

OSOBINE SPERME U TOKU SKLADIŠTENJA NAKON KRIOPREZERVACIJE KOD LINJAKA (*TINCA TINCA L.*): ZNAČAJ ZA AKVAKULTURU

Jelena Lujic¹, Gergely Bernáth², Zoran Marinović¹, Tímea Kollár², Eszter Kása², Vladica Simić³, Miroslav Čirković⁴, Béla Urbányi², Ákos Horváth²

Izvod: Cilj rada je bio da se ispita uticaj različitih krioprotektanta na pokretljivost spermatozoida linjaka nakon krioprezervacije, kao i na njihove osobine u toku jednog časa nakon odmrzavanja. Formirane su dve eksperimentalne grupe u zavisnosti od krioprotektanta. U prvoj grupi uzorak je pripreman sa metanolom, a u drugoj sa DMSO. Rezultati su pokazali da odmah nakon odmrzavanja postoji statistički značajna razlika u progresivnom motilitetu testiranih grupa te je test skladištenja mogao biti nastavljen jedino sa uzorkom sa metanolom za koje su dobijene zadovoljavajuće vrednosti. U toku jednog časa skladištenja nije došlo do statistički značajne promene u pokretljivosti. Može se zaključiti da je kombinacija metanola (10%) i Grayling ekstendera veoma zadovoljavajuća za krioprezervaciju i skladištenje sperme linjaka.

Gljučne reči: linjak, krioprezervacija, skladištenjeprva, osobine sperme

Uvod

Akvakultura je grana privrede koja se najbrže razvija. Savremene tendencije u akvakulturi zahtevaju modifikacije u klasičnom proizvodnom procesu.

Krioprezervacija je savremena metoda za manipulaciju gametima koja se uspešno primenjuje u programima veštačke oplodnje i konzervacione biologije. Zastupljena je u akvakulturi pošto olakšava manipulaciju genetičkim materijalom i smanjuje troškove oko uzgoja i transporta (Cabrita et al., 2010).

Gamete različitih vrsta odlikuju morfološke i fiziološke specifičnosti i zahtevi u procesu krioprezervacije (Alavi and Cosson, 2006; Cabrita et al., 2010). Iako je ustanovljena metodologija krioprezervacije gameta za više stotina ribljih vrsta (Tiersch and Mazik, 2000), standardizovan protokol još uvek ne postoji.

Uslovi u kojima se obavlja veštačka oplodnja u akvakulturi često nisu idealni i ponekad je potrebno skladištenje sperma nakon otapanja. Zbog toga je veoma važno znati koliki vremenski period i koji uslovi su potrebni da bi sperma nakon odmrzavanja očuvala svoj kvalitet.

¹ Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad, Srbija (jelena.lujic@dbe.uns.ac.rs)

² SzentIstván Univerzitet, Departman za akvakulturu, H-2100, Gödöllő, Mađarska

³ Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Kragujevac, Srbija

⁴ Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, Srbija

Najbolja metodologija krioprezervacije gameta linjaka još uvek nije utvrđena. Stalno se testiraju različiti ekstenderi i krioprotektanti kao i njihove kombinacije koje bi najbolje očuvale zadovoljavajuće osobine spermatozoida nakon zamrzavanja.

U poslednjih 20 godina, prema FAO (2006), raste interes za uvođenje linjaka u akvakulturu. U periodu od 1990. do 2004. godine proizvodnja linjaka u svetu se udvostručila. Potrebu povratka linjaka u akvakulturu u Srbiji potvrđuju podaci Kostić i Maletin (1992) i Maletin i sar. (1998) koji svedoče o drastičnom smanjenju brojnosti ove vrste u otvorenim vodama naše zemlje tokom poslednjih decenija. Njegov uzgoj u ribnjacima, pored ekonomskog, mogao bi imati i ekosistemski i biodiverzitetki značaj, jer ribnjaci mogu biti mesta uzgoja matičnih jedinki čijim bi se potomstvom kasnije mogla poribljavati nekadašnja prirodna staništa ove vrsta.

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja različitih krioprotektanta na pokretljivost spermatozoida nakon krioprezervacije, kao i na njihove osobine u toku kratkoročnog skladištenja nakon odmrzavanja.

Materijal i metode rada

Šest mužjaka linjaka poreklom iz reke Tise, aklimatizovano je i čuvano u prostorijama Departmana za akvakulturu, Univerziteta Sent Ištvan, Godollo, Mađarska. Jedinke su injektovane rastvorom hipofize šarana (4 mg/kg bruto mase). Sperma je 24 časa nakon injekcije bila prikupljana direktno u špricave sa rastvorom Grayling ekstendera (glukoza 200 mM, KCl 40 mM, Tris 30 mM, pH 8) kako bi se sprečila prevremena aktivacija spermatozoida. Prilikom uzorkovanja vodilo se računa da odnos očekivane zapremine sperme i ekstendera bude oko 1:2, kao i da se izbegne kontaminacija sperme vodom, fecesom ili urinom.

Za zamrzavanje je pripremana smeša u kojoj je odnos uzorka i ekstendera sa krioprotektantom bio 1:9. Kao ekstender je korišćen Grayling ekstender. Testirana su dva krioprotektanta - 10% rastvori metanola i dimetil sulfoksida (DMSO). Pripremljeni uzorci zamrzavani su u cevčicama za krioprezervaciju (zapremine 5 ml). Uzorci su držani 3 minuta u oblaku tečnog azota na visini od 3 cm kako bi se obezbedilo postepeno hlađenje uzoraka (oko 40 °C/min). Nakon toga su uronjeni direktno u tečni azot. Za dalju upotrebu uzorci su odmrzavani potapanjem u vodeno kupatilo (40 °C) u trajanju od 13 sekundi. Nakon toga su držani u ependorf epruvetama na ledu u periodu od sat vremena. Svakih 15 minuta su praćeni parametri kretanja spermatozoida.

Svaki pojedinačni uzorak je aktiviran pod mikroskopom na predmetnoj pločici. Parametri kretanja su analizirani pomoću CASA softvera (Computer-assisted sperm analysis) (SpermVision 3.5, Minitube, Tiefenbach, Nemačka). Za kontrolu su korišćeni podaci dobijeni CASA analizom za svaki pojedinačni uzorak u svežem stanju.

Razlike u parametrima pokretljivosti između grupa analizirani su pomoću ANOVA testa. Statističke analize urađene su u programu GraphPad Prism 5.0 sortveru. Značajnost razlika je prihvaćena kada je $p < 0.05$.

Rezultati istraživanja i diskusija

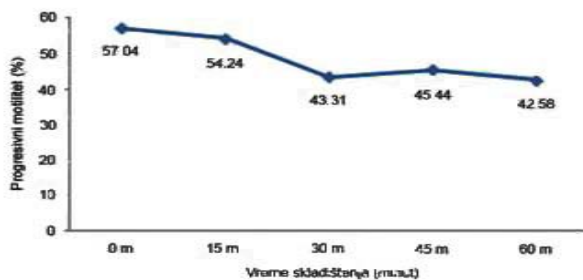
U radu je testiran uticaj metanola i DMSO kao krioprotektanata na osobine sperme linjaka nakon odmrzavanja i tokom skladištenja u trajanju od sat vremena. U CASA softveru ukupno je testirano šest uzoraka sperme uzetih od šest mužjaka. Jedan uzorak je eliminisan iz analize zbog niskog progresivnog motiliteta u svežem stanju (14.02%).

Tabela 1. Progresivni motilitet sveže (kontrolne) i tek odmrznute sperme (0 minuta nakon odmrzavanja) sa različitim krioprotektantima

Table 1. Progressive motility of fresh (control) and thawed sperm (0 minutes after thawing) with different cryoprotectants

Uzorci Samples	Progresivni motilitet (%) Progressive motility (%)		
	Kontrola Control	Krioprotektanti Cryoprotectants	
		Metanol	DMSO
1	95.12	35.60	1.33
2	92.07	46.43	4.60
3	96.14	66.77	2.61
4	97.19	82.43	10.28
5	92.87	53.99	2.02
Srednja vrednost ± SD Average ± SD	94.68 ± 2.16	57.04 ± 18.17	4.17 ± 3.63

Prosečni progresivni motilitet neposredno nakon otapanja u uzorku krioprezerviranim sa DMSO se statistički značajno razlikovao u odnosu na kontrolu, ali i uzorak sa metanolom ($p < 0.05$). S obzirom na veoma loš motilitet sperme sa DMSO nakon otapanja (Tabela 1), test skladištenja je sproveden samo za uzorke sa metanolom.



Graf. 1. Progresivni motilitet (%) uzorka sa metanolom do 1h nakon odmrzavanja
Graph. 1. Progressive motility of the methanol sample up to an hour post-thawing

U toku testa skladištenja sperme analizirano je u proseku od 1916.40 do 2605.60 ćelija na svakih 15 minuta. Prema rezultatima CASA analize, jedan čas nakon otapanja nije zabeležen značajan pad u progresivnom motilitetu spermatozoida (motilitet na 0 min: $57 \pm 18.17\%$, na 60 min: $43 \pm 27.93\%$) (Grafik

1.) tako da se u navedenom periodu u najvećeojoj meri očuvao inicijalni kvalitet sperme.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da su 10% metanol i Grayling ekstender bili izuzetno dobra kombinacija za krioprezervaciju sperme linjaka. Prema Kovács et al. (2010) održavanju dobre pokretljivosti spermatozoida u toku skladištenja nakon otapanja doprinosi njihovo čuvanje u istom rastvoru u kojem su i zamrzavani tako da proces odmrzavanje ne predstavlja prevelik šok za njih. Prisustvo šećera u ekstenderu takođe doprinosi oporavku spermatozoida pošto im omogućuje dodatnu energiju i, u određenoj meri, oponaša prirodno okruženje (Lahnsteiner et al., 2003).

DMSO se veoma često koristi kao krioprotektant, iako je potvrđeno da tokom skladištenja nije stabilan i da može izazvati jednonančane prekide DNK. Upotreba koncentracije veće od 10% dovodi do aktivacije spermatozoide (Rodina et al., 2007).

Dobijeni rezultati za pokretljivost spermatozoida zamrzavanih sa DMSO odmah nakon odmrzavanja su bili lošiji u poređenju sa podacima dobijenim za uzorke sa metanolom. Dziewulska et al. (2011) su dobili slične rezultete za lososa, dok su testom skladištenja sperme pokazali da postoji različit uticaj dva krioprotektanta na osobine kretanja spermatozoida, kao i neophodnost nastavika ovih tipova.

Najviše istraživanja do sada usmereno je ka testiranju sperme nakon otapanja, dok je veoma malo podataka o eventualnim promenama osobina u toku skladištenja (Horváth et al., 2003, 2007; Kovács et al., 2010; Dziewulska et al., 2011). Čuvanje uzoraka na -196 °C nesumnjivo menja osobine spermatozoida, čemu doprinose i supstance koje se dodaju spermima za tu namenu. Zbog toga je neophodno vršiti kontrolu sperme koja se nakon krioprezervacije koristi za procese veštačke oplodnje.

Zaključak

Rezultati ovih istraživanja imaju izuzetan značaj s obzirom na nedostatak relevantnih podataka za linjaka i druge vrste riba. Podaci o osobinama sperme nakon krioprezervacije i tokom skladištenja imaju veliki biološki, organizacioni i ekonomski značaj. Istraživanjem je potvrđena pogodnost upotrebe metanola za krioprezervaciju ove vrste s obzirom da održava visok progresivni motilitet nakon krioprezervacije, koji se ne menja značajno ni u toku čuvanja na ledu u trajanju od sat vremena.

Napomena

Istraživanja radu deo su projekta "Veštački mrest i ambijentalni uslovi kao najbitniji faktor za uspešnu proizvodnju linjaka" (broj 114-451-2104/2011-01) koji finansira AP Vojvodina, Pokrajinski sekretarijat za zaštitu životne sredine i održivi razvoj.

Literatura

- Alavi S.M.H., Cosson J. (2006). Sperm motility in fishes: II. Effects of ions and osmolality. *Cell Biology International*, 30, 1-14.
- Cabrita E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cerezales S., Herráez M. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 623–635.
- Dziewulska K., Rzemieniecki A., Czerniawski R., Domagała J. (2011). Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology*, 76(2), 300-11.
- Horváth Á., Miskolczi E., Mihálffy S., Ósz K., Szabó K., Urbányi B. (2007). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm *Cryobiology*, 54, 251-257.
- Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. (2003). Cryopreservation of common carp sperm *Aquatic Living Resources*, 16, 453-460.
- Kostić D., Maletin S. (1992). Contribution to the knowledge of ichthyofauna of some stagnant waters in Vojvodina. *Ichthyologia*, 24(1), 25-31.
- Kovács É., Müller T., Márián T., Krasznai Z., Urbányi B., Horváth Á. (2010). Quality of cryopreserved African catfish sperm following post-thaw storage. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 737–741.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weissmann T. (2003). Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology*, 60, 829-841.
- Maletin S., Đukić N., Miljanović B., Teodorović I. (1998). Contribution to the knowledge of the ichthyofauna of the Vlasina reservoir. *Ichthyologia*, 30(1), 83-85.
- Rodina M., Gela D., Kocour M., Hadi Alavi S. M., Hulak M., Linhart O. (2007). Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. *Theriogenology*, 67, 931–940.

POST-THAWING STORAGE TEST IN TENCH (*TINCA TINCA* L.): SIGNIFICANCE FOR AQUACULTURE

Jelena Lujic¹, Gergely Bernáth², Zoran Marinović¹, Tímea Kollár², Eszter Kása², Vladica Simić³, Miroslav Čirković⁴, Béla Urbányi², Ákos Horváth²

Abstract

The aim of this study was to test the effects of various cryoprotectants on the motility of tench sperm, and also on the sperm features one hour after thawing. Two experimental groups were formed, each for different cryoprotectants. Methanol was used in the first group, and DMSO in the second. Results displayed statistically significant differences in sperm motility between groups right after thawing. The test was continued only for the methanol group which showed satisfying progressive motility right after thawing. During the one hour post-thawing storage test, there were no significant differences in the progressive motility which indicated that the combination of methanol (10%) and Grayling extender present a favorable combination for cryopreservation and storage of tench sperm.

Key words: tench, cryopreservation, storage, sperm features

¹ University of Novi sad, Faculty of Sciences, Department for Biology and Ecology, Novi Sad, Serbia (jelena.lujic@dbe.uns.ac.rs)

² SzentIstván University, Department for Aquaculture, H-2100, Gödöllő, Madarska

³ University of Kragujevac, Faculty of Sciences, Institute for Biology and Ecology, Kragujevac, Serbia.

⁴ Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad, Srbija