii Ur do 16 mld/ml dla ryb linii B, a oszacowane wartości nie różniły się istotnie ( $P > 0,05$ ) (rys. 1). Najwyższą zawartość białka ogólnego stwierdzono w plazmie nasienia samców linii Ur (2,2 mg/ml), natomiast najniższą w plazmie samców linii W (1,6 mg/ml). Istotne różnice między liniami dla tego parametru jakości mlecza stwierdzono między linią Ur a linią W ( $P < 0,001$ ) oraz linią nr 6 ( $P < 0,05$ ). W obrębie wszystkich badanych linii osmolalność plazmy nasienia utrzymywała się na zbliżonym poziomie, tj. około 250 mOsm/kg (różnice nieistotne,  $P > 0,05$ ) (rys. 1).

Najwyższą aktywność LDH stwierdzono w plazmie nasienia samców linii B, natomiast najniższą w plazmie samców linii W (tab. 1). Aktywność AcP w plazmie samców linii B, W i nr 6 kształtowała się na zbliżonym poziomie, natomiast wyższą aktywność tego białka stwierdzono w plazmie samców linii Ur (5,9 U/l). Podobnie jak w wypadku aktywności LDH, różnice w aktywności tego białka nie były między badanymi liniami istotne ( $P > 0,05$ ). Średnie wartości aktywności APA, oznaczone dla samców czterech linii hodowlanych, mieściły się w szerokim zakresie, tj. od 370,3 U/l dla linii W do 536,7 U/l dla linii Ur. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic między wartościami dla tego parametru między badanymi liniami karpia ( $P > 0,05$ ).

TABELA 1

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH), fosfatazy kwasnej (AcP) oraz ogólna aktywność antyproteolityczna (APA) w plazmie nasienia samców czterech linii hodowlanych karpia *Cyprinus carpio* L. ( $P > 0,05$ )

Linie karpia	LDH (U/l)	AcP (U/l)	APA (U/l)
B	229,5±48,9	4,2±2,2	448,2±110,2
W	176,7±55,6	4,6±2,0	370,3±158,6
Ur	210,9±80,07	5,9±3,05	536,7±220,7
nr 6	226,6±105,1	4,4±1,9	397,1±171,5

Wysokie współczynniki korelacji dla samców linii B stwierdzono między ruchliwością plemników a osmolalno-

ścią, stężeniem białka ogólnego oraz aktywnością LDH ( $P < 0,05$ ) w plazmie nasienia, jak również między stężeniem białka a aktywnością LDH ( $P < 0,01$ ) (tab. 2). Dla samców linii W, istotną korelację stwierdzono między stężeniem białka a osmolalnością plazmy nasienia ( $P < 0,01$ ) oraz aktywnością LDH ( $P < 0,01$ ), jak również między osmolalnością a aktywnością AcP ( $P < 0,05$ ), gdzie korelacja była ujemna (tab. 3). Istotną zależność dla samców linii Ur wykazano między aktywnością APA a koncentracją plemników w mleczu ( $P < 0,05$ ), stężeniem białka ( $P < 0,001$ ) oraz aktywnością LDH ( $P < 0,01$ ) oraz między aktywnością LDH a stężeniem białka ( $P < 0,01$ ) (tab. 4). Dla samców linii nr 6 jedynie w dwóch przypadkach korelacja była istotna, stwierdzono ją między ruchliwością a koncentracją plemników w mleczu ( $P < 0,05$ ) oraz między stężeniem białka a aktywnością APA ( $P < 0,01$ ) (tab. 5).

TABELA 2

Wartości współczynników korelacji Pearsona (R) między analizowanymi parametrami mlecza samców linii litewskiej B ( $n = 12$ ) (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ )

	Ruchliwość	Koncentracja	Osmolalność	Białko	APA	AcP	LDH
Ruchliwość	-						
Koncentracja	0,018	-					
Osmolalność	0,577*	0,213	-				
Białko	0,667*	0,141	0,398	-			
APA	0,246	0,139	0,475	0,526	-		
AcP	0,306	0,378	0,221	0,362	0,041	-	
LDH	0,617*	0,248	0,206	0,720**	0,185	0,517	-

TABELA 3

Wartości współczynników korelacji Pearsona między analizowanymi parametrami mlecza samców linii węgierskiej W ( $n = 16$ )(\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ )

	Ruchliwość	Koncentracja	Osmolalność	Białko	APA	AcP	LDH
Ruchliwość	-						
Koncentracja	0,304	-					
Osmolalność	0,250	0,094	-				
Białko	0,090	0,386	0,639**	-			
APA	0,120	0,041	0,287	0,365	-		
AcP	0,131	0,368	-0,528*	-0,031	0,261	-	
LDH	0,179	0,381	0,208	0,543*	0,197	0,243	-

TABELA 4

Wartości współczynników korelacji Pearsona między analizowanymi parametrami mlecza samców linii ukraińskiej Ur ( $n = 14$ ) (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ )

	Ruchliwość	Koncentracja	Osmolalność	Białko	APA	AcP	LDH
Ruchliwość	-						
Koncentracja	-0,442	-					
Osmolalność	0,442	-0,395	-				
Białko	0,209	0,284	0,167	-			
APA	-0,038	0,534*	-0,224	0,862***	-		
AcP	-0,022	0,113	-0,118	0,495	0,483	-	
LDH	-0,145	0,305	-0,148	0,744**	0,783***	0,249	-

TABELA 5

Wartości współczynników korelacji Pearsona między analizowanymi parametrami mlecza samców linii polskiej nr 6 (n = 16) (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01)

	Ruchliwość	Koncentracja	Osmolalność	Białko	APA	AcP	LDH
Ruchliwość	-						
Koncentracja	0,555*	-					
Osmolalność	0,172	0,254	-				
Białko	0,242	0,023	0,127	-			
APA	0,175	-0,098	-0,452	0,667**	-		
AcP	0,01	0,309	0,415	0,041	-0,165	-	
LDH	0,48	0,103	-0,119	0,257	0,208	0,239	-

## Dyskusja

Koncentracja plemników w mleczu karpia mieści się w granicach 16,0-18,0 mld/ml (Sikra i Linhart 1987, Rurangwa i in. 2002), choć w literaturze notowane są także inne wartości (Christ i in. 1996). Wśród badanych najbardziej podobnymi pod względem koncentracji okazały się linia W i linia nr 6, a więc linie, których historia selekcji sięga lat 50. XX wieku (Białowąs 2003). Pochodzenie samców linii B i Ur jest inne niż linii polskich, ale brak istotnych różnic w koncentracji plemników między badanymi liniami może sugerować, że ten parametr jakości mlecza determinowany jest przede wszystkim gatunkowo. Potwierdzeniem tego mogą być badania Białowąsa (2008), w których koncentracja plemników w mleczu samców linii francuskiej F nie różniła się istotnie od wartości stwierdzonej dla samców linii polskiej nr 6 czy węgierskiej W.

Istotna korelacja stwierdzona między ruchliwością a osmolalnością plazmy nasienia samców linii B wskazuje na wyraźny wpływ ciśnienia osmotycznego na ruchliwość plemników w mleczu tych ryb. Być może wskazuje to także na zanieczyszczenie pobranego mlecza moczem, do jakiego może dojść podczas tradycyjnej metody wycierania tarłaków karpia (Perchec i in. 1995). Odsetek ruchliwych plemników oznaczony w mleczu samców wszystkich linii kształtował się jednak na wysokim poziomie (70-80%), dlatego nie wydaje się, aby doszło do zanieczyszczenia pobranego mlecza moczem.

Rola białek plazmy nasienia nie jest dobrze poznana, ale niektóre badania wskazują, że mogą one pełnić funkcję ochronną, polegającą na utrzymywaniu optymalnego składu lipidów błon komórkowych plemników w trakcie ich przechowywania w nasieniowodach (lipoproteiny) czy zabezpieczeniu gamet męskich przed atakiem proteolitycznym (antyproteinyazy) (Loir i in. 1990). Stężenie białka w plazmie nasienia karpia obniża się wraz z upływem czasu w sezonie rozrodczym, co stwierdzono u samców karpia koi oraz karpia linii jugosłowiańskiej J, linii zatorskiej Z oraz linii węgierskiej (Wojtczak i in. 2003). Wraz z upływem czasu w sezonie rozrodczym obserwuje się u karpia nie tylko obniżenie zawartości białka ogólnego, ale również spadek aktywności APA. Dla samców linii węgierskiej wartości APA

w szczycie sezonu tarłowego kształtowały się na poziomie 523,3 U/l, natomiast po jego zakończeniu obniżyły się do wartości 403,1 U/l (Wojtczak i in. 2003). Obserwowane zmiany spowodowane były najprawdopodobniej zjawiskiem starzenia się plemników po zakończonym sezonie tarłowym, co charakterystyczne jest dla gatunków z cyklicznością procesu rozrodu. Obniżenie aktywności APA może wskazywać na udział proteinaz w degradacji plemników, które najprawdopodobniej ma miejsce po zakończeniu sezonu tarłowego. Co ciekawe, w naszych badaniach aktywność APA oznaczona w sezonie tarłowym była zdecydowanie niższa dla ryb linii W niż wartości prezentowane przez Wojtczak i in. (2003). Cytowani przez nas autorzy nie sprecyzowali pochodzenia samców, których mlecz analizowano, dlatego przypuszczamy, że nie pochodził on od samców linii W, a od innej linii węgierskiej będącej w posiadaniu ZliGR PAN w Gołyszcu (Białowąs 2003).

Stosunkowo ubogie są informacje dotyczące enzymologii nasienia ryb, dlatego charakterystyka mlecza wzbogacona o aktywność enzymów, obok wartości poznawczej dostarcza także informacji na temat funkcjonowania układu rozrodczego ryb, czy zdolności plemników do zapłodnienia. Źródłem enzymów mogą być plemniki, dlatego oznaczenie ich aktywności w plazmie nasienia dostarcza wiedzy na temat stabilności błon komórkowych gamet męskich. Odgrywa to istotną rolę m.in. przy analizie skuteczności metod głębokiego mrożenia mlecza. W związku z tym, że brak jest danych na temat aktywności LDH czy AcP w plazmie nasienia karpia różnych linii hodowlanych, prezentowane dane mają charakter informacyjny.

Wyniki przedstawionych badań wskazują na brak różnic w podstawowych parametrach jakości mlecza, tj. ruchliwości, koncentracji plemników w mleczu oraz osmolalności plazmy nasienia między samcami linii B, W, Ur i nr 6. Również aktywność AcP, LDH i APA w plazmie nasienia samców badanych linii kształtowała się na zbliżonym poziomie, nie różniąc się istotnie. Wysokie współczynniki korelacji między APA a stężeniem białka w plazmie nasienia samców linii Ur i nr 6 mogą natomiast wskazywać, że główną frakcją białkową w plazmie nasienia samców badanych przez nas karpia są białka pełniące funkcję protekcyjną. Dane literaturowe (Wojtczak i in. 2003) oraz nasze obserwacje pozwalają przypuszczać, że stężenie białka ogólnego w plazmie nasienia może być determinowane pochodzeniem samców badanych linii. Być może zaobserwowane różnice wynikają z odmiennej aktywności enzymów proteolitycznych obecnych w plazmie nasienia badanych przez nas linii karpia.

W ostatnim czasie dokonano charakterystyki aktywności proteolitycznej i aktywności trypsyny, wskazując na związek aktywności inhibitorów z zawartością białka ogólnego w plazmie nasienia karpia (Kowalski i in. 2003, Wojtczak i in. 2003). Rola i funkcja proteinaz nie jest do końca wyjaśniona, ale ich obecność zapewnia prawidłowe funkcjonowanie układu rozrodczego, umożliwiając plemnikom wzrost, rozwój i nabywanie przez nie zdolności do ruchu.

Wyjaśnienie funkcji proteinaz plazmy nasienia karpia wymaga zatem podjęcia dalszych badań.

## Podziękowania

Dyrektorowi Zakładu Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej PAN w Gołyszach, Panu doc. dr. hab. Andrzejowi Pilarczykowi za udostępnienie materiału do badań oraz Panu dr. Ilgizowi Ilnazarow za pomoc w trakcie prowadzonych badań.

## Literatura

- Bessey O.L.A., Lowry O.H., Brock M.J.Z. 1946 – A method of the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum – J. Biol. Chem. 164: 321-325.
- Białowąs H. 2003 – Selekcja ryb – W: Rybactwo stawowe w stawach karpio- wych, urządzeniach przemysłowych oraz małych zbiornikach śródlądowych. (red. J. Guziur, H. Białowąs, W. Milczarewicz), Wyd. HOZA, Warszawa: 147-166.
- Białowąs H. 2008 – Efekt heterozji w rozrodzie karpia (*Cyprinus carpio*) – W: Biotechnologia w akwakulturze (red. Z. Zakęś, J. Wolnicki, K. Dem- ska-Zakęś, R. Kamiński, D. Ulkowski), Wyd. IRS, Olsztyn: 119-128.
- Bieleński W. 1979 – Rozród zwierząt, PWRiL, Warszawa: 443-446.
- Brzuska E. 2000 – Artificial spawning of carp *Cyprinus carpio* L.: differences between the effects on reproduction in females of Polish and Hunga- rian provenance treated with carp pituitary and (D-Ala<sup>6</sup>) GnRH ProN- HET (Kobarelin) – Aquacult. Res. 31: 457-465.
- Brzuska E. 2001 – Artificial spawning of carp (*Cyprinus carpio* L.): the use of Aquaspawn and carp pituitary to induce ovulation in females of Lithu- anian line B – Aquacult. Res. 32: 357-364.
- Brzuska E. 2003 – Artificial propagation of the carp (*Cyprinus carpio*): two- year reproduction results of females of Hungarian line W and Polish line 6 after ovulation stimulation with carp pituitary or mGnRH-a and dopaminergic inhibitor – Czech J. Anim. Sci. 48: 139-151.
- Brzuska E. 2005 – Artificial spawning of carp (*Cyprinus carpio* L.): differen- ces between females of Polish strain 6 and Hungarian strain W treated with carp pituitary homogenate, Ovopel or Dagin – Aquacult. Res. 36: 1015-1025.
- Brzuska E. 2006 – Artificial spawning of female Lithuanian strain B carp (*Cyprinus carpio* L.) after treatment with carp pituitary homogenate, Ovopel or [D-Tle<sup>1</sup>, ProNHET<sup>6</sup>] GnRH-a (Lecirelin) – Aquacult. Res. 37: 264-271.
- Brzuska E., Grzywaczewski R. 1999 – Artificial spawning of carp *Cyprinus carpio* L.: differences between the effects on reproduction in females of Israeli strain Dor-70 and its cross-breed treated with carp pituitary and Ovopel – Aquacult. Res. 30: 559-570.
- Brzuska E., Białowąs H. 2002 – Artificial spawning of carp, *Cyprinus carpio* (L.) – Aquacult. Res. 33: 753-765.
- Bryliński E. 2000 – Karp – W: Ryby Śródlądowe Polski (red. M. Brylińska), PWN, Warszawa: 193-200.

- Christ S.A., Toth G.P., McCarthy H.W., Torsella J.A., Smith M.K. 1996 – Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA) – J. Fish Biol. 48: 1210-1222.
- Ciereszko A., Dąbrowski K. 1993 – Estimation of sperm concentration of rain- bow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique – Aquaculture 109: 367-373.
- Ciereszko A., Liu L., Dąbrowski K. 1996 – Effects of seasonal and dietary ascorbic acid on some biochemical characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen – Fish. Physiol. Biochem. 15: 1-10.
- Glogowski J., Cejko B.I. 2008 – Podstawowe parametry i wskaźniki jakości nasienia ryb ze szczególnym uwzględnieniem karpio- watek ryb reofilnych – W: Wybrane aspekty rozrodu karpio- watek ryb reofilnych w warunkach kontrolowanych (red. A. Mamcarz, K. Targońska), Wyd. Mercurius Kaczmarek Andrzej: 81-97.
- Horváth L., Szabó T., Burke J. 1997 – Hatchery testing of GnRH analogu- e-containing pellets on ovulation in four cyprinid species – Pol. Arch. Hydrobiol. 44: 221-226.
- Ilnazarow I., Białowąs H. 1994 – Genetic characteristics of carp breeding lines at the Institute of Ichthyobiology and Aquaculture of the Polish Academy of Sciences Gołysz. 1. Polish lines – Acta Hydrobiol. 36: 125-142.
- Ilnazarow I., Białowąs H. 1995 – Genetic characteristics of carp breeding lines at the Institute of Ichthyobiology and Aquaculture of the Polish Academy of Sciences at Gołysz. 2. Hungarian lines – Acta Hydrobiol. 37: 141-151.
- Kowalski R., Wojtczak M., Glogowski J., Ciereszko A. 2003 – Gelatinolytic and anti-trypsin activities in seminal plasma of common carp: relation- ship to blond, skin mucus and spermatozoa – Aquat. Living Resour. 16: 438-444.
- Loir M., Labbe C., Maise G., Pinson A., Boulard G., Mourot B., Chambeyron F. 1990 – Proteins of seminal fluid and spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Partial characterization and variations – Fish Physiol. Biochem. 8: 485-495.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.R., Randall K.J. 1951 – Protein measu- rement with the Folin phenol-reagent – J. Biol. Chem. 193: 265-275
- Nelson 1994 – Fishes of the World. III-rd edition. Wiley, New York, pp 600.
- Perchech G.P., Cosson J., Andre F., Billard R. 1995 – Degradation of the quality of carp sperm by urine contamination during stripping – Aqu- aculture 129: 135-136.
- Rurangwa E., Biegnewska A., Stonimska E., Skorkowski E.F., Ollevier F. 2002 – Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility – Comp. Biochem. Physiol. Part C 131: 335-344.
- Sikra O., Linhart O. 1987 – The spermatocrit value as a parameter of sperm concentration in some fish – Bull. VÚRH Vodňany 2: 12-18.
- Vassault A. 1983 – Lactate dehydrogenase. UV-method with pyruvate and NADH – In: Method in enzymatic analysis (red. H.U. Bergmeyer) Ver- lag Chemie, Weinheim 13 (3): 118-126.
- Wojtczak M., Glogowski J., Kołdras M., Kucharczyk D., Ciereszko A. 2003 – Characterization of protease inhibitors of seminal plasma of cyprinids – Aquat. Liv. Res. 16: 461-465.
- Woynarovich E., Woynarovich E. 1980 – Modified technology for elimination of stickiness of common carp (*Cyprinus carpio*) eggs – Aquacult. Hung. 2: 19-21.

Przyjęto po recenzji 15.10.2010 r.

## COMPARITIVE CHARACTERIZATION OF SELECTED PARAMETERS OF MILT QUALITY IN FOUR BREEDING STRAINS OF CARP, *CYPRINUS CARPIO* L.

Beata Irena Cejko, Jan Glogowski

ABSTRACT. Values of selected parameters of milt from carp, *Cyprinus carpio* L., representing four breeding strains – the Lithuanian strain B (n = 12); the Hungarian strain W (n = 16), the Ukrainian strain Ur (n = 16), and the Polish strain 6 (n = 14) collected during the spawning season after stimulation with Ovopel (1 pellet/kg) were compared. Spermatozoa motility (%), their concentration in milt (billion/ml), total protein content in seminal plasma (mg/ml), as well as its osmolality (mOsm/kg) were determined. The activity of lactate dehydrogenase (LDH), acid phosphatase, and anti-proteolytic activity (APA) were also determined. Values obtained for the activity of the analyzed enzymes are presented in U/l. Significant differences were observed among the basic parameters of milt only in total protein content between males of the Ur and W strains (P < 0.01) and strain 6 (P < 0.05). Significant differences were not noted in the activity of LDH, AcP, or APA (P > 0.05). High correlation coefficients (R = 0.862, P < 0.001 and R = 0.667, P < 0.01) between APA activity and total protein content in the seminal plasma of males from strain 6 suggest that protective proteins might constitute the main protein fraction in the seminal plasma of these fish.

Keywords: carp strains, milt, spermatozoa motility, acid phosphatase, lactate dehydrogenase, anti-proteolytic activity