



SZKOLENIE

Technologia pozasezonowej produkcji materiału obsadowego okonia europejskiego w kontekście dywersyfikacji akwakultury

Olsztyn, 21-22 kwietnia 2023 r.

Operacja „Dywersyfikacja produkcyjnej funkcji stawów ziemnych w oparciu o semi-intensywny wychów okonia” współfinansowana jest ze środków pochodzących z Europejskiego Funduszu Morskiego i Rybackiego w ramach działania Innowacje, Priorytetu 2 „Wspieranie akwakultury zrównoważonej środowiskowo, zasobooszczędnej, innowacyjnej, konkurencyjnej i opartej na wiedzy” zawartego w Programie Operacyjnym „Rybactwo i Morze 2014-2020”; umowa o dofinansowanie nr 00002-6521.1-OR1400004/17/20 zawarta w dniu 13.11.2020 r.

PRO PERCH

Konsorcjum badawcze





Biotechnologiczne aspekty akwakultury okonia

Piotr Hliwa¹, Daniel Źarski², Jarosław Król³

¹ Katedra Ichtiologii i Akwakultury, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

² Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

³ Zakład Hodowli Ryb Łososiowatych, Instytut Rybnictwa Śródlądowego im. St. Sakowicza, Państwowy Instytut Badawczy w Olsztynie

PRO PERCH

Konsorcjum badawcze



Techniki biotechnologiczne

akwakultura okonia

(1) krótko- i długoterminowe przechowywanie gamet

(2) poliploidyzacja

(3) produkcja samiczych monoptciowych stad



PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Krótkoterminowe przechowywanie gamet

Cele

- zabezpieczenie nasienia o najlepszej jakości** (zgromadzenie odpowiedniego zapasu nasienia; synchronizacja tarła; wykorzystanie nasienia w odpowiednim momencie)
- poprawa jakości nasienia** (rewitalizacja plemników; poprawa wartości biologicznej plemników; odbudowa i zmagazynowanie zapasów ATP)
- ograniczenie manipulacji z tarlakami** (dbałość o kondycję i zdrowotność tarlaków; krzyżowanie osobników odległych od siebie genetycznie; możliwość uzyskania efektu heterozji)
- restytucja gatunków zagrożonych** (ochrona populacji przed chowem wsobnym; wzrost jakości podchowyanego materiału; zachowanie zmienności genetycznej rozradzanych ryb)
- zarządzanie stadem tarłowym** (możliwość produkcji krzyżówek; efektywne wykorzystanie nasienia; wzrost ekonomiki produkcji)



PRO PERCH

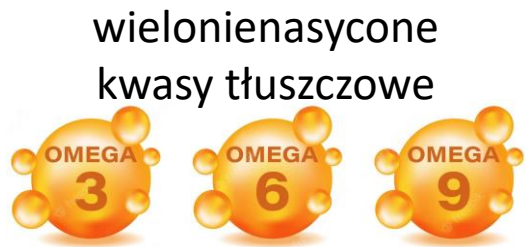


Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki

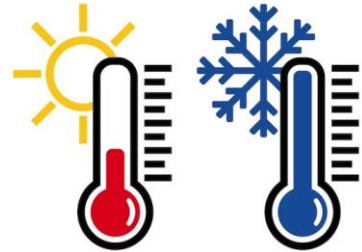


Krótkoterminowe przechowywanie gamet









Przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro* – temperatura



- zapewnienie płynności
- wymiana tlenowa
- absorbcja nutrientów
- wydalanie metabolitów



odmienny skład lipidowy błon komórkowych plemników

temperatura	4°C	8°C
udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych		
dynamika procesów oksydacyjnych		
zachowanie żywotności plemników w warunkach <i>in vitro</i>		
spermatogeneza		



PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Krótkoterminowe przechowywanie gamet

Skuteczność przechowywania nasienia w warunkach *in vitro*



- właściwy sposób pozyskiwania
- wstępna ocena jakości (nasienie <30% ruchliwości nie powinno być wykorzystywane w trakcie kontrolowanego rozrodu w warunkach produkcyjnych)
- wybór prób cechujących się najlepszą jakością
- optymalizacja czasu i metody przechowywania



PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Krótkoterminowe przechowywanie gamet

Przechowywanie nasienia w warunkach *in vitro* – rozrzedzanie



- ograniczanie negatywnego wpływu kumulowania produktów przemiany materii (zapewnienie plemnikom dostępu do tlenu)
- podtrzymanie bazowego metabolizmu (limitowanie szkodliwych metabolitów oddychania komórkowego)



PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Kriokonserwacja – wstęp

kriokonserwacja / krioprezerwacja (grec. *κρύος kryos* – zimno i łac. *praeservare/conservare* – zachować)

kriobiologia (*krio* + grec. *bios* „życie” oraz *logos* „nauka”) – dział biologii zajmujący się badaniem wpływu niskich temperatur na życie organizmów

- ❑ kriokonserwacja – głębokie zamrażanie, umożliwiające przechowywanie materiału biologicznego przez bardzo długi czas, ze względów praktycznych (dostępność, stosunkowo niska cena) w ciekłym azocie (temp. -196°C)
- ❑ w temperaturze poniżej -139°C woda przechodzi w stan krystaliczny; jej cząsteczki drgają, lecz nie przemieszczają się, co uniemożliwia przebieg jakichkolwiek reakcji chemicznych
- ❑ jedynym zagrożeniem natywności materiału biologicznego jest promieniowanie tła oraz protony promieni kosmicznych powodujące jonizację, która akumuluje się z upływem czasu
- ❑ teoretycznie takie oddziaływanie może uszkodzić zamrożone komórki po 3 - 20 tys. lat przechowywania



PRO PERCH

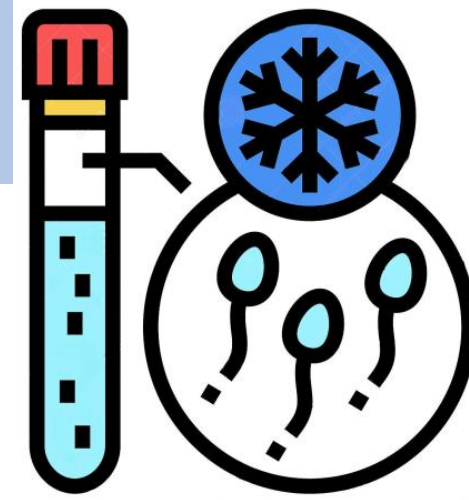


Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Kriokonserwacja gamet

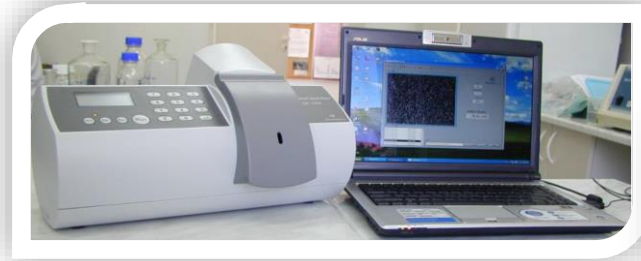
Schemat kriokonserwacji nasienia – (1) ocena jakości



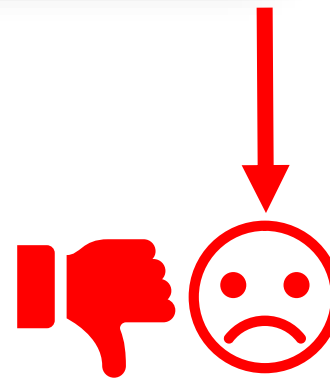
pobór nasienia



analiza ruchliwości plemników



analiza koncentracji plemników



PRO PERCH

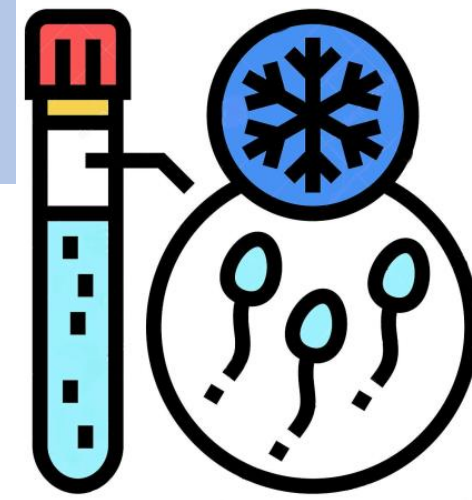


Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



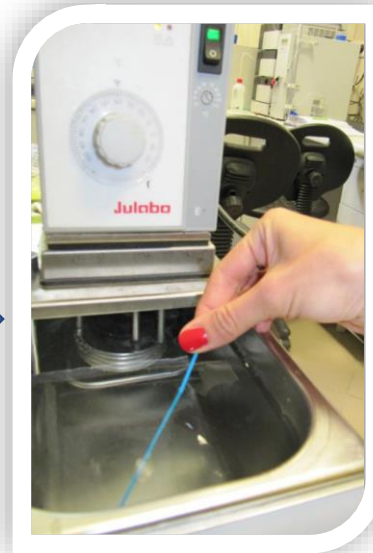
Kriokonserwacja gamet

Schemat kriokonserwacji nasienia – (2) zamrażanie oraz ocena jakości po rozmrożeniu

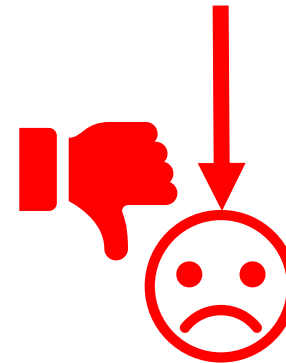


zamrażanie nasienia
(temp. -196°C)

rozmrażanie nasienia
(40°C/10 s)



analiza ruchliwości plemników



przechowywanie w ciekłym azocie



kontrolowany rozród



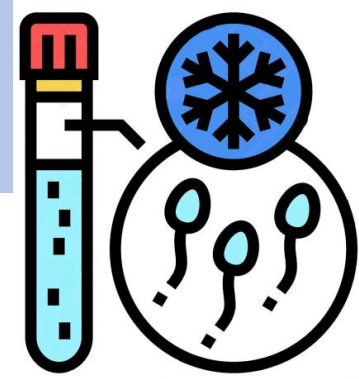
PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Kriokonserwacja gamet



krioprotektanty – związki chemiczne chroniące zamrażane tkanki

krioprotektanty / krioprotektory

przenikające:

glicerol, metanol, glikol etylenowy,
dimetylosulfotlenek (DMSO),
dimetyloacetamid (DMA)

- 1) wnikają do komórki zwiększając osmolalność
- 2) zmniejszają tempo dyfuzji wody i powstawania kryształków lodu
- 3) neutralizują skutki szoku osmotycznego

nieprzenikające:

cukry (glukoza, sacharoza, trechaloza),
białka (żółtka jaja kurzego, kazeina,
albumina), polimery (poliwinylopyrroidon,
dextran)

- 1) nie wnikają do komórki
- 2) obniżają temperaturę zamarzania i zeszklenia (witryfikacji)



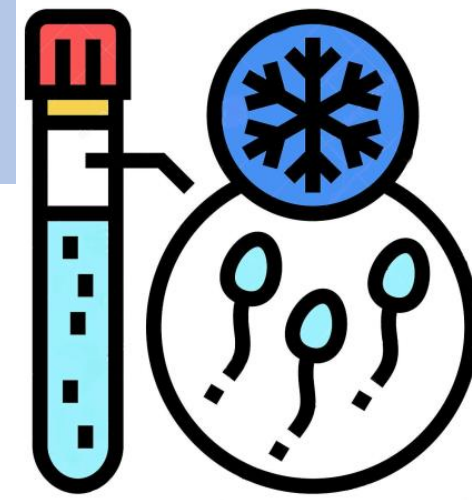
PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Kriokonserwacja gamet



Wyniki kriokonserwacji nasienia okonia w zależności od zastosowanego krioprotektanta

ruchliwość (%)	próba biologiczna - zapłodnienie (%)	krioprotektant	źródło
b.d.	29,1-37,2	glukoza i DMSO	Rodina i in. (2008)
43 – 90	b.d.	10% metanol	Bernáth i in. (2015)
14.0 ± 1.6	4.5 (± 9.0)	Tanaka (30% krioprotektant) tj. 15% metanol + 15% propylen-glikol	Kása i in. (2017)
66 – 73	78	0.30 M glukoza w 7.5% metanolu	Judycka i in. (2019)
77 – 81	61-96 (średnio 77,6%)	(GM 25K) tj. 0.30 M glukoza, 7.5% metanol i 25 mM KCl	Judycka i in. (2022)



PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Poliploidyzacja – triploidyzacja

- ❑ **triploidyzacja** – biotechnika, której celem jest uzyskanie potomstwa o powiększonym o **50% zestawie chromosomów (3n)** wobec osobników rodzicielskich
- ❑ u ryb najczęściej wykorzystuje się do tego celu dwa rodzaje szoków/udarów środowiskowych (**termiczne, ciśnieniowe**), znacznie rzadziej chemiczne
- ❑ parametry szoków środowiskowych ustalane są eksperymentalnie dla każdego gatunku, dotyczą określenia: **temperatury wody w trakcie szoków termicznych, wartości zastosowanego ciśnienia hydrostatycznego, czasu inicjacji szoku od momentu aktywacji komórki jajowej oraz czasu trwania samego szoku**



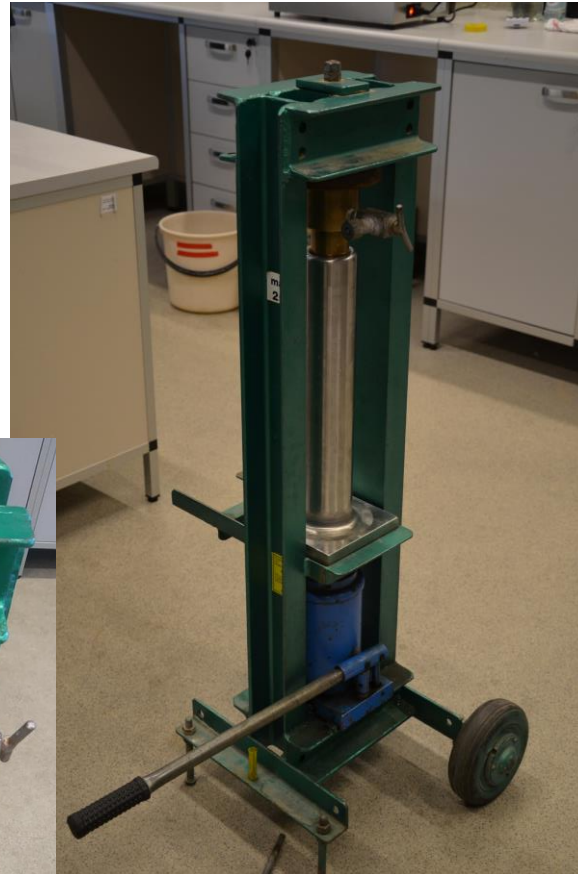
PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



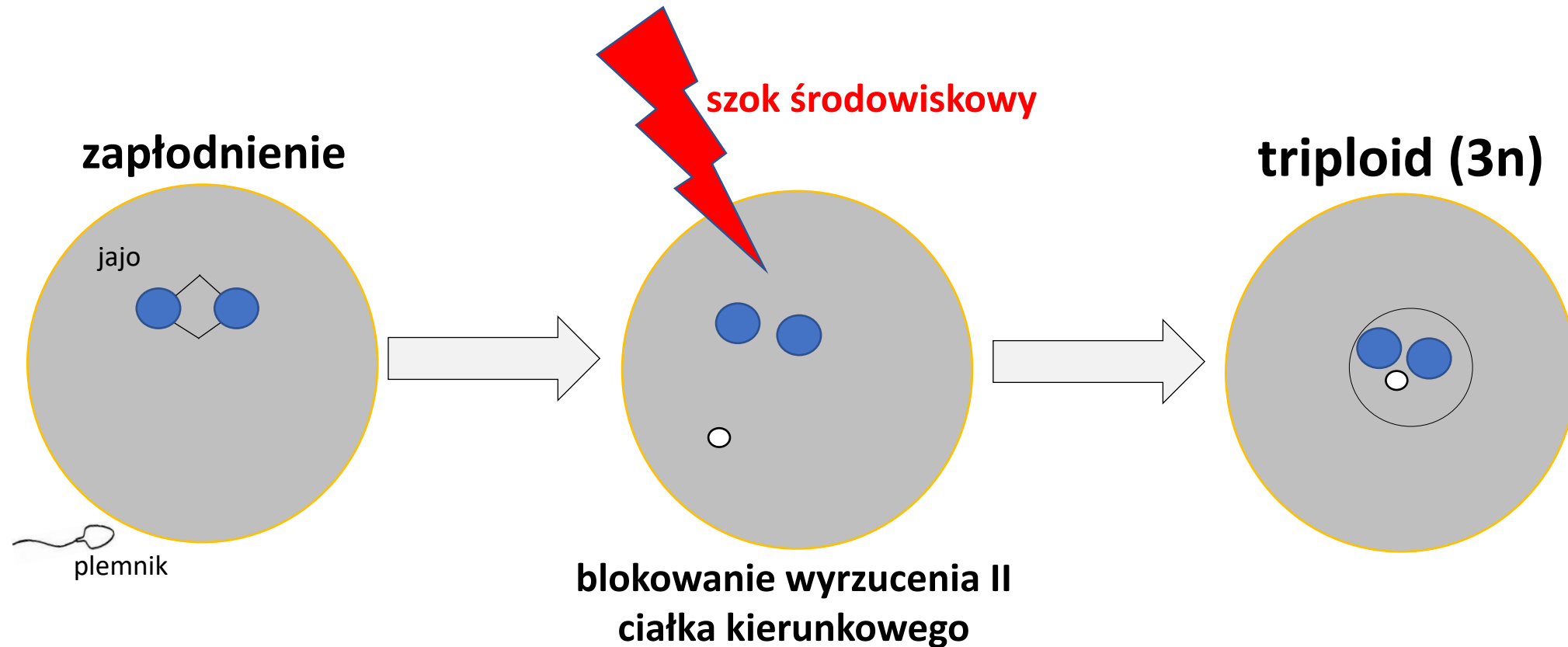
Szoki środowiskowe



Fot. K. Grecki



Schemat procedury triploidyzacji



PRO PERCH



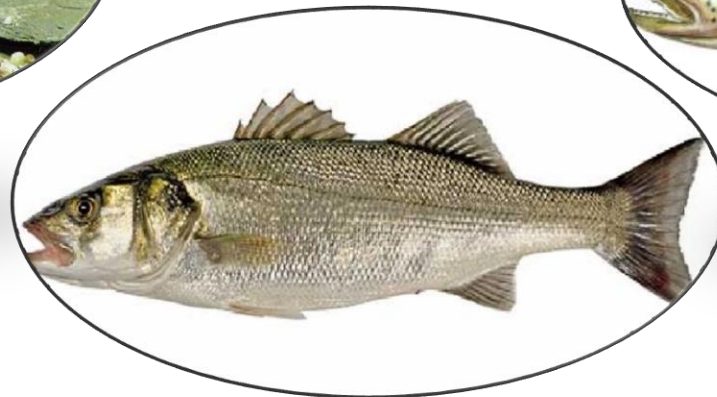
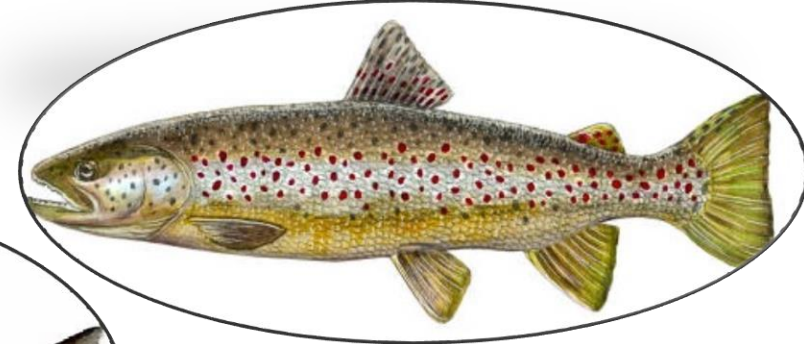
Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Triploidyzacja w akwakulturze

Doświadczalne zabiegi triploidyzacji prowadzono przede wszystkim u gatunków ryb, ważnych z gospodarczego lub ekologicznego punktu widzenia np.:

- pstrąg tęczy (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) (Chourrout 1980)
- pstrąg potokowy (*Salmo trutta m. fario* L.) (Quillet i in. 1991)
- karp (*Cyprinus carpio* L.) (Gervai i in. 1980)
- okoń żółty (*Perca flavescens*, Mitchill 1814) (Malison i in. 1993)
- labraks (*Dicentrarchus labrax* L.) (Felipe i in. 1997)



Przykłady triploidyzacji u ryb okoniowatych z zastosowaniem szoku termicznego

gatunek	parametry szoku (czas inicjacji/temp./czas szoku)	odsetek triploidów (%)	przeżywalność (%)	źródło
sandacz amerykański <i>Sander vitreus</i> (Mitchill, 1818)	2 min. AF/30°C/25 min.	44,3 ± 29,4	13,3 ± 8,8	Malison i in. (1993)
	2 min. AF/31°C/25 min.	35,3 ± 19,2	16,7 ± 12,8	
	5 min. AF/30°C/25 min.	30,3 ± 19,2	16,7 ± 8,8	
sandacz europejski <i>Sander lucioperca</i> L.	1 min. AF/29°C/40 min.	75,0	-	Blecha i in. (2016)
	5 min. AF/31°C/20 min.	100,0	-	
okoń żółty <i>Perca flavescens</i> (Mitchill, 1814)	5 min. AF/30°C/25 min.	100,0	16,7 ± 6,7	Malison i in. (2001)
	5 min. AF/31°C/25 min.	100,0	3,3 ± 3,3	
	2 min. AF/30°C/10 min.	100,0	30,0 ± 15,3	
	2 min. AF/30°C/10 min.	93,3 ± 6,7	43,3 ± 14,5	
okoń europejski <i>Perca fluviatilis</i> L.	5 min. AF/30°C/10 min.	88,0 ± 6,0	36,6 ± 3,0	Reugeot i in. (2003)
	7 min. AF/30°C/10 min.	98,0 ± 2,0	38,0 ± 7,0	
	5 min. AF/30°C/25 min.	100,0	43,0 ± 34,0	
	7 min. AF/30°C/25 min.	93,0	27,0 ± 17,0	

Triploidyzacja ryb okoniowatych

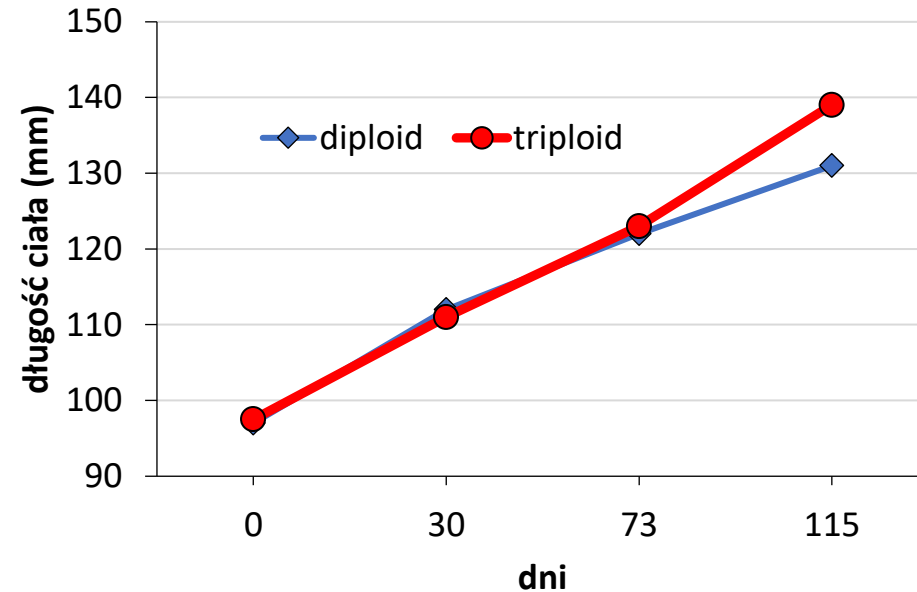
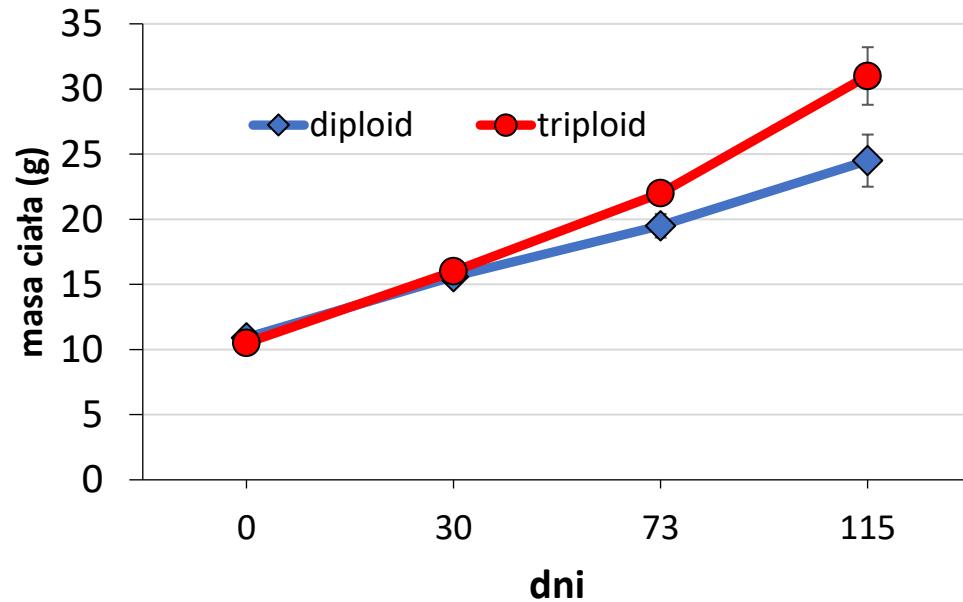
Przykłady triploidyzacji u ryb okoniowatych z zastosowaniem szoku ciśnieniowego

gatunek	parametry szoku (czas inicjacji/wartość ciśnienia/czas trwania)	odsetek triploidów (%)	przeżywalność (%)	źródło
labraks <i>Dicentrarchus labrax</i> L.	6 min AF/8500 PSI*/2 min	100	71	Peruzzi i Chatain (2000)
okoń żółty <i>Perca flavescens</i> , Mitchill 1814	5 min AF/9000 PSI*/12 min	54	80	Malison i in. (1993)
okoń europejski <i>Perca fluviatilis</i> L.	4 min AF/9000 PSI*/12 min	50,3	73,9	Stabińska i in. (2020)

* PSI (*pound per square inch*); 1000 PSI = 68.05 atm (atmosfer); 1000 PSI = 68.95 bar

Zalety stad sterylnych

a) zwiększone tempo wzrostu



b) eliminacja dojrzewania płciowego

c) redukcja zachowań agresywnych

d) skrócenie cyklu produkcyjnego

e) podniesienie efektywności i rentowności podmiotów rybackich

f) pozytywny wpływ na gospodarkę wędkarską

Malison i in. (1993) zmodyfikowane



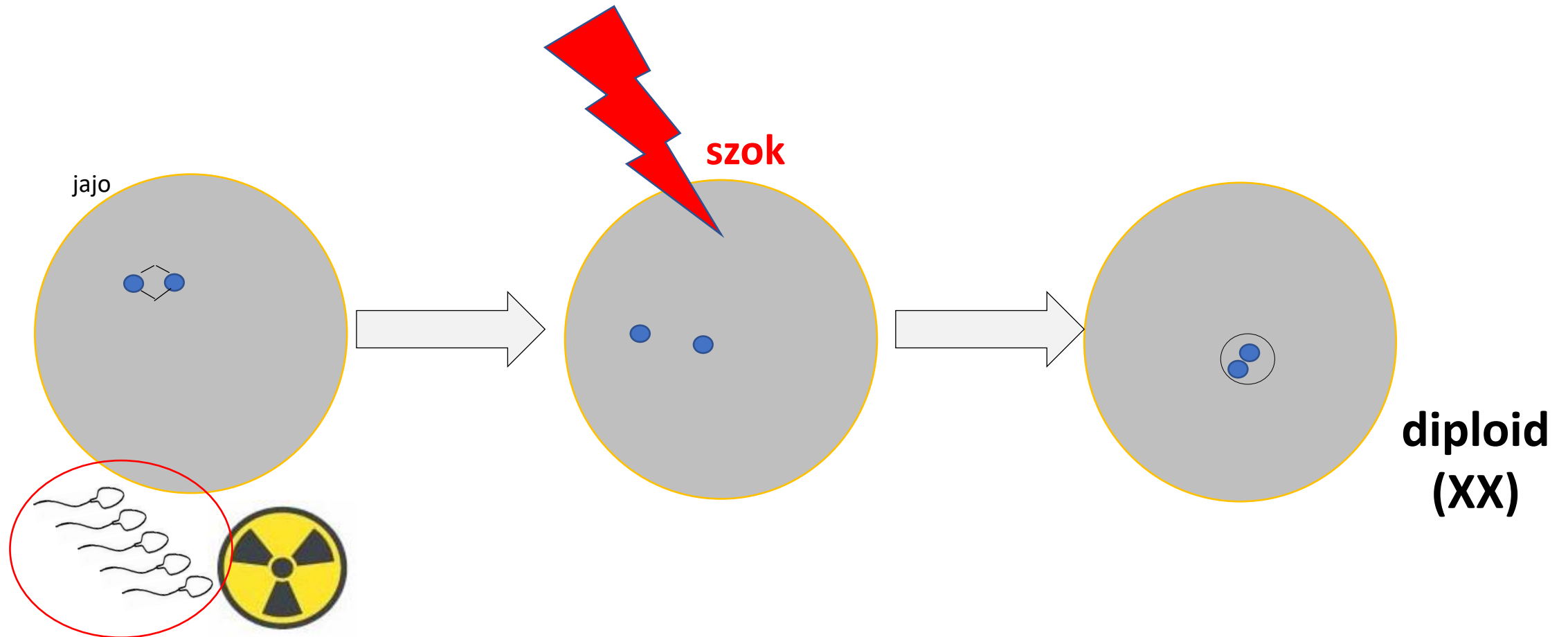
PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Schemat zabiegu gynogenezy homozygotycznej



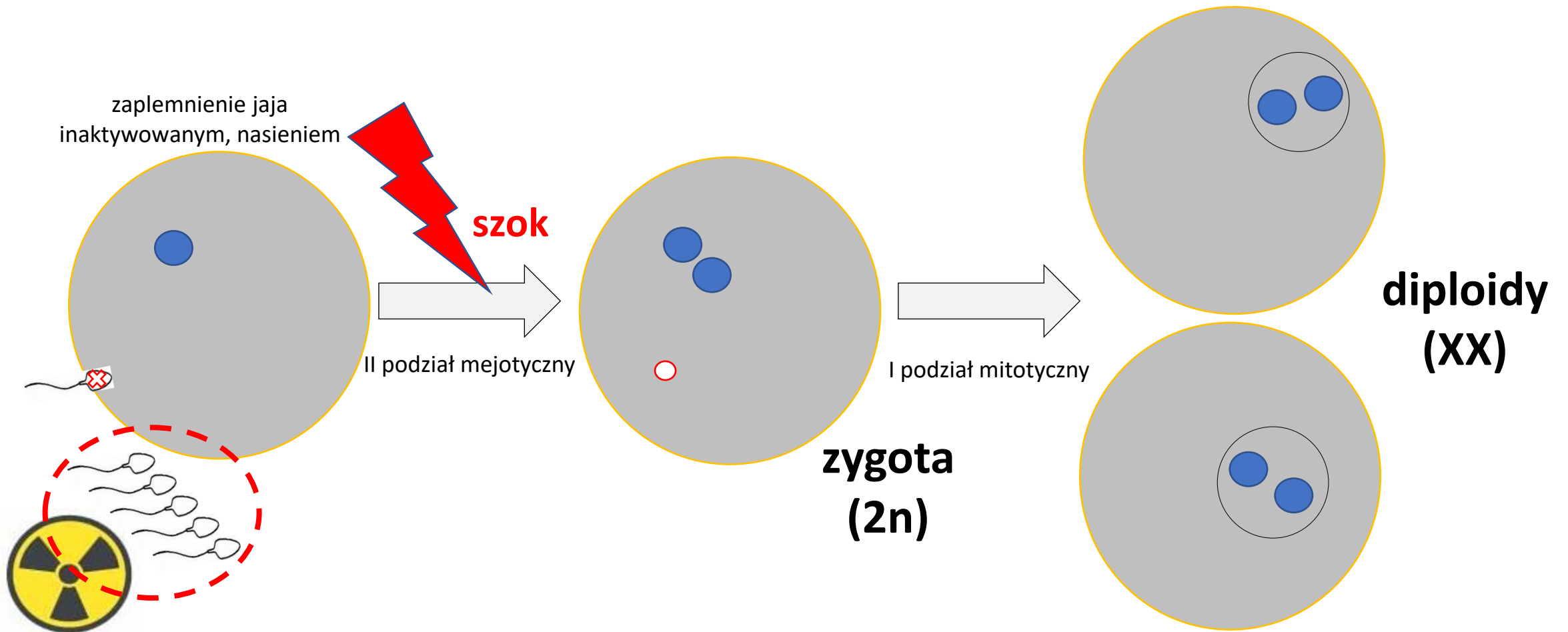
PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Schemat zabiegu gynogenezy



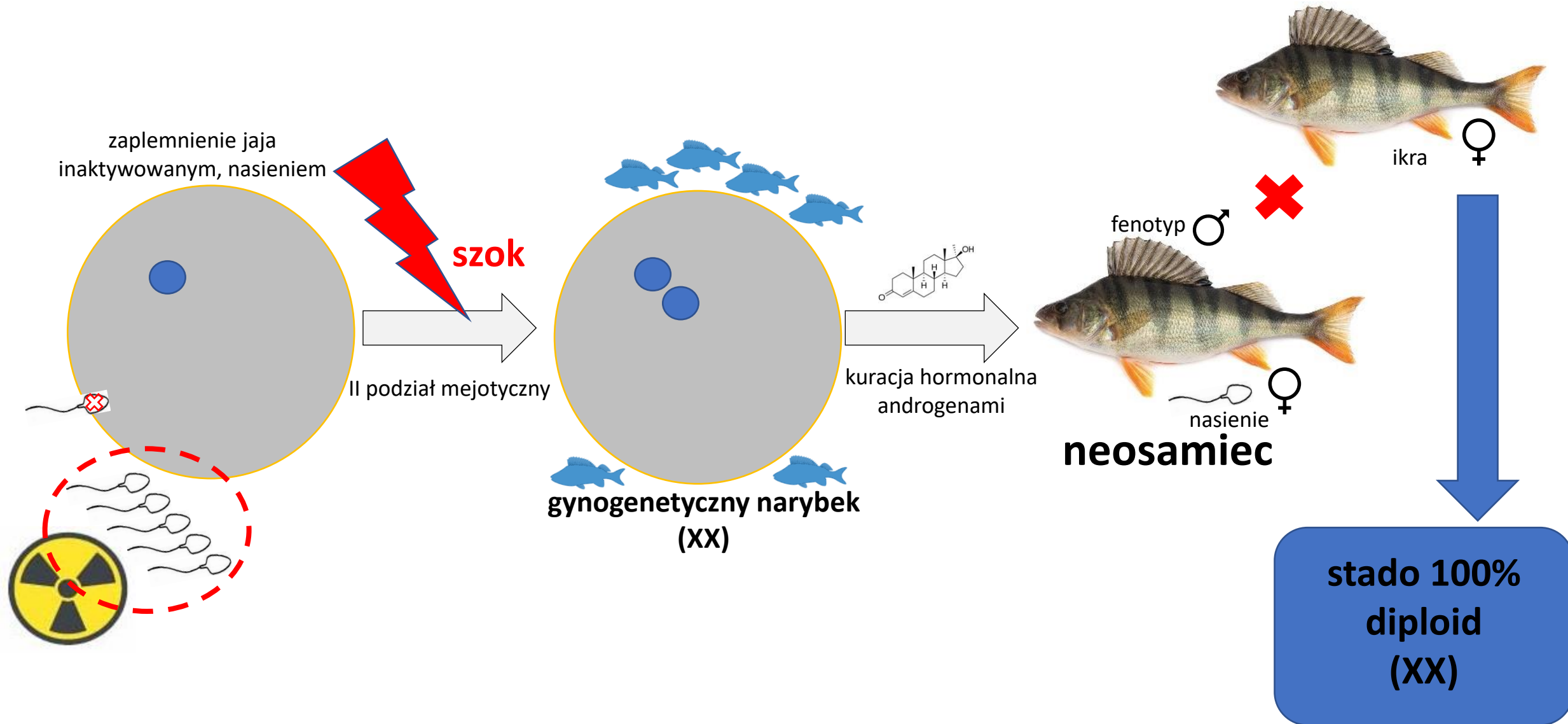
PRO PERCH



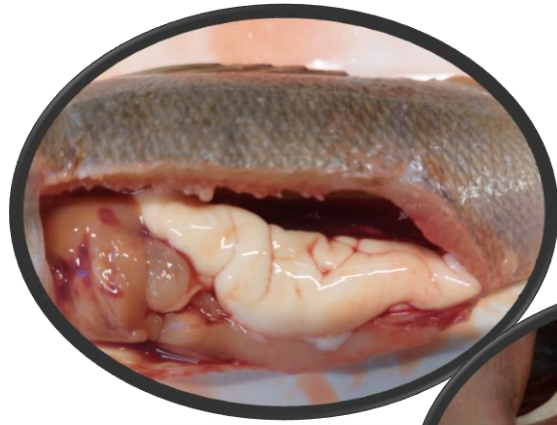
Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Schemat produkcji stada monoptciowego



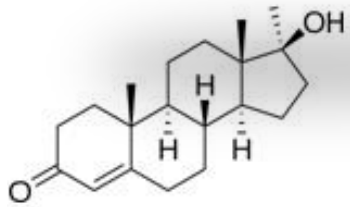
Maskulinizacja okonia – produkcja neosamców



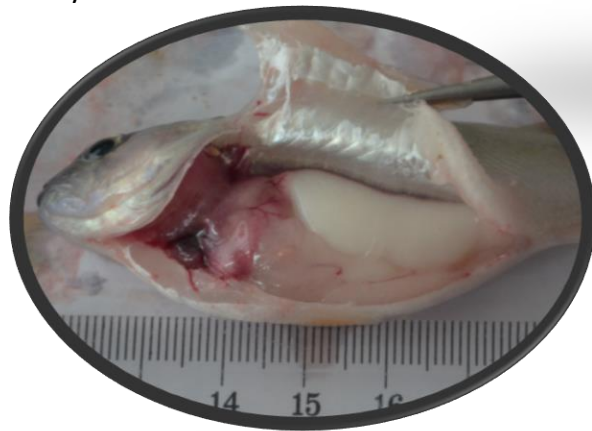
20 mg OHA/kg paszy



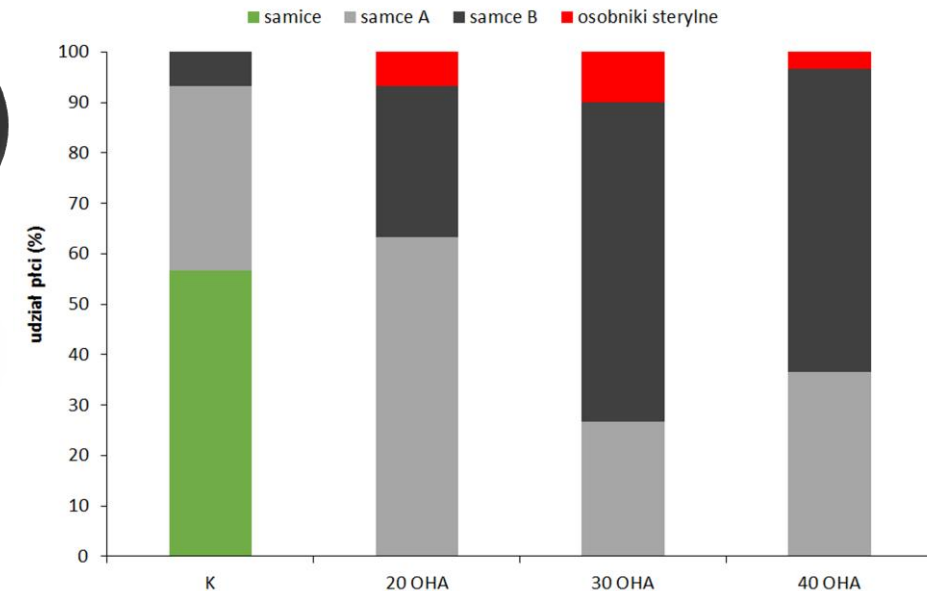
30 mg OHA/kg paszy



11 β -hydroksyandrostenedion



Struktura płci okoni w grupach eksperymentalnych po zakończeniu podchowu (Król i in. 2019)



samce A – wykształcone typowe ampuły plemnikotwórcze, wypełnione plemnikami i spermatydami, na obrzeżach których ulokowane były skupiska spermatogonii oraz spermatocytów, oddzielonych cienką warstwą tkanki interstycjalnej
samce B – jądra zdecydowanie mniejszych rozmiarów, z zarysowanymi ampułami, zawierające jedynie liczne spermatogonia w trakcie podziałów komórkowych

Maskulinizacja okonia – produkcja neosamców

Wyniki eksperymentalnego podchowu narybku okonia związanego z produkcją maskulinizowanych samic – neosamców (wg Król i in. 2019)

Parametry	Grupa			
	Kontrola	20 OHA	30 OHA	40 OHA
początkowa długość całkowita (cm)	2,13 ± 0,26			
początkowa masa ciała (g)	0,102 ± 0,04			
końcowa długość całkowita (cm)	7,23 ± 0,5	7,12 ± 0,34	6,70 ± 0,09	6,82 ± 0,14
końcowa masa ciała (g)	5,52^a ± 1,04	5,21^a ± 0,87	4,12^b ± 0,18	4,26^b ± 0,30
współczynnik zróżnicowania masy ciała (%)	36,5 ± 3,3	37,2 ± 2,7	37,3 ± 4,6	41,1 ± 1,1
względny dzienny przyrost masy ciała (% dzień ⁻¹)	6,63^a ± 0,3	6,54^{ab} ± 0,28	6,16^b ± 0,07	6,22^b ± 0,11
przeżywalność (%)	48,0 ± 4,0	52,3 ± 2,9	53,3 ± 5,7	50,0 ± 4,4



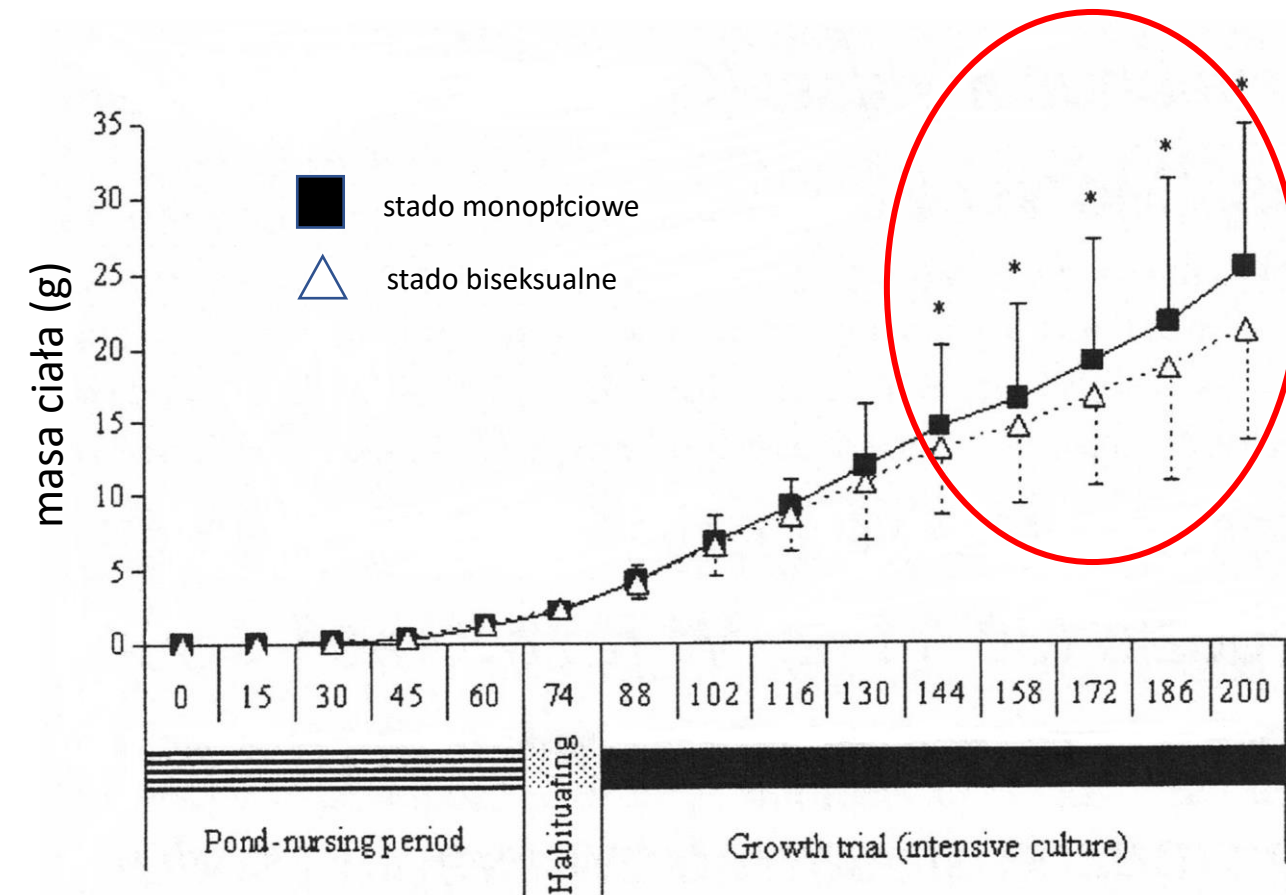
PRO PERCH



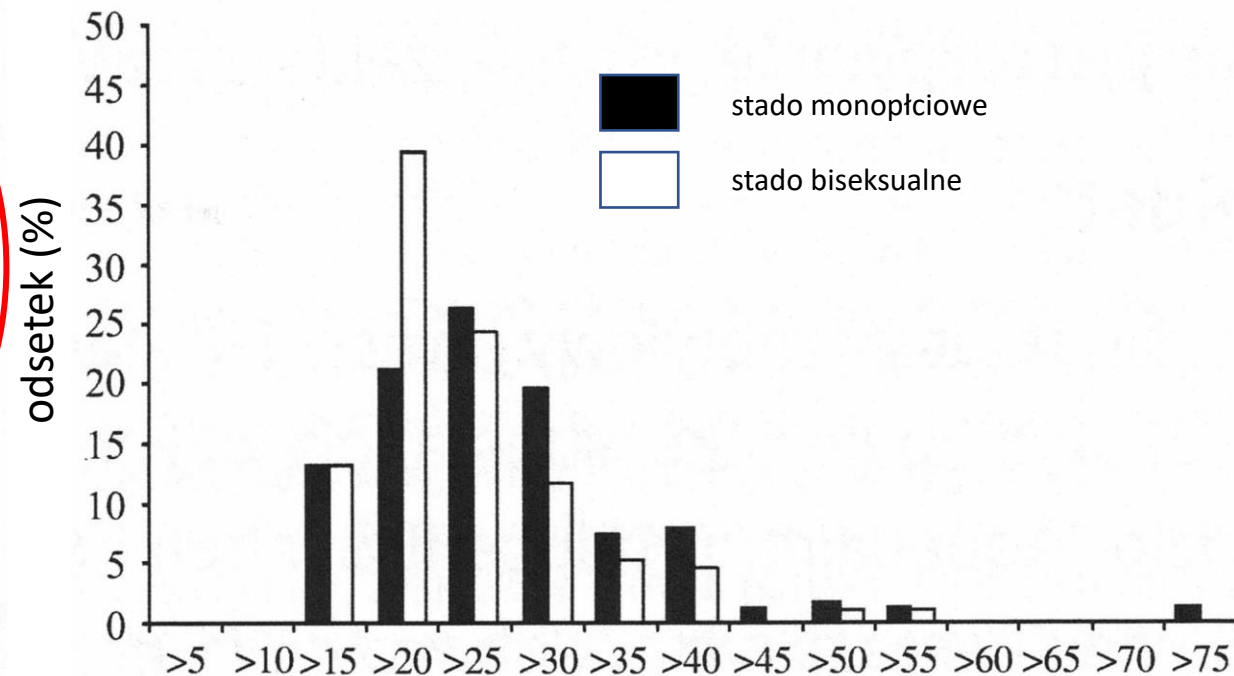
Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Stado monoptyciowe *via* biseksualne



Masa ciała (średnia \pm SD) narybku okonia w trakcie dwóch różnych etapów podchowu.



Rozkład masy ciała narybku okonia (w wieku 200 DPH) po zakończeniu eksperymentalnego podchowu w systemie stawy-RAS

Stado monopłciowe *via* biseksualne

Charakterystyka biometryczna okoni po zakończeniu eksperymentalnego podchowu (Stejskal i in. 2009)

Parametr	monopłciowe	biseksualne
długość całkowita (mm)	121,9 ± 13,6 ^a	116,9 ± 11,5 ^b
długość ciała (mm)	102,6 ± 12,3 ^a	98,2 ± 9,8 ^b
wysokość ciała (mm)	31,0 ± 4,4 ^a	28,9 ± 3,6 ^b
masa ciała (g)	25,2 ± 9,7 ^a	21,0 ± 7,5 ^b
wskaźnik kondycji	1,3 ± 0,13	1,3 ± 0,12
wskaźnik wygrzbiecienia	3,95 ± 0,2 ^b	4,06 ± 0,2 ^a
wskaźnik zróżnicowania wewnątrzgrupowego (%)	39,3 ± 1,2	39,3 ± 1,2



PRO PERCH



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



Techniki biotechnologiczne



(1) krótko- i długoterminowe przechowywanie gamet

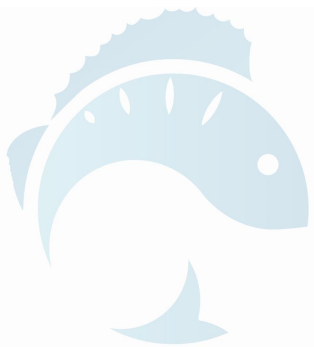
(2) poliploidyzacja

(3) produkcja samiczych monoptciowych stad



Unia Europejska

Europejski Fundusz
Morski i Rybacki



PRO PERCH

Konsorcjum badawcze



Dziękuję za uwagę



<https://www.profundal.pl/okon-pospolity/>



SZKOLENIE

Technologia pozasezonowej produkcji materiału obsadowego okonia europejskiego w kontekście dywersyfikacji akwakultury

Olsztyn, 21-22 kwietnia 2023 r.

Operacja „Dywersyfikacja produkcyjnej funkcji stawów ziemnych w oparciu o semi-intensywny wychów okonia” współfinansowana jest ze środków pochodzących z Europejskiego Funduszu Morskiego i Rybackiego w ramach działania Innowacje, Priorytetu 2 „Wspieranie akwakultury zrównoważonej środowiskowo, zasobooszczędnej, innowacyjnej, konkurencyjnej i opartej na wiedzy” zawartego w Programie Operacyjnym „Rybactwo i Morze 2014-2020”; umowa o dofinansowanie nr 00002-6521.1-OR1400004/17/20 zawarta w dniu 13.11.2020 r.

PRO PERCH

Konsorcjum badawcze

