



1 Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
2 Zakład Hodowli Ryb Łososiowatych, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie
3 Zakład Hodowli Ryb Jesiotrowatych Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie
4 Ośrodek Zarybieniowy i Wylęgarnia Ryb Łososiowatych PZW w Łopusznej
e-mail : *j.nynca@pan.olsztyn.pl

Wstęp

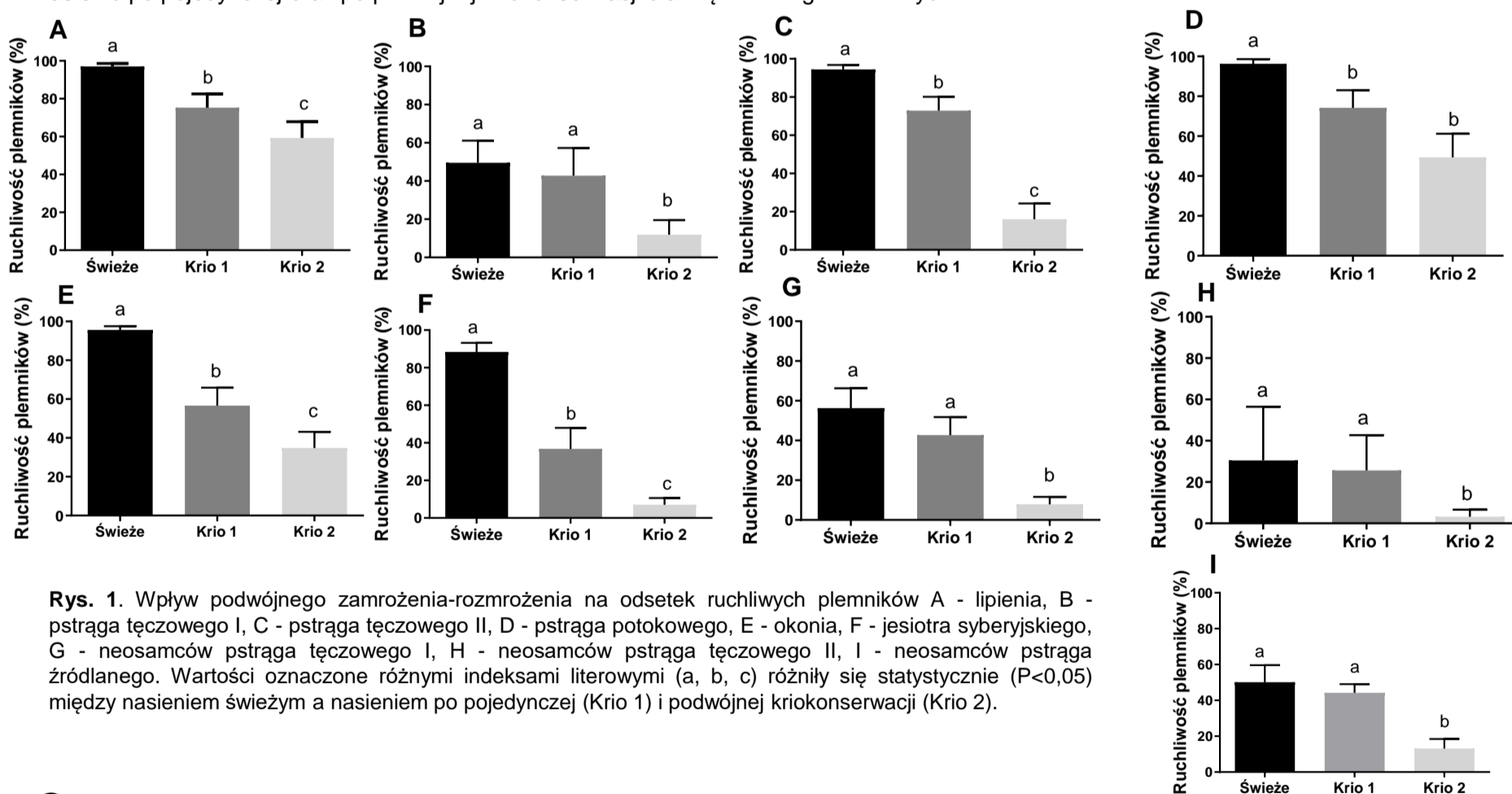
Technika podwójnej kriokonserwacji może być przydatna dla ochrony zagrożonych gatunków, gdyż umożliwia wykorzystanie mniejszej objętości nasienia w porównaniu do standardowej pojedynczej procedury kriokonserwacji oraz pozwala na dwukrotne użycie tej samej porcji nasienia. Jednakże, zgodnie z naszą wiedzą zastosowanie podwójnej kriokonserwacji nigdy nie było testowane dla nasienia ryb. Ponowne zamrożenie nasienia ryb mogłoby przyczynić się do ochrony materiału genetycznego zagrożonych gatunków, osobników niezwykle cennych dla akwakultury oraz osobników, od których można pobrać znikomą objętość nasienia. Celem niniejszych badań była ocena wpływu dwóch cykli zamrażania i rozmrażania na (i) odsetek ruchliwych plemników różnych gatunków ryb [lipień, pstrąg potokowy, pstrąg tęczowy, okoń europejski, jesiotr syberyjski, odwrócone samice (neosamce) pstrąga tęczowego i pstrąga źródlanego] oraz (ii) ruchliwość i zdolność zapładniającą nasienia pstrąga tęczowego.

Materiały i Metody

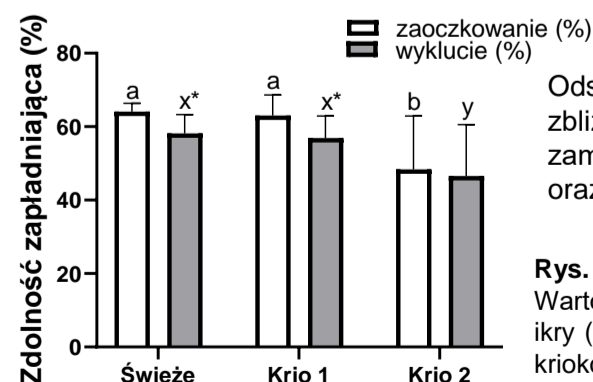
Kriokonserwację przeprowadzono przy użyciu rozrzedzalnika glukoza-metanol (GM). Słomki o pojemności 0,5 ml po napełnieniu rozrzedzonym nasieniem do odpowiednich koncentracji plemników ekwilibrowano przez 15 min w temp. 4°C, a następnie zamrażano przez 5 min w oparach ciekłego azotu na ramkach o wysokości 3 cm (Minitüb GmbH). Po upływie 5 min słomki przenoszono do ciekłego azotu. Słomki z zamrożonym nasieniem rozmrażano w łaźni wodnej w temp. 40°C przez 10 s. Po rozmrożeniu (Krio 1) i ocenie odsetka ruchliwych plemników próbki nasienia zostały poddane ponownej kriokonserwacji (Krio 2). Test zapłodnienia dla nasienia świeżego, poddanego pojedynczej kriokonserwacji (Krio 1) oraz po podwójnej kriokonserwacji (Krio 2) przeprowadzono dla pstrąga tęczowego. Odsetek ruchliwych plemników nasienia świeżego oraz kriokonserwowanego analizowano przy pomocy systemu do komputerowej analizy ruchliwości plemników (CEROS II, Hamilton-Thorne).

Wyniki

Dwa cykle zamrażania i rozmrażania nasienia skutkowały uzyskaniem zróżnicowanych wartości odsetka ruchliwości plemników dla poszczególnych gatunków ryb. Nasienie lipienia (59,2%), pstrąga potokowego (49,4%) oraz okonia (34,8%) charakteryzowało się wyjątkowo wysokim odsetkiem ruchliwych plemników po podwójnej kriokonserwacji, w przeciwieństwie do nasienia neosamców pstrąga tęczowego (3,2%) oraz jesiotra syberyjskiego (7%), dla których odnotowano najniższe wartości tego parametru (Rys. 1). Wykazano istotne korelacje między odsetkiem ruchliwych plemników w nasieniu po pojedynczej oraz po podwójnej kriokonserwacji dla większości gatunków ryb.



Rys. 1. Wpływ podwójnego zamrożenia-rozmrożenia na odsetek ruchliwych plemników A - lipienia, B - pstrąga tęczowego I, C - pstrąga tęczowego II, D - pstrąga potokowego, E - okonia, F - jesiotra syberyjskiego, G - neosamców pstrąga tęczowego I, H - neosamców pstrąga tęczowego II, I - neosamców pstrąga źródlanego. Wartości oznaczone różnymi indeksami literowymi (a, b, c) różniły się statystycznie ($P < 0,05$) między nasieniem świeżym a nasieniem po pojedynczej (Krio 1) i podwójnej kriokonserwacji (Krio 2).



Odsetek zaoczkowanej ikry zapłodnionej nasieniem świeżym (kontrola jakości ikry) wynosił ok. 64% i był zbliżony dla wartości uzyskanych dla nasienia po pojedynczej kriokonserwacji. Po dwóch cyklach zamrażania i rozmrażania odnotowano znaczny spadek odsetka zaoczkowanych embryonów (do ok. 48%) oraz w odsetku wyklucia larw (ok. 46%) (Rys. 2).

Rys. 2. Zdolność zapładniająca świeżego, nasienia po pojedynczej (Krio 1) i podwójnej kriokonserwacji (Krio 2). Wartości oznaczone różnymi indeksami literowymi różniły się od siebie statystycznie ($P < 0,05$) w odsetku zaoczkowanej ikry (a, b) oraz w odsetku wyklucia (x, y) między świeżym nasieniem, nasieniem po pojedynczej (Krio 1) i podwójnej kriokonserwacji (Krio 2).

Podsumowanie

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na skuteczność podwójnej kriokonserwacji nasienia ryb. Podejście to może być ważne dla poprawy skuteczności wykorzystania kriokonserwowanego nasienia ryb, co może potencjalnie zredukować koszty i przestrzeń niezbędną do utrzymania banku zamrożonego nasienia. Metoda podwójnej kriokonserwacji może być nowym narzędziem w pełniejszym wykorzystaniu cennych prób zamrożonego nasienia, co może zwiększyć możliwość ochrony zagrożonych gatunków ryb i osobników, które są niezwykle cenne dla hodowli.