

Kriokonserwacja nasienia ryb – znaczenie, specyfika oraz krajowe osiągnięcia w ostatnim dziesięcioleciu

JAN GLOGOWSKI, ANDRZEJ CIERESZKO*

Zakład Andrologii Molekularnej, *Zakład Biologii Nasienia Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Glogowski J., Ciereszko A.

Fish sperm cryopreservation – importance, specificity and Polish achievements from the last decade

Summary

This paper deals with fish sperm cryopreservation techniques emphasizing the contribution of Polish science in this field in the past decade. Useful aspects of this biotechnology both in commercial applications for fish hatcheries, as well as in the protection of endangered species, are presented. Stages of the cryopreservation procedure are described together with aspects of sperm collection and spermatozoa physiology of freshwater euteleosts and sturgeons. Details of sperm quality evaluation and their purpose in sperm deep freezing are discussed. Design criteria concerning choice of diluents and cryoprotectants as well as dilution ratios and storage methods are described. The use of thawed sperm for ova fertilization together with thawing conditions and procedures with regards to the storage method are explained. Prospects for biochemical methods of sperm quality evaluation, especially emphasizing their usefulness in predicting the effects of fish sperm freezing/thawing procedures are also introduced.

Keywords: fish sperm, cryopreservation

Problematykę kriokonserwacji nasienia ryb podjęto już cztery lata po odkryciu przez Polge i wsp. (29) w 1949 r., że glicerol, obniżając punkt zamarzania, pełni ochronną funkcję w procesie zamrażania do -79°C i rozmrażania plemników ptaków. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że pionierem w zakresie kriokonserwacji nasienia ryb (mlecza) był Blaxter (11), który w 1953 r. użył mrożonego nasienia śledzia do uzyskania krzyżówki śledzi wiosennego i jesiennego tarła. Od tego czasu obserwuje się wzrost zainteresowania problematyką kriokonserwacji nasienia ryb, przejawiający się zarówno liczbą publikowanych prac, jak i próbami opracowania biotechniki mrożenia nasienia coraz to nowych gatunków tej, liczącej około 20 000 gatunków, gromady zwierząt. Jak szacują Billard i wsp. (10) oraz Rana (30), do 1995 r. zamrożono nasienie około 200 gatunków ryb. Najwięcej publikacji dotyczy kriokonserwacji nasienia ważnych z punktu widzenia gospodarczego i ekonomicznego gatunków ryb łososiowatych, karpowatych i sumowatych. Obejmuje zarówno gatunki ryb słodkowodnych, morskich, jak i wędrownych (dwiśrodowiskowych), ważnych dla rybactwa, wędkarstwa, hodowli ryb ozdobnych, dzikich oraz gatunków zagrożonych wyginięciem. Problematykę kriokonserwacji nasienia ryb w Polsce podjął jako pierwszy Moczarski (28), który w 1977 r. zamroził nasienie karpia, jednak jego wartość biologiczna określona na podstawie wyklutych larw była niezadowalająca. Do tej pory w Pol-

sce dokonano kriokonserwacji nasienia takich gatunków, jak: pstrąg tęczy, pstrąg źródlany, pstrąg potokowy, głowacica, lipień, karp, leszcz, amur, boleń, szczupak, okoń, sum, a ostatnio także jesiotr syberyjski, jesiotr rosyjski, wiosłonos amerykański, sterlet i białuga. Uzyskiwane ostatnio wyniki po zapłodnieniu ikry kriokonserwowanym nasieniem, liczone na etapie zaoczkowania embrionów lub wyklucia larw, są zadowalające i dorównują często efektom zapłodnienia świeżym mleczem.

Znaczenie kriokonserwacji nasienia w hodowli i ochronie zagrożonych gatunków ryb

Zastosowanie na skalę produkcyjną kriokonserwowanego nasienia w akwakulturze nie znajduje jeszcze ekonomicznego uzasadnienia. Chcąc uzyskać zapłodnienie na poziomie stosowania świeżego mleczka, które byłoby do przyjęcia w ośrodkach zajmujących się wylęgarnictwem i sprzedażą wylęgu, należy użyć do zapłodnienia 10 razy więcej kriokonserwowanych plemników w przeliczeniu na ziarno ikry. Ponadto zarówno kriokonserwacja, jak i zapłodnienie ikry mrożonym nasieniem wymagają posiadania specjalistycznego sprzętu oraz przeszkolonego personelu. Sygnały z praktyki wskazują jednak, że np. u pstrąga tęczy wiosennego tarła owulacja znacznego odsetka samic wyprzedza możliwość uzyskania nasienia, co powoduje marnotrawienie ikry. Odwrotną sytuację obserwuje się u ważnego dla

wędkarstwa gatunku, jakim jest lipień. Mlecz od samców pozyskuje się znacznie wcześniej niż występuje gotowości samic do tarła, a pod koniec sezonu tarła nie można już uzyskać wartościowego nasienia. Dokonując kriokonserwacji mleczka w szczycie tarła samców można byłoby go użyć do zapłodnienia ikry wcześniej lub późno owulujących samic. Dysponując zamrożonym nasieniem można także dokonywać wymiany materiału genetycznego między dowolnie oddalonymi od siebie ośrodkami, co jest mniej kosztowne i bardziej bezpieczne niż transport żywych tarlaków. Kriokonserwacja umożliwia także długookresowe przechowywanie genomów osobników z cennych linii hodowlanych, uzyskanych na drodze wieloletnich prac selekcyjnych lub w wyniku transgenezy, manipulacji hormonalnych i chromosomowych, co zabezpiecza przed ich utratą spowodowaną groźnymi chorobami, letalnymi warunkami środowiska lub awarią urządzeń w ośrodkach hodowlanych. Kriokonserwacja powinna być także wykorzystana do prac selekcyjnych, jako metoda sprawdzania skuteczności selekcji, poprzez użycie długookresowo przechowywanego nasienia osobników wyjściowych. W oparciu o kriokonserwowane nasienie możliwe jest także tworzenie krzyżówek międzygatunkowych, w przypadku, gdy gatunki rodzicielskie odbywają tarło w różnych porach roku (np. wiosną i jesienią).

Istotne znaczenie ma użycie kriokonserwowanego nasienia w badaniach naukowych, a zwłaszcza do oceny jakości ikry, pozyskanej w różnych okresach sezonu tarła. W okresie naturalnego tarła, trwającego zazwyczaj kilkanaście dni lub nawet kilka tygodni, wartość biologiczna gamet ulega często zmianom. Chcąc wykluczyć czynnik ojcowski, można użyć zamrożonego w szczycie tarła nasienia do testowania jakości ikry pozyskanej na początku, w szczycie i pod koniec naturalnego tarła.

Szczególnie istotne znaczenie może mieć kriokonserwacja i zdeponowanie w banku nasienia w szeroko pojętej ochronie gatunków lub lokalnych populacji ryb zagrożonych wyginieciem (25). Specyfika (zapłodnienie zewnętrzne, zewnętrzny rozwój embrionalny) oraz plastyczność rozrodu tej gromady kręgowców umożliwiają przeprowadzanie manipulacji hormonalnych i genetycznych, w tym androgenozy, czyli uzyskanie żywotnego potomstwa w oparciu jedynie o materiał genetyczny plemnika. Androgeneza polega na inaktywacji matczynej genomu jądrowego w oocytach przy zastosowaniu odpowiedniej dawki promieniowania gamma, X lub UV (1). W celu uzyskania żywotnego, androgenetycznego potomstwa naświetloną ikrę zapładnia się plemnikami diploidalnymi, uzyskanymi od tetraploidalnych samców, lub plemnikami haploidalnymi, od normalnych samców. W tym drugim przypadku, w określonym eksperymentalnie czasie po zapłodnieniu, stosuje się szok fizyczny (termiczny lub ciśnieniowy) powodujący duplikację pojedynczego zestawu chromosomowego poprzez zatrzymanie pierwszego podziału mitotycznego zygoty. Szoki fizyczne stosuje się także w celu uzyskania osobników poliploidalnych.

Do tej pory w Polsce dokonano udanej androgenozy, zarówno wewnątrzgatunkowej (homologicznej) z użyciem kriokonserwowanego nasienia pstrąga tęczowego (1), jak i obcogatunkowej (heterologicznej) w obrębie kilku gatunków ryb karpiowatych (27).

Od kilkunastu lat na świecie tworzone są banki nasienia zarówno gatunków zagrożonych wyginieciem, lokalnych populacji danego gatunku, jak również cennych linii hodowlanych. W Norwegii od 1988 r. realizowany jest program banku genomów ponad 100 rodzimych populacji łososia, w oparciu o kriokonserwację nasienia. W Polsce w 1999 r. utworzono bank nasienia pstrąga tęczowego, w którym przechowywany jest mlecz, uzyskanych drogą wieloletniej selekcji cennych linii tego gatunku. W 2001 r. powstał w kraju bank nasienia karpia, w którym gromadzony jest mlecz kilku rodzimych linii hodowlanych.

Technologia kriokonserwacji nasienia ryb

O sukcesie kriokonserwacji nasienia ryb, mierzonym odsetkiem wykłutych larw po użyciu do zapłodnienia mrożonego mleczka, decyduje szereg czynników, a w postępowaniu technologicznym wyróżnia się siedem głównych etapów (32): pozyskanie nasienia, określenie jego jakości, dobór rozcieńczalnika i krioprotektora, postępowanie przed zamrożeniem, mrożenie, rozmrażanie oraz postępowanie w czasie zapładniania.

Nasienie ryb uzyskuje się bez (łososiwate) lub po uprzedniej stymulacji hormonalnej (karpiowate, jesiotrowate) samców. Stymulacja może odbywać się na poziomie podwzgórza (iniekcja dootrzewnowa różnego rodzaju analogów GnRH) lub przysadki (podanie homologicznego lub heterologicznego ekstraktu przysadki mózgowej lub gonadotropin, np. hCG). Najczęściej po 24 godzinach od iniekcji można pozyskać mlecz dobrej jakości. Rutynowo nasienie pozyskuje się metodą wycierania, polegającą na masażu powłok brzusznych i wyciskaniu mleczka. Wydostające się nasienie można bezpośrednio pobierać do szklanych zlewek lub odsysać przy pomocy strzykawki. W czasie wycierania może jednak dojść do zanieczyszczenia nasienia wodą, śluzem, kałem, krwią lub moczem (13), co w istotnym stopniu obniża jego jakość i przydatność do głębokiego zamrażania. Uniknięcie tych zanieczyszczeń można uzyskać przez pozyskiwanie nasienia bezpośrednio z nasieniowodów przy użyciu plastikowych drenów (21, 24).

Rutynowa ocena nasienia przeznaczonego do kriokonserwacji obejmuje określenie barwy, konsystencji, objętości oraz koncentracji i ruchliwości plemników. Koncentrację plemników określa się najczęściej szybko metodą spektrofotometryczną (12). Koncentracja plemników w nasieniu ryb jest cechą gatunkową, ale jest także zróżnicowana w obrębie gatunku, w zależności od wielu czynników. Odsetek ruchliwych plemników ocenia się subiektywną metodą mikroskopową lub przy użyciu komputerowego systemu do oceny nasienia (CASA). Specyfiką plemników ryb jest brak ruchu w prawidłowo pozyskanym nasieniu, dzięki dużemu stężeniu jonów potasowych w plazmie nasienia lub jej wysokiemu ciśnieniu osmotycznemu. Aktywacja ruchu następuje po

dotaniu do nasienia wody (zapłodnienie następuje w środowisku wodnym) lub specjalnie preparowanych płynów aktywujących. Stosunek objętości nasienia do objętości płynu aktywującego powinien wynosić przynajmniej 1 : 30. W nasieniu przeznaczonym do kriokonserwacji odsetek ruchliwych plemników powinien wynosić co najmniej 80%. Czas trwania ruchu plemników ryb jest stosunkowo krótki i waha się od kilkudziesięciu sekund w przypadku nasienia ryb łososiowatych do kilku minut w zaktywowanym nasieniu ryb karpio-watych i jesiotrowatych. Poza wymienionymi wyżej wyznacznikami przydatne do dodatkowej oceny jakości mlecza jest oznaczanie ciśnienia osmotycznego plazmy nasienia oraz określanie aktywności wybranych enzymów.

W kriokonserwacji nasienia ryb stosuje się bardzo wiele rozcieńczalników, których właściwy skład komponowany jest dla każdego gatunku eksperymentalnie. Początkowo skład mineralny oparty był na zawartości jonów w plazmie nasienia lub osoczu krwi. Dalsze badania wykazały jednak, że proste rozcieńczalniki zawierające 0,3 M glukozę (32) lub 0,6 M sacharozę (20, 24, 26) gwarantują dobre środowisko ochronne podczas kriokonserwacji nasienia pstrąga tęczowego. Niekiedy do rozcieńczalnika dodawane jest żółtko jaja kurzego (2) lub izolowane z żółtka lipoproteidy (8). Istotnym czynnikiem wpływającym na efekt kriokonserwacji jest dobór jakościowy i ilościowy krioprotektora (2, 3, 32). W odróżnieniu od nasienia ssaków, gdzie stosuje się w zasadzie jedynie glicerol, w badaniach kriokonserwacji nasienia ryb najczęściej stosowany jest dimetylo-sulfotlenek (DMSO). Stosowany jest także glicerol, glikol etylenowy (EG), glikol propylenowy (PG), dime-tyloacetamid (DMA) oraz metanol. Wybór rodzaju i optymalnego stężenia krioprotektora zależy od gatunku, sposobu konfekcjonowania nasienia oraz metody zamrażania.

Przed kriokonserwacją nasienie i rozcieńczalnik schładza się najczęściej do temperatury $+4^{\circ}\text{C}$, a następnie do próby mlecza dodawany jest stopniowo rozcieńczalnik. Stosowane są różne stopnie rozrzedzenia, w zależności od koncentracji plemników. Uważa się, że koncentracja plemników w rozrzedzonym nasieniu powinna wynosić około $2,5 \times 10^9/\text{cm}^3$ (32). Nasienie ryb łososiowatych o średniej koncentracji $8-10 \times 10^9/\text{cm}^3$ rozrzedza się w stosunku 1 : 3, karpio-watych (koncentracja $15-20 \times 10^9/\text{cm}^3$) 1 : 5, a jesiotrowatych (koncentracja $0,5-2,5 \times 10^9/\text{cm}^3$) w stosunku 1 : 1. Specyfiką w głębokim zamrażaniu nasienia ryb jest z reguły pominięcie etapu ekwilibracji, czyli jak najszybsze zamrożenie po rozrzedzeniu. Nasienie ryb zamrażane jest w kulkach na suchym lodzie (zestalony CO_2 o temperaturze -79°C), słómkach lub ampułkach w parach ciekłego azotu lub komputerowo sterowanych kriostatach. Stosowane tempo zamrażania wynosi z reguły $20-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Zamrożone nasienie przechowywane jest w ciekłym azocie (-196°C).

W czasie rozmrażania nasienia zalecane jest bardzo szybkie tempo tego procesu (powyżej $1200^{\circ}\text{C}/\text{min}$), w celu niedopuszczenia do powstania dużych kryształ-

ków lodu. Takie warunki uzyskuje się rozmrażając kulki w roztworze o temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$ w czasie 5-7 sekund lub słómkę bądź ampułkę w łaźni wodnej o temperaturze $+40^{\circ}\text{C}$ w czasie 7-8 sekund. Użyte płyny do rozmrażania kulek aktywują ruch plemników, dlatego przy zapłodnieniu ikry należy go użyć natychmiast, dodając odpowiednią objętość rozmrożonego nasienia do znanej porcji ikry. W rozmrożonym nasieniu konfekcjonowanym w słómkach nie dochodzi do aktywacji ruchu, dlatego można go użyć do zapłodnienia w ciągu kilku minut. W tym przypadku do określonej porcji ikry dodaje się odpowiednią objętość rozmrożonego nasienia, aktywuje plemniki roztworem aktywującym i pozostawia przez 2-3 minuty do zapłodnienia.

Przy zapładnianiu ikry kriokonserwowanym nasieniem wykonuje się zawsze próbę kontrolną, w której ikrę zapładnia się świeżym mleczem, bowiem na efekt zapłodnienia wpływa zarówno wartość biologiczna plemników, jak i jakość ikry. Efekt zapłodnienia podawany jest najczęściej jako odsetek zaoczkowanych embri-
onów lub wyklutych larw, w odniesieniu do próby kontrolnej.

Krajowe osiągnięcia kriokonserwacji nasienia ryb w ostatnim dziesięcioleciu

W ostatnim okresie polscy naukowcy opublikowali wiele prac, zarówno w czasopismach o zasięgu światowym, jak i wydawnictwach krajowych, dotyczących problematyki kriokonserwacji nasienia ryb. Najwięcej prac dotyczyło różnych aspektów kriokonserwacji nasienia, ważnego gospodarczo gatunku, jakim jest pstrąg tęczowy (1, 3, 4, 6, 14, 20, 24, 26). Wykazano wpływ składu rozcieńczalnika i czasu ekwilibracji na zdolność zapładniającą kriokonserwowanego nasienia oraz przydatność określania aktywności aminotransferazy asparaginiano-wej i fosfatazy kwaśnej do szacowania wartości biologicznej plemników (4, 14). Stosując świeże i kriokonserwowane nasienie od czterech, różnych pod względem markerów genetycznych, samców stwierdzono, że kriokonserwacja nie zmienia odsetka potomstwa uzyskanego od poszczególnego ojca w stosunku do użycia nasienia świeżego (6). Kriokonserwacja mlecza pochodzącego od samców uzyskanych w wyniku zapłodnienia kriokonserwowanym nasieniem zaowocowała lepszą przydatnością ich nasienia do kriokonserwacji niż nasienia samców uzyskanych po zapłodnieniu ikry nasieniem świeżym (3). Wykazano także (24), że pozyskany metodą katetyzacji nasieniowodów mlecz gwarantuje jego bardzo dobrą przydatność do kriokonserwacji, a średni odsetek wyklutych embri-
onów uzyskanych po zapłodnieniu ikry zamrożonym-rozmrożonym nasieniem od 25 samców wyniósł prawie 82%. Potwierdzono przydatność prostego rozcieńczalnika, jakim jest 0,6 M sacharoza z 10% dodatkiem DMSO do kriokonserwacji nasienia, zarówno normalnych (XY), androgenetycznych (YY), jak i odwróconych hormonalnie (neosamce XX) samców pstrąga tęczowego (20, 26).

Dokonano także udanej kriokonserwacji nasienia głowacicy (15, 23), gatunku zagrożonego wyginięciem, wpisanego do czerwonej księgi. Wykazano jednocześ-

nie (23), że efektywność zastosowanego krioprotektora zależy od sposobu konfekcjonowania nasienia. Mroząc nasienie w kulkach, uzyskano porównywalne efekty wyklucia larw, stosując glicerol lub metanol. Najlepszy efekt (ponad 80% wyklutych larw) uzyskano mroząc nasienie w słómkach w obecności metanolu, podczas gdy glicerol okazał się całkowicie nieprzydatny (około 1% wyklucia).

Krajowe badania dotyczyły także kriokonserwacji nasienia szczupaka europejskiego (8, 9, 18) i amerykańskiego (19). Stosując rozcieńczalnik zawierający 0,6 M sacharozę z 10% dodatkiem żółtka jaja kurzego oraz 15% DMSO uzyskano odsetek zaoczkowanych embriónów na poziomie ponad 90% (18). Przeprowadzono także udane próby kriokonserwacji nasienia karpia (2), leszcza (16, 17) i bolenia (5). Wykazano jednocześnie, że w kriokonserwacji nasienia karpia lepszym krioprotektorem jest dimetyloacetamid (DMA), w stosunku do powszechnie używanego DMSO (2).

Szczególne znaczenie przypisać należy opracowaniu biotechniki kriokonserwacji nasienia ryb jesiotrowatych. Wspólnie z naukowcami z Węgier opublikowano badania (22), w których stosując rozcieńczalnik Tris-sacharoza-KCl, z 10% dodatkiem metanolu i mroząc nasienie w słómkach, uzyskano wylęg jesiotra syberyjskiego na poziomie zbliżonym do próby kontrolnej. Dalsze badania (21, 31) wykazały przydatność tej procedury do kriokonserwacji nasienia jesiotra rosyjskiego i sterleta oraz celowość stosowania testów enzymatycznych i barwienia fluorescencyjnego z użyciem SYBR 14 – jodek propydydy testem żywe/martwe do szacowania wartości biologicznej kriokonserwowanych plemników. Ostatnio (dane niepublikowane) spektakularnym sukcesem zakończył się eksperyment zapłodnienia ikry sterleta kriokonserwowanym nasieniem białugi. Uzyskano wylęg krzyżówki, zwanej besterem, na poziomie powyżej 50%.

Podsumowując, należy stwierdzić, że o sukcesie kriokonserwacji nasienia ryb decyduje wiele czynników. Przydatność badań nad głębokim zamrażaniem nasienia ważnych gospodarczo i zagrożonych gatunków jest powszechnie akceptowana i doceniana. Krajowe osiągnięcia z tego zakresu widoczne są w światowym piśmiennictwie, jak i w cytowaniu realizowanych w Polsce badań.

Piśmiennictwo

- Babiak I., Dobosz S., Goryczko K., Kuźmiński H., Brzuzan P., Ciesielski S.: Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology* 2002, 57, 1229-1249.
- Babiak I., Glogowski J., Brzuska E., Szumiec J., Adamek J.: Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Res.* 1997, 28, 567-571.
- Babiak I., Glogowski J., Dobosz S., Kuzminski H., Goryczko K.: Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation. *J. Fish Biol.* 2002, 60, 561-570.
- Babiak I., Glogowski J., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H.: Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 2001, 56, 177-192.
- Babiak I., Glogowski J., Kujawa R., Kucharczyk D., Mamcarz A.: Cryopreservation of sperm from asp *Aspius aspius*. *Progr. Fish-Cult.* 1998, 60, 146-148.
- Babiak I., Glogowski J., Luczynski M., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H.: The effect of individual male potency on fertilization ability of fresh and cryopreserved milt of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Res.* 1998, 29, 337-340.
- Babiak I., Glogowski J., Luczynski M. J., Kucharczyk D., Luczynski M.: Cryopreservation of the milt of northern pike. *J. Fish Biol.* 1995, 46, 819-825.
- Babiak I., Glogowski J., Luczynski M. J., Luczynski M.: Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike *Esox lucius* L. sperm. *Aquaculture Res.* 1997, 28, 191-197.
- Babiak I., Glogowski J., Luczynski M. J., Luczynski M., Demianowicz W.: The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology* 1999, 52, 473-479.
- Billard R., Cosson J., Crim L. W., Suquet M.: Sperm physiology and quality, [w:] Bromage N. R., Roberts J. (red.): *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Ltd., Cambridge, Massachusetts 1995, 25-52.
- Blaxter J. H. S.: Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature (London)* 1953, 172, 1189-1190.
- Ciereszko A., Dabrowski K.: Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using spectrophotometric technique. *Aquaculture* 1993, 109, 1292-1305.
- Ciereszko A., Dobosz S., Kwaśnik M., Goryczko K., Glogowski J.: Problemy związane z zanieczyszczeniem mleczka. *Komun. Ryb.* 1998, 3, 5-7.
- Glogowski J., Babiak I., Goryczko K., Dobosz S.: Activity of aspartate aminotransferase and acid phosphatase in cryopreserved trout sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996, 8, 1179-1184.
- Glogowski J., Babiak I., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H.: Properties and cryopreservation of Danube salmon (*Hucho hucho*) milt. *Arch. Polish Fish.* 1997, 5, 235-239.
- Glogowski J., Babiak I., Kucharczyk D., Luczynski M.: The effect of individual male variability on cryopreservation of bream (*Abramis brama* (L.)) sperm. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 1997, 44, 279-283.
- Glogowski J., Babiak I., Kucharczyk D., Luczynski M., Piros B.: Some properties of bream *Abramis brama* L. sperm and its cryopreservation. *Aquaculture Res.* 1999, 30, 765-772.
- Glogowski J., Babiak I., Luczynski M. J., Luczynski M.: Factor affecting cryopreservation efficiency and enzyme activity in northern pike, *Esox lucius*, sperm. *J. Appl. Aquaculture* 1997, 7, 53-67.
- Glogowski J., Ciereszko A., Dabrowski K.: Cryopreservation of muskellunge and yellow perch semen. *N.A.J.A.* 1999, 61, 258-262.
- Glogowski J., Goryczko K., Dobosz S., Babiak I., Kowalski R., Kuźmiński H., Drabiński M., Ciereszko A.: Możliwości wykorzystania świeżego i kriokonserwowanego nasienia samców androgenetycznych i maskulinizowanych samic w celu uzyskania jednopłciowych populacji pstrąga tęczowego, [w:] Goryczko K. (red.): *Problemy pstrągarstwa polskiego w 2001 roku*. Wyd. IRS 2002, 51-64.
- Glogowski J., Kolman R., Rzemieniecki A., Dietrich G., Demianowicz W., Sieczyński P., Sarosiek B., Wysocka J., Kowalski R., Wojtczak M., Ciereszko A.: Biologia nasienia ryb jesiotrowatych i jego kriokonserwacja, [w:] Zakęś Z. i wsp. (red.): *Rozród, podchów, profilaktyka ryb jesiotrowatych i innych gatunków*. Wyd. IRS 2004, 35-42.
- Glogowski J., Kolman R., Szczepkowski M., Horvath A., Urbanyi B., Sieczyński P., Rzemieniecki A., Domagala J., Demianowicz W., Kowalski R., Ciereszko A.: Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture* 2002, 211, 367-373.
- Glogowski J., Kowalewski M., Demianowicz W., Dietrich G., Wojtczak M., Kowalski R., Sarosiek B., Ciereszko A.: Kriokonserwacja nasienia głowacicy (*Hucho hucho*), [w:] Goryczko K. (red.): *Pstrągarstwo: produkcja, środowisko, profilaktyka*. Wyd. IRS 2003, 85-96.
- Glogowski J., Kwaśnik M., Piros B., Dabrowski K., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H., Ciereszko A.: Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquaculture Res.* 2000, 31, 289-296.
- Goryczko K., Glogowski J., Ciereszko A.: Propozycja sposobu realizacji ochrony ex situ rzadkich gatunków ryb. *Rocz. Nauk. PZW.* 2001, 14 (Suppl.), 73-82.
- Kowalski R. K., Sarosiek B., Judek J., Dobosz S., Kuźmiński H., Glogowski J.: Możliwości krótko- i długookresowego przechowywania nasienia manipulowanych genetycznie pstrągów tęczowych, [w:] Kuźmiński H. (red.): *Pstrągarstwo – hodowla, manipulacje genetyczne, zagrożenia prawne, ochrona zdrowia*. Wyd. IRS 2006, 97-107.
- Kucharczyk D.: Rozród kontrolowany i androgeniza wybranych gatunków ryb karpowatych. *Praca hab.* Wyd. UWM Olsztyn, Rozprawy i Monografie 2002, 63, 7-80.
- Moczarski M.: Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.* 1977, 25, 187-190.
- Polge C., Smith A. U., Parkes A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature (London)* 1949, 164, 266-267.
- Rana K. J.: Preservation of gametes, [w:] Bromage N. R., Roberts J. (red.): *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science Ltd., Cambridge, Massachusetts 1995, s. 53-75.
- Sarosiek B., Ciereszko A., Rzemieniecki A., Domagala J., Glogowski J.: The influence of semen cryopreservation on the release of some enzymes from siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) and starlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Arch. Pol. Fish.* 2004, 12, 13-22.
- Tiersch T. R., Mazik P. M. (red.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA 2000, 1-439.

Adres autora: prof. dr hab. Jan Glogowski, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: glogo@pan.olsztyn.pl