УДК 639.212./.3.034.2:502.7

Оцінка виживаності молоді стерляді, отриманої від кріоконсервованої сперми

І. Кононенко
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Анотація. *Наведено результати вирощування молоді стерляді, отриманої із застосуванням кріоконсервованої сперми. Проведено порівняльний аналіз виживаності молоді стерляді, одержаної від запліднення ікри нативною та кріоконсервованою спермою, замороженою у вигляді суспензії з різними за складом кріозахисними розчинами.*

Ключові слова: *кріоконсервування, сперма стерляді, сперматозоїди, осетрові, молодь, виживаність.*

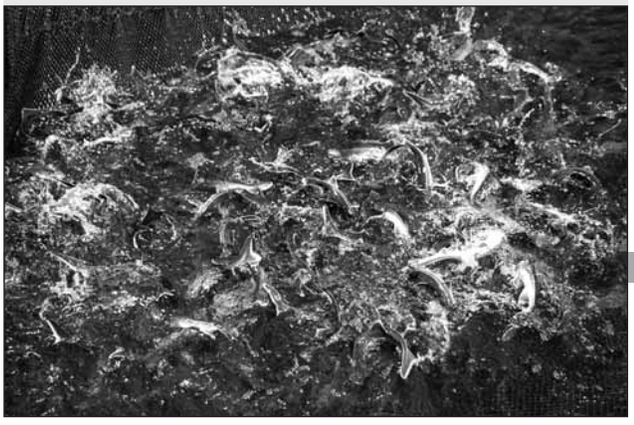
THE ESTIMATION OF SURVIVAL OF YOUNG STARLET (Acipenser ruthenus, L. 1758) WHICH IS BORN FROM CRYOPRESERVED SPERM

Iryna S. Kononenko *(National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv).*

Abstract. *This article presents the results of growing young staret. This young starlet was born after cryo preserved sperm had been used. We did a comparative analysis of young starlet survival after the starlet eggs had been fertilized by native and cryo preserved sperm. We used different compositions in solutions to freeze this cryo preserved sperm in the form of suspension.*

Key words: *cryo preservation, starlet sperm, mail sperm cells, sturgeon,the young, survival.*

Рецензенти:
ст. наук. співробітник ***В.О. Черепнін*** *(Інститут рибного господарства НААН України);*
канд. біол. наук, пров. наук. співробітник ***Є.Ф. Копєйка*** *(Інститут кріобіології і кріомедицини НАН України)*



Аналіз сучасного стану природніх популяцій осетрових видів свідчить про відсутність можливості їх природного відтворення. Єдиним шляхом отримання потомства цих цінних риб зараз є відтворення їх у заводських умовах із застосуванням передових технологій та біотехнологій, зокрема кріоконсервування статевих продуктів самців [7, 12]. За умов, що склалися на даному етапі розвитку осетрівництва, актуальним є вивчення питання виживаності вирощеної молоді, як одного із головних показників, що характеризує якість процесу кріоконсервування статевих продуктів осетрових.

Аналіз літературних даних стосовно питання виживаності молоді від кріоконсервованої сперми показав, що більшість робіт спрямовані на вивчення впливу процесу кріоконсервування та окремих компонентів кріозахисних розчинів на розмірні показники вирощеної молоді. Найменше інформації зустрічається з питання виживаності молоді, хоча цей показник один із тих, що якнайкраще характеризує якість процесу кріоконсервування.

Так, у роботах українських дослідників [3] показано, що різниця у виживаності молоді коропа, отриманої з використанням нативної та кріоконсервованої сперми, не набувала статистично значимого розміру. Проте, автори досліджень повністю не виключають відсутності або наявності такої різниці, стверджуючи, що вона може бути доволі незначною і не проявляється в умовах конкретного досліду або ж на першому році життя.

Найбільше інформації зустрічається з питання життєстійкості молоді риб, отриманої із застосування кріоконсервованої сперми, до дії різних негативних факторів. Зокрема, результатами досліджень [10] з ли-

чинками нивківських лускатих коропів на етапі переходу до активного плавання встановлено кращу опірність до зневоднення особин, отриманих з використанням кріоконсервованої сперми. Відповідно, дана група риб характеризувалася і вищим показником виживання.

Дослідженнями, проведеними з личинками амурського сазана, отриманими із застосуванням кріоконсервованої сперми [2], показано, що молодь за своїми характеристиками, які виражаються через опірність до тривалої дії низьких температур і гострого дефіциту корму, не поступалися аналогічним показникам личинока, одержаних від запліднення ікри нативною спермою.

Таким чином, оцінка виживання молоді, отриманої із застосуванням кріоконсервованої сперми, так само, як і характеристика лінійно-вагових даних, являється важливим показником для вирощування риб з високими господарськими характеристиками з метою використання їх для зариблення природних водойм, або ж в товарних цілях.

Мета досліджень – аналіз виживаності молоді стерляді, отриманої з використанням кріоконсервованої сперми та порівняння одержаних даних із результатами вирощування молоді шляхом запліднення ікри нативною спермою.

Експериментальна частина роботи виконана на базі навчально-науково-виробничої лабораторії рибництва кафедри аквакультури НУБіП України. У якості матеріалу для досліджень використовували молодь стерляді, одержану шляхом застосування нативної та замороженої сперми. Предмет досліджень – дані запліднення ікри та виходу вільних ембріонів з інкубаційних апаратів та показники виживаності вирощеної молоді. Роботи з плідниками стерляді проводили відповідно до методик, загальноприйнятих в осетрівництві [8]. У дослідженнях використовували сперму, якістю 5 балів, у якій після активації ставковою водою здатності до руху набувало 95–100 % спермиїв [1]. Отриманий еякулят розподіляли на дві порції: одну використовували для запліднення ікри, а іншу піддавали процедурі низькотемпературного заморожування. Для кріоконсервування використовували два модифіковані кріозахисні розчини (КР), до складу яких входили:

– *КР № 1*: $KHCO_3$ – 8,9 мМ, креатин моногідрат – 3,8мМ, сахароза – 11,7 мМ, фруктоза – 5,6 мМ, метанол – 3,75 М, дистильована вода (дослідна група № 1);

– *КР № 2*: $KHCO_3$ – 8,9 мМ, креатин моногідрат – 7,6 мМ, сахароза – 11,7 мМ, фруктоза – 5,6 мМ, метанол – 3,75 М, плазма крові карася 1:800 (v/v), дистильована вода (дослідна група № 2).

Заморожування сперми, розведеної кріозахисним розчином (1:1), проводили у гранулах, об'ємом 0,1 мл шляхом накапування суспензії на поверхню фторопластової пластини, що знаходилася в парах рідкого азоту при температурі +50 °С за допомогою піпет-дозатора. Розморожування гранул проводили шляхом підігріву по 10 гранул сперми (1 мл) додаванням до 50–60 мл ставової води за температури 15 °С і відразу ж проводили запліднення ікри. Оцінку впливу кріозахисних середовищ на якість сперми проводили шляхом порівняння показника виживання сперматозоїдів на трьох етапах робіт: нативна сперма; сперма після розведення кріозахисним середовищем; розморожена сперма.

Для інкубації заплідненої ікри контрольної (нативна сперма) та дослідної (розморожена сперма) груп використовували апарати Вейса. Оцінку процесу інкубування проводили шляхом дослідження порції ікри (100–120 прим. ікринок) та визначення відсотка запліднення та кількості ембріонів, що розвиваються. Підрахунок передличинок, що виклюнулися, здійснювали об'ємно-ваговим методом, після чого з кожної із трьох груп відібрали по 1500 шт. передличинок для подальших спостережень. Всього для досліджень було використано 4500 прим. молоді стерляді, для вирощування якої використовували пластикові басейни (по 4 м^3) інкубаційного цеху лабораторії. На першому етапі вирощування підгодівлю личинок здійснювали живим природним кормом – дафнією (*Daphnia magna*), а в

подальшому – стартовим осетровим комбікормом. Вплив процесу кріоконсервування на отримане потомство стерляді оцінювали за показниками виживання та лінійно-вагового росту молоді у порівняльному аспекті між контрольною та дослідними групами.

Результати досліджень та їх обговорення. Перевірка кріорозчинів № 1 та № 2 виявила вищі захисні властивості кріозахисного розчину № 1. Активність спермиїв, розведених у середовищах № 1 та № 2 становила 95 % та 80–85 % відповідно. Після розморожування активність сперматозоїдів, заморожених в обох розчинах, знизилася до 75–80 %.

Запліднюючу здатність розмороженої сперми оцінювали за кількістю ікринок, що досягли стадії 4-х бластомерів. Встановлено, що запліднення ікри в дослідній групі № 1 в середньому проходило на рівні з контролем – 85,6 % та 87,6 % відповідно. Розвиток ікри дослідної групи № 2 характеризувався дещо нижчим показником запліднення – 68,0 %. Підрахунок кількості ембріонів, що розвиваються (через 20–22 год. після запліднення), показав аналогічні результати: розвиток ікри контрольної та дослідної групи № 1 проходив на однаковому рівні – 79,7 та 77,02 % відповідно; результати дослідної групи № 2 були очікувано нижчими – 60,5 %.

Вихід вільних ембріонів з ікри розпочався на 5 день інкубації за температури 16,5 °С та становив: 68,7 % – у контролі, 63,2 % – у дослідній групі № 1 та 47,3 % – у дослідній групі № 2. Як видно із отриманих даних, використанням кріозахисного розчину № 1 вдалося забезпечити високий кріозахист спермиїв від екстремальних факторів кріоконсервування. Водночас встановлено, що використання кріозахисного розчину № 2 для розведення та заморожування сперми спричинило значне погіршення її якості, що може бути проявом впливу осмотичного тиску, який є ключовим фактором кріопошкоджень сперматозоїдів [11], внаслідок подвійної концентрації креатину (порівняно із кріорозчином № 1) та плазми крові карася у розчині.

Протягом 3-х місяців вирощування молоді стерляді встановлено тенденцію переважання морфометричних показників дослідних груп відносно контролю. Так, середня маса мальків дослідної групи № 1 на кінець 3-го місяця вирощування становила 4,37 г та переважала за масою молодь контрольної групи – 3,96 г. Водночас, маса молоді дослідної групи № 2, не зважаючи на невисокий відсоток запліднення ікри та низький вихід вільних ембріонів, переважала молодь контрольної та дослідної групи № 1 – 5,05 г. Аналогічні результати отримані при вимірюванні лінійних показників – довжина молоді контрольної групи на кінець періоду вирощування становила 8,39 см, дослідної групи № 1 та № 2 – 8,78 та 9,09 см відповідно.

Оцінку виживаності вирощеної молоді стерляді проводили за результатами порівняння відсоткової частки мальків контрольної та досліджуваних груп, що залишилися на момент проведення досліду.

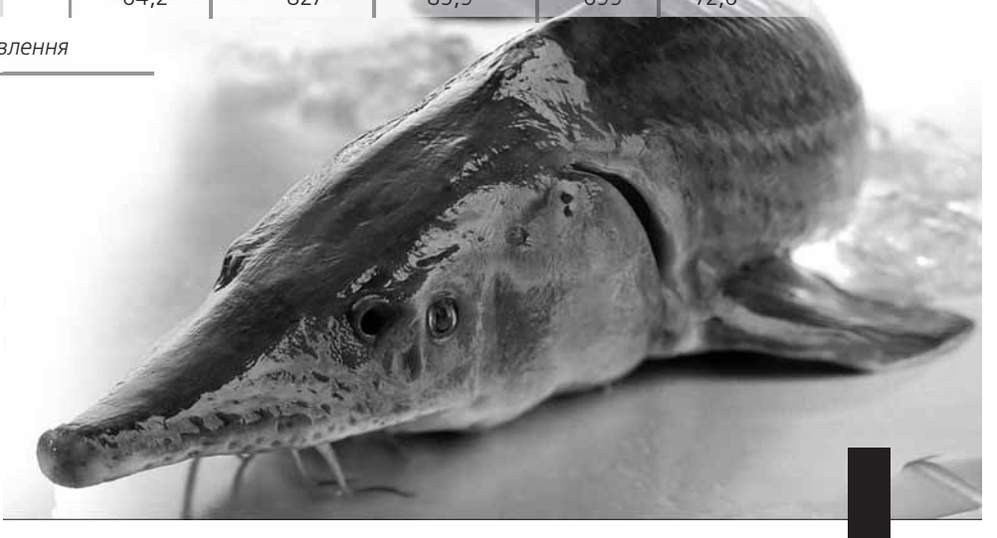
Аналіз даних перших 9-ти днів вирощування показав, що 74,2 % молоді контрольної групи та 77, 4 % молоді дослідної групи № 1 перейшла на активне жив-

Таблиця 1

Виживаність молоді стерляді протягом 1-го місяця вирощування

Групи	Чисельність передличинок у групах	Перехід на змішане живлення (9 діб)		Підгодівля штучним комбікормом (17 діб)*		31 доба*	
		од.	%*	од.	%*	од.	%*
Контроль	1500	1113	74,2	992	89,1	814	73,1
Група 1	1500	1161	77,4	1101	94,8	956	82,3
Група 2	1500	963	64,2	827	85,9	699	72,6

** – від молоді, що перейшла на активне живлення*



лення (табли. 1); одержані дані знаходяться в межах нормативних показників [8].

Як видно із результатів, найбільш критичним для молоді дослідної групи № 2 протягом 1-го місяця життя виявився період переходу на зовнішнє живлення. На даному періоді відійшли всі слабкі та нездатні до життя особини, перехід молоді на активне живлення становив 64,2 %. Очевидно, такий результат може бути викликаний слабкою функціональною пристосованістю травної системи молоді [1], або ж проявом кріоселективного ефекту внаслідок дії екстремально низьких температур та підвищеної осмотичності кріозахисного середовища № 2, яке використовувалося для розведення та заморожування сперми [4, 6, 10].

Подальше вирощування молоді дослідної групи № 2 проходило на рівні показників контрольної групи і на 3-й місяць вирощування майже на 7 % переважало виживання молоді контрольної групи (табл.2).

Вихід стерляді, масою 3 г (2,5 місяці) від молоді, що перейшла на активне живлення, у дослідній групі № 1 становив 72,3 %, що відповідало нормативним вимогам. Виживання 3-х г молоді контрольної та дослідної групи № 2 були дещо нижчими – 61,4 та 64,6 %.

На основі одержаних результатів досліджень встановлено, що протягом досліджуваного періоду, молодь дослідної групи № 1 характеризувалася вищими показниками виживання, порівняно із контролем та дослідною групою № 2. Отержані результати свідчать про перспективність методу кріоконсервування сперми за умови використання кріорозчину № 1 (на основі метанолу і з додаванням креатину) для одержання потомства стерляді у заводських умовах, а також для поповнення колекції заморожених зразків сперми стерляді в кріобанках.

Висновки та перспективи подальших досліджень

В результаті проведених досліджень встановлено, що молодь стерляді від використаної кріоконсервованої сперми за досліджуваними показниками не поступається молоді від запліднення ікри нативною спермою.

Головним фактором, який вплинув на виживаність молоді стерляді, був осмотичний тиск кріозахисного середовища, яке використовувалося для розведення та заморожування сперми. Так, у середовищі із високим осмотичним тиском (№ 2) отримані результати значно відрізнялися від контрольних в меншу сторону. В результаті використання модифікованого кріозахисного розчину на основі метанолу із додавання креатину виживаність молоді дослідної групи № 1 на кожному етапі досліджень переважала молодь контрольної групи. Найбільш чітко проявилася життєстійкість досліджуваних груп молоді на кінцевих етапах досліджень – після 3-х місяців вирощування вихід молоді досліджуваної групи № 1 переважав контрольну на 11 %.

Перспективним вважається напрямок формування ремонтно-маточного стада стерляді, одержаної із використанням кріоконсервованої сперми, однак в галузі даного питання потребуються подальші дослідження.

Таблиця 2

Виживаність молоді стерляді до кінця дослідного періоду

Групи	Виживання 1,5-місячних личинок*		Виживання 2-місячних личинок*		Виживання 2,5-місячних личинок*		Виживання 3-місячних личинок*	
	од.	%*	од.	%*	од.	%*	од.	%*
Контроль	769	69,1	719	64,6	683	61,4	657	59,02
Група 1	913	78,6	875	75,4	839	72,3	813	70,02
Група 2	652	67,7	609	63,2	622	64,6	635	65,9

* – від молоді, що перейшла на активне живлення

Література

1. ***Андрющенко А.І., Вовк Н.І., Кононенко Р.В.*** *та ін. Ставове осетрівництво. Методичний посібник для самостійної роботи та проведення розрахункових робіт студентами за спеціалізацією «Осетрівництво». – Київ: УФЦ, 2013. – С. 153.*
2. ***Безусий О.Л., Копєйка Є.Ф., Дрокін С.І.*** *та ін. Вивчення впливу кріоконсервування та довгострокового зберігання сперми амурського сазана на життєстійкість личинок//Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології: тези IV Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції. (Одеса, 7 – 11 вересня 2011 р.). – Одесса: Феникс, 2011. – С. 30–32.*
3. ***Безусий О.Л., Черепнін В.О., Бех В.В.*** *та ін. Вивчення впливу кріоконсервування сперми на розвиток молоді українських порід коропа // Рибогосподарська наука України. – № 4. – 2010. – С. 95–100.*
4. ***Бибенко О.В.*** *Влияние факторов криоконсервирования на генетический аппарат спермиев рыб / Автореф. диссер. на соискание уч. степ. канд. биолог. наук, 03.00.22 – криобиология. –Харьков, 1993. – 16 с.*
5. ***Копейка Е.Ф., Черепанов В.В., Аюшин Б.Н.*** *и др. Использование криоконсервированной спермы карпа для коммерческой гибридизации на теплых водах Приморской ГРЕС // IV Всесоюзное совещание по рыбохоз. использ. тепл. вод.: тез. докладов (Курчатов, окт., 1990):. – М., 1990. – С. 145–146.*
6. ***Копєйка Є.Ф., Дрокін С.І., Гордієнко Є.О.*** *та ін. Вплив осмотичності кріозахисного середовища, форми та об'єму контейнерів на виживання кріоконсервованих сперматозоїдів коропів Cyprinus carpio // Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Рибне господарство». Київ –2009. – В. 66. – С. 89–93.*
7. ***Пономарева Е.Н., Металлов Г.Ф., Корчунов А.А.*** *и др. Особенности развития репродуктивной системы донской стерляди в зарегулированных условиях водной среды // Известия Самарского научного центра РАН. – 2012. – Т. 14. - № 4. С. 190 – 193.*
8. ***Судакова Н.В.*** *Технологии и нормативы по товарному осетроводству в VI рыбоводной зоне. – Москва: ВНИРО, 2006. – 100 с.*
9. ***Чебанов М.С., Галич Е.В., Чмырь Ю.М.*** *Руководство по разведению и выращиванию осетровых рыб. – Москва: Росинформагротек, 2004. – 135 с.*
10. ***Черепнін В.О.*** *Прояв ефекту кріоселекції у нащадків коропа, отриманих від дефростованої суспензії сперми з модифікованими кріозахисними розчинами // Рибогосподарська наука України. – 2016. – № 3(37). – С. 88–98.*
11. ***Horvбth Б., Wayman W.R., Urbбnyi B.*** *et al. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethylsulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species // Aquaculture. – 2005. –Vol. 247, № 1–4. – P.243–251.*
12. ***Kononenko I.*** *Development of cryoprotective media for low–temperature freezing of sterlet (Acipenser ruthenus) sperm // Рибогосподарська наука України. – 2017.– №2 (40). – С. 100–114.*