

Mgr Sylwia Judycka

**Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
Zakład Biologii Gamet i Zarodka**

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.

„Wykorzystanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia w celu zrozumienia mechanizmów kriouszkodzeń plemników ryb jesiotrowatych i łososiowatych”

Promotor pracy: dr hab. Mirosław Szczepkowski, prof. Instytutu

Promotor pomocniczy: dr inż. Grzegorz Dietrich

Kriokonserwacja nasienia oraz tworzenie banków gamet są narzędziami stosowanymi w akwakulturze do zabezpieczenia genomów cennych ryb. Biologia rozrodu ryb, w tym morfologia gamet, różni się pomiędzy gatunkami. Z tego powodu procedury kriokonserwacji muszą być dostosowane indywidualnie dla każdego z gatunków. W niniejszej rozprawie doktorskiej skupiono się na poszukiwaniu wyznaczników jakości nasienia ryb jesiotrowatych oraz łososiowatych, które mogą zostać wykorzystane do prognozowania sukcesu kriokonserwacji.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było wykorzystanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia (CASA – komputerowa analiza ruchu plemników oraz cytometria przepływowa) jako narzędzi umożliwiających poznanie mechanizmów leżących u podstaw kriouszkodzeń plemników ryb łososiowatych oraz jesiotrowatych podczas przechowywania, na temat których brak lub są dostępne bardzo ograniczone dane. Badania obejmowały:

Cel I) charakterystykę nasienia jesiotra syberyjskiego pozyskanego poza sezonem rozrodczym,

Cel II) opracowanie nowej, efektywnej procedury kriokonserwacji nasienia jesiotra syberyjskiego,

Cel III) zbadanie wpływu dodatku jonów potasu do rozrzedzalnika na sukces kriokonserwacji oraz przechowywanie po rozmrożeniu nasienia pstrąga tęczowego,

Cel IV) zbadanie wpływu rozrzedzenia w płynach do dojrzewania kriokonserwowanego nasienia oraz czasu po rozmrożeniu na ruchliwość oraz zdolność zapładniającą plemników neosamców pstrąga tęczowego.

Cel I. Badania dotyczące pozasezonowego rozrodu jesiotra syberyjskiego pozwoliły na określenie po raz pierwszy podstawowych parametrów nasienia, których wartości różniły się od otrzymywanych podczas tarła w naturalnym terminie. Spontaniczna ruchliwość plemników w nierozrzedzonym nasieniu okazała się być cechą charakterystyczną mlecza uzyskanego poza sezonem. Nasienie pozyskane poza sezonem rozrodczym wykazywało stosunkowo niską przydatność do krótkookresowego przechowywania. Jednakże wyniki dotyczące ruchliwości i żywotności oraz zdolności zapładniającej plemników po zamrożeniu/rozmrożeniu wykazały możliwość skutecznej kriokonserwacji nasienia jesiotra uzyskanego poza sezonem rozrodczym.

Cel II. Na podstawie rezultatów uzyskanych w wyniku kriokonserwacji nasienia jesiotra syberyjskiego wykazano, iż nasienie może być z powodzeniem kriokonserwowane z zastosowaniem prostego rozrzedzalnika glukoza-metanol. Wybór odpowiedniego stężenia glukozy okazał się być kluczowym etapem dla udoskonalenia procedury kriokonserwacji. Czas ekwilibracji przed kriokonserwacją (30 min) nie wpłynął na jakość zarówno nasienia rozrzedzonego, jak i kriokonserwowanego. Dodatkowo, ruchliwość plemników oraz zdolność zapładniająca plemników nie obniżyły się przez 30 min przechowywania nasienia po rozmrożeniu.

Cel III. Badania dotyczące wpływu rozrzedzalnika na bazie trehalozy na nasienie pstrąga tęczowego wykazały jego użyteczność do kriokonserwacji. Stężenie trehalozy 175 mM oraz 11,5-krotne rozrzedzenie nasienia w rozrzedzalniku skutkowały uzyskaniem najwyższego odsetka ruchliwych plemników po rozmrożeniu. Wykazano również wpływ końcowej koncentracji plemników na sukces kriokonserwacji, której optymalny zakres mieścił się w zakresie $1,2-1,3 \times 10^9$ plemników ml^{-1} . Rozrzedzalnik składający się z 175 mM trehalozy jak i rozrzedzalnik zawierający 175 mM trehalozę z 40 mM KCl okazały się być najbardziej skuteczne do kriokonserwacji nasienia pstrąga tęczowego. Wybór odpowiedniego rozrzedzalnika został również potwierdzony poprzez przeprowadzenie prób biologicznych i uzyskanie wysokich wartości zaoczkowanej ikry. Inkubacja nasienia po rozmrożeniu przez 60 min nie spowodowała obniżenia ruchliwości plemników oraz integralności błon cytoplazmatycznych.

Cel IV. Ważnym aspektem poruszonym w niniejszej rozprawie doktorskiej jest również kriokonserwacja nasienia neosamców pstrąga tęczowego. Potwierdzono użyteczność procedury kriokonserwacji nasienia neosamców z zastosowaniem rozrzedzalnika glukoza-metanol oraz wykazano istotny wpływ płynów do dojrzewania nasienia na ruchliwość plemników oraz przechowywanie nasienia po rozmrożeniu. Okazało się, iż ruchliwość plemników jest hamowana bezpośrednio po rozrzedzeniu nasienia w płynie do dojrzewania nasienia, natomiast efekt ten w znacznej mierze zanika po upływie godziny przechowywania po rozmrożeniu. Zdolność zapładniająca plemników kriokonserwowanego nasienia była wysoka bez względu na zastosowany płyn do dojrzewania nasienia bądź długość trwania czasu po rozmrożeniu.

Reasumując, zastosowanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia tj. CASA oraz cytometria przepływowa pozwoliło na zrealizowanie celów badawczych ujętych w rozprawie doktorskiej. W efekcie zostały uzupełnione istotne braki w wiedzy dotyczącej kriobiologii oraz krótkookresowego przechowywania nasienia ryb jesiotrowatych oraz łososiowatych. Opisane zmiany w markerach jakości nasienia zostały zweryfikowane poprzez przeprowadzenie prób biologicznych, dzięki czemu opracowane procedury kriokonserwacji mogą być wdrożone do tworzenia banków genów, jak również do praktyki wylęgarniczej po uprzednim przeskalowaniu metodyki na warunki produkcyjne.