

USPEŠNOST SPERME LINJAKA (*Tinca tinca* L., 1758) NAKON KRIOPREZERVACIJE U OPLODNJI I IZLEGANJU

Jelena Lujic¹, Zoran Marinović², Gergely Bernáth¹, Tímea Kollár¹, Eszter Kása¹, Nataša Radojković³, Vladica Simić³, Miroslav Ćirković⁴, Béla Urbányi¹, Ákos Horváth¹

Izvod: Linjak *Tinca tinca* (L., 1758) je vrsta ribe sa velikim potencijalom u akvakulturi i interes za unapređenjem tehnika za njeno gajenje rastu tokom proteklih decenija. Cilj ovog rada bio je testiranje uticaja različitih krioprotektanata (metanol i DMSO) i ekstendera (Kurokura 180 i Grayling) tokom krioprezervacije sperme na uspešnost oplodnje i izleganja kod linjaka. Sve eksperimentalne grupe su imale značajno niže vrednosti stepena oplodnje i izleganja od kontrole. Uzorci krioprezervirani sa Grayling eksterdom su pokazali veću uspešnost oplodnje i izleganja bez obzira na korišćeni krioprotektant što ukazuje na značaj upotrebe ekstendera na šećernoj bazi u krioprezervaciji sperme ove vrste.

Ključne reči: linjak, krioprezervacija, oplodnja, izleganje

Uvod

Linjak *Tinca tinca* (L., 1758) je vrsta ribe sa velikim potencijalom u akvakulturi. Značaj ove vrste, kao i interes za unapređenjem tehnika za njeno gajenje rastu tokom poslednje dve decenije, posebno u Republici Češkoj i Kini (Wang i sar., 2006; Rodina i sar., 2007). Povećan ekonomski interes inicira intenzivan razvoj i unapređenje metoda veštačke oplodnje, gajenja i menadžmenta vrste (Linhart i sar., 2006).

Krioprezervacija sperme predstavlja tehniku skladištenja sperme u tečnom azotu na neograničeno vreme. Čuvanjem genetičkog materijala mužjaka na ovaj način omogućava se stalna dostupnost sperme kao i njen jednostavan transport, ali i dalja upotreba u svrhu genetičkog unapređenja vrste u akvakulturi i različitim programima konzervacije vrste (Horváth i sar., 2012).

Iako je krioprezervacija već decenijama široko primenjivana u stočarstvu, a danas sve više i u akvakulturi, izlaganje sperme ekstermno niskim temperaturama, i pored odgovarajuće pripreme uzorka, može dovesti od određenog narušavanja ćelijske strukture spermatozoida (Cabrita i sar., 2010). Praksa je do sada pokazala da protokoli za krioprezervaciju sperme treba da budu specifični za vrstu (Vuthiphandchai i sar., 2014), najčešće zbog specifičnosti u pogledu fizičko-hemijskih osobina sperme. Za pripremu sperme za krioprezervaciju neophodna je primena različitih supstanci koje

¹ Szent István Univerzitet, Departman za akvakulturu, H-2100, Gödöllő, Mađarska
(kontakt osoba: jelena.lujic@mkk.szie.hu; lujicjelena@gmail.com)

² Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad, Srbija

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

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

ublažavaju negativan efekat zamrzavanja, a te supstance su krioprotektanti i ekstenderi. Prilagodavanjem protokola za svaku vrstu, pre svega se traga za optimalnom kombinacijom vrste i količine navedenih supstanci kojom bi se postigla ravnoteža između njihovog korisnog dejstva i potencijalnog toksičnog efekta.

Do sada postoji veoma malo radova koji su se bavili krioprezervacijom sperme linjaka. Jedini do sada objavljeni rad je prikazao rezultate primene ekstendera na bazi jona, sa dva različita krioprotektanta: dimetil-sulfoksidom (DMSO) i propandiolom (Rodina i sar., 2007). Nakon odmrzavanja ovako pripremljene sperme linjaka, test oplodnje je pokazao najviše 40% uspešnosti, dok je pokretljivo bilo do 20% spermatozoida. Iako je DMSO u širokoj upotrebi, neka istraživanja ukazuju na metanol kao veoma uspešan krioprotektant koji zadržava najviši kvalitet sperme nakon procesa zamrzavanja (Horváth i sar., 2003; Ciereszko i sar., 2014). Navedena istraživanja takođe ukazuju i na mogućnost uspešne primene ekstendera na bazi šećera.

Cilj ovog rada bio je testiranje uticaja različitih krioprotektanata (metanol i DMSO) i ekstendera (modifikovani Kurokura i Grayling ekstender) na uspešnost oplodnje i izleganja kod linjaka.

Materijal i metode rada

Jedinke linjaka za ovaj eksperiment su poreklom sa više ribnjaka u Mađarskoj koje su dopremljen na Departman za Akvakulturu na Sent Ištvan Univerzitet u Godolu, Mađarska. Korišćeno je ukupno 20 riba (10 mužjaka i 10 ženki)

Jedinke su bile hormonski indukovane intraperitonealnom injekcijom rastvora hipofize šarana (25 mg kg⁻¹ telesne mase) u 0.65% NaCl. Mužjaci su injektovani jednom dozom, dok su ženke primile dve doze (prva je činila 10% pripremljenog rastvora, a druga je data 12 časova nakon prve i sadržala je preostalih 90% rastvora). Pre bilo kakvog rada, ribe su bile anestezirane u rastvoru 2-fenoksi etalnola (0.4 mL L⁻¹).

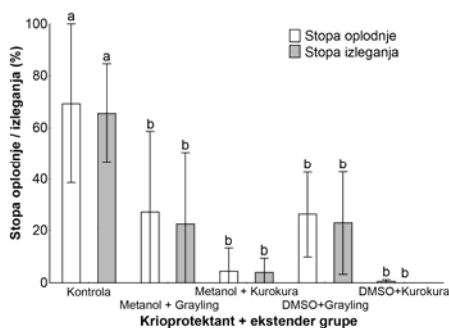
Sperma mužjaka je uzorkovana 24 h nakon hormonske injekcije, a ženke 18 h nakon druge doze hormona. Sperma svakog mužjaka je posebno pripremana za krioprezervaciju, dok je pomešani uzorak korišćen za kontrolnu oplodnju. Jaja svih ženki su pomešana kako bi se izbegla individualna varijabilnost u kvalitetu jaja.

Za krioprezervaciju sperme su korišćena dva krioprotektanta: 10 % dimetil sulfoksid (DMSO) i 10 % metanol, dok su kao ekstenderi korišćeni modifikovani Kurokura rastvor (Kurokura 180) (180 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 2.4 mM NaHCO₃; Rodina i sar., 2007) i Grayling ekstender (200 mM glukoza, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8; Horváth i sar., 2012). Pre krioprezervacije izvršena je analiza pokretljivosti spermatozoida pomoću CASA softvera (Computer-assisted sperm analysis) (SpermVision 3.5, Minitube, Tiefenbach, Nemačka) i u daljem toku eksperimenta je korišćeno pet uzoraka sa najboljom progresivnom pokretljivošću spermatozoida. Za zamrzavanje uzoraka je pripremana smeša u kojoj je odnos uzorka i ekstendera sa krioprotektantom bio 1:9. 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 i 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.

Pomešana jaja ženki su podeljena u petri posude tako da je u svaku raspoređeno 0.25 g (oko 400 jaja; Rodina i sar., 2007). Oplodnja je izvršena dodavanjem otopljene sperme u preporučenom odnosu 100000:1 (Rodina i sar., 2007), a inicirana je dodavanjem 1ml vode i mešanjem 2 minuta. Nakon toga, na oplodena jaja je dodato još 10 ml vode i ostavljeni su da se inkubiraju na 28 °C. Voda u petri posudama je menjana na svaka tri sata kako bi se izbegao bilo koji vid infekcije. Uspešnost oplodnje određivana je 24 h nakon oplodnje i izražena je kao broj uspešno oplodjenih jaja u odnosu na ukupan broj jaja (stadijum od 35 somita prema Linhartova i sar., 2014). Uspešnost izleganja je utvrđena 48 h nakon oplodnje i izražena je kao procenat izlegnutih larvi u odnosu na ukupan broj jaja

Rezultati istraživanja i diskusija

Stepen oplodnje i izleganja u kontrolnoj grupi su bili $69.36 \pm 12.54\%$ i $65.66 \pm 7.74\%$. Sve eksperimentalne grupe su imali značajno niže vrednost od kontrole (Slika 1; Tukey’s HSD, $p < 0.05$). Dvofaktorska ANOVA je istakla značajne razlike jedino u primeni različitih ekstendera ($F(1,17) = 9.86$, $p < 0.01$). Najviši fertilizacioni uspeh i uspeh u izleganju je bio u grupama sa Grayling ekstenderom. Test grupa sa DMSO i Kurokura 180 imala je najniže vrednost oba parametra (oplodnja $0.47 \pm 0.65\%$ i izleganje 0%).



Graf. 1. Uspešnost oplodnje i izleganja (%) jaja linjaka oplodjenih sa svežom spermom i krioprezerviranom spermom (N = 5) zamrznutih sa dva ekstendera (Grayling i Kurokura 180) i dva krioprotektanta (methanol i DMSO). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Različita slova iznad SD bara označavaju statistički značajnu razliku (Tukey’s HSD, $p < 0.05$).

Graph. 1. Fertilization and hatching rates (%) of tench eggs fertilized with fresh and cryopreserved sperm (N = 5) frozen in the presence of two extenders (Grayling and Kurokura 180) and two cryoprotectants (methanol and dimethyl-sulfoxide – DMSO). Results are displayed as mean \pm standard deviation. Different letters above the standard deviation bar indicate significant difference (Tukey’s HSD, $p < 0.05$).

U ovoj studiji je prvi put pokazana uspešnost korišćenja ekstendera na bazi šećera kao i metanola kao krioprotektanta u postizanju visok uspeh u krioprezervaciji sperme linjaka. Uzorci krioprezervirani sa Grayling ekstenderom su pokazali veću uspešnost oplodnje i izleganja bez obzira na korišćeni krioprotektant. To je najverovatnije zbog glukoze koja je prisutna u ovom ekstenderu, a koja se ponaša kao spoljašnji,

nepermeabilni krioprotektant koji stabilizuju membrane tokom zamrzavanja (Maise, 1996). Ovi rezultati pokazuju da je moguće da je sperma linjaka osetljiva na eksterna oštećenja i da im je potrebna eksterna zaštita tokom krioprezervacije. Ekstenderi na šećernoj bazi su takođe bili uspešni u krioprezervaciji sperme šarana *Cyprinus carpio* (Horváth i sar., 2003), afričkog soma *Clarias gariepinus* (Urbányi i sar., 1999) i Kalifornijske pastrmke *Oncorhynchus mykiss* (Ciereszko i sar., 2014;). Bitno je napomenuti da tokom primene ovog ekstendera nije doslo do stvaranja želatina što može biti česta pojava tokom krioprezervacije sperme ciprinidnih vrsta riba sa ekstenderima na šećernoj bazi (Horváth i sar., 2003).

Zaključak

Ova studija je prva koja je pokazala da primena metanola i ekstendera zasnovanog na šećernoj bazi daju bolje rezultate od predhodno opisanih protokola za krioprezervaciju sperme linjaka. Sperma linjaka se može uspešno krioprezervirati sa Grazling ekstenderom i metanolom kao krioprotektantom. Protokol opisan u ovoj studiji se može uspešno koristiti u akvakulturi i u konzervacionim strategijama za ovu vrstu.

Napomena

Istraživanja u ovom radu su finansirane od strane COST akcije FA 1205 AQUAGAMETE, projekta 8526-5/2014/TUDPOL koji finansira Ministarstvo ljudskih resursa Mađarske i projekta TR 31011 koji finansira Ministarstvo obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Cabrera E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cerezales S. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*. 26: 623-365.
- Ciereszko A., Dietrich G.J., Nynca J., Dobosz S., Zalewski T. (2014). Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*. 420-421: 275-281.
- Horváth Á., Jesenšek D., Csorbai B., Bokor Z., Raboczki É., Kaczkó D., Bernáth G., Hoitsy G., Urbányi B., Sušnik Bajec S., Snoj A. (2012). Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture*. 358-359: 213-215.
- Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. (2003). Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*. 16: 457-460.
- Linhart O., Rodina M., Kocour M., Gela D. (2006). Insemination, fertilization and gamete management in tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture International*. 14: 61-73.
- Linhartova Z., Saito T., Psenicka M. (2014). Embryogenesis, visualization and migration of primordial germ cells in tench (*Tinca tinca*). *Journal of Applied Ichthyology*. 30: 29-39.

- Maisse G. (1996). Cryopreservation of fish semen: a review. Proceedings of the Refrigeration Science and Technology Conference, Refrigeration and Aquaculture. Institut International du Froid, Paris, France. pp. 443-467.
- 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.
- Urbányi B., Horváth Á., Varga Z., Horváth L., Magyary I., Radics F. (1999). Effects of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture Research*. 30: 145-151.
- Vuthiphandchai V., Wilairattanadilok K., Chomphuthawach S., Sooksawat T., Nimrat S. (2014). Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. *Aquaculture Research*. DOI: 10.1111/are.12396
- Wang J., Min W., Guan M., Gong L., Ren J., Huang Z., Zheng H., Zhang J., Liu H., Han Y. (2006). Tench farming in China: present status and future prospects. *Aquaculture International*. 14: 205-208.

SUCCESS OF CRYOPRESERVED TENCH (*Tinca tinca* L., 1758) SPERM IN FERTILIZATION AND HATCHING

Jelena Lujic¹, Zoran Marinović², Gergely Bernáth¹, Tímea Kollár¹, Eszter Kása¹, Nataša Radojković³, Vladica Simić³, Miroslav Ćirković⁴, Béla Urbányi¹, Ákos Horváth¹

Abstract

Tench *Tinca tinca* (L., 1758) is a fish species with big potential in aquaculture and for which there is a great interest for improving rearing and reproduction techniques. The aim of this study was to test the efficiency of different cryoprotectants (methanol and DMSO) and extenders (Kurokura 180 and Grayling) during sperm cryopreservation on fertilization and hatching rates. Cryopreserved sperm had significantly lower fertilization and hatching success than control group. Samples cryopreserved with Grayling extender had higher fertilization and hatching success, independently of the cryoprotectant used, therefore pointing out the significance of use of sugar-based extenders in the cryopreservation of tench sperm.

Key words: tench, cryopreservation, fertilization, hatching

¹ Szent István University, Department of Aquaculture, H-2100, Gödöllő, Hungary
(Corresponding author: jelena.lujic@mkk.szie.hu; lujicjelena@gmail.com)

² University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Novi Sad, Serbia

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

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