

СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 597-146.3:639.371.51

ВПЛИВ РІЗНИХ РЕЖИМІВ РОЗМОРОЖУВАННЯ НА РУХЛИВІСТЬ ДЕФРОСТОВАНИХ СПЕРМІЇВ БІЛОГО АМУРА (*STENOPHARYNGODON IDELLA*)

Д. А. Сироватка, В. В. Бех

Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

Впровадження в рибницьку практику методу глибокого заморожування статевих продуктів риб (кріоконсервування) зумовлює необхідність постійної оптимізації параметрів процесу розморожування, важливим елементом якого є правильний підбір температури водяної бані та експозиція в ній сперми.

*В статті представлено результати використання різних програм розморожування та їх вплив на результати дефростації сперми білого амура (*Stenopharyngodon idella*). Дослідження були проведені під час нерестової кампанії 2012 року на базі дослідного господарства «Нивка» та відділу селекції риб Інституту рибного господарства НААН.*

Пошук оптимального режиму дефростації проводили серед дев'яти варіантів досліду, умови кожного з яких визначались комбінацією трьох температур водяної бані: 30, 35 і 40°C і відповідними експозиціями витримування в ній пластикових соломинок із замороженою спермою білого амура - 10, 20 та 30 секунд.

Найкращий результат за такими параметрами, як загальний час руху та вихід живих спермій у дефростованій і активованій спермі отримали за температури 35°C та експозиції 30 с. При використанні такої програми кількість живих сперматозоїдів сягала $77,4 \pm 0,57\%$, а час їх руху становив $75 \pm 2,0$ с. Для перевірки запліднюючої здатності дефростованої сперми проводили осіменіння овульованої ікри. Заплідненість ікри становила $85,6 \pm 2,8\%$, що свідчить про фертильність отриманої сперми.

Ключові слова: *кріоконсервування, режими розморожування, білий амур, запліднююча здатність дефростованої сперми, овульована ікра.*

На сьогоднішній день кріоконсервування використовують для збереження генетичного різноманіття рідкісних та зникаючих видів риб, проведення селекційних робіт, постачання спермою інкубаційних цехів з метою отримання різноманітних кросів, помісей та гібридів.

Технологія довгострокового зберігання статевих клітин самців у рідкому азоті, з метою їх подальшого використання для отримання нащадків, достатньо відпрацьована для багатьох видів риб [4, 5, 10, 12]. На сьогодні розроблено низку різноманітних кріозахисних розчинів, які відповідають певним вимогам, що є



специфічними для того чи іншого виду риб. Це дає змогу тривалий час зберігати спермії риб у стані кріобіозу не пошкоджуючи їх геном, без втрати здатності до запліднення після розморожування. Проте, для отримання повноцінних, життєздатних спермій потрібно дуже ретельно підбирати параметри кріоконсервування та дефростування, адже саме ці етапи є найбільш критичними [1, 6, 10].

Як біологічний об'єкт, для проведення досліджень з визначення оптимальних режимів дефростування спермодоз, які зберігались у рідкому азоті, було використано представника родини коропових риб, аборигенний вид далекосхідної іхтіофауни, цінну промислову рибу – білого амур (*Stenopharyngodon idella*). За способом живлення цей вид є фітофагом, що робить його ефективним інструментом боротьби з неконтрольованим заростанням водойм.

Роботи з інтродукції білого амур в Україні почалися з 1954 року і, на даний час, є актуальною проблема запобігання проявам інбредної депресії. Вирішенням її є проведення цілеспрямованого покращення генетичної структури стад плідників шляхом завезення молоді або дорослих риб з ареалу поширення даного виду або транспортування сперми заготовленої під час природного нерестового ходу. Звичайно, транспортування сперми, охолодженої до температури 2–5°C, є більш економічно доцільним, проте і це значно лімітує термін використання еякуляту і тільки кріоконсервування може забезпечити збереженість матеріалу протягом десятиліть у спеціальному кріобанку. При цьому використання кріосховища дозволяє завчасно заготовляти і використовувати протягом багатьох років кріоконсервовану сперму від самців з унікальними генотипами і рибницькими якостями. Окремим напрямом досліджень є вивчення ефекту кріоселекції спермій риб, який теоретично можна використовувати для отримання нащадків з підвищеною резистентністю організму [3].

Як відомо, основою кріоконсервування є зберігання спермодоз за температури -196°C, коли більшість біохімічних процесів припиняються. Заморожені клітини можуть залишатись живими протягом сотні років за умов відсутності впливу іонізуючого випромінювання [13]. Проте, без спеціальних заходів захисту більшість живих об'єктів гине в діапазоні температур від 0 до -50°C. Зокрема, таким захистом клітин від кріопошкоджень є правильний вибір кріопротектора і режиму заморожування – розморожування. Тому апробація ефективних режимів на даному етапі залишається одним з пріоритетних завдань сучасної кріобіології [8].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В ході проведених досліджень застосовувались загальноприйняті в кріобіології, селекції та рибництві методи.

Дослідження проводились на базі дослідного господарства «Нивка» та відділу селекції риб Інституту рибного господарства НААН. Матеріалом для проведення досліджень були плідники та статеві продукти білого амур, відібрані під час нерестової кампанії 2012 року.



Для проведення запланованого дослідження було відібрано 10 пар плідників. Відбір плідників проводили відповідно до існуючих стандартів за морфометричними показниками [2, 5].

Для стимулювання дозрівання гонад використовували синтетичний гонадотропін – рилізінг-гормон торгової марки "Ovopel" угорського виробництва. Відбір статевих продуктів здійснювали за відповідними методиками [9].

Об'єм еякуляту визначали за допомогою піпет-дозатора з точністю до $0,1 \text{ см}^3$. Якість сперми визначали за існуючими методиками [9, 14]. Одержанні матеріали опрацьовували статистично за допомогою комп'ютерної програми «ВідеоТест-Сперм 2.1», а також камери Маклера та оптичного мікроскопа «Zeiss Axiostar plus» з відеокамерою «JVC ТК-С1480ВЕ». Замороженню піддавалась нативна сперма, в якій не менше ніж 60% сперматозоїдів рухались прямолінійно-поступально.

Для проведення кріоконсервування отримані еякуляти розбавляли в співвідношенні 1:3 (сперма : кріопротектор), при цьому, досягали розрідження спермій на рівні $(1,0-2,5) \times 10^9$ клітин/мл. До використовуваного кріозахистного середовища входили наступні компоненти: 17 г трис-оксиметил-амінометану, розчиненого в 1 л дистилату з доведенням її НСІ до рівня рН 8. Для отримання 1 л середовища, в 600-700 мл буферу розчиняли (за постійного перемішування) наступні компоненти: 4,2 г NaCl; 0,06 г KCl; 2,8 г NaHCO₃; 1,37 г цукрози; 0,62 Mg SO₄, 7 H₂O; 0,18 г CaCl₂, 6 H₂O. Перед використанням до отриманої суспензії додавали 150 г свіжого курячого жовтка та 180 г етиленгліколю [15]. Отриманий буфер модифікували гліцирином за концентрації 5% від загального об'єму кріопротектора (рН 8,0).

Зразки сперми розбавлені кріопротектором були розфасовані в пластикові соломинки місткістю по 0,25 мл (IMV, France) і залишенні в холодильній установці протягом 15 хв за температури 5°C. Для проведення заморожування охолодження проводили в такому режимі:

I етап: за температури від +5 до -15°C з швидкістю 1-2 град / хв.

II етап: за температури від -15 до -70°C з швидкістю 15-20 град / хв.

III етап: повільне занурення в рідкий азот.

В рідкому азоті дослідні спермодози витримувались 5 днів. Для проведення основної частини досліду, а саме визначення оптимального режиму дефростації, проводили розморожування за трьома варіантами температур: 30, 35 і 40°C з експозицією у водному середовищі по: 10, 20 та 30 секунд. Отримані статеві клітини активували за допомогою ставової води, осіменіння ікри проводили сухим способом.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У досліджуваних самців відібраний середній об'єм сперми складав $9,1 \pm 2,43$ мл, рухливість сперматозоїдів – $93,4 \pm 1,0$ %, тривалість поступального руху – $86,5 \pm 0,56$ с, рН сперми – 7,5.

Ефект від використання різних програм дефростації та час руху спермій білого амура представлено в таблиці.



Як видно з даних таблиці режими розморожування були розділені на три групи, кожна з яких відповідає певній температурі розморожування (30 °С, 35 °С, 40 °С). В межах кожної групи об'єднані три експозиції, позначені відповідними індексами (1, 2, 3). Таким чином, було отримано дев'ять режимів розморожування з різними параметрами.

Таблиця. Використання різних режимів розморожування та їх вплив на рухливість і запліднюючу здатність дефростованої сперми білого амура

Режим розморожування (m ⁿ)*	Температура, °С	Експозиція у водному середовищі, с	Кількість живих спермій, %	Загальний час руху спермій, с
1 ¹	30	10	51,2±2,41	57±1,1
1 ²	30	20	55,3±2,85	55±1,2
1 ³	30	30	59,6±5,73	63±2,3
2 ¹	35	10	61,6±4,35	68±1,2
2 ²	35	20	71,6±1,21	74±1,5
2 ³	35	30	77,4±0,57	75±2,0
3 ¹	40	10	68,3±1,20	64±3,2
3 ²	40	20	54,4±1,49	63±1,2
3 ³	40	30	61,2±2,15	70±1,2
Контроль	-	-	86,5±0,56	93±1,0

Примітка: * - mⁿ, де m - позначає відповідну температуру водяної бані, а n - відповідає застосованій експозиції

Кількість живих спермій у контролі була 86,5±0,56 % за тривалості руху 93±1,0 с, що відповідає нормативним вимогам [9]. У проведеному дослідженні процес заморожування-розморожування значно вплинув на рухливість дефростованих спермій. Крім того, існують відмінності в отриманих результатах за часом руху дефростованої сперми, яка розморожувалась за різних температур. Так, найкращий результат був зафіксований при застосуванні режиму 2³, тут були зафіксовані максимальні показники рухливості дефростованої сперми 77,4±0,57 %, час руху при цьому складав 75±2,0 с. Для перевірки здатності до відтворення після розморожування, отриманими зразками сперми осіменяли овульовану ікру. Заплідненість ікри, при застосуванні сперми, отриманої в режимі 2³ становила 85,6±2,8 %, що підтверджує достатньо високу фертильність отриманої сперми.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що при проведенні дефростування сперми одним з ключових чинників є температура розморожування та час витримування її бані.

Оптимальним режимом розморожування сперми є температура 35 °С за експозиції 30 с. Застосування таких параметрів розморожування дозволяє забезпечити виживання спермій на рівні 77,4±0,57 % з часом їх загального руху 75 с. Дефростована сперма білого амура здатна до запліднення ікри.

Показники дефростованої сперми є співрозмірними з відповідними характеристиками нативної сперми і дозволяють ефективно використовувати розморожену сперму для заводського відтворення білого амура.



ЛІТЕРАТУРА

1. *Андреев А.А.* Замораживание растворов антифризных веществ / А.А. Андреев, Н.Н. Петропавлов // Биофизика живой клетки: Сб. науч. тр. ИБК РАН. – 1994. – Т.6. – С. 65-67
2. *Балтаджи Р.А.* Технологія відтворення рослиноїдних риб у внутрішніх водоймах України. – К.: УААН ІРГ, 1996. – 82 с.
3. *Безусий О.Л.* Вивчення впливу криоконсервування та довгострокового зберігання сперми амурського сазана на життєстійкість личинок. / О.Л. Безусий, Є.Ф. Копейка та ін. // «Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології» IV міжнар. іхтіолог. наук.-практ. конф. – Одеса., 2011. - С. 30-32.
4. *Бергман Ю.Э.* Криоконсервация геномов гидробионтов / Ю. Э. Бергман, Т.Х. Найденко // Бюлл. ДВО РАН. – 1992. - № 1-2. – С. 76-84.
5. *Вепринцев Б.Н.* Сохранить генофонд рыб и водных беспозвоночных / Б. Н. Вепринцев, С. А. Пилиев // Рыбн. хоз-во. – 1989. - № 6. – С. 29-32.
6. *Гахова Э.Н.* Криоконсервация гамет и личинок водных беспозвоночных / Э. Н. Гахова, Н. Р. Чекурова // Биофизика живой клетки: Сб. науч. тр. ИБК РАН. – 1994. –Т.6. – С. 104-110.
7. *Гречковская А.П.* Рекомендации по селекции белого и пестрого толстолобиков в условиях прудовых и тепловодных хозяйств Украины (первый тап) / А.П. Гречковская, Е. Е. Басалкевич – Львов. 1990 – 22 с.
8. *Животова Е.Н.* Фазовые переходы и стеклование в водных растворах оксиэтилированного глицерина при температурах ниже 273 К / Е. Н. Животова, А. В. Зинченко, Л. Г. Кулешова и др. // Биофизика живой клетки. - 2008. - Т. 9. - С. 52 - 53.
9. *Казаков Р.В.* Определения качества половых продуктов самцов рыб (методические указания). – Ленинград: ГосНИОРХ, 1978. – 15 с.
10. *Каранова М.В.* Антифризные свойства низкомолекулярных гликопротеидов из крови полярных рыб /М. В. Каранова // Биофизика живой клетки: Сб. науч. тр. ИБК РАН, 1994. – Т.6. – С. 68-73.
11. *Катасонов В.Я.* Формирование генетической коллекции спермы рыб в низкотемпературном банке / В. Я. Катасонов, Л. И. Цветкова, В.И. Ананьев // Рыбн. хоз-во. Сер. аквакультура: информ. пакет ВНИЭРХ. - 1994. - Вып. 1. - С. 14 - 16.
12. *Копейка Е.Ф.* Состояние и некоторые перспективы работ по криоконсервации половых клеток рыб / Е. Ф. Копейка, В. И. Ананьев// Рыбн. хоз-во. Сер. аквакультура: информ. пакет ВНИЭРХ. – 1994. – Вып.1. – С. 8 - 14.
13. *Цветкова Л.И.* Влияние антифризных гликопротеинов на качество криоконсервированной спермы рыб / Л. И. Цветкова, М. В. Каранова // Цитология. – 1994. – Т. 36 № 11. – С. 1157 – 1163.
14. *Цветкова Л.И.* Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых рыб / Л. И. Цветкова, С. И. Савушкина, Л. Н. Титарева – М.: ВНИИПРХ, 1997. – 10 с.
15. *Ilker Y.* Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*ctenopharyngodon idella*) sperm / Y. Ilker, Y. Bozkurt, M. Kemal // Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 25/2011/1.



16. *Sutton D.L.* University of Florida Bulletin 867, Department of Fisheries and Aquacultural Sciences / D. L. Sutton, V. V. Vandiver // Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. – 2006.
17. *Withler F.C.* Cryopreservation of spermatozoa of some freshwater fishes cultured in South and Southeast Asia / F. C. Withler F.C // Aquaculture 1981/1982. – V. 26. – P. 395 – 398

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ РАЗМОРАЖИВАНИЯ НА ПОДВИЖНОСТЬ ДЕФРОСТОВАНИХ СПЕРМИЕВ БЕЛОГО АМУРА (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

Д.А. Сыроватка, В.В. Бех

Внедрение в рыбоводческую практику метода глубокой заморозки половых продуктов рыб (криоконсервирование) предопределяет необходимость постоянной оптимизации параметров процесса размораживания, важным элементом которого является правильный подбор температуры водяной бани и экспозиция в ней спермы.

В статье представлены результаты использования различных программ размораживания и их влияние на результаты дефростации спермы белого амура (*Stenopharyngodon idella*). Исследования были проведены во время нерестовой компании 2012 года на базе опытного хозяйства «Нивка» и отдела селекции рыб Института рыбного хозяйства НААН.

Поиск оптимального режима дефростации проводили среди девяти вариантов опыта, условия каждого из которых определялись комбинацией трех температур водяной бани: 30, 35 и 40°C и соответствующими экспозициями выдерживания в ней микротрубочек с замороженной спермой белого амура – 10, 20 и 30 секунд. Лучший результат по таким параметрам, как общее время движения и количество живых сперматозоидов в дефростированной и активированной сперме получили при температуре 35°C и экспозиции 30 с. При использовании такой программы количество живых сперматозоидов достигала $77,4 \pm 0,57\%$, а время их движения составлял $75 \pm 2,0$ с. Для проверки оплодотворяющей способности полученной спермой осеменяли овулированную икру. Оплодотворяемость икры составила $85,6 \pm 2,8\%$, что свидетельствует о фертильности полученной спермы.

Ключевые слова: криоконсервация, режим размораживания, белый амур, оплодотворяющая способность дефростированной спермы, овулированная икра.

EFFECT OF DIFFERENT MODES OF THAWING ON CRYOPRESERVED SPERM MOTILITY GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

D. Syrovatka, V. Bekh

Implementation of deep freeze genital products (cryopreservation) in fish practice the need of continuation of optimizing process of defrosting parameters. The important defines element is the proper matching of the temperature water bath and exposing inside.



This research was carried out for the purpose of investigation investigate the effect of different thawing procedures for motility and fertilizing capacity of frozen/thawed grass carp sperm. The studies were conducted during the spawning company in 2012 at the experimental farm "Nyvka" and Institute Fisheries NAAS.

The optimal mode of defrostation was conducted among nine variants of the experiment. The conditions of each experiments are determined combination of three temperature water baths: 30, 35 and 40°C and the corresponding exposures of the holding inside it with frozen sperm microtubules of grass carp - 10, 20 and 30 seconds. The best result for parameters such as total time of motion and percentage of live sperm during thawing and activated sperm were obtained at 35°C and 30 seconds of exposure. Number of live spermatozoa's reached $77,4 \pm 0,57\%$ and time of their movement $75 \pm 2,0$ seconds. Eggs after ovulation were fertilized by received sperm for the purpose of checking of semen fertilizing capacity. Artificial fertilization was $85,6 \pm 2,8\%$ that to confirm fertility received sperm.

Key words: *cryopreservation, defrosting regime, grass carp, defrosted sperm fertilizing ability, ovulated fish eggs.*

