



Ryszard Kolman², Jan Glogowski¹, Mirosław Szczepkowski³, Radosław Kowalski⁴,
Beata Sarosiek⁴, Beata Cejko⁴, Grzegorz Dietrich⁴

¹Katedra Ichtiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

²Zakład Ichtiologii, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

³Zakład Hodowli Ryb Jesiotrowatych w Pieczarkach, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

⁴Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

Przebieg procesu dojrzewania i jakości mlecza jesiotra ostronosego *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell, jakość nasienia oraz próba kriokonserwacji

Wstęp

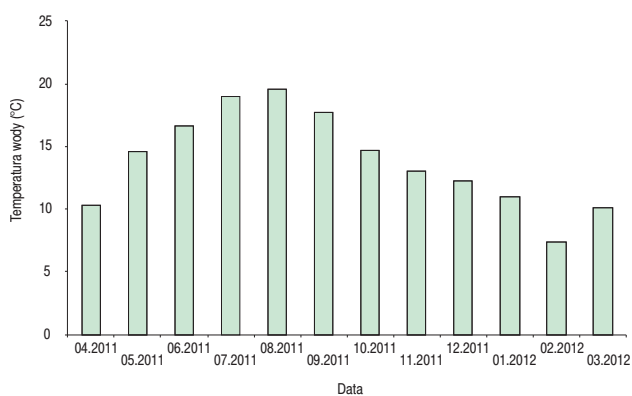
Na początku XX wieku nastąpił gwałtowny spadek liczebności bałtyckiej populacji jesiotra ostronosego *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* (Kulmatycki 1933, Berg 1948). Nie zahamowały tego procesu podejmowane działania mające na celu ochronę gatunku, takie jak: wprowadzenie wymiarów ochronnych, okresowe zakazy połowów, a od 1936 roku całkowity zakaz połowów (Rudnicki 1966). Ostatni odnotowany fakt połowu jesiotra bałtyckiego w naszych rzekach odnotowano w 1965 roku, a w Morzu Bałtyckim w 1996 i w związku z tym bałtycką populację jesiotra ostronosego uznano za utraconą (Paaver 1995, Kolman 2003). Prace przygotowawcze mające na celu restytucję jesiotra bałtyckiego rozpoczęto jeszcze w końcu lat 90. ubiegłego wieku. Jednakże w owym czasie oficjalnie uważano, że w Morzu Bałtyckim występował jesiotr zachodni *Acipenser sturio* L., chociaż istniały przesłanki o odmienności jesiotra bałtyckiego od pozostałych populacji *A. sturio* (Artiukhin i Vecsei 1999). Ostatecznych argumentów przemawiających za koniecznością zmiany statusu systematycznego jesiotra bałtyckiego dostarczyli genetycy (Ludwig i in. 2002, Stankovič i in. 2007). Stwierdzili oni jednoznacznie, że w Morzu Bałtyckim występował jesiotr ostronosy *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*, który obecnie zasiedla atlantyckie wybrzeże Kanady i na tarło wchodzi do rzek Św. Jana i Św. Wawrzyńca (Scott i Crossman 1973, Smith i Clugston 1997). Ponieważ jesiotr ostronosy w Kanadzie jest jeszcze poławiany przemysłowo, stał się dostępny materiał

wyjściowy do prac restytucyjnych. Od 2004 roku do Polski sprowadzany jest corocznie z Kanady narybek, wylęg lub zapłodniona ikra jesiotra ostronosego (Kolman i in. 2008). Z narybku w wieku 2-3 lat są tworzone kolejne roczniki stada selektów. Wybrane ryby są indywidualnie znakowane i oceniany jest ich stopień zróżnicowania genetycznego (Panagiotopoulou i in. 2012). Stada selektów chowane są w dwóch ośrodkach, w różnych warunkach: w basenach systemów z zamkniętym obiegiem wody w Zakładzie Hodowli Ryb Jesiotrowatych IRS w Pieczarkach (ZHRJ) oraz w przepływowych stawach pstrągowych z naturalną termiką w Gospodarstwie Rybackim w Kuźniczce. Najstarsze grupy selektów, z rocznika 1998 i 2002 były dwukrotnie w ciągu roku badane pod kątem zmian masy ciała i długości oraz stopnia zaawansowania dojrzałości płciowej (Kolman i in. 2012). Pierwsze oznaki dojrzewania samców stwierdzono w Gosp. Ryb. Kuźniczka w 2009 roku. Natomiast później podczas przeglądu selektów z rocznika 2002 przeprowadzanego późną jesienią 2011 roku w ZHRJ w Pieczarkach stwierdzono u kilku samców wyraźne zewnętrzne oznaki dojrzałości płciowej (Kolman i in. 2012). Od dwóch z nich, posiadających najwyraźniejszy rysunek na górnej powierzchni rostrum, pobrano trokarem próbki gonady, w których stwierdzono obecność niewielkich ilości plemników. Ryby te wytypowano do dalszych badań nad dojrzewaniem, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy.

Materiał i metody

Warunki chowu

Badane stado selektów jesiotra ostronosego zostało przewiezione do Zakładu Hodowli Ryb Jesiotrowatych w Pieczarkach w wieku 4 lat. Ryby zostały poznacone indywidualnie znaczkami PIT z kodem magnetycznym. Przez kolejne trzy lata chowano je w stawach ziemnych, a następnie przeniesiono do basenów rotacyjnych włączonych w systemy z zamkniętym obiegiem wody i pełnym jej uzdatnianiem (Kolman i in. 2012). Jakość wody podczas chowu ryb była zadowalająca, tzn. nasycenie wody tlenem nie spadało poniżej 70%, a zawartość toksycznych produktów metabolizmu ryb nie przekraczała wartości uznanych za dopuszczalne dla ryb jesiotrowatych (Kolman 2010).



Rys. 1. Zmiany temperatury wody w basenie z selektami jesiotra ostronosego w sezonie 2011-2012.

Podczas chowu selekty karmiono paszą Vitalis (Skretting) przeznaczoną dla tarlaków ryb łososiowatych o wartości energii strawnej 17,1 MJ/kg, zawierającą 44% białka oraz 16% tłuszczu. Dobowa dawka paszy zmieniała się w zależności od temperatury wody i wynosiła od 0,1 do 0,4% masy ciała ryb w okresie wiosenno-letnim i od 0,03 do 0,15% w sezonie jesienno-zimowym. Pasza była podawana za pomocą karmników taśmowych w sposób ciągły, przez 12 godzin, począwszy od godziny 19.00.

Temperatura wody w ciągu roku zmieniała się w sposób łagodny w zależności od temperatur zewnętrznych. W okresie poprzedzającym końcową fazę dojrzewania samców w okresie zimowym wynosiła ona średnio ok. 10°C, natomiast latem nie przekraczała 20°C (rys. 1).

Stymulacja końcowego dojrzewania samców

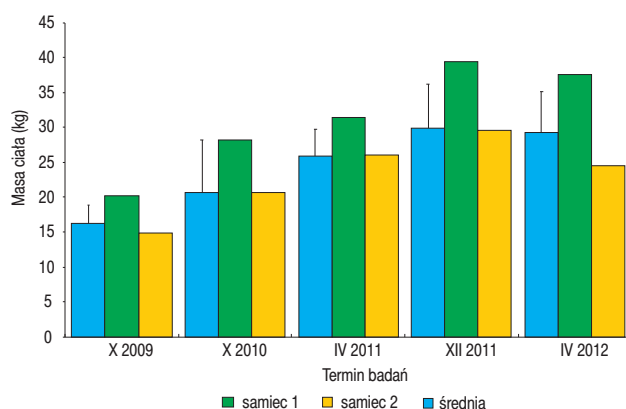
Tydzień przed planowanym terminem pozyskiwania mlecza dwa wybrane samce przeniesiono do basenu dojrzewalni tarlaków. Temperatura wody w momencie przeniesienia wynosiła w obydwu systemach 10,3°C. W okresie dwóch dni temperaturę wody podwyższono do 16°C i utrzymywano ją na tym poziomie przez następne dwie doby. Po czterech dobach od przeniesienia samców do

obiegu „tarłowego” przeprowadzono iniekcje ryb, stosując wyciąg z przysadki mózgowej karpia w ilości 3 mg/kg masy ciała ryb. Ryby iniekowano domięśniowo, pod wodą, tzn. bez ich wyławiania z basenów. Jednocześnie podwyższono temperaturę wody do 17°C.

Wyniki i ich omówienie

Przyrost masy ciała selektów

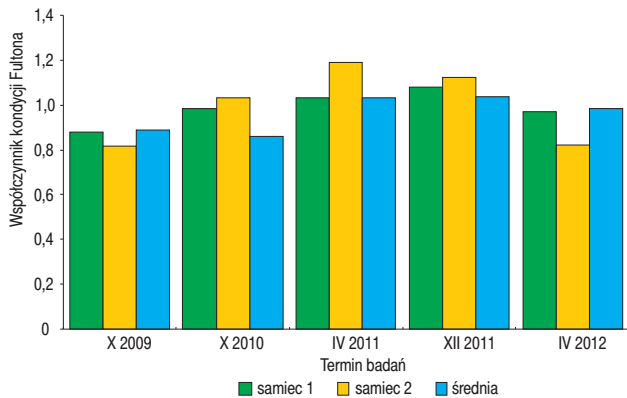
Badane samce różniły się pod względem początkowej masy ciała w omawianym okresie ich chowu. Pierwszy samiec (nr 1) ważył 20,2 kg i był o ok. 25% cięższy od średniej wagi selektów, natomiast drugi (nr 2) ważył 14,8 kg (rys. 2) i był lżejszy o ok. 9%.



Rys. 2. Zmiany masy ciała badanych samców na tle zmian średniej masy ciała stada selektów jesiotra ostronosego.

Analizując tempo wzrostu badanych samców na tle zmian średniej masy ciała wszystkich selektów rocznika 2001 (rys. 2) można stwierdzić, że w ciągu pierwszych dwóch lat chowu w warunkach zamkniętego obiegu wody tempo ich wzrostu było bardzo wysokie. Roczny przyrost średniej masy ciała selektów wyniósł 42% masy początkowej. Badane samce przyrastały jeszcze szybciej: samiec nr 1 rocznie zwiększał swoją masę ciała o 47,5%, a nr 2 o 49,5%. Należy podkreślić, że w ostatnim jesienno-zimowym sezonie nastąpiło zahamowanie tempa wzrostu, a nawet spadek masy ciała ryb szczególnie widoczny u dojrzewających samców. Najbardziej spektakularny spadek masy ciała odnotowano u samca nr 2 – wyniósł on ok. 20%. Ponieważ w poprzednim sezonie jesienno-zimowym (2010-2011) obserwowano przyrost masy ciała ryb zarówno średniej u wszystkich selektów, jak i indywidualnej u badanych samców, a warunki środowiskowe i pokarmowe nie uległy istotnym zmianom, można wysnuć hipotezę, że obserwowany spadek masy ciała związany był z procesem dojrzewania ryb. Podobną zależność tempa wzrostu od zaawansowania procesu dojrzewania obserwowano u wiostonosa amerykańskiego *Polyodon spatula* (Kolman i Szczepkowski 2003).

Tempo wzrostu badanych selektów chowanych w basenach w porównaniu ze wzrostem przedstawicieli



Rys. 3. Zmiany współczynnika kondycji badanych samców na tle zmian współczynnika kondycji stada selektów jesiota ostronosego.

tego gatunku w warunkach naturalnych, tzn. w rzece Św. Jana, z której pochodzą, było znacznie szybsze, ponieważ 10-letnie jesiotry w rzece Św. Jana osiągają masę ciała zaledwie 4-5 kg, a odnotowaną u badanych selektów, tzn. powyżej 20 kg w wieku powyżej 20 lat (Magnin 1963).

Chowane w warunkach zamkniętego obiegu wody selekty jesiotrów ostronosych charakteryzowały się również wysoką kondycją, przy czym wielkość współczynnika kondycji w ciągu dwóch pierwszych lat chowu wykazywała tendencję wzrostową, a w ostatnim okresie jesienno-zimowym wyraźnie zmalała. Z wytypowanych samców większą dynamikę zmian wartości współczynnika kondycji wykazywał mniejszy samiec (nr 2) (rys. 3). Należy zauważyć, że tarlaki wchodzące na tarło do rzeki Hudson charakteryzowały się niższymi wartościami współczynników kondycji (K_F), które zmieniały się w zależności od płci i wynosiły średnio dla samic $0,94 \pm 0,11$ i dla samców $0,83 \pm 0,08$ (Van Eenennam i in. 1996).

Pobieranie i badanie jakości mlecza

Podczas przeglądu samców po 36 godzinach od iniekcji preparatu hormonalnego stwierdzono początek ejakulacji. Od samca (większego) nr 1 podczas pierwszego pobrania uzyskano niewielką ilość (kilkanaście ml) lekko opalizującego płynu z pojedynczymi plemnikami. Podobny rezultat osiągnięto podczas powtórnej próby pobierania mlecza. Natomiast od (mniejszego) samca nr 2 uzyskano mlecz dobrej jakości. Mlecz miał białą barwę z lekko żółtawym odcieniem (fot. 1), a jego ilość była znaczna: podczas pierwszego poboru uzyskano ok. 230 ml, a po trzech godzinach dodatkowo ok. 260 ml. Dla zwiększenia koncentracji plemników mlecz z pierwszego pobrania podgęszczono, poddając go łagodnemu wirowaniu ($900 \times g$, przez 10 min), a z nad osadu plemników odpipetowano około 30% plazmy nasienia. Mlecz z drugiego pobrania nie podgęszczano.

Wszystkie trzy pobrane próby poddano analizie. Zbadano pod mikroskopem jakość mlecza. Oceniono koncen-



Fot. 1. Pobieranie mlecza od samca jesiota ostronosego.

trację plemników metodą spektrofotometryczną oraz parametry ruchu plemników metodą komputerowej analizy nasienia (CASA). Wyniki zestawiono w tabeli (tab. 1). Z zestawienia wynika, iż mlecz pochodzący z II pobrania charakteryzował się nieco wyższą koncentracją, lecz niższą ruchliwością. Jednakże procent ruchliwych plemników był na tyle wysoki, że można je było zakwalifikować wg skali Presova do kategorii 4, a więc w pełni przydatnych do zapłodnienia ikry. Zważywszy na stosunkowo dobrą jakość pozyskanego nasienia zarówno przed, jak i po podgęszczeniu mlecz poddano kriokonserwacji, stosując metodę opisaną przez Glogowskiego i in. (2002). Mlecz zamrożono w 0,5 ml słómkach, a rozmrażano w łaźni wodnej o temp. $40^\circ C$ przez 7 sekund.

Po rozmrożeniu odsetek ruchliwych plemników z pierwszego pobrania wyniósł 65,4%, a z drugiego 64,9% i był bardzo zbliżony do ruchliwości w nasieniu świeżym. Zarówno prędkość krzywoliniowa, jak i prostoliniowa ruchu kriokonserwowanych plemników nieznacznie wzrosły w porównaniu z tymi parametrami w świeżym mleczu (odpowiednio $203,9 \mu m/s$ i $151,6 \mu m/s$).

Uzyskane, więcej niż zadowalające, efekty kriokonserwacji mlecza jesiota ostronosego jednoznacznie wskazują na możliwość tworzenia banku nasienia tego gatunku.

TABELA 1
Wyznaczniki jakościowe pozyskanego mlecza

Mlecz	Koncentracja plemników (mld/ml)	Ruchliwość plemników (%)	Prędkość krzywoliniowa ($\mu m/s$)	Prędkość prostoliniowa ($\mu m/s$)
I pobranie	0,735	74,2	156,1	109,3
I pobranie i podgęszczenie	1,109	72,6	155,7	103,8
II pobranie	0,800	69,7	166,9	102,3

Podsumowanie

Należy podkreślić, że po raz pierwszy w Polsce pobrano mlecz od samców jesiota ostronosego wychowa-

nego w warunkach akwakultury. Natomiast po raz pierwszy na świecie mlecz tego gatunku jesiotra zamrożono i przeprowadzono badania jakości takiego mlecza poddanego kriokonserwacji, a następnie rozmrożeniu. Uzyskane wyniki są bardzo cenne w aspekcie prowadzonych prac nad restytucją jesiotra bałtyckiego. Z uwagi na ograniczoną liczebność przyszłych tarlaków konieczny będzie bardzo precyzyjny dobór par uczestniczących w sztucznym rozrodzie, które będą warunkować wysoką zmienność genetyczną ich potomstwa i tym samym, miejmy nadzieję, wartość biologiczną przyszłej populacji jesiotra bałtyckiego. Utworzenie banku kriokonserwowanego mlecza pochodzącego od samców o znanym profilu genetycznym w znacznym stopniu ułatwi to zadanie. W ten sposób czas dzielący nas do pełnego rozpoczęcia funkcjonowania stada tarlaków tworzonego w warunkach akwakultury, tzn. do osiągnięcia dojrzałości przez samice, może być racjonalnie wykorzystany poprzez utworzenie kolekcji zamrożonego mlecza pochodzącego od samców o różnym profilu genetycznym.

Literatura

Artiukhin E., Vecsei P. 1999 – On the status of Atlantic sturgeon: conspecificity of European *Acipenser sturio* and North American *Acipenser oxyrinchus* – J. Appl. Ichthyol. 15: 35-37.
 Berg L.S. 1948 – Ryby presnykh vod SSSR i sopredelnykh stran – Moskwa. AN SSSR. cz. 1: 467 s.
 Glogowski J., Kolman R., Szczepkowski M., Horvath A., Urbanyi B., Sieczyński P., Rzemieniecki A., Domagała J., Demianowicz W., Kowalski R., Ciereszko A. 2002 – Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) milt cryopreserved with methanol – Aquaculture 211: 367-373.

Kolman R. 2001 – Perspektywy i możliwości restytucji bałtyckiej populacji jesiotra zachodniego (*Acipenser sturio* L.) – Roczniki Naukowe PZW, t. 14 supl.: 331-337.
 Kolman R. 2003 – Jaki jesiotr wyginął w Bałtyku? – Komun. Ryb. 1: 1-3.
 Kolman R. 2010 – Jesiotry chów i hodowla – Poradnik hodowcy. Wydanie II uzupełnione. Wyd. IRS, Olsztyn: 134s.
 Kolman R., Zarkua Z. 1999 – Jesiotr zachodni (*Acipenser sturio* L.) w Gruzji – Komun. Ryb. 5: 24-27.
 Kolman R., Szczepkowski M. 2003 – Biometric analysis of the American paddlefish *Polyodon spatula* (Walbaum, 1792) – Acta Sci. Pol. Piscaria, 2(1): 115-121.
 Kolman R., Kapusta A., Szczepkowski M., Duda A., Bogacka-Kapusta E. 2008 – Jesiotr bałtycki *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell. Wyd. IRS, Olsztyn: 73.
 Kolman R., Szczepkowski M., Raczkowski M. 2012 – Formowanie stad tarlaków jesiotra bałtyckiego w różnych warunkach środowiskowych – Komun. Ryb. 2: 6-10.
 Kulmatycki W. 1933 – W sprawie zachowania jesiotra w rzekach polskich – Ochrona Przyrody. Roczn. XII: 1-21.
 Ludwig A., Debus L., Lieckfeld D., Wirigin I., Benecke N., Jenneckens I., Willet P., Waldmann J.R., Pitra C. 2002 – When the American sea sturgeon swam east – Nature. 493: 447-448.
 Magnin E. 1963 – Recherches sur la systematique et la biologie des Acipenserides: *Acipenser sturio* L., *Acipenser oxyrinchus* Mitchell et *Acipenser fulvescens* Raf. – Ann. Stat. Cent. Hydrobiol. Appl. 9: 1-242.
 Paaver T. 1996 – A common or Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*, was caught in the Estonian waters of the Baltic Sea – The Sturgeon Quart. Vol. 4, No. 3: 7 p.
 Panagiotopoulou H., Popović D., Stanković A., Węgleński P., Kolman R., Szczepkowski M., Raczkowski M. 2012 – Badania genetyczne biologicznego materiału wyjściowego do prac nad restytucją jesiotra bałtyckiego (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell) w Polsce – Komun. Ryb. 6: 15-20.
 Rudnicki A. 1966 – Jesiotr ochrona, kłusownictwo – Gosp. Ryb. 1: 21-22.
 Scott W.B., Crossman E.J. 1973 – Freshwater fishes of Canada – Fisheries Research Board of Canada Bulletin 184: 92-96
 Smith T.I.J., Clugston J.P. 1997 – Status and management of Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, in North America – Environ. Biol. Fish. 48: 335-346.
 Stanković A., Panagiotopoulou H., Węgleński P., Popović D. 2007 – Badania genetyczne nad jesiotrem w związku z programem jego restytucji w wodach Polski – W: Restytucja jesiotra bałtyckiego. Wyd. IRS, Olsztyn: 21-26.
 Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I., Boberg G.P., Watson J.G., Moore D.S., Linares J. 1996 – Reproductive conditions of the Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) in the Hudson River – Estuaries 19: 769-777.

Przyjęto po recenzji 30.03.2013 r.

MATURATION AND QUALITY OF BALTIC STURGEON, *ACIPENSER OXYRHINCHUS OXYRHINCHUS* MITCHELL, SEMEN AND ATTEMPTS AT CRYOPRESERVATION

Ryszard Kolman, Jan Glogowski, Mirosław Szczepkowski, Radosław Kowalski, Beata Sarosiek, Beata Cejko, Grzegorz Dietrich

ABSTRACT. Since its inception, the material used in the Baltic sturgeon restoration program has been, and continues to be, hatch and fry of this species imported to Poland from Canada. Heavy fry was used to create a stock of selects that are cultured under different conditions. In 2011, signs of maturation were noted among some selects cultured in tanks in a recirculating aquaculture system. After conducting biopsies, two males were chosen for hormonal stimulation, after which milt was collected from them. The body weight growth of these males was analyzed in comparison with the mean body weights of other select stocks, and the mean growth rates of the selects was very high at 42% annually. Sperm was collected twice. The milt obtained was characterized by high sperm motility (above 70%) and a relatively low concentration (0.735 mld/ml). The milt from the first collection was thickened with the centrifugation method, and that of the second was cryopreserved in liquid nitrogen vapor. The motility of the sperm following cryopreservation and then thawing was high (65.4% from the first collection and following centrifugation and 64.9% from the second collection).

Keywords: Baltic sturgeon, growth rate, condition, sexual maturation, milt cryopreservation