Черкасской области. Выявлено высокую степень полиморфизма за отдельными микросателитными локусами. Полученные результаты анализа ДНК-маркеров свидетельствуют о возможности их использования в дальнейшем для паспортизации, идентификации и выяснения происхождения племенных групп веслоноса.

USE OF DNA-MARKERS IN STUDIES OF GENETIC STRUCTURE OF PADDLEFISH PEDIGREE MATERIAL (*Polyodon spathula* (Walb.))

O. Tretyak, I. Hrytsynyak, S. Tarasjuk

Analysis of paddlefish genetic variability with the use of DNA-markers in pedigree stock, which is reproduced and reared in the fish farm "Gornyi Tikich" of Cherkassy region, has been analyzed. It was found high degree of polymorphism by individual microsatellite loci. The obtained results of DNA-markers indicate about possibilities of their use further for certification, identification, and clarification of origin of paddlefish pedigree groups.

УДК 597.554.3:621.59

ВИКОРИСТАННЯ КОБАМАМІДУ І ПЛАЗМИ КРОВІ СРІБНОГО КАРАСЯ ПРИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ КОРОПА

О.Л. Безусий, В.О. Черепнін

Інститут рибного господарства НААН України, м. Київ

Представлені результати вирощування різновікових груп українських порід коропа, отриманих з використанням сперми, кріоконсервованої із кріозахистними розчинами, модифікованими кобамамідом та плазмою крові срібного карася (Carassius auratus gibelio), що попередньо зазнав впливу холодового шоку.

Використання замороженої сперми дозволяє значно підвищити економічну ефективність племінних заводів і репродукторів, знизити вплив інбредної депресії в локальних стадах елітних плідників, урізноманітнити та розширити роботи генетико-селекційного і племінного напрямів, що, безумовно, дозволить поліпшити генетичну різноманітність і рибницькі якості цінних видів риб у найближчій перспективі.

Практика наукових досліджень кріоконсервування сперми риб пов'язана з пошуком нових способів та хімічних агентів для модифікації кріозахистних розчинів, з метою покращення як кількісних так і якісних вітальних характеристик розмороженої сперми. Крім того в сферу наукового інтересу потрапляє вивчення впливу процесу заморожування — дефростації на якість отриманої молоді та, надалі, різновікових груп ремонту і плідників.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом даних досліджень слугували сперма плідників, ембріони, личинки, цьоголітки та дволітки українських порід коропа.

Гормональна стимуляція плідників коропа з метою отримання від них сперми проводилась за допомогою ін'єкцій гіпофізу сазана та синтетичного гонадотропного рилізинг-фактору торгової марки "Ovopel" угорського виробництва.

Об'єм еякуляту визначали за допомогою піпет-дозатора "Eppendorf" з точністю до 0,1 см^3. Якість сперми визначали за допомогою оптичного мікроскопа

"Zeiss Axiostar plus" з фазовоконтрасним об'єктивом 20х/0.40, відеокамерою "JVC TK-C1480BE", рахувальною камерою Маклера і програмним забезпеченням "Відео Тест Сперм 2.1" ТОВ "ВідеоТесТ". Осмотичний тиск плазми сперми визначали за допомогою автоматичного кріоскопічного осмометра "Osmomat 030" фірми "Gonotec".

Замороженню піддавалась сперма з не менш ніж 60% сперматозоїдів що рухались прямолінійно-поступально.

Використання програми "Відео Тест Сперм 2.1" для проведення комп'ютерного аналізу еякуляту (CASA) [1] було зумовлено рядом переваг над ручною методикою. Це дозволило отримати високу точність вимірювань і отримання достовірних і відтворюваних даних при аналізі рухливості і морфологічних критеріїв сперматозоїдів. Для визначення осмотичного тиску плазми сперму центрифугували 10 хв. при 18000 G у пробірках типу Епендорф на 1,5 мл.

Кріоконсервування сперми коропа проводили у відповідності до прийнятих рекомендацій [2] з використанням розробленої нами експериментальної методики кріоконсервування сперми коропових риб, яка передбачає застосування високомолекулярних кріопротекторів та модифікованого їми кріозахисного середовища.

Частина отриманого кріозахисного розчину була модифікована введенням до його складу 10% плазми крові срібного карася (*Carassius auratus gibelio*), попередньо підданого холодовому шоку різкою зміною температури води з +20°С до +5°С .

Модифікація розчину проводилася також додаванням до нього кобамаміду (коферменту вітаміну B_{12}) в концентраціях від 0,1 до 1,0 мг/л.

Заморожування сперми риб проводили за такою схемою:

1) у температурному діапазоні від +20°С до –15°С швидкість охолодження становить 2–3 град./хв.

2) у температурному діапазоні від –15°С до –70°С швидкість охолодження становить 15 град./хв.

3) повільне занурення ампул у рідкий азот.

Розморожували сперму у воді за температури 40°С протягом 45 сек. Оцінку якості розмороженої сперми проводили після розморожування пробірок Епендорфа, згідно загальноприйнятих критеріїв [3]. Для активації розмороженої сперми використовували ставову воду, або фізіологічний розчин Хольтфретера для риб і амфібій. Після активації ставовою водою активність клітин складала 50–60% протягом 1 хв.

Отриманих личинок підрощували в пластикових лотоках інкубцеху протягом 14 діб, з підгодівлею їх стартовим кормом Tetra.

Відбір однорічок риб для формування експериментальних стад дволіток коропа проводили рендомно.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті весняної інвентаризації дослідних груп однонорічок нивківських лускатих і малолускатих коропів, отриманих із застосуванням дефростованої сперми встановлено, що їх вихід із зимівлі становив 82% для коропа, що відповідає нормативним вимогам.

Для подальшого формування експериментальних стад дволіток коропа отриманих із застосуванням технологій кріобіозу та з метою максимального вирівняння впливу паратипових чинників на реалізацію генотипу дослідних риб було сформовано без відбору (рендомно) групи по 500 однорічок кожного виду риб, які були посаджені на літнє вирощування у вирощувальні стави дослідного господарства "Нивка" .

Дослідні роботи проводилось у квітні–травні на базі дослідного господарства "Нивка" та в лабораторних умовах Інституту рибного господарства НААН. Всього в роботі було використано по п'ять пар плідників відповідно лускатого і малолускатого коропа.

Результати дослідів з модифікації кріозахистних розчинів при заморожувані сперми коропа представлені в табл. 1. Введення до кріозахисного розчину 10% плазми крові карася, попередньо підданого холодовому шоку, дозволило збільшити кількість життєздатних сперміїв коропа на 20% (після розморожування). Час їх поступального руху збільшилася на 25% відповідно. Модифікація розчину проводилася також додаванням до

Таблиця 1. **Характеристика нативної і дефростованої сперми коропа отриманої із застосуванням модифікованих кріопротекторів**

Показник			Група досліду	
Короп	Малолускатий	Живі спермії, від загальної суми, %	Нативна сперма	80,09±1,11
			Кобамамід	58,55±1,26
			Плазма крові карася	69,09±1,02
		Тривалість активного поступального руху сперміів, с	Нативна сперма	120,54±0,98
			Кобамамід	56,21±1,45
			Плазма крові карася	78,04±0,68
	Нивківський лускатий	Живі спермії, від загальної суми, %	Нативна сперма	87,10±1,12
			Кобамамід	64,50±1,18
			Плазма крові карася	69,60±1,06
		Тривалість активного поступального руху сперміів, с	Нативна сперма	159,54±0,98
			Кобамамід	90,25±1,35
			Плазма крові карася	132,25±0,68

нього кобамаміду (коферменту вітаміну B_{12}) у концентраціях від 0,1 до 1,0 мг/л. Кращий результат показало введення до кріозахистного середовища кобамаміду в концентрації 0,3 мг/л. Виживаність сперматозоїдів коропа після дефростації зросла на 18%, час поступального руху сперміів — на 20 сек.

Отримані із застосуванням кріоконсервованої сперми личинки коропа після підрощування, були посаджені в вирощувальні стави, а отримані експериментальні групи цьоголіок українських порід коропа (личинки нивківського лускатого і малолускатого коропа вирощувались спільно) в подальшому будуть використані для формування стад старшого ремонту і плідників відповідних порід

Результати вирощування дослідної групи цьоголітки коропа, одержаних з використанням дефростованої сперми, наведено в табл. 2.

У квітні під час весняної інвентаризації риб, було роденомно відібрано і сформовано дослідні і контрольні групи однорічок коропа, одержанні з використанням як нативної, так і дефростованої сперми риб, яких було посаджено на вирощування в експериментальні нагульні стави для встановлення їх рибогосподарських показників на другому році життя.

Умови утримання та оцінка коропів, отриманих від кріоконсервованої сперми другому році життя

Екологічний стан дослідних водойм. Протягом вегетаційного сезону температурний, кисневий, гідрологічний та гідрохімічний режими дослідних ставів сприяли розвитку та росту риб. Концент-

Таблиця 2. Результати вирощування дослідних цьоголіток коропа

Показник		Значення
Площа ставів, га		0,5
Густота посадки, тис. екз./га		10
Вихід, %		30
Маса, г	Нивківський	33,5
	Малолускатий	30,9
Рибопродуктивність, кг/га		195

рація розчинного кисню коливалась протягом вегетаційного сезону в межах від 8 до 5 мгO_2/л. Реакція середовища (pH) у нагульних ставах протягом вегетаційного сезону знаходилась в межах — 6,7–8,5. Загальна твердість води у нагульних ставах коливалась в межах 3,5–4,2 мг-екв./л. Перманганатна та біхроматна окислюваність були в межах рибницьких норм.

Розчинні у воді основні біогенні елементи (сполуки фосфору та азоту природного походження) мали незначну концентрацію. Мінералізація гідрокарбонатної води нагульних ставів була досить високою, але не перевищувала 550 мг/л. Серед інших іонів, перше місце посідали іони Ca^{2+}, концентрація яких коливалась у межах 48–65 мг/л, далі йшли іони Na^+ та K^+, концентрація яких знаходилась в межах 30,0–60,0 мг/л. Іони Mg^{2+} були присутні у незначній концентрації: 6,5–15,5 мг/л.

Аніони переважно були представлені HCO_3^- з концентрацією 152,4–202,2 мг/л, концентрація аніонів SO_4^{2-} становила 15,3–39,6 мг/л.

Навесні передбачувано спостерігалось значне перевищення ГДК за вмістом аніонів Cl^- (84,3–95,4 мг/л), які потрапляють з весняними стічними водами багатими на хлориди до р. Нивка.

Природна кормова база ставів. Зоопланктон вирощувальних ставів був представлений коловертками, веслоногими та гіллястовусими ракоподібними, зокрема наступними основними таксономічними групами: Cladocera (Bosmina longirostris, Daphnia magna, D.longispina, Moina rectirostris), Rotatoria (Asplanchna priodonta Gosse, Filinia longiseta, Euchlanis dilatata Ehr., Brachionus bacceri), Copepoda (Cyclops sp.) та личинками Chironomidae, видове визначення яких не проводилось. Загалом, кількісний розвиток зоопланктону дослідних ставів характеризувався помірними середньосезонними величинами його біомаси 0,63 г/м^3.

Навесні у складі зоопланктону найчисельнішими були коловертки, влітку — веслоногі ракоподібні (циклопи та їх науплiуси). Найбільша кількість коловерток у планктоні дослідних ставів спостерігалась з першої декади травня і до другої декади червня. Гіллястовусі ракоподібні та їх личинки (Daphnia manga, Scapholeberis mucronata, Moina rectirostris), знаходились в значній кількості лише в кінці весни та на початку літа; серед них домінували дафнії. Біомаса зоопланктону в цей період сягала 1,0 г/м^3 при чисельності 7,5 тис. екз./м^3.

Крім вищезазначених зоопланктерів враховувались також інші (“varia”) безхребетні, такі як личинки та кладки багатьох видів хірономід, одноденок, тощо, які деякою мірою впливали на біомасу та чисельність зоопланктону.

На другому році життя в раціоні коропа найважливішим складовим компонентом є представники зообентосу, серед яких кладки яєць та личинки Diptera займають чільне місце.

Протягом вегетаційного періоду 2012 р. у дослідних ставах спостерігалось 11 форм зообентосу, у тому числі 5 з класу Insecta. Найвищі значення кількості зообентосу у вирощувальних ставах припадали на останню декаду червня і досягали за біомасою — 3,8 г/м^2, за чисельністю — 314,7 екз./м^2. Середньосезонна біомаса зообентосу складала 1,2 г/м^2.

Отже, температурний, гідрохімічний та гідробіологічний режими були задовільними для вирощування цьоголіток і дволіток коропа.

У жовтні дослідні ставки були обловлені, проведена інвентаризація риб.

У результаті проведених робіт сформовано експериментальне стадо українських коропів, одержаних з використанням кріобіотехнологій в загальній кількості 423 екз. дволіток та 3000 тис. екз. цьоголіток. Середня маса отриманих дослідних цьоголіток нивківського лускатого коропа становила 32,5 г. Середня маса дволіток коропа становила 594,29 г. Результати аналізу рибницьких показників дволіток коропа представлені в табл. 3.

Як видно із наведених даних, дослідні дволітки продемонстрували високу потенцію росту. За рибогосподарськими показниками показниками дволітки коропа, отримані з використанням дефростованої сперми не поступаються таким, отриманим з використанням нативної сперми і за низкою показників переважають останніх.

Таблиця 3. **Результати порівняльного вирощування дослідних і контрольних груп дволіток коропа**

№ з/п	Показники	Одиниці вимірювання	Нивківський лускатий короп		Малолускатий короп	
			Нативна сперма	Дефростована сперма	Нативна сперма	Дефростована сперма
1	Густота посадки*	екз./га	1000	1000* (500+500)	1000	1000* (500+500)
2	Середня маса K_1	г	33,7	35,6	29	31,5
3	Вихід дволіток	%	63,2	87,8	55,2	81,2
4	Середня маса K_{1+}	г	554,5	594,29	444,5	579,3
5	Абсолютний приріст маси	г	520,8	558,69	415,5	547,8
6	Кратність збільшення середньої маси	разів	16,45	16,69	15,33	18,39
7	Індекс фізичного розвитку	г/см	17,23	22,26	21,43	24,33
8	Рибопродуктивність за групами	кг/га	316,74	486,19	216,36	438,89

*Дослідні групи лускатого і малолускатого когопа вирощувались в одному ставку.

Таким чином, отримані результати свідчать про ефективність використання методів кріобіотехнології в рибництві.

ВИСНОВКИ

Введення до кріозахисного розчину 10% плазми крові карася, попередньо підданого холодовому шоку, дозволило після розморожування збільшити кількість життєздатних сперміїв коропа на 20%. Час їх поступального руху збільшилася на 25% відповідно.

Виживання сперматозоїдів коропа після введення до кріозахистного середовища кобамаміду в концентрації 0,3 мг/л. після дефростації зросла на 18 %, час поступального руху сперміїв — на 20 сек.

Вирощування потомства малолускатого і нивківського лускатого коропів отриманого з використанням дефростованої сперми показало їх перевагу за рибницькими показниками порівняно з потомством, отриманим традиційними методами.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Kime D.E.* et all. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. Aquatic Toxicology, 36 (1996). — P. 223–237. Elseiver Science B.V.
2. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых рыб. — М.: ВНИИПРХ, 1997.
3. Методические указания определения качества половых продуктов самцов рыб. — М.: ВНИИПРХ, 1978.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОБАМАМИДА И ПЛАЗМЫ КРОВИ СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ СПЕРМЫ КАРПА

А.Л. Безусый, В.А. Черепнин

Изложены результаты выращивания разновозрастных групп украинских пород карпа, полученных при использовании спермы, криоконсервированой с криозащитными растворами, модифицированными кобамамидом и плазмой крови серебряного карася (Carassius auratus gibelio) предварительно подвергнутого воздействию холодового шока.

SPERM CRYOPRESERVATION OF COMMON CARP USING KOBAMAMID AND BLOOD PLASMA OF GOLDFISH

A. Bezusy, V. Cherepnin

The show results of carp grown offspring of different ages obtained from defrosted sperm. Using modified kobamamid and blood plasma of goldfish cryopreservation media are presented.