

Beata Sarosiek¹, Beata I. Cejko¹, Sławomir Krejszeff³, Jan Glogowski^{1,2},
Katarzyna Targońska³, Dariusz Kucharczyk³, Daniel Źarski³, Radosław K. Kowalski¹

¹Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

²Katedra Ichtiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

³Katedra Rybactwa Jeziorowego i Rzecznego, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Nasienie szczupaka (*Esox lucius* L.) – możliwości przechowywania plemników w warunkach chłodniczych

Wstęp

W ostatnich latach liczebność szczupaka w polskich wodach wyraźnie się zmniejszyła z powodu nieracjonalnej gospodarki rybackiej i kłusownictwa oraz bardzo dużej presji wędkarskiej. Szczupak jest gatunkiem niezwykle wartościowym, gdyż jako drapieżca żywiący się przeważnie rybami mało cennymi przyczynia się do poprawy struktury rybostanu. Rozwijająca się w Polsce akwakultura wymaga ciągłego doskonalenia metod sztucznego zapłodnienia. Jedną z technik stosowanych w wylęgarniach ryb jest krótkookresowe przechowywanie nasienia w warunkach chłodniczych, bez konieczności mrożenia (Kowalski i in. 2009). Metoda ta z dużym powodzeniem może służyć do przechowywania plemników w sytuacji, gdy samice dojrzewają później niż samce. Jest to metoda prosta, możliwa do zastosowania praktycznie wszędzie, ponadto nie powoduje tak drastycznej utraty jakości nasienia jak kriokonserwacja, jeżeli czas przechowywania nie jest zbyt długi. W literaturze znaleźć można opisy krótkookresowego przechowywania plemników pstrąga tęczowego (McNiven 1993, Kowalski i in. 2008), czy stynki (Kowalski i in. 2010).

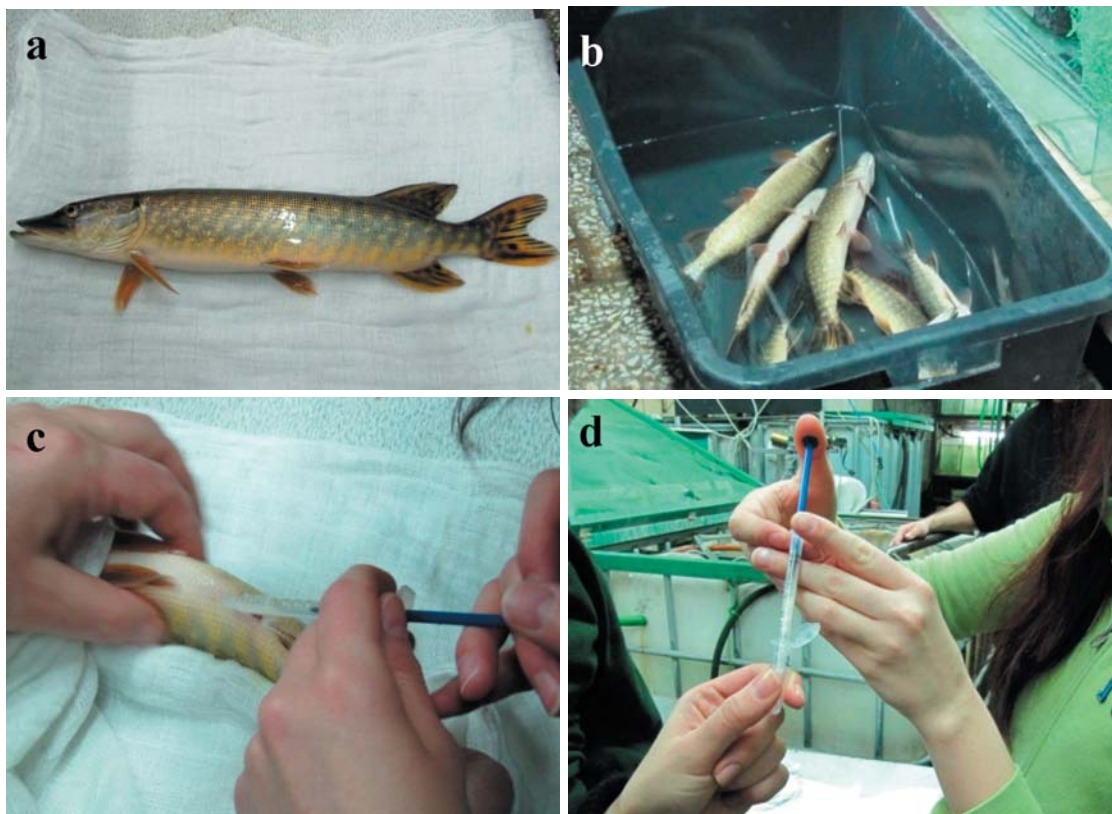
Nasienie ryb cechuje wysoka koncentracja plemników, co stanowi ograniczenie w możliwości długotrwałego przetrzymywania nasienia w warunkach obniżonego metabolizmu (temperatura poniżej 4°C). Aby zmniejszyć możliwość grawitacyjnej sedymentacji plemników, a co za tym idzie uszkodzeń błon komórkowych wywołanych naciskiem masy plemników oraz umożliwić dostęp jak największej liczbie komórek do tlenu, nasienie nierozcieńczone przechowuje się w cienkiej warstwie. Aby zwiększyć objętość przechowywanego nasienia oraz wydłużyć okres jego przeżywalności w warunkach *in vitro* stosuje się odpowiednie dla gatunku buforu immobilizujące. Mają one na celu rozrzedzenie plemników oraz zniwelowanie ewentualnego negatywnego wpływu takich zanieczyszczeń nasienia jak mocz (Cabrita i in. 2008). Skład buforów immobilizujących dobierany jest indywidualnie do każdego gatunku, w zale-

żności od jego biologii rozrodu oraz składu jonowego plazmy nasienia.

W przypadku ryb, których plemniki poruszają się krótko i mają niewiele mitochondriów, nie stosuje się dodatków substratów energetycznych. Można jednak sądzić, że w czasie długookresowego przechowywania, substraty takie mogłyby stanowić dodatkowe źródło energii dla plemników. Nascimento i in. (2008) wykazali, że glikoliza stanowi pierwszorzędowe źródło energii w przypadku nasienia człowieka. Lahnsteiner i in. (1993) podają, że glukoza jest wykorzystywana jako źródło energii podczas ruchu plemników pstrąga. Dlatego też, w niniejszej pracy podjęto próbę zastosowania rozcieńczalników z dodatkiem cukrów (glukozy i fruktozy) do krótkookresowego przechowywania nasienia szczupaka.

Materiał i metody

W doświadczeniu wykorzystano nasienie pochodzące od szczupaków (n=5), wyłowionych z Jeziora Kortowskiego (Olsztyn, ptn.-wsch. Polska, fot. 1a). Do czasu poboru nasienia ryby przetrzymywano w basenach o temperaturze wody 10°C, w Katedrze Rybactwa Jeziorowego i Rzecznego, UWM, Olsztyn. W celu pobrania nasienia ryby uśpiono w roztworze Propiscinu (1 ml l⁻¹, fot. 1b). Nasienie pobrano metodą masażu powłok brzusznych (fot. 1c). Pobrane nasienie (fot. 1d) przewieziono w temperaturze +4°C do laboratorium Zakładu Biologii Gamet i Zarodka, PAN Olsztyn, gdzie przeprowadzono komputerową analizę ruchu plemników CASA (Image House CRISMAS Company Ltd). Analizowano następujące parametry ruchu plemników: VCL (całkowita prędkość plemników; μm/s), VSL (prostoliniowość ruchu plemników; μm/s), VAP (średnia prędkość plemników; μm/s), LIN (liniowość; %), STR (kierunkowość; %), WOB (wskaźnik drgań plemników; %), ALH (amplituda bocznych wychyleń główki; μm), BCF (częstotliwość zmiany pracy wtyki; Hz), MOT (odsetek



Fot. 1. Szczupak odłowiony z Jeziora Kortowskiego (a), usypianie ryb (b), pobieranie nasienia szczupaka (c, d).

plemników ruchliwych; %), PRG (odsetek plemników o ruchu postępowym; %).

Do aktywacji ruchu plemników wykorzystano roztwór 40 mM NaHCO₃, z dodatkiem 20 mM Tris i 0,5% albuminy, pH 8,5 (Kowalski i in. 2010). Do krótkookresowego przechowywania posłużył płyn immobilizujący (A) o następującym składzie: 130 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 40 mM KCl, 20mM Tris, 2 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂ x 6 H₂O (Kobayashi i in. 2004). Ponadto do jednej części płynu immobilizującego dodano 10 mM glukozę (B), do drugiej części 10 mM fruktozę (C). Parametry ruchu oraz całkowity czas ruchu plemników analizowano w czasie „0” – bezpośrednio po pobraniu i przywiezieniu do laboratorium, po 24 oraz po 96 godzinach przechowywania w temperaturze +4°C.

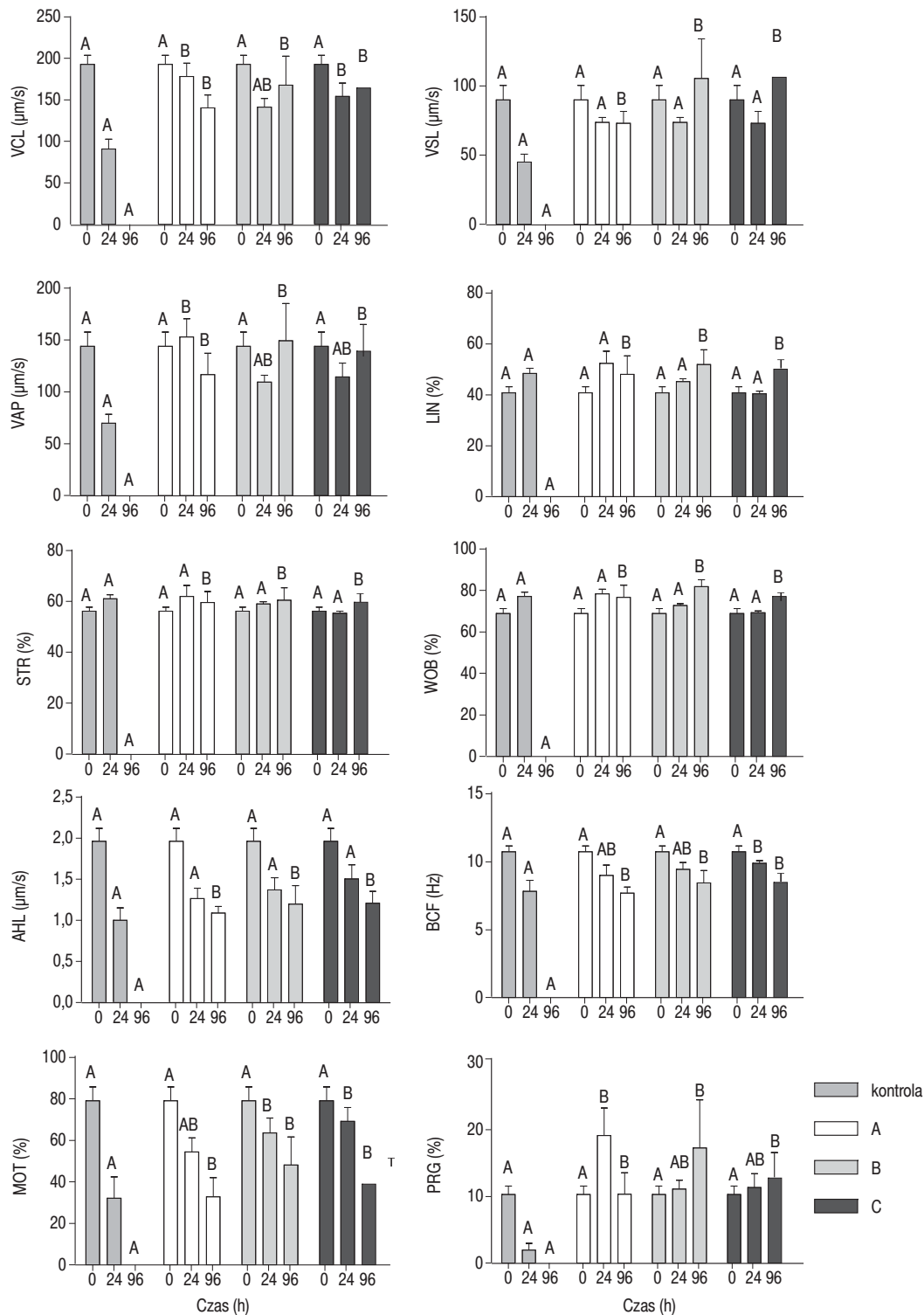
Wyniki opracowano w programie GraphPadPrism stosując dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA. Różnice między poszczególnymi wariantami doświadczalnymi określono stosując Bonferroni post-test.

Wyniki i dyskusja

W przypadku nasienia szczupaka stwierdzono, że rozcieńczenie buforem immobilizującym poprawia jego przeżycie w warunkach *in vitro* (Erdahl i Graham 1987). Również i w naszych badaniach, nasienie rozrzedzone buforem immobilizującym zachowywało ruchliwość znacznie dłużej od nasienia nierozrzedzonego. Po 24 godzinach przechowywania nasienia nierozcieńczonego stwierdzono istotne

pogorszenie wartości takich parametrów jak VCL, VSL, VAP, czy spadek odsetka ruchliwych plemników (MOT) z 79% do zaledwie 32% (rys. 1). Dodatek buforu immobilizującego znacząco poprawił żywotność nasienia. W grupie eksperymentalnej, gdzie mlecz rozcieńczono buforem immobilizującym z dodatkiem glukozy, ruchliwość plemników (MOT) po 24 godzinach wynosiła 64%, natomiast po 96 godzinach – 48%, podczas gdy w grupie kontrolnej po 96 godzinach nie obserwowano już ruchliwych plemników. Nie stwierdzono natomiast różnic statystycznie istotnych pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczalnymi, tj. między nasieniem rozcieńczonym buforem immobilizującym bez dodatków (A) oraz buforem z dodatkiem cukrów, glukozy (B) i fruktozy (C).

Ciereszko i in. (1999) stwierdzili, że nierozrzedzone nasienie szczupaka amerykańskiego (*Esox masquinongy* Mitchill) przechowywane przez 5 h na lodzie, znacząco obniża swoje parametry ruchu oraz zdolność zapładniającą. W naszej pracy zastosowaliśmy wybrany w badaniach wstępnych bufor immobilizujący, który pozwala na przechowywanie nasienia szczupaka 4 dni, bez konieczności jego kriokonserwacji. Pomimo że jest to najdłuższy znany nam czas przechowywania nasienia szczupaka w warunkach chłodniczych, dalsza jego poprawa wydaje się możliwa. Zastosowanie cukrów w osiągnięciu tego celu okazało się jednak niemożliwe. Konieczne są dalsze prace zmierzające do optymalizacji

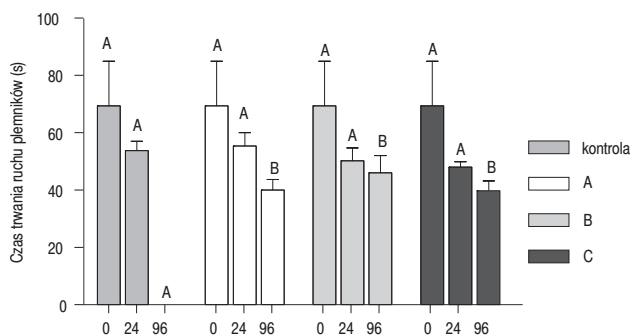


Rys. 1. Wpływ rozcieńczalników na parametry ruchu plemników w trakcie krótkookresowego przechowywania. Istotne różnice wartości pomiędzy zastosowanymi rozciezczalnikami oznaczono różnymi literami ($p < 0,01$).

metody przechowywania nasienia szczupaka, w celu lepszego poznania jego fizjologii oraz opracowania doskonalszej metody przechowywania plemników.

Całkowity czas ruchu plemników był najwyższy w czasie „0”, wynosił 69 s (rys. 2). Po 24 godzinach inkubacji nie stwierdzono różnic między grupą kontrolną i poszczególnymi wariantami doświadczenia (54 s w grupie kontrolnej, 55 s, 50 s i 48 s kolejno w grupie A, B i C). Po 4 dniach przechowywania nasienia, najdłuższy czas trwania ruchu plem-

ników zanotowano w wariantach z dodatkiem glukozy – 46 s, w pozostałych wariantach doświadczalnych czas trwania ruchu plemników wynosił ok. 40 s, podczas gdy w grupie kontrolnej nie obserwowano już ruchu. Wyniki Ziętała i in. (2009) wskazują, że dodatek glukozy poprawia żywotność plemników suma, choć lepsze rezultaty uzyskano stosując dodatek mleczanu. Z kolei wyniki uzyskane dla medaki wykazały, że dodatek glukozy jako egzogennej źródła energii, nie spowodował wydłużenia czasu ruchu plemni-



Rys. 2. Wpływ rozcieńczalników na czas trwania ruchu plemników. Istotne różnice wartości pomiędzy rozcieńczalnikami oznaczono różnymi literami ($p < 0,01$).

ków (Yang i Tiersch 2009). Podobnie i nasze wyniki nie potwierdziły skuteczności glukozy i fruktozy w wydłużeniu czasu przechowywania nasienia szczupaka.

Powyższe wyniki wskazują, że zastosowanie rozcieńczalnika zdecydowanie poprawia przeżywalność plemników szczupaka podczas krótkookresowego przechowywania. Bufor immobilizujący wykorzystany w niniejszym doświadczeniu niewątpliwie poprawił żywotność plemników, jednakże czas, w jakim możliwe jest utrzymanie 50% ruchliwych plemników w warunkach *in vitro* nie jest satysfakcjonujący, gdy porównamy go do wyników uzyskanych dla innych gatunków (Kowalski i in. 2009). Z uwagi na to, że istnieją różnice w przemianach energetycznych plemników pomiędzy gatunkami (Ziętara i in. 2009), a skład buforów do przechowywania nasienia odgrywa kluczową rolę, konieczne będzie przeprowadzenie kolejnych eksperymentów nad krótkookresowym przechowywaniem nasienia szczupaka.

Literatura

Cabrera E., Robles V., Herráez P. 2008 – Sperm quality assessment – W: Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Spe-

- cies. Cabrera E., Robles V., Herráez M.P. (Eds). CRC Press, Boca Raton, pp. 93-147.
- Ciereszko A., Dabrowski K., Lin F., Christ S.A., Toth G.P. 1999 – Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved Muskellunge spermatozoa – Trans. Am. Fish. Soc. 128: 542- 548.
- Erdahl, A.W., Graham, E.F. 1987 – Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking medium – Aquaculture 60: 311-321.
- Kobayashi T., Fushiki S., Ueno K. 2004 – Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high pH artificial seminal plasma – Environmental Biology of Fishes 69: 419-425.
- Kowalski R.K., Yoshida M., Yoshida K., Morisawa M., Cejko B.I., Glogowski J. 2008 – Effect of albumin, casein and hemoglobin on short-term preservation of rainbow trout sperm – W: Resource Management. Natural, human and material for the sustainable development of aquaculture. Aquaculture Europe 2008 (Eds.) E. Kamler, K. Dabrowski, IFI, Olsztyn: 354-355.
- Kowalski R.K., Cejko B.I., Sarosiek B., Demianowicz W., Glogowski J. 2009 – Przechowywanie nasienia ryb łososiowatych – przegląd metod i ich praktyczne zastosowanie w wylęgarniach – W: Rozród, podchów, profilaktyka ryb łososiowatych i innych gatunków (Red.) Z. Zakęś, K. Demaska-Zakęś, A. Kowalska, D. Ulikowski, Wyd. IRS, Olsztyn: 105-117.
- Kowalski R.K., Hliwa P., Cejko B.I., Król J., Dietrich G.J., Stabiński R., Ciereszko A. 2010 – Sztuczny rozród stynki (*Osmerus eperlanus*) z zastosowaniem nasienia przechowywanego w warunkach chłodniczych – W: Rozród, podchów, profilaktyka ryb rzadkich i chronionych oraz innych gatunków (Red.) Z. Zakęś, K. Demaska-Zakęś, A. Kowalska, Wyd. IRS, Olsztyn: 121-129.
- Lahnsteiner F., Patzner R.A., Weismann T. 1993 – Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Pices, teleostei) – Reproduction Nutrition Dev. 33: 349-360.
- McNiven M.A., Gallant R.K., Richardson G.F. 1993 – Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium – Aquaculture 109: 71-82.
- Nascimento J.M., Shi L.Z., Tam J., Chandsawangbhuwana C., Durrant B., Botvinick E.L., Berns M.W. 2008 – Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping – J. Cell Physiol 217(3): 745-751.
- Yang H., Tiersch T.R. 2009 – Sperm motility initiation and duration in a euryhaline fish, medaka (*Oryzias latipes*) – Theriogenology 72(3): 386-392.
- Ziętara M.S., Biegieniewska A., Rurangwa E., Świerczyński J., Ollevier F., Skorkowski E.F. 2009 – Bioenergetics of fish spermatozoa during semen storage – Fish Physiol. Biochem. 35: 607-614.

Przyjęto po recenzji 03.02.2012 r.

PIKE (*ESOX LUCIUS* L.) SEMEN – POSSIBILITIES FOR STORING SPERM UNDER REFRIGERATED CONDITIONS

Beata Sarosiek, Beata I. Cejko, Sławomir Krejszeff, Jan Glogowski, Katarzyna Targońska, Dariusz Kucharczyk, Daniel Źarski, Radosław K. Kowalski

ABSTRACT. One of the ways to improve methods for the artificial reproduction of fish is the possibility of storing sperm for short periods under refrigerated conditions (+4°C) without the necessity of freezing. In the experiment semen extenders with and without sugars (glucose and fructose) were applied during the storage of pike semen. The analysis of sperm motility parameters indicated that semen that had not been diluted with an immobilization buffer decreased in quality very quickly. After 24 hours of storage significant differences were noted in parameters measured with CASA, and after the subsequent two days no motile sperm were noted. The semen that was diluted with the immobilization buffer that included glucose retained 48% motile sperm after four days of the experiment. The results indicate that diluting the semen with an immobilization buffer lengthens the storage period of pike semen under refrigerated conditions.

Keywords: pike, semen, sperm, storage, CASA