

Katarzyna Dziewulska, Robert Czerniawski, Iwona Goździk, Józef Domagała

Katedra Zoologii Ogólnej, Uniwersytet Szczeciński

## Przeżywalność i wzrost narybku troci wędrownej (*Salmo trutta m. trutta* L.) uzyskanego z mrożonego nasienia

### Wstęp

Kriokonserwacja nasienia ryb rozwija się od lat sześćdziesiątych XX wieku (Truscott i in. 1968, Graybill i Horton 1969). Technika ta zaczyna być wykorzystywana w gospodarstwach do przechowywania nasienia cennych linii hodowlanych i magazynowania nadmiaru gamet. Gamety te wykorzystywane są, gdy brakuje reproduktorów lub w celu ograniczenia manipulacji tarlakami. Kriokonserwacja jest również narzędziem stosowanym w ochronie gatunkowej. W stanie głębokiego zamrożenia, przez długi okres przechowuje się komórki zagrożonych gatunków czy też lokalnych populacji w celu zachowania ich bioróżnorodności genetycznej lub gdy zajdzie potrzeba ich odtworzenia.

Plemniki ryb są materiałem łatwym do pozyskania i to w dużej ilości, stanowiąc dogodny materiał do zdeponowania w „bankach nasienia”. Metanol jest jednym z krioprotektorów często stosowanym podczas mrożenia nasienia ryb (Harvey i in. 1982, Tiersh i in. 1994, Gwo i in. 1999, Linhart i in. 2005, Jodun i in. 2006). W zależności od zastosowanego protokołu mrożeniowego wartość biologiczna kriokonserwowanych plemników może się różnić. Na skuteczność techniki mrożenia mają wpływ liczne czynniki. Do głównych należą: rodzaj i stężenie użytego krioprotektora, skład rozcieńczalnika, proporcja rozcieńczenia nasienia, tempo zamrażania i rozmrażania prób (Lahnsteiner i in. 1995). Efektywność stosowanej techniki kriokonserwacji, początkowo oceniana była na podstawie uzyskanego odsetka poruszających się plemników lub ilości zapłodnionych jaj. Sporadycznie analizowano parametry ruchu rozmrożonych plemników (Dreanno i in. 1997, Lahnsteiner 2000, Linhart i in. 2005, Liu i in. 2007). Dalsze badania nad wpływem procesu mrożenia na plemniki ujawniły, że rozmrożone plemniki mogą zawierać defekty: uszkodzone błony cytoplazmatyczne, uszkodzone lub zablokowane DNA, zmieniony metabolizm (Ogier de Baulny i in. 1997, Cabrita i in. 1998, 2005, Drokin i in. 1998, Labbe i in. 2001, Tiersch i in. 2004). Defekty te, często trudne do zdiagnozowania, mogą się ujawniać na różnych etapach rozwoju potomstwa otrzymanego po użyciu zamrożonych/roz-

mrożonych gamet. W związku z tym, zwrócono uwagę na konieczność monitoringu rozwoju potomstwa uzyskanego z zapłodnienia mrożonym nasieniem (Horváth i Urbányi 2000, Young i in. 2009). Wyniki przeprowadzonych dotychczas nielicznych doświadczeń nad kondycją potomstwa otrzymanego z zapłodnienia mrożonymi plemnikami u ryb były rozbieżne.

Celem niniejszych badań była ocena rozwoju troci wędrownej (*Salmo trutta m. trutta* L.), uzyskanej z zapłodnienia świeżej ikry nasieniem zamrożonym z zastosowaniem metanolu.

### Materiały i metody

20 listopada nasienie pobrano od 12 samców troci wędrownej (*Salmo trutta m. trutta* L.) (średnia długość  $\pm$  SD;  $59,1 \pm 6,7$  cm) wpływających na tarło do Wieprzy. Nasienie w workach z tlenem, rozłożono na rozkruszonym lodzie, przewieziono do laboratorium. Po ocenie odsetka ruchliwych plemników, metodą wzrokową, nasienie z ruchliwością powyżej 70% wyselekcjonowano do zamrożenia w ciekłym azocie. Nasienie pochodzące od 5 samców (koncentracja plemników  $12,0-15,2$  mld  $\text{ml}^{-1}$ ), oddzielnie od każdego osobnika, zamrożono w 0,25 ml słomkach, w proporcji 1:3 z rozcieńczalnikiem. Rozcieńczalnik zawierał mieszaninę 0,3 M glukozy, 10% metanolu i 10% żółtka jaja kurzego. Słomki układano na ramce styropianowej o wysokości 4 cm, którą umieszczano na ciekłym azocie. Po 3-minutowym zamrożeniu nasienia w oparach ciekłego azotu, słomki zrzucano do ciekłego azotu i przechowywano w dewarze (Glogowski i in. 2009). Po dwóch tygodniach przywieziono świeże nasienie od kilku samców. Do zapłodnienia wybrano mieszaninę 3 najlepszych (ruchliwość 90%). Przywieziono także ikrę od trzech samic, którą zmieszano w jednakowej proporcji. Po ok. 100 ziaren ikry zapłodniono nasieniem świeżym (grupa kontrolna) lub rozmrożonym, osobno od każdego samca (grupa doświadczalna). Podczas zapłodnienia nasieniem świeżym, proporcja ikra/plemnik wynosiła 1:400000. Dziesięć razy wyższą proporcję zastosowano, gdy zapładniano ikrę nasieniem rozmrożonym. Gamety mieszano przez 20-30 s. Po 2-3 minutach dodano

po 50 ml wody z obiegu, przepłukując ikrę trzykrotnie, a następnie pozostawiono na okres 60 min. Następnie ikrę obsadzono ponumerowane koszyczki w obiegu zamkniętym w Katedrze Zoologii Ogólnej Uniwersytetu Szczecińskiego. Inkubacja trwała 47 dni. W trakcie inkubacji, białe ziarna z nierozwijającymi się zarodkami liczono i wybierano. W stadium zaoczkowania ikry policzono liczbę ziaren z widocznym pigmentem gałek ocznych i przeliczono proporcję do wszystkich ziaren ikry znajdujących się pierwotnie w koszyczku (uzyskując odsetek zapłodnionych jaj). Wylęg nastąpił 18 stycznia. Larwy w stadium końcowej fazy resorpcji woreczka żółtkowego zważono i przeliczono ich liczbę. W dniu 7 lutego wylęg umieszczono w basenach o pojemności 55 litrów, po 60 ryb w każdym. Do basenów wpuszczono po jednakowej liczbie potomstwa od każdego samca z grupy doświadczalnej, do kolejnych ryby z grupy kontrolnej. Wysokość wody w basenach wynosiła 25 cm. Temperatura wody wahała się od 10 do 13°C. Przepływ wody wynosił 300 l h<sup>-1</sup>. Chemiczne i fizyczne parametry wody rejestrowano 3 razy dziennie. W trakcie podchowu N-NH<sub>3</sub> wynosiło 0,008 ± 0,005 mg l<sup>-1</sup>, tlen rozpuszczony 8,40 ± 0,35 mg l<sup>-1</sup>, a pH 7,98 ± 0,42. Larwy otrzymywały pokarm *ad libitum*. Pierwszym pokarmem był żywy zooplankton odłowiony z naturalnych stawów. Następnie żywe larwy: solowca *Artemia salina*, Chironomidae i much (Muscidae). Pokarm był podawany tylko w dzień od godziny 7 do 17, co 3-4 godziny. Co tydzień ryby ważono po uśpieniu w roztworze Propiscinu, następnie z powrotem wpuszczano do basenów. W dniu 16 kwietnia zakończono doświadczenie pomiarami masy narybku (n=50 grupa kontrola, n=100 grupa doświadczalna).

## Wyniki

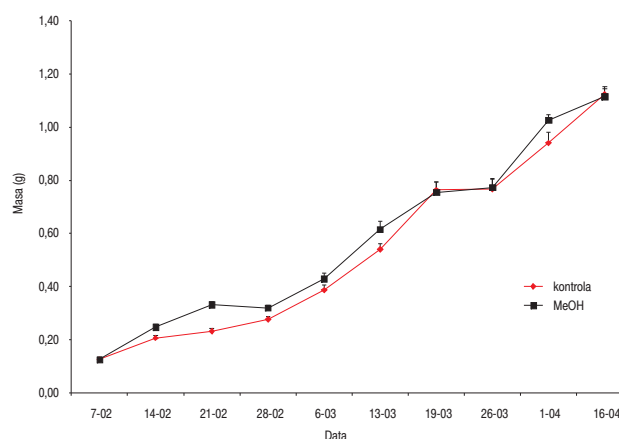
Zdolność zapładniająca nasienia zamrożonego/roz-mrożonego była niższa niż świeżego nasienia (test chi-kwadrat,  $p < 0,05$ ). Odsetek zapłodnionej ikry w pierwszej grupie, ocenianej na etapie zaoczkowania, wynosił 54,7 ± 6,7% w stosunku do kontroli. Od stadium zaoczkowania do stadium wylęgu przeżywalność ryb grupy doświadczalnej była podobna do ryb z grupy kontrolnej (94,4 i 93,1%, odpowiednio; test chi-kwadrat,  $p > 0,05$ , tabela 1).

Również w okresie od stadium wylęgu do momentu rozpoczęcia podchowu przeżywalność była podobna w obu grupach (94,2 i 91,1%, odpowiednio, test chi-kwadrat,  $p > 0,05$ , tabela 1). Masa ciała wylęgu rozpoczynającego żerowanie w obu grupach była taka sama (0,125 g) (test t,  $p > 0,05$ , rys. 1). Przeżywalność potomstwa w trakcie podchowu była również podobna w grupie doświadczalnej i kontrolnej (95,0 i 96,7%, odpowiednio, test chi-kwadrat,  $p > 0,05$ , tabela 1). W okresie wzrostu w obiegu zamkniętym początkowo masa narybku w grupie doświadczalnej była nieznacznie wyższa niż w grupie kontrolnej. Pod koniec podchowu masa w obu grupach wyrównała się (1,115 g i 1,123 g, odpowiednio) (test t,  $p > 0,05$ , rys. 1).

TABELA 1

Przeżywalność potomstwa troci wędrowej (średnia ± SD), na różnych etapach rozwoju, w grupach ryb uzyskanych z zapłodnienia świeżym nasieniem (kontrola) i mrożonym z użyciem metanolu. Brak różnic istotnych statystycznie ( $p > 0,05$ ; test chi-kwadrat)

Okres rozwoju ryb	potomstwo kontrola (%)	potomstwo metanol (%)
od zaoczkowania do wylęgu	93,1±6,8	94,4±6,2
od wylęgu do rozpoczęcia żerowania	91,1±3,6	94,2±4,8
od rozpoczęcia żerowania do wieku 3 miesięcy, okres podchowu ryb w obiegu zamkniętym	96,7	95,0



Rys. 1. Zmiana masy wylęgu troci wędrowej (średnia ± SD) w trakcie podchowu, od stadium wylęgu żerującego do 3-miesięcznego narybku, w grupach ryb uzyskanych z zapłodnienia świeżym nasieniem (kontrola) i mrożonym z użyciem metanolu (MeOH).

## Dyskusja

Uzyskany w niniejszych badaniach niski odsetek zapłodnionej ikry troci wędrowej nasieniem mrożonym może częściowo wynikać z zastosowania zbyt niskiej liczebności plemników przypadających na jedno ziarno ikry. Zastosowanie większej ilości mrożonego nasienia może zmniejszyć tę różnicę. Natomiast dalsze wyniki pracy, nad rozwojem potomstwa uzyskanego z zapłodnienia mrożonym nasieniem nie ujawniły różnic w rozwoju ryb do stadium 3-miesięcznego narybku. Zarówno przeżywalność, jak i wzrost ryb były podobne w grupie doświadczalnej i kontrolnej. W poprzedniej pracy (Dziewulska i in. 2011), przeprowadzanej na łososiu, stwierdzono niższą przeżywalność ryb uzyskanych z zapłodnienia nasieniem mrożonym z metanolem w stosunku do grupy kontrolnej, na etapie od stadium zaoczkowania do wylęgu. W późniejszym okresie (badania do narybku 2-miesięcznego) różnice nie były istotne statystycznie pomiędzy grupami. Jednakże w okresie podchowu łososi w obiegu zamkniętym, masa ryb z grupy mrożeniowej była niższa niż grupy kontrolnej, choć długość ciała i współczynnik kondycji były zbliżone w obu grupach (Dziewulska i in. 2011). Inni autorzy u ryb łosio-

watych nie odnotowywali różnicy w przeżywalności ryb grupy kontrolnej i doświadczalnej (nasienie mrożone z użyciem metanolu) (Babiak i in. 2001, Sarvi i in. 2006), jak i po zastosowaniu innych krioprotektorów DMSO, glicerol (Lahnsteiner i in. 1995), DMSO, DMA, EG, glicerol, glikol propylenowy (Babiak i in. 2001, Sarvi i in. 2006), DMSO (Labbe i in. 2001). U ryb należących do innych rodzin również wzrost, śmiertelność i deformacje ciała nie różniły się między rybami z grupy doświadczalnej i kontrolnej (*I. punctatus* (Tiersch i in. 1994), *C. carpio* (Linhart i in. 2000), *S. glanis* (Linhart i in. 1993), *P. maxima* (Chereguini i in. 2002), *C. gariepinus* (Miskolczy i in. 2005)). Nieliczne badania innych autorów donosiły o występowaniu wyższego odsetka zniekształconych zarodków u potomstwa grupy mrożeniowej w porównaniu z kontrolną (Horváth i in. 2000).

Uzyskane wyniki pokazują możliwość wykorzystania zamrożonego nasienia do produkcji narybku i przy odbudowie populacji ryb. Jednocześnie wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań nad monitoringiem rozwoju potomstwa otrzymanego z zapłodnienia mrożonymi plemnikami. Zarówno przeżywalność, jak i kondycja potomstwa uzyskanego z zapłodnienia mrożonym nasieniem są najlepszym kryterium doboru procedury mrożeniowej. Inne wskaźniki, takie jak ruchliwość plemników, uzyskany odsetek zapłodnionej ikry, same nie zawsze są najlepszym wskaźnikiem biologicznej wartości kriokonserwowanych plemników. Końcowym miernikiem wartości plemników jest to, jakie cechy ujawnią się u potomstwa. Dotychczas przeprowadzono zbyt mało badań, aby stwierdzić wpływ procesu mrożenia gamet i użytych substancji chemicznych na cechy przekazywane potomstwu. Wskazane jest rozszerzenie zakresu badań, przy użyciu innych technik, pozwalających stwierdzić prawidłowość rozwoju potomstwa.

*Badania współfinansowane przez Unię Europejską w ramach Programu Operacyjnego „Zrównoważony rozwój sektora rybołówstwa i nadbrzeżnych obszarów rybackich 2007- 2013”, nr umowy 00001-61724-OR1600004/10.*

## Literatura

Babiak I., Glogowski J., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H., Strzezek J., Demianowicz W. 2001 – Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa – *Theriogenology* 56: 177-192.

Cabrita E., Alvarez R., Anel L., Rana K.J., Herráez M.P. 1998 – Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm – *Cryobiology* 37: 245-253.

Cabrita E., Robles V., Rebordinos L., Serasquete C., Herráez M.P. 2005 – Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm – *Cryobiology* 50: 144-153.

Chereguini O., García de la Banda I., Rasines I., Fernández A. 2002 – Growth and survival of young turbot (*Scophthalmus maximus* L.) produced with cryopreserved sperm – *Aquacult. Res.* 33: 637-641.

Dreanno C., Suquet M., Quemener L., Cosson J., Fierville F., Normant Y., Billard R. 1997 – Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa – *Theriogenology* 48: 589-603.

Drokin S., Stein H., Bertscherer H. 1998 – Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta* F. fario) – *Cryobiology* 37: 263-270.

Dziewulska K., Rzemieniecki A., Czerniawski R., Domagała J. 2011 – Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets – *Theriogenology* 76: 300-311.

Glogowski J., Cejko B.I., Sarosiek B., Demianowicz W., Kowalski R.K. 2009 – Kriokonserwacja nasienia ryb łososiowatych – W: Rozród, profilaktyka ryb łososiowatych i innych gatunków (red.) Z. Zakęś, K. Demska-Zakęś, A. Kowalska, D. Ulikowski, Wyd. IRS, Olsztyn: 117-125.

Graybill J.R., Horton H.F. 1969 – Limited fertilization of steelhead trout eggs with cryo-preserved sperm – *J. Fish. Bd Can.* 26: 1400-1404.

Gwo J.C., Ohta H., Okuzawa K., Wu H.C. 1999 – Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) – *Theriogenology* 51: 569-582.

Harvey B., Kelley R.N., Ashwood-Smith M.J. 1982 – Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol – *Can. J. Zool.* 60: 1867-1870.

Horváth Á., Urbányi B. 2000 – The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm – *Aquacult. Res.* 31: 317-324.

Jodun W.A., King K., Farrell P., Wayman W. 2006 – Methanol and egg yolk as cryoprotectants for Atlantic salmon spermatozoa – *N. Am. J. Aquacult.* 69: 36-40.

Labbe C., Martoriati A., Devaux A., Maise G. 2001 – Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout – *Mol. Reprod. Dev.* 60: 397-404.

Lahnsteiner F. 2000 – Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike – *Aquacult. Res.* 31: 245-258.

Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R. A. 1995 – uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta fario* L., *Salmo trutta lacustris* L., *Coregonus* sp. – *Aquacult. Res.* 26: 801-806.

Linhart O., Billard R., Proteau J.P. 1993 – Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa – *Aquaculture* 115: 347-359.

Linhart O., Rodina M., Cosson J. 2000 – Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos – *Cryobiology* 41: 241-250.

Linhart O., Rodina M., Cosson J. 2005 – Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability and hatching success of embryos – *Cryobiology* 51: 250-261.

Liu Q.H., Li J., Xio Z.Z., Ding F.H., Yu D.D., Xu X.Z. 2007 – Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*) – *Aquaculture* 263: 20-25.

Miskolczy E., Mihályfi Sz., Várkonyi E.P., Urbányi B., Horváth A. 2005 – Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm – *Aquaculture* 247: 119-125.

Ogier de Baulny B., Le Vern Y., Kerboeuf D., Maise G. 1997 – Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa – *Cryobiology*, 34, 141-149.

Sarvi K., Niksirat H., Mojazi Amiri B., Mirtorabi S.M., Rafiee G.R., Bakhtiyari M. 2006 – Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) – *Aquaculture* 256: 564-569.

Tiersch T.R., Goudie Ch.A., Carmichael G.J. 1994 – Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm – *Trans. Am. Fish. Soc.* 123: 580-586.

Tiersch T.R., Wayman W.R., Skapura D.P., Neidig C.L., Grier H.J. 2004 – Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch) – *Aquacult. Res.* 3: 278-288.

Truscott B., Idler R., Hoyle R.J., Freeman H.C. 1968 – Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm – *J. Fish. Res. Bd Canada* 25: 363-372.

Young W.P., Frenyea K., Wheeler P.A., Thorgaard G.H. 2009 – No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm – *Aquaculture* 289: 13-18.

*Przyjęto po recenzji 4.09.2012 r.*

---

## **SURVIVAL AND GROWTH OF SEA TROUT (*SALMO TRUTTA M. TRUTTA* L.) ALEVIN PRODUCED FROM EGGS FERTILIZED WITH CRYOPRESERVED SPERMATOZOA**

**Katarzyna Dziewulska, Robert Czerniawski, Iwona Goździk, Józef Domagała**

**ABSTRACT.** The cryopreservation of milt in liquid nitrogen has recently been introduced on farms as a storage technique for the milt of valuable breeding lines and for surpluses of spermatozoa. It is also used in conservation programs for endangered species. However, physical factors and the chemical environment during the freezing of gametes in liquid nitrogen can damage the cells, which can result in changes in cell properties and can also affect the characteristics of the offspring obtained from fertilization with frozen gametes. The resulting defects can appear at different stages of ontogenesis and influence life functions. The aim of this study was to evaluate the survival and health of sea trout offspring up to the three-month-old alevin stage. The offspring were obtained by fertilizing fresh eggs using spermatozoa that had previously been frozen in liquid nitrogen with the addition of methanol as a cryoprotectant. The milt was frozen in straws in liquid nitrogen according to the standard technique for salmonids. Then the eggs were fertilized with fresh (control group) and frozen/thawed (experimental group) sperm. The eggs were incubated, and then the fish were reared until the age of three months in a closed recirculation system. During early development, no significant differences between the control and experimental groups of fish were noted. Survival from the eyed-egg stage to the end of rearing was similar in both groups. The weights of the hatched and 3-month-old alevins were similar. These results suggest it is possible to use frozen milt for fry production and fish population restoration. Moreover, the results indicate the need for further research on monitoring the development of offspring produced through fertilization with frozen sperm.

**Keywords:** cryopreservation, methanol, sea trout, *Salmo trutta m. trutta*