

Kriokonserwacja nasienia maskulinizowanych samic pstrąga tęczowego

GRZEGORZ J. DIETRICH, MARIOLA WOJTCZAK, MARIOLA SŁOWIŃSKA, HENRYK KUŹMIŃSKI*, STEFAN DOBOSZ*, JAN GLOGOWSKI, ANDRZEJ CIERESZKO

Zakład Biologii Nasienia Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn
*Zakład Hodowli Ryb Łososiowatych Instytutu Rybactwa Śródlądowego, Rutki, 83-330 Żukowo

Dietrich G. J., Wojtczak M., Słowińska M., Kuźmiński H., Dobosz S., Glogowski J., Ciereszko A.
Cryopreservation of sperm of rainbow trout neomales

Summary

The objectives of this study were: sperm cryopreservation, computer assisted sperm motility analysis (CASA) and improvement of sperm motility through *in vitro* incubation of rainbow trout neomale spermatozoa. *In vitro* incubation of sperm in ASP (Artificial Seminal Plasma) solution resulted in an increase of the percentage of motile spermatozoa, while other sperm motility characteristics remained unchanged. The highest hatching rates were obtained for sperm cryopreserved in straws (16.3% and 25.0%): cryopreservation in pellets was less successful (7.7% and 3.8%), for non-incubated and incubated sperm, respectively. There were significant regressions between hatching rates and straight-line velocity (VSL; $R^2 = 0.75$) and average path velocity (VAP; $R^2 = 0.74$) for sperm preincubated in ASP and cryopreserved in straws. These data indicate that sperm of rainbow trout neomales may be successfully cryopreserved and CASA analysis is useful for the prediction of fertilizing ability of cryopreserved sperm.

Keywords: milt, rainbow trout, cryopreservation, neomales

Produkcja wyłącznie samiczych populacji pstrąga tęczowego ma istotne znaczenie dla akwakultury. Samice pstrąga tęczowego dojrzewają później od samców i w związku z tym ich okres wzrostu jest dłuższy, co pozwala na uzyskanie rozmiarów handlowych przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. Z tego powodu efektywność chowu populacji samiczych jest większa niż w przypadku obupłciowych populacji, gdyż składniki pasz używane są głównie do przyrostu masy mięsniowej, nie zaś do wzrostu i rozwoju układu rozrodczego. Dodatkowo, mięso samic charakteryzuje się lepszymi parametrami konsumpcyjnymi (9).

Populacje samicze można uzyskać poprzez metody manipulacji bezpośredniej, takiej jak: gynogeneza lub stymulacja hormonalna, lub manipulacji pośredniej (8). Przez wzgląd na duże straty narybku związane z manipulacjami hormonalnymi oraz obawy konsumentów, związane z podawaniem rybom hormonów steroidowych, preferuje się stosowanie metod pośrednich. W przypadku pstrąga tęczowego, w celu otrzymania pokolenia samiczego, stosuje się metodę pośrednią, wykorzystując nasienie uzyskane od maskulinizowanych samic. Proces maskulinizacji indukowany jest poprzez podawanie w paszy androgenów (np. 17- α -metylotestosteron) we wczesnym okresie dyferencjacji płci (3). Powstałe w ten sposób neosamce, ryby o fenotypie samczym i genotypie samiczym, są zdolne do

wytwarzania plemników. Ponieważ płęć genetyczna neosamców jest żeńska, plemniki zawierają tylko chromosom X. W wyniku użycia takich plemników do zapłodnienia uzyskuje się wyłącznie potomstwo żeńskie (6).

Układ rozrodczy neosamców na ogół nie posiada nasieniowodów, plemniki uzyskuje się bezpośrednio z jąder, w związku z czym nie podlegają one dojrzewaniu, które zachodzi w nasieniowodach (4). W nasieniowodach ryb dochodzi do szeregu procesów fizjologicznych, m.in. regulacji składu jonowego plazmy nasienia i uwalniania hormonów wpływających na uzyskanie przez plemniki zdolności do ruchu (1, 7). Z powodu braku etapu dojrzewania plemniki neosamców charakteryzują się obniżoną jakością (np. niskim odsetkiem ruchliwych plemników) i często wymagają dodatkowej inkubacji w warunkach *in vitro*, zanim zostaną użyte do zapłodnienia (10). W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat głębszej charakterystyki nasienia neosamców, szczególnie w zakresie poznania parametrów szybkości i trajektorii ruchu plemników. Tego typu badania można przeprowadzić przy pomocy komputerowej analizy ruchu plemników (CASA).

Brak nasieniowodów u neosamców uniemożliwia przyżyciowe pobranie nasienia, w związku z czym konieczne jest przetrzymywanie zwiększonej ilości ryb

w ośrodkach hodowlanych. Potencjalną metodą umożliwiającą zredukowanie stada tarłowego jest kriokonserwacja nasienia neosamców. Jej wprowadzenie może zapewnić hodowcy całoroczną dostępność nasienia, możliwość tworzenia banków genów oraz ułatwienie w obrocie mleczem (10).

Celem badań było opracowanie technik kriokonserwacji nasienia neosamców, a także szczegółowa analiza ruchu plemników neosamców przy pomocy komputerowego systemu analizy ruchu oraz próba poprawy ruchliwości plemników w warunkach *in vitro* poprzez inkubację w płynie dojrzewającym.

Material i metody

Do badań wykorzystano nasienie 10 maskulinizowanych samic (2+, średnia masa 300 g). Ryby pochodziły z Zakładu Hodowli Ryb Łososiowatych w Rutkach.

Mlecz uzyskano *post mortem* po uprzedniej maceracji jąder. Następnie mlecz rozrzedzono w stosunku 1 : 1 buforem ASP (artificial seminal plasma; 7) o składzie: 100 mM NaCl, 40 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM Tris, pH 8,5. Tak uzyskaną zawiesinę oraz próbki kontrolne (mlecz bez dodatku ASP) inkubowano przez 60 min. w temperaturze 4°C. Po określeniu ruchliwości plemników (metodą subiektywną i CASA) próby nasienia poddano kriokonserwacji, stosując dwie metody konfekcjonowania: w kulkach i słomkach.

We wszystkich próbkach mleczu przeznaczonych do kriokonserwacji określono koncentrację plemników przy użyciu komory Bürkera. W celu kriokonserwacji próby nasienia rozrzedzono rozcieńczalnikiem składającym się z 0,6 M sacharozy z 10% dodatkiem DMSO (dimetylosulfotlenek) w stosunku objętościowym 1 : 3. Nasienie i rozcieńczalnik schłodzono do temperatury 4°C. Po rozrzedzeniu i wymieszaniu nasienie zamrażano w kulkach o objętości 50 µl na suchym lodzie (-79°C). Po 5 minutach kulki przenoszono do ciekłego azotu (-196°C) i przechowywano do czasu użycia do zapłodnienia. W celu kriokonserwacji w słomkach rozrzedzonym nasieniem napełniano standardowe słomki o objętości 250 µl i umieszczano je na przygotowanej ze styropianu ramce o wysokości 4 cm, pływającej na ciepłym azocie. Po trzech minutach słomki umieszczano i przechowywano w ciepłym azocie.

W celu oceny zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia rozmrożono 8 kulek w ciągu 6 sekund w 10 cm³ wody wylęgarnianej o temperaturze 25°C, dodano do 200 ziaren ikry (około 3 mln plemników/ziarno ikry) i delikatnie wymieszano. Po 3 minutach ikrę kilkakrotnie przepłukano wodą wylęgarnianą. Zapłodnioną ikrę pozostawiono do napęcznienia przez 1 godzinę, po czym obsadzano w aparacie kalifornijskim. Jednocześnie wykonano próbę kontrolną, w której do 200 ziaren ikry dodano 100 µl świeżego mleczu, zalano 10 cm³ wody wylęgarnianej o temperaturze 6°C, a następnie postępowano jak wyżej. Oceny wartości biologicznej plemników (zdolności zapładniającej) dokonano na etapie wylęgu w stadium resorpcji połowy woreczka żółtkowego.

Nasienie w słomkach rozmrażano w łaźni wodnej, w temperaturze 40°C przez 7 sekund i przenoszono do próbek. Następnie pobierano od 250 do 500 µl (w zależności

od koncentracji plemników, tak aby uzyskać około 3 mln plemników na ziarno ikry) i dodawano do ikry. Dalej postępowano jak w przypadku zapłodnienia z użyciem kulek. Próby wykonano w duplikatach.

Przed kriokonserwacją dokonano komputerowej analizy ruchu plemników. Plemniki aktywowano płynem owaryjnym, stosując 200-krotne rozcieńczenie nasienia (2). Natychmiast po aktywacji 0,7 µl mieszaniny nanoszono na szkiełko podstawowe, jednocześnie nagrywając ruch plemników. Nagrań video dokonano przy pomocy mikroskopu z obiektywem o 10-krotnym powiększeniu, czarno-białej kamery CCD (Sony SPT-M108CE) i magnetowidu. Nagrania analizowano przy pomocy programu Hobson Sperm Tracker (Hobson Vision Ltd, Maslow, Wielka Brytania) służącego do komputerowej analizy ruchu plemników (system CASA).

Określono następujące parametry ruchu plemników:

VSL – prędkość ruchu prostoliniowego plemników mierzona w µm/sekundę,

VCL – prędkość ruchu krzywoliniowego plemników mierzona w µm/sekundę,

STR – kierunkowość ruchu plemników mierzona w procentach (VAP/VCL*100),

MOT – odsetek ruchliwych plemników mierzony w procentach,

VAP – prędkość średnia ruchu plemnika mierzona w µm/sekundę,

LIN – liniowość ruchu plemnika wyrażona w procentach (VSL/VCL*100).

Obliczeń statystycznych dokonano przy użyciu programu GraphPad Prism 4.0 stosując test t-Studenta oraz jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA dla pomiarów powtarzalnych z testem post-hoc Tukeya. Analizę zależności pomiędzy parametrami ruchu plemników a odsetkiem wylęgających larw przeprowadzono przy pomocy regresji prostoliniowej.

Wyniki i omówienie

Inkubacja nasienia w buforze ASP powodowała istotny wzrost odsetka plemników ruchliwych mierzonego zarówno metodą subiektywną oraz CASA (tab. 1).

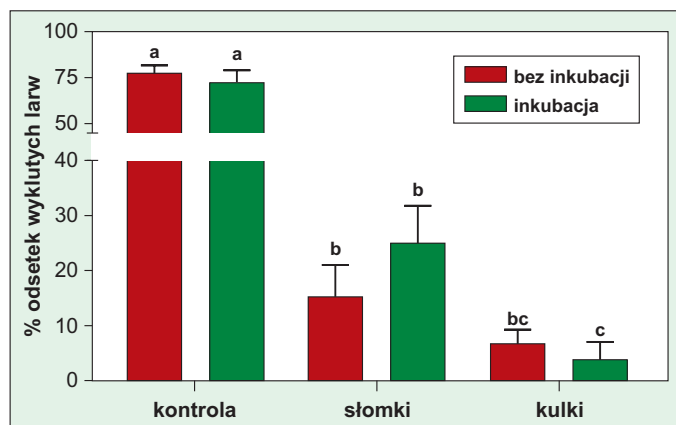
Tab. 1. Parametry ruchu plemników neosamców pstrąga tęczowego (średnie ± SE) oznaczane metodą subiektywną (n = 10) oraz metodą CASA (n = 7)

Parametr	Bez inkubacji	Inkubacja 1 godz. w buforze ASP
% ruchliwych plemników (metoda subiektywna)	27,0 ± 6,0	45,0 ± 8,0*
% ruchliwych plemników (metoda CASA)	27,4 ± 5,8	40,4 ± 4,3*
VSL	37,1 ± 4,1	33,6 ± 1,7
VAP	63,4 ± 7,2	66,5 ± 5,6
VCL	100,8 ± 6,1	93,1 ± 6,9
LIN	37,6 ± 3,5	32,2 ± 2,4
STR	59,1 ± 3,4	48,9 ± 2,1*

Objaśnienia: * – istotnie różne od nasienia nie poddanego inkubacji, p < 0,05

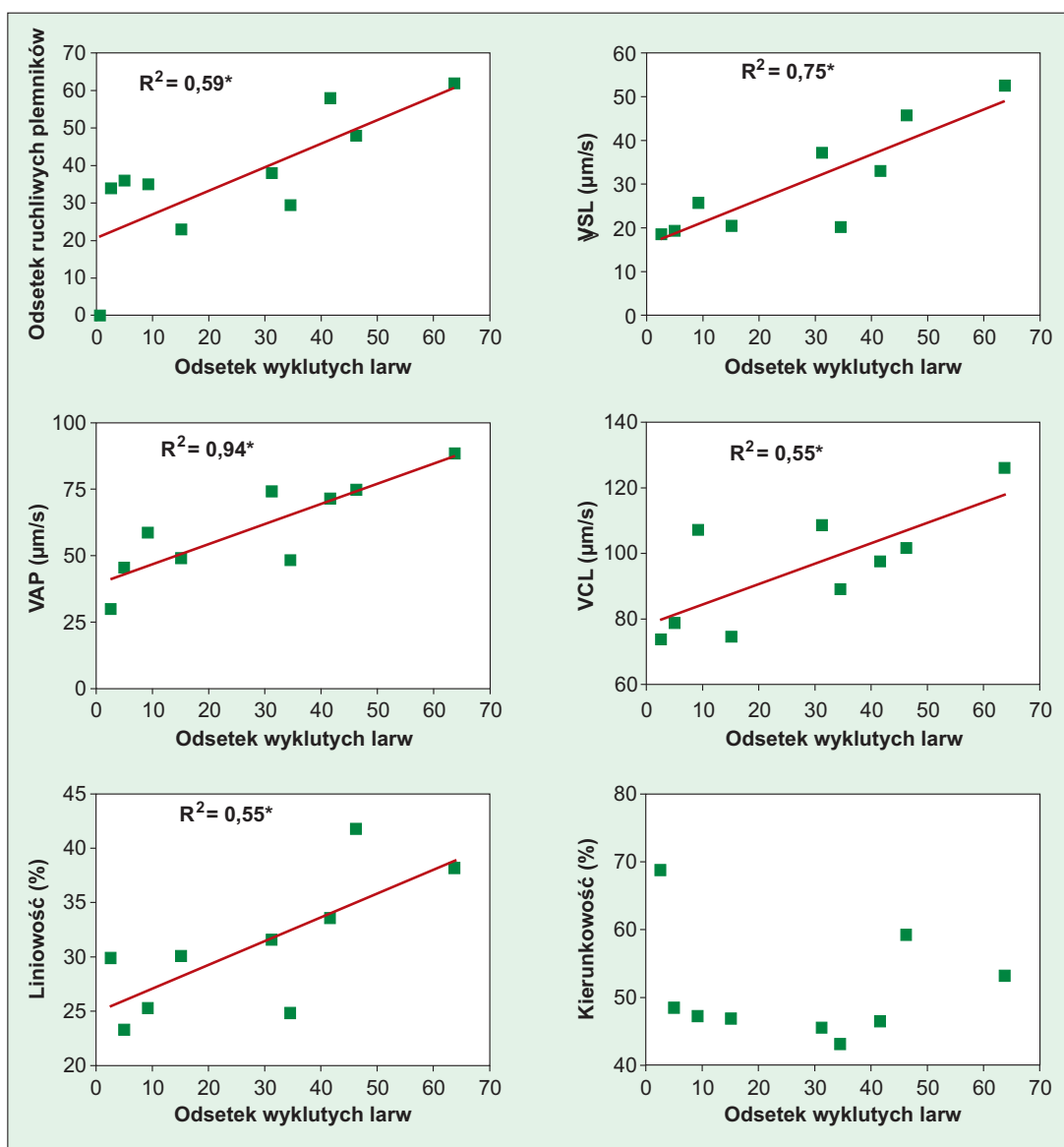
Jednocześnie obserwowano obniżenie kierunkowości (STR) ruchu plemników ($p < 0,05$) oraz tendencję do obniżania się parametru liniowości (LIN, $p = 0,08$). Wyniki te wskazują na możliwość poprawy odsetka ruchliwych plemników maskulinizowanych samic poprzez inkubację w warunkach *in vitro*. Analiza parametrów CASA wykazała, że dojrzewaniu plemników w warunkach *in vitro* towarzyszą zmiany w trajektorii ruchu. ASP był używany do przeprowadzenia dojrzewania plemników jądrowych pstrąga tęczowego w warunkach *in vitro* (7). Uzyskane wyniki wskazują, że podobne zjawisko występuje w odniesieniu do plemników uzyskanych od neosamców. Należy podkreślić, że podobne wyniki uzyskali Robles i wsp. (10) przy zastosowaniu komercyjnego płynu Maturfish IMV, Francja. W chwili obecnej trudno dyskutować o mechanizmie działania tego płynu, gdyż skład jest zastrzeżony.

Nasienie świeże charakteryzowało się stosunkowo wysoką zdolnością zapładniającą (około 75%, ryc. 1). Wartość biologiczna kriokonserwowanego nasienia była znacznie niższa i wynosiła dla kulek 7,7% i 3,8%, zaś dla słomek 16,3% i 25%, odpowiednio dla nasienia nieinkubowanego i inkubowanego w ASP. Inkubacja w buforze ASP nie wpłynęła znacząco na zdolność zapładniającą plemników świeżych i kriokonserwowanych. Uzyskane wyniki wskazują, że przydatność nasienia neosamców do kriokonserwacji była ograniczona. Użyty rozcieńczalnik i metoda konfekcjonowania w kulках jest skuteczną i powtarzalną metodą kriokonserwacji nasienia pstrąga tęczowego. Glogowski i wsp. (5), stosując omawianą metodę, uzyskali odsetek wylęgu 82%. Przyczyny obniżonej przydatności nasienia neosamców do kriokonserwacji nie są znane. Na-



Ryc. 1. Wpływ metody konfekcjonowania kriokonserwowanego nasienia neosamców i preinkubacji w buforze dojrzewającym na zdolność zapładniającą plemników mierzoną odsetkiem wylutych larw ($n = 10$)

Objaśnienia: Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie, $p < 0,05$



Ryc. 2. Wybrane istotne zależności pomiędzy odsetkiem wylutych larw a wybranymi parametrami ruchliwymi kriokonserwowanych plemników pstrąga tęczowego poddanego 1-godzinnej ekspozycji przed mrożeniem w słomkach ($n = 9$)

Objaśnienia: * – zależność statystycznie istotna, $p < 0,05$

szym zdaniem, jednym z czynników decydujących była niska jakość nasienia świeżego (np. ruchliwość 40%, podczas gdy nasienie świeże powinno charakteryzować się ruchliwością co najmniej 90% (5)). Niska jakość nasienia neosamców może być uwarunkowana sezonowo. Robles i wsp. (10) stwierdzili, że nasienie neosamców pobrane zimą było bardziej przydatne do kriokonserwacji, co wyrażało się wyższym odsetkiem zapłodnienia w stosunku do nasienia pobranego wiosną. Otrzymane wyniki wskazują, że konfekcjonowanie w słómkach może być przydatne do kriokonserwacji nasienia neosamców. Tę metodę konfekcjonowania należy preferować z powodu ułatwień związanych z identyfikacją i przenoszeniem zamrożonego mleczu oraz obniżeniem ryzyka przenoszenia patogenów. Należy dążyć do polepszenia jakości wyjściowej nasienia, uwzględniając takie czynniki, jak: wiek tarlaków, metodyka odwracania płci, stymulacja hormonalna produkcji nasienia oraz okres sezonu rozrodczego.

W przeciwieństwie do ruchliwości (tab. 1) zastosowanie ASP nie doprowadziło do zwiększenia zdolności zapładniającej plemników neosamców. W odniesieniu do nasienia świeżego, brak zwiększonej zdolności zapładniającej nasienia inkubowanego mógł wynikać ze zbyt dużej ilości plemników użytych do zapłodnienia. Być może, inkubacja w ASP może być przydatna do polepszenia jakości nasienia kriokonserwowanego w słómkach, jednakże dalsze badania są potrzebne do potwierdzenia tej sugestii.

Stwierdzono istotne zależności pomiędzy wartością biologiczną plemników kriokonserwowanych w słómkach a odsetkiem ruchliwych plemników (MOT), parametrami opisującymi prędkość ruchu (VCL, VSL, VAP) oraz liniowość ruchu (LIN) dla nasienia poddanego przed mrożeniem 1 godz. inkubacji (ryc. 2). Najwyższe wartości współczynników regresji stwierdzono dla VSL ($R^2 = 0,75$) i VAP ($R^2 = 0,74$). Między pozostałymi parametrami ruchu plemników, a ich wartością biologiczną nie stwierdzono statystycznie istotnych zależności. Analiza korelacji nie wykazała statystycznie istotnych zależności między wartością biologiczną mleczu mrożonego w kulkach, określoną na podstawie odsetka wykłutych larw pstrąga tęczowego, a parametrami ruchliwości. Rurangwa i wsp. (11) wykazali, że parametry CASA charakteryzujące prędkość ruchu plemników (VAP, VSL, VCL) są wysoce skorelowane z wynikami zapłodnienia. Można zatem wnioskować, że uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność metody CASA do oceny jakości kriokonserwowanego nasienia pstrąga tęczowego. Metoda ta pozwala na oszacowanie jakości nasienia, poddanego różnym procedurom kriokonserwacji (np. wpływ preinkubacji, rozcieńczalnika, krioprotektora, konfekcjonowania, tempa mrożenia) bez konieczności przeprowadzania kosztownych i czasochłonnych prób biologicznych (11).

Reasumując, wykazano możliwość kriokonserwacji nasienia neosamców pstrąga tęczowego. Szczegól-

nie korzystne okazało się konfekcjonowanie nasienia w słómkach. Wykazano powiązanie parametrów ruchu, wyznaczonych przy pomocy CASA, ze zdolnością zapładniającą plemników mrożonych w słómkach. Dalsze prace powinny koncentrować się na polepszeniu zdolności zapładniającej plemników neosamców pstrąga tęczowego.

Piśmiennictwo

1. Billard R., Takashima F.: Resorption of spermatozoa in the sperm duct of rainbow trout during the post-spawning period. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1983, 49, 387-392.
2. Dietrich G. J., Kowalski R., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K., Ciereszko A.: Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. Fish Physiol. Biochem. 2005, 31, 1-9.
3. Donaldson E. M.: Manipulation of reproduction in farmed fish. Anim. Reprod. Sci. 1996, 42, 381-392.
4. Geffen A. J., Evans J. P.: Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 2000, 182, 61-72.
5. Glogowski J., Kwasnik 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. Aquac. Res. 2000, 31, 289-296.
6. Goryczko K.: Pstrągi, chów i hodowla. Poradnik hodowcy.: Wyd. IRŚ, Olsztyn 2005.
7. Morisawa S., Morisawa M.: Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. J. Exp. Biol. 1986, 126, 89-96.
8. Pandian T. J., Koteeswaran R.: Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia 1998, 384, 167-243.
9. Piferrer F., Donaldson E. M.: Sex control in Pacific salmon, [w:] Bromage N., Donaldson E. M., Zanuy S., Carrilo M., Planas J.: Applications of Comparative Endocrinology to Fish Culture, [w:] Muir J. F., Roberts R. J. (wyd.): Recent Advances in Aquaculture IV. Blackwell, Oxford 1993, 69-77.
10. Robles V., Cabrera E., Cuñado S., Herraiz M. P.: Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. Aquaculture 2003, 224, 203-212.
11. Rurangwa E., Volckaert F. A. M., Huyskens G., Kime D. E., Ollevier F.: Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clarias gariepinus*). Theriogenology 2000, 55, 751-769.

Adres autora: mgr inż. Grzegorz Dietrich, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn;
e-mail: dietrich@pan.olsztyn.pl