

Wyniki odchowu narybku karpia (*Cyprinus carpio*) uzyskanego po inseminacji nasieniem mrożonym w rozcieńczalniku z dodatkiem kobamamidu

W. Czerepnin, I. Grycyniak, W. Bech, A. Bezusyj, D. Syrowatka

*Instytut Gospodarki Rybackiej, Narodowa Akademia Nauk Rolniczych,
ul. Obuhovskaja 135, 03164 Kijów, Ukraina*

Współczesna gospodarka rybacka stoi przed problemem zachowania cennych gatunków ryb – stanowiących część kultury wodnej. W świecie funkcjonują dwie drogi osiągnięcia tego celu – tworzenie stad selekcyjnych lub też zachowanie ich zarodków w bankach materiału genetycznego.

Krótki czas tarła powoduje, że w procesie produkcji ryb wykorzystuje się ograniczoną ilość reproduktorów elitarnych. Wspomniane warunki negatywnie wpływają na jakościowe wskaźniki potomstwa i jego genetyczną różnorodność, co często prowadzi do zubożenia puli genów ryb i negatywnego wpływu depresji inbredowej.

Jednym z działań, zmierzających do zachowania puli genów ryb jest doskonalenie metod kriokonserwacji i przechowywania nasienia elitarnych samców (Kopeika i in., 2007). Nowe metody pozwolą na efektywne magazynowanie i wieloletnie wykorzystanie zamrożonego nasienia, pobranego od niewielkiej ilości reproduktorów. W efekcie, nastąpi poprawa genetycznej i hodowlanej jakości cennych gatunków ryb już w najbliższym okresie.

Pomimo dużych osiągnięć w zakresie metod kriokonserwacji nasienia ryb, konieczne są dalsze badania, uwzględniające między innymi specyficzne wymagania poszczególnych gatunków (Sarvi i in., 2006). Niestety, na Ukrainie jedynie niewielka część badań kriobiologicznych poświęcona jest doskonaleniu metod konserwacji i przechowywania nasienia ryb.

Celem podjętych badań była optymalizacja metod kriokonserwacji nasienia karpio-

wych na drodze modyfikacja rozcieńczalnika do mrożenia nasienia przez dodanie kobamamidu¹ oraz ocena efektywności tej modyfikacji.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w latach 2011–2012 w gospodarstwie doświadczalnym „Niwka” na potomstwie niwczańskiego karpia łuskowego w stadium ontogenezy, otrzymanym po inseminacji nasieniem świeżym i mrożonym.

Nasienie pobrano od 10 samców i określono jego objętość przy użyciu pipety z dokładnością do 0,01 cm³. Jakość nasienia badano przy użyciu mikroskopu optycznego „Zeiss Axiostar plus” z zainstalowaną kamerą „JVC TK-C1480BE” oraz programu „Video Test Sperm 2.1”. Następnie, nasienie dzielono na dwie porcje, z których jedną poddawano procesowi zamrażania – rozmrażania w ciekłym azocie. Mrożeniu poddawano nasienie zawierające co najmniej 60% plemników o ruchu postępowym.

W procesie zamrażania wykorzystano zmodyfikowany rozcieńczalnik dla nasienia karpia, przygotowany według następującej receptury: 17 g tris-hydroksymetyloaminometanu rozpuszczano w 1 litrze wody destylowanej z miareczkowaniem HCl do poziomu pH 8. Z kolei, w celu uzyskania 1 l roztworu w 600–700 ml buforu rozcieńczano, stale mieszając, następujące komponenty: 4,2 g NaCl, 0,6 g KCl, 2,8 g

¹ Kobamamid – koenzym witaminowy B12

NaHCO₃, 1,37 g sacharozy, 0,62 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,18 g CaCl₂ · 6 H₂O. Na pół godziny przed inseminacją do roztworu dodano 150 g żółtka jajka oraz 180 g glikolu etylenowego. Objętość roztworu doprowadzono do 1 l przez dodanie roztworu buforowego Tris-HCl. Modyfikacji rozcieńczalnika dokonano przez dodanie do niego kobamamidu o koncentracji od 0,1 do 1,0 mg/l.

Przed rozpoczęciem doświadczeń nasienie oraz rozcieńczalnik schłodzono do temperatury +9°C. Do schłodzonego nasienia karpia dawano, mieszając nieprzerwanie, schłodzony do tej samej temperatury rozcieńczalnik w proporcji 1:1. Uzyskane zawiesiny poddawane były półgodzinnej ekwilibracji w temperaturze +9°C, a następnie umieszczane w plastikowych ampułkach o objętości 0,5 ml oraz w zagłębieniach uprzednio schłodzonej płytki polimerowej. Zastosowano następujący proces zamrażania:

I etap: od +5 do -15°C z szybkością 1–2 min;
 II etap: od -15 do -70°C z szybkością 15–20 min;
 III etap: bezpośrednie zanurzenie w azocie ciekłym.

W celu przeprowadzenia kontroli jakości zakonserwowanego nasienia zamrożone kulki rozmrażano w łaźni wodnej przez 30 s w temperaturze +40°C do uzyskania fazy ciekłej, a po wyjęciu energicznie wstrząsano ampułki do pełnego rozmrożenia nasienia. Rozmrożone nasienie aktywowano wodą ze stawu oraz 0,35% NaHCO₃.

Wyniki i ich omówienie

Najlepsze wyniki uzyskano stosując roz-

cieńczalnik do nasienia z dodatkiem kobamamidu o stężeniu 0,3 mg/l. Przeżywalność plemników po rozmrożeniu wzrosła o 18%, a czas aktywności - o 20 s w porównaniu do nasienia bez kobamamidu. Rozmrożonym nasieniem z dodatkiem kobamamidu zapłodniono następnie ikrę grupy eksperymentalnej.

Ikrę każdej z pięciu samic, po wcześniejszym pozbawieniu jej kleistości, rozkładano na dwie szalki Petriego, w których dokonywano zapłodnienia nasieniem świeżym i mrożonym, należącym do określonego samca. Inkubację przeprowadzono w pięciu litrowych aparatach inkubacyjnych, zbliżonych swą konstrukcją do aparatów Weissa.

Otrzymany narybek wzrastał w plastikowych pojemnikach o pojemności 40 l, podłączonych do zamkniętego obiegu wody. W ten sposób parametry środowiska (temperatura wody: +24°C, poziom tlenu w wodzie: 7,8–8,2 mg O₂/l) były jednakowe dla wszystkich grup narybku. W pierwszym etapie narybek karmiono wrotkami, a następnie stawowym zooplanktonem i startową paszą jesienną.

Otrzymanym z eksperymentalnej oraz kontrolnej grupy narybkiem zarybiono dwa stawy o powierzchni 0,5 ha, określając gęstość zarybienia na 25 tys. szt./ha.

Chów obu grup karpia odbywał się wyłącznie z wykorzystaniem naturalnej bazy paszowej. Nie stosowano żadnych organicznych ani sztucznych odżywek mineralnych.

Podstawowymi wskaźnikami oceny i porównania jednorocznego karpia o różnym pochodzeniu były wskaźniki średniej masy ciała, czas opuszczenia stawu narybkowego oraz produkcja ryb (tab. 1).

Tabela 1. Wyniki porównawcze chowu karpia w sezonie 2010–2011 w dwóch grupach
 Table 1. Comparative results of carp husbandry in the 2010–2011 season in two groups

Nr stawu <i>Pond no.</i>	Powierzchnia <i>Area (ha)</i>	Grupy karpia <i>Carp groups</i>	Wyłowione <i>Caught</i>			Produkcja ryb <i>Fish productivity (kg/ha)</i>
			%	W, g	K _t	
1	0,5	świeże nasienie <i>natural semen</i>	38,5	48,4	2,77	353,2
2	0,5	Mrożone nasienie <i>frozen semen</i>	58,9	54,9	2,98	400,4

W stawie numer 1 uzyskano 353,2 kg karpia w przeliczeniu na 1 ha. W stawie numer 2 produktywność karpia kształtowała się na poziomie 400,4 kg/ha, co w przypadku stawów na Polesiu jest dobrym wynikiem w warunkach naturalnego chowu narybku karpia. W dodatku, przy wskaźniku średniej masy 58,9 g, karpie ze stawu nr 2, uzyskane po zapłodnieniu nasieniem mrożonym, przewyższały karpie z grupy kontrolnej o 34,6%. Przewyższały je także pod względem zdolności do tuczu (K_t).

Na zarodkach, wylęgu i narybku z eksperymentalnej i kontrolnej grupy karpia przeprowadzono badania reakcji na działanie czynników ekstremalnych.

Aby umożliwić porównanie uzyskanych w badaniach różnorodnych danych i wskaźni-

ków, wartości absolutne przekształcono w wartości porównywalne odchyłeń normatywnych:

$$\eta = X - \bar{X} / \sigma,$$

gdzie: X – średnia wartość wskaźnika dla konkretnej grupy;

\bar{X} – średnia wartość wskaźnika dla wszystkich eksperymentalnych grup;

σ – zmienność.

Wyniki charakterystyki produkcyjnej dwóch grup karpia opracowane zostały na podstawie przeprowadzonych badań według metody przyjętej w hodowli ryb.

Wyniki badań odchyłeń normatywnych w grupach różnego pochodzenia w stadium wylęgu i narybku demonstruje tabela 2.

Tabela 2. Normatywne odchylenia średnich wartości w badaniach ekstremalnych i hodowlanych dwóch grup karpia

Table 2. Standard deviations of the means in extreme and breeding studies of two carp groups

Wskaźniki – <i>Indicators</i>	Grupy karpia – <i>Carp groups</i>	
	mrożone nasienie <i>frozen semen</i>	świeże nasienie <i>natural semen</i>
Ikra zaoczkowana – <i>Oculated eggs</i>		
Odporność na szok termiczny – <i>Resistance to thermal shock</i>	1,53	-0,34
Odporność na pirydynę – <i>Resistance to pyridine</i>	1,37	-0,21
Odporność na pirydynę pod wpływem szoku termicznego <i>Resistance to pyridine in response to thermal shock</i>	1,61	0,76
Wydajność wolno pływającego w podwyższonej temperaturze <i>Yield of slow-flowing in elevated temperature</i>	0,80	-0,01
Wydajność wolno pływającego w obniżonej temperaturze <i>Yield of slow-flowing in decreased temperature</i>	1,44	-0,12
Wydajność wolno pływającego w podwyższonej temperaturze pod wpływem szoku termicznego <i>Yield of slow-flowing in elevated temperature in response to thermal shock</i>	1,55	1,48
Wydajność wolno pływającego w obniżonej temperaturze pod wpływem szoku termicznego <i>Yield of slow-flowing in decreased temperature in response to thermal shock</i>	1,42	1,06
Suma – <i>Total</i>	9,72	2,62
Wylęg – <i>Hatchlings</i>		
Odporność na odwodnienie – <i>Resistance to dehydration</i>	1,25	-0,14
Odporność na szok termiczny – <i>Resistance to thermal shock</i>	1,10	-1,60
Suma – <i>Total</i>	2,35	-1,74
Narybek – <i>Fry</i>		
Odporność na chroniczną hipoksję – <i>Resistance to chronic hypoxia</i>	-0,50	-0,41
Odporność na stan ostrej hipoksji – <i>Resistance to acute hypoxia</i>	0,68	-0,01
Suma – <i>Total</i>	1,18	-0,52
Narybek ze stawów hodowlanych – <i>Fry from breeding ponds</i>		
Wydajność – <i>Yield</i>	0,63	-0,46
Produkcja ryb – <i>Fish productivity</i>	0,48	0,59
Suma – <i>Total</i>	1,11	0,13

Najwyższe wskaźniki według sumy wartości odchyień normatywnych dla wczesnych stadiów rozwoju, pozwalają na wskazanie grupy karpia otrzymanych po inseminacji nasieniem mrożonym jako najbardziej wydajnej.

Grupa ta przewyższa sumą otrzymanych wartości grupę karpia uzyskanych po inseminacji nasieniem świeżym we wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach.

Wnioski

W podsumowaniu należy stwierdzić, że we wszystkich badaniach grupa karpia uzyskanych po inseminacji nasieniem mrożonym w rozcieńczalniku z dodatkiem kobamamidu osiągnęła lepsze wyniki we wszystkich stadiach ontogenezy w porównaniu do grupy karpia inseminowanych nasieniem świeżym. Wysokie wartości sumaryczne odchyień normatywnych w ekstremalnie szkodliwych warunkach potwierdziły praktyczne walory hodowli tych ryb.

Literatura

Kopeika E., Kopeika J., Zhang T. (2007). Cryopreservation of fish sperm. *Met. Mol. Biol.*, 386: 203–217.

Metodičeskoe posobie po kriokonservacii spermy karpa, lososevyh i osetrovyh ryb (1997). Moskwa.

Sarvi K., Niksirat H., Mojazi Armi B., Mirtorabi

S.M., Rafiee G.R., Bakhtyari M. (2006). Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture*, 256: 564–569.

Urbah W.Ju. (1975). Statističeskij analiz v biologičeskikh i medicinskih issledovanijah. Moskwa, *Medicina*, ss. 234–240.

GROWTH PERFORMANCE OF CARP FRY (*CYPRINUS CARPIO*) OBTAINED AFTER INSEMINATION WITH SEMEN FROZEN IN COBAMAMIDE EXTENDER

Summary

Modern fishery management faces the problem of preserving valuable species of fish that are a part of aquaculture. Throughout the world, this goal is achieved in two ways: by creating selection herds or by preserving their embryos in genetic material banks.

One of the measures aimed at maintaining the pool of fish genes is to improve the methods for cryopreservation and storage of semen from elite males. The aim of the present study was to optimize methods for cryopreservation of Cyprinidae semen through modification of semen freezing extender (by adding cobamamide) and to evaluate the efficiency of this modification.

The study was carried out in 2011–2012 at the Niwka Experimental Farm using the offspring of Niwka scale carp during ontogenesis, obtained from fresh and frozen semen. In all the experiments, the group of carp obtained from semen frozen in cobamamide extender achieved better results at all stages of ontogenesis compared to the group of carp inseminated with fresh semen. The high total values of standard deviations in extremely harmful conditions confirmed the practical value of breeding these fishes.

Tłumaczenie z jęz. ros.: Aleksander Wawrzyńczak