

СПЕЦИФИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ АМУРСКОГО САЗАНА ВАТ “ДОНРЫБКОМБИНАТ”

А.Э. Мариуца

Исследована специфика генетической структуры амурского сазана, ВАТ “Донрыбкомбинат” Славянского района, отделения “Красная Долина”, по распределению аллелей и генотипов электрофоретических вариантов отдельных локусов. Выявлены породоспецифические особенности генетической структуры по исследованным локусам. Рассчитаны реальные и ожидаемые уровни средней гетерозиготности на локус у амурского сазана.

SPECIFICITY OF ECIFICITY OF GENETIC STRUCTURE OF THE AMUR WIDL CARP AT THE OS “DONFISHCOMBINE”

A. Mariutsa

Specificity of genetic structure of the Amur widl carp at the OS “Donfishcombine” of Slavic area of the department “Red Valley” according to separation of alleles and genotypes of electrophores variants particular loci has been investigated. It has been found out the breedspecific peculiarities of genetic structure according to the investigated loci. The real and expected level of middle heterozygosity on a locus of the Amur widl carp was calculated.

УДК 639.3.032

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМИ НА РОЗВИТОК МОЛОДІ УКРАЇНСЬКИХ ПОРІД КОРОПА

О.Л. Безусий¹, В.О. Черепнін¹, В.В. Бех¹, Є.Ф. Копейка², С.І. Дрокін²

¹ Інститут рибного господарства НААН

² Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАНУ

*Проведено дослідження порівняння швидкості росту та відсотка виходу після періоду під-
рощування між групами молоді коропа, отриманої із застосуванням як нативної, так
і розмороженої кріоконсервованої сперми.*

Кріоконсервування статевих продуктів риб з метою збереження та подальшого використання генетичного матеріалу найбільш цінних у господарському відношенні плідників на сучасному етапі переходить із галузі новітніх досліджень у сферу рутинних технологій. Детально розроблені та постійно вдосконалюються режими заморожування, склад кріозахисних середовищ, форма та матеріал контейнерів [1–3].

Тим часом недостатньо вивченим залишається питання про те, як впливає глибоке охолодження сперми (до -196°C) на якість потомства риб, отриманого з її використанням. Серед фахівців активно дискутувались гіпотези щодо селективно-го впливу попереднього заморожування

на якість сперміїв, а отже, і на життєстійкість отриманої молоді. У літературі з'явилися публікації [4], в яких наводяться дані про вищу активність харчування та резистентність личинок, отриманих із застосуванням розмороженої сперми, порівняно із личинками, які виключились із ікри заплідненої нативною спермою. З іншого боку, інформації про порівняння найпростіших морфометричних показників, які б характеризували темп росту личинок із дослідної і контрольної груп, не наведено.

Мета досліджень полягала в тому, щоб шляхом порівняльного аналізу виявити наявність різниці (або показати її відсутність) між личинками коропа, отриманими з використанням нативної

та кріоконсервованої сперми за такими показниками як темп росту та відсоток виживання протягом першого року життя.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідні роботи з кріоконсервування та розморожування сперми коропа, отримання личинок, їх підрощування були проведені протягом червня — вересня 2009 р. на базі дослідного господарства “Нивка” та в лабораторних умовах Інституту рибного господарства НААН. Матеріалом дослідження були личинки коропа, отримані шляхом інкубації в лабораторних умовах ікри самок нивківського лускатого і малолускатого коропів, частина з якої була запліднена нативною спермою самців коропа відповідних порід, а інша частина — розмороженою спермою цих самих самців коропа.

Досліді проводили за такою схемою: були відібрані по дві пари плідників кожної з вказаних порід коропа. У кожного з самців була відібрана сперма, об’єм еякуляту визначали за допомогою піпетдозатора з точністю до 0,1 см³. Якість сперми визначали за допомогою оптичного мікроскопа “Zeiss Axiostar plus” з відеокамерою “JVC ТК-С1480ВЕ” і програмним забезпеченням “Відео Тест Сперм 2.1”. Після чого сперму розділяли на дві порції, одна з яких проходила процедуру заморожування — заморожування в рідкому азоті. Замороженню піддавалась сперма з не менш ніж 60% сперматозоїдів, що рухались прямолінійно-поступально.

При заморожуванні використовували модифіковане кріозахисне середовище для сперми коропа і сазана [1], приготовлене за таким прописом.

17 г тріс-оксиметіл-амінометану було розчинено в 1 л дистилату з титруванням НСІ до рН 8. Далі для отримання 1 л середовища в 600–700 мл буферу розчиняли з постійним перемішуванням такі компоненти: 4,2 г NaCl; 0,06 г KCl; 2,8 г NaHCO₃; 1,37 г сахарози; 0,62 Mg SO₄ 7 H₂O; 0,18 г CaCl₂ 6H₂O. За 30 хв до використання до цього розчину було додано 150 г яєчного жовтка та 180 г етиленгліколю. Об’єм усього розчину доведено до 1 л додаванням ТРІС-НСІ буферу.

Перед початком робіт сперма, кріозахисні середовища та активатори охолодили до 9°C. До охолодженої сперми коропа добавляли, безперервно перемішуючи, охолоджені до тієї самої температури кріозахисні середовища в об’ємному співвідношенні 1:1. Отримані суспензії залишали на еквілібрацію за температури 9°C на 30 хв.

Потім суспензії розфасовувались у поліетиленові ампули (по 0,5 мл у кожену), а також у чарунки попередньо охолодженої фторопластової платівки.

У роботі був використаний такий режим заморожування:

I етап: від +5 до –15°C зі швидкістю 1–2 град./хв.

II етап: від –15 до –70°C зі швидкістю 15–20 град./хв.

III етап: плавне занурення в рідкий азот.

З метою контролю якості кріоконсервованої сперми щойно заморожені гранули розморожували на водяній бані за температури 40°C протягом 30 с до появи рідкої фази. Завершували розморожування на повітрі, енергійно збовтуючи ампули до повного розморожування. Розморожену сперму активували ставковою водою, а також 0,35%-м NaHCO₃.

Ікру кожної із самок без попереднього знеклеювання розподіляли по дну двох чашок Петрі, в кожній з яких проводили запліднення нативною і відповідно розмороженою спермою окремого самця коропа. В кожній з чашок Петрі залишали по 100 ікринок. Інкубацію проводили на вказаних чашках Петрі у 5-літрових лабораторних інкубаційних апаратах, близьких за конструкцією до апаратів Вейса.

Отримані личинки підрощувались у пластикових лотках об’ємом 40 л, під’єднаних до системи замкненого водообігу. Таким чином, параметри середовища (температура води — 24°C, вміст розчиненого у воді кисню — 7,8–8,2 мг O₂/л) були повністю однаковими для всіх дослідних і контрольних груп личинок. На першому етапі личинок годували культивованими в окремій посудині на сінному відварі коловертками, надалі відловленим у природних водоймах зоопланктоном і стартовим форелевим комбікоромом.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рухливість спермій у відібраній спермі оцінювали на рівні 60–80% для малолускатих і 80–90% — лускатих короїв.

Вилуплення вільних ембріонів із ікри за температури інкубації 23°C відбувалось на 3-тю добу після запліднення ікри. Хід ембріонального розвитку ікри, заплідненої розмороженою спермою лускатого короїа, проілюстровано на рис. 1.

У кожному із варіантів досліду із ста ікринок вилупилось від 53 до 75 вільних ембріонів (табл. 2). У трьох випадках із чотирьох із ікри заплідненої нативною спермою виклюнулось на 3, 4 чи 9% личинок менше, ніж від застосування кріоконсервованої сперми, в одному випадку, навпаки, — на 17% більше.

Після 3-х місяців підрощування в лабораторних умовах мальки короїа були перераховані та індивідуально визначені у них довжин і мас тіла. Результати вимірювань та їх статистичної обробки подано в табл. 1.

Маса мальків на кінець досліду, як видно із табл. 1, коливалась від 50 до 2400 мг, а довжина тіла відповідно від 10 до 52 мм. Порівнюючи масу тіла мальків, можна побачити, що в середньому маса мальків, отриманих зі застосуванням нативної сперми, становила і 485,3 мг, кріоконсервованої сперми — 516,4 мг. Із чотирьох пар дослід — контроль у трьох випадках маса тіла була вища в досліді, в одному випадку — в контролі. На рис. 2 наведено графік, який демонструє математичну обробку результатів морфометричних промірів мальків дослідних і контрольних груп у кінці досліду.

На наведеному графіку на осі ординат відкладена довжина мальків (мм), нивківських лускатих короїів, отриманих з використанням замороженої сперми (Кріо-1 — це групи A_1+B_1), та нативної сперми (Контроль 1 — це групи A_2+B_2), довжина мальків нивківських малолускатих короїів, отриманих з використанням замороженої сперми (Кріо-2 — це групи C_1+D_1), та нативної сперми (Контроль 2 —

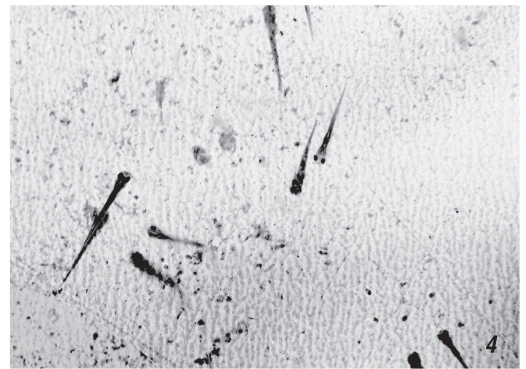
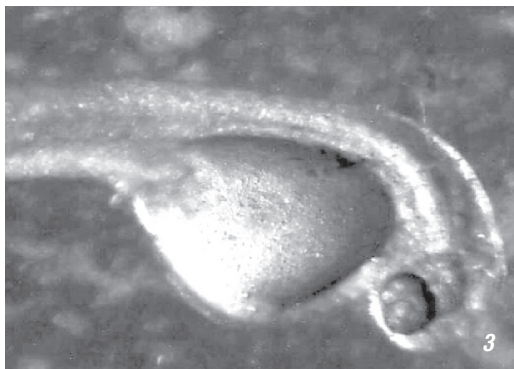
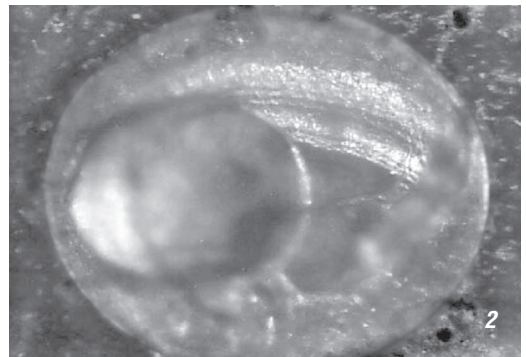
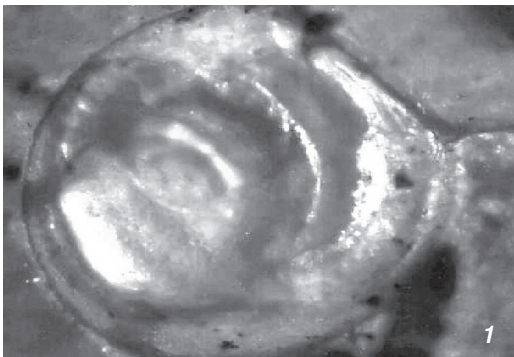


Рис. 1. Послідовні стадії розвитку ембріона (фото 1–4, відповідно 20, 25, 48, 72 год після запліднення)

Таблиця 1. Результати морфометричних промірів підрощених мальків коропа, отриманих із застосуванням розмороженої та нативної сперми (початкова кількість ікринок $N=100$, n_1 — кількість вільних ембріонів, які виклюнулись із ікри, n_2 — кількість мальків у кінці періоду підрощування)

Стат. показник	Варіант досліду															
	A_1		A_2		B_1		B_2		C_1		C_2		D_1		D_2	
	м, мг	Л, мм	м, мг	Л, мм	м, мг	Л, мм	м, мг	Л, мм	м, мг	Л, мм	м, мг	Л, мм	м, мг	Л, мм	м, мг	Л, мм
n_1	61	57	55	72	74	70	62	53								
n_2	35	28	22	31	32	28	24	27								
M	496,0	23,5	563,1	24,6	519,8	24,4	464,8	23,4	487,7	23,6	442,7	23,2	562,1	24,6	470,6	22,7
m	140,13	2,69	156,28	2,97	105,14	2,66	126,47	2,57	136,50	2,60	98,20	2,37	141,57	2,85	121,45	2,36
δ	443,12	8,52	494,21	9,38	332,48	8,43	399,94	8,12	431,64	8,22	310,54	7,48	447,69	9,01	384,07	7,46
C_v	89,34	36,31	87,76	38,19	63,97	34,48	86,04	34,75	88,51	34,86	70,15	32,23	79,65	36,57	81,62	32,77
max	2100	46	2300	50	1200	42	2000	48	2400	52	1350	42	1850	44	1800	44
min	65	10	70	10	50	10	80	10	75	10	100	13	50	10	90	11

* Групи личинок отримані від плідників нивківського лускастого коропа (A_1, A_2, B_1, B_2) та нивківського малолускастого коропа (C_1, C_2, D_1, D_2). Однакові букви позначають одну пару плідників, числовий індекс 1 при буквах позначає групи личинок отриманих із застосуванням розмороженої сперми, а індекс 2 — контрольні групи личинок отриманих із застосуванням нативної сперми.

Таблиця 2. Результати підрощування молоді коропа, отриманої із застосуванням нативної та розмороженої сперми

Варіант досліджу	Кількість ікринок, шт.	Кількість отриманих личинок, екз.	Кількість мальків, екз. (10 жовтня)	Середня маса, мг	Середня довжина, L, мм	Відсоток виходу (% від личинок)
A ₁	100	61	35	496	23,5	57
A ₂	100	57	28	563	24,6	49
B ₁	100	55	22	520	24,4	40
B ₂	100	72	31	465	23,4	43
C ₁	100	74	32	488	23,6	43
C ₂	100	70	28	443	23,2	40
D ₁	100	62	24	562	24,6	39
D ₂	100	53	27	471	22,7	51

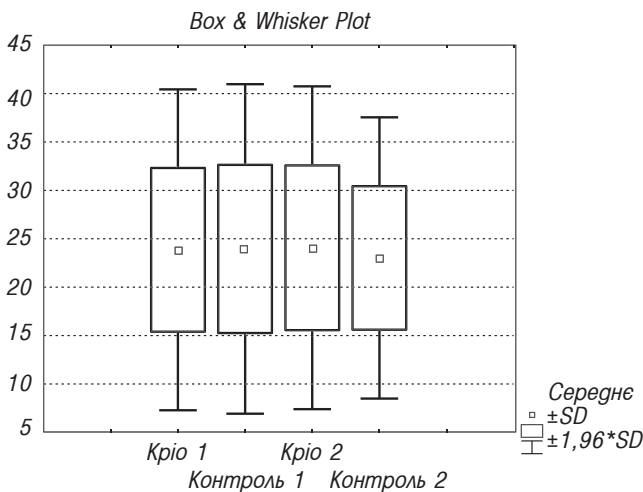


Рис. 2. Середні значення довжини тіла та значення середньоквадратичного відхилення ($\pm SD$) у дослідних та контрольних групах риб

це групи C₂+D₂). Як видно з графіка, довжина мальків лускатого та малолускатого коропів, отриманих з використанням нативної або кріоконсервованої сперми, статистично значимо не різняться між собою.

Спостерігалась незначна (близько 20 мг) різниця між темпом росту лускатих і рамчастих коропів. Так, якщо середня маса мальків лускатого коропа як дослідних, так і контрольних груп дорівнює 511 мг, то для мальків рамчастого коропа цей показник перебуває на рівні 491 мг.

Така сама картина спостерігається і з життєстійкістю риб, яку оцінювали за відсотковою часткою мальків, які залишились до моменту закінчення досліджу. Як видно із табл. 2, у дослідних парах А і С вищим був відсоток виходу у мальків, отриманих із розмороженої сперми, тоді як для пар плідників В і D спостерігалась зворотня картина.

Висновки. Проведені досліді із вивчення впливу кріоконсервації сперми коропа на якість отриманого потомства показали, що різниця за досліджуваними показниками (абсолютні показники росту та відсоток виживання мальків від личинок) між молоддю

коропа, отриманою з використанням нативної та кріоконсервованої сперми, не набувала розміру статистично значимого, принаймні в умовах лабораторного досліджу на першому році життя. Звичайно, це свідчить не про відсутність впливу кріоконсервації сперми плідників на якість отриманої молоді, про те, що або така різниця (якщо вона існує) не є настільки значною, щоб її вдалося показати в умовах конкретного досліджу, або вона проявляється не на першому році вирощування. У такому разі це питання потребує подальших досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературному консервированию спермы карпа. — М.: ВНПО по рыбоводству, 1986. — 11 с.
2. Linhart O., Rodina A.M., Cosson B.J. Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus Carpio*. Vol. 41, Issue 3, November 2000, P. 241–250.
3. Horváth A., Miskolczi E., Mihálffy S. et al. 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*.— Vol. 54, Issue 3, June 2007, P. 251–257.
4. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Трефилов А.Н. Метод криоконсервации спермы рыб — для сохранения геномов и получения жизнестойкого потомства // Сб. тр. конф. — Адлер, 2001. — С. 116–117.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ НА РАЗВИТИЕ МОЛОДИ УКРАИНСКИХ ПОРОД КОРОПА

А.Л. Безусый, В.А. Черепнин, В.В. Бех, Е.Ф. Копейка, С.И. Дрокин

Проведено исследование сравнения скорости роста и процента выхода после периода подращивания между группами молоди карпа, полученной с применением как нативной, так и размороженной криоконсервированной спермы.

STUDYING OF INFLUENCE CRYOPRESERVATION OF SPERM ON DEVELOPMENT YOUNGER OF UKRAINIAN BREEDS CARP

A. Bezusyj, V. Cherepnin, V. Bech, E. Copeika, S. Drokin

During the spent researches growth rate and percent survival after the season on-growing between bunches carp younger received with application both native, and defrost cryopreserved sperms have been compared.