

К



БОГАТЫРЕВА МАРИЯ МИХАЙЛОВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ
СПЕРМЫ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

2

Специальность 03.02.06. – ихтиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Е 693.32

Астрахань 2010

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет» (АГТУ), Учреждении РАН Южный научный центр Российской академии наук (ЮНЦ РАН)

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Пономарева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Ходоревская Раиса Павловна

доктор биологических наук,
профессор

Абросимова Нина Акоповна

Ведущая организация:

ФГУ «Межведомственная ихтиологическая комиссия»

Защита состоится 30 июня 2010 г в 14 часов на заседании диссертационного совета Д. 307.001.05 при Астраханском государственном техническом университете (АГТУ) по адресу: 414025, г. Астрахань, ул. Тагищева, 16

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке АГТУ

Автореферат разослан «29» мая 2010 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

Мелякина Э.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В последние годы в экосистемах водоемов наблюдаются существенные изменения, в результате которых произошло снижение численности осетровых рыб. В связи с этим основным источником формирования и поддержания запасов осетровых стало их искусственное воспроизводство. Однако в настоящее время отмечается снижение масштабов заводского воспроизводства. Одной из причин этого является отсутствие возможности заготовки производителей с высокими рыбоводно-продуктивными показателями.

Возникла необходимость разработки разнообразных подходов использования и сохранения популяционного генофонда производителей естественной генерации для целей искусственного воспроизводства.

Криоконсервация остается одним из наиболее привлекательных и быстро развивающихся направлений сохранения редких исчезающих видов. Наличие в криобанке генетически репрезентативных коллекций геномов рыб и маточных стад на осетровых рыбоводных заводах позволяет с максимальным эффектом сохранить генетическое разнообразие этих ценных промысловых объектов.

В настоящее время разработаны методики криоконсервации половых продуктов рыб, в частности осетровых (Копейка, 1986; Цветкова и др., 1997; Linhart et., 2009). Однако результаты часто невоспроизводимы и не всегда обеспечивают высокий процент выживаемости дефростированных сперматозоидов. Это связано с тем, что на процесс криоконсервации оказывает влияние большое количество факторов: физиологическое состояние производителей, качество половых продуктов, индивидуальные особенности рыб разных популяций, физические факторы и т.д. Кроме того, отрицательное воздействие на клетки оказывает охлаждение, поэтому очень важно подобрать криозащитные среды и криопротекторы. В сложившейся ситуации проблема сохранения генофонда осетровых рыб путем глубокого замораживания является актуальной.

Цель и задачи исследований. Целью работы явилась разработка новых методов криоконсервации половых клеток осетровых рыб для сохранения их генофонда.

Поставленная цель определила следующие задачи:

- исследовать компоненты криосред и подобрать оптимальные протекторы для криоконсервации спермы осетровых видов рыб (русский осетр, севрюга);
- изучить действие электростимуляции на половые клетки осетровых рыб для увеличения проницаемости мембран;
- разработать метод выведения криопротектора из дефростированных половых клеток осетровых рыб;
- усовершенствовать стандартную технологию криоконсервации при введении новых биотехнологических методов;
- установить возможность использования криоконсервированного генетического материала для оплодотворения икры в целях искусственного воспроизводства в лабораторных условиях и на рыбоводных предприятиях.

Научная новизна. Подобран оптимальный состав криосреды, способствующий увеличению выживаемости дефростированных клеток осетровых рыб. Научно обосновано использование метода электростимуляции в процессе криоконсервации для усиления проникновения протекторов внутрь половых клеток

осетровых рыб, определен механизм усиления протекторного действия при воздействии низкочастотным током, установлены оптимальные параметры электрического сигнала. Обосновано использование метода выведения криопротектора из дефростированных половых клеток рыб. Использование новых методов криоконсервации позволило усовершенствовать стандартную биотехнологию сохранения клеточного материала редких и исчезающих видов осетровых рыб. Дефростированный клеточный материал, сохраненный по новой технологии, впервые использован для оплодотворения крупной партии икры русского осетра и получения жизнеспособного потомства.

Практическая значимость. Результаты настоящей работы могут быть использованы для создания криобанков редких и исчезающих видов рыб с целью сохранения их генофонда, для увеличения эффективности процесса криоконсервации репродуктивных клеток осетровых рыб, для повышения выживаемости сперматозоидов после оттаивания. Усовершенствованная технология низкотемпературного консервирования половых клеток может применяться на предприятиях, занимающихся воспроизводством и товарным выращиванием осетровых видов рыб.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Новый криораствор для половых клеток осетровых рыб с оптимальным подбором протекторов.
2. Метод электростимуляции для усиления проникновения криопротекторов через клеточные мембраны.
3. Метод выведения протектора из дефростированных клеток.
4. Усовершенствованная биотехнология криоконсервации половых клеток осетровых рыб.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы докладывались на ежегодных студенческих научных конференциях Астраханского государственного технического университета (АГТУ) в 2005-2006 гг., на ежегодных научных конференциях студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН (Ростов-на-Дону, 2006-2009 гг.), на международной конференции «Состояние и перспективы развития фермерского рыбоводства аридной зоны» (Азов, 2006 г.), на международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных» (Дубровицы, 2007 г.), на 11-й и 12-й Пущинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино 2007-2008 гг.), на международной научно-практической конференции «Инновационные технологии аквакультур» (Ростов-на-Дону, 2009 г.), на VI международном симпозиуме по осетровым: Гармония и взаимоотношения между деятельностью человека и природой: на примере осетровых (Китай, г.Ухань, 2009 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 28 работ, 2 из них из перечня ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, пяти глав, содержащих описание результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов и рекомендаций производству, приложения. Общий объем 126 страниц с 30 рисунками, 11 таблицами, 2 приложениями. Список литературы включает 178 источников, из них 94 иностранных.

Глава I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Изложены данные отечественных и зарубежных авторов по вопросам криоконсервации половых клеток различных видов рыб. Изучены методики сохранения активных сперматозоидов при воздействии низких температур.

Анализ литературных данных показал недостаточный уровень исследований по созданию универсальной технологии криоконсервации для редких и исчезающих видов рыб, в частности осетровых рыб, которая способствует сохранению генетического материала при низких температурах длительное время. В связи с этим возникла необходимость усовершенствовать существующие методики замораживания половых клеток рыб.

Глава II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили с 2005 по 2009 г. в лаборатории аквакультуры и биологических ресурсов Южного научного центра РАН, на базе Астраханского государственного технического университета. Материал собирали на осетровых рыбоводных заводах Севкаспрыбвода в период нерестовой кампании: Александровский, Кизанский, Сергиевский, Житинский, на научной базе ЮНЦ РАН п. Кагальник Ростовской области и в инновационном центре «Биоаквапарк – Научно-технический центр аквакультуры» АГТУ.

Объектом исследований служила сперма русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt et Ratzeburg, 1833) и севрюги (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771). Схема проведения исследований по теме диссертации представлена на рис. 1.

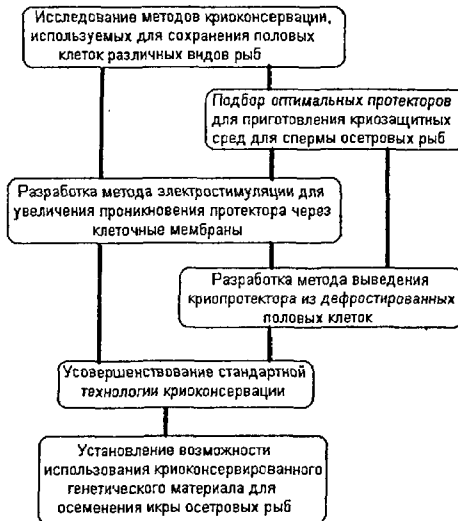


Рис. 1. Схема проведения экспериментов

Использовали классическую схему криоконсервации половых клеток осетровых рыб (Цветкова и др., 1997).

Активность спермы определяли по 5-балльной шкале Г.М. Персова (1953).

Для криоконсервации на начальных этапах (до -20°C) использовали среду Штайна и трис-НСI-буфер, для усиления протекторного эффекта вводили цианокобаламин.

Для глубокой заморозки был использован базовый раствор следующего состава: NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃, HCl.

Составы криопротекторов были следующими:

№ 1: БР – 80%, сахараза – 6,8 г/л, яичный желток -10%, ДМСО – 10%;

№ 2: БР – 80%, сахараза – 3,94 г/л, яичный желток -10%, ДМСО – 10%;

№ 3: БР – 80%, сахараза – 1,71 г/л, маннит – 0,98 г/л, яичный желток – 10%, ДМСО – 10%;

№ 4: БР – 80%, яичный желток – 10%, ДМСО – 10%;

№ 5: среда Г. Штайна (1991) модифицированная;

№ 6: трис-НСI-буфер.

Для усиления действия криопротекторов применяли электрический сигнал. Использовали ступенчатый режим замораживания: $3^{\circ}/\text{мин}$ в течение 4 минут, затем $10^{\circ}/\text{мин}$ в течение 10 минут. После достижения температуры образцов -70°C их помещали в сосуды Дьюара или биологическое хранилище (БХ-300) с жидким азотом на долгосрочное хранение (-196°C). Размораживание спермы проводили на водяной бане при температуре $38-40^{\circ}\text{C}$. Время оттаивания в среднем составляло не более 35-45 с.

Для постановки эксперимента по выведению протектора из клеток в качестве изотонического раствора, был избран физиологический раствор (0,65% NaCl).

Оплодотворение дефростированной спермой икры русского осетра и севрюги в лабораторных условиях проводили в инновационном центре «Биоаквапарк – Научно-технический центр аквакультуры» АГТУ по методу Е.М. Коханской (1980) в чашках Петри. На следующем этапе работ проводили оплодотворение икры русского осетра дефростированной спермой в условиях осетрового рыбодобного завода по стандартной технологии (Иванов, 1988).

Учет вылупившихся предличиннок осуществляли сплошным поштучным методом в контрольной и опытной ячейках аппарата «Осетр». В период подраживания личинок кормление проводили живой дафнией.

Через 10 суток после перехода на активное питание молодь русского осетра в контроле и опыте подвергали биологическому тестированию в «открытом поле» (Тихомиров и др., 1995). В качестве раздражителей применяли высокочастотный, низкочастотный сигнал и воздействие светом.

Опыты проводили в трехкратной повторности, данные подвергали статистической обработке по Г.Ф. Лакину (1973) и Ю.П. Адлер (1969).

В процессе исследований проведено 200 опытов по подбору оптимальных протекторов на начальных этапах замораживания (до -20°C), 500 опытов по подбору оптимальных криопротекторов для глубокого замораживания (до -196°C), 300 экспериментов по воздействию электрическим сигналом на половые клетки осетровых рыб, 100 опытов по выведению протекторов из дефростированного

материала, 10 опытов по оплодотворению икры в лабораторных условиях, оплодотворение икры русского осетра в условиях осетрового рыбоводного завода (187 тыс. шт.), 100 опытов по определению поведения молоди осетровых рыб, полученной с использованием криоконсервированной спермы. В процессе проведения исследований использована сперма от 60 самцов русского осетра (1200 мл), 50 самцов севрюги (1000 мл), икра от 5 самок русского осетра и 5 самок севрюги для постановки эксперимента в лабораторных условиях, икра русского осетра в производственных условиях (3,4 кг) для подрачивания в производственных условиях использована личинка русского осетра – 1000 шт., биологическому тестированию подвергнуто 100 шт. молоди русского осетра

Глава III. ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА КРИОПРОТЕКТОРА ДЛЯ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

В настоящее время в отечественных и зарубежных исследованиях не получены оптимальные результаты криоконсервации половых клеток различных видов рыб для использования их при рыборазведении. Низкая результативность криоконсервации спермы и сложность выявления необходимых физико-химических условий среды для сохранения клеток в жизнеспособном состоянии требует глубокой научной разработки технологических приемов низкотемпературного замораживания в жидком азоте (Савушкина, 2008).

Одной из основных проблем современной криобиологии является подбор оптимальных протекторов. Для пресноводных видов и проходных рыб, нерестащихся в пресной воде, используют солевые среды, близкие по составу к сыворотке крови или семенной плазме. В них включают неорганические соли, буферы, сахара, фосфолипиды, липопротеины, протенины и другие соединения (Цветкова, 1996).

3.1 Использование криопротекторов для краткосрочного хранения спермы

При работе с производителями осетровых рыб в период нереста созревание самцов и самок происходит в разное время. Использование методов криоконсервации для краткосрочного сохранения спермы в искусственных условиях при температуре до -20°C является надежным способом получения половых продуктов в любое удобное время.

Для исследования процесса криоконсервации спермы осетровых рыб в диапазоне температур от 0 до -20°C применяли разработанные криосреды Штайна Г. (1991) и Трис-НСI-буфер (табл. 1).

Результаты исследований показали, что при использовании среды Штайна для криоконсервации половых продуктов с активностью 4 и 5 баллов выживаемость сперматозоидов с поступательным движением составила 34,4 и 63,1% при времени жизни 46,2 и 57,5 с, соответственно. В дефростированной сперме все показатели значительно снизились. В 5-балльной сперме в 1,3-1,8 раза, в 4-балльной в 1,9-3,7.

Показатели качества спермы русского осетра при криоконсервации на начальных этапах замораживания

Показатели	5 баллов		4 балла	
	Активность, %	Время жизни, с	Активность, %	Время жизни, с
Среда Штайна				
Нативная	100	99±0,50	80±0,11	82±0,20
Разбавленная	63,1±0,10*	57,5±0,30*	34,4±0,23**	46,2±0,12**
Дефростированная	46,9±0,12*	31,9±0,22	15,2±0,14**	12,4±0,14**
Трис-НС1-буфер				
Нативная	100	99±0,50	80±0,11	82±0,20
Разбавленная	39,2±0,08*	35±0,12*	12,5±0,15**	25±0,21**
Дефростированная	14,5±0,13*	35,2±0,31	0**	0**

Примечание: *, ** - различия достоверны при $P < 0,01$

Для смягчения осмотического стресса в клетках и предотвращения свободнорадикального окисления в криоаствор (среда Штайна) вводили цианкобаламин (витамин В₁₂) в различной концентрации – I – 0,5 мг/л; II – 1 мг/л; III – 1,5 мг/л (рис. 2).

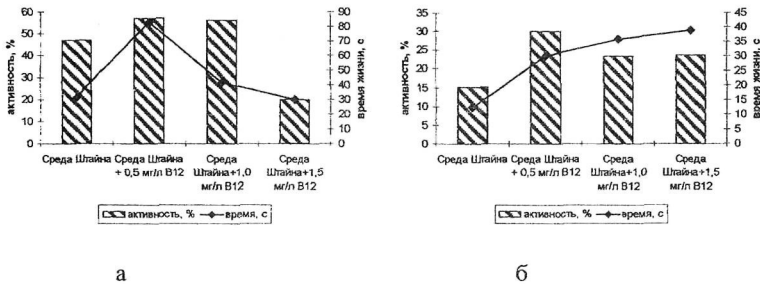


Рис. 2. Влияние цианкобаламина на качество дефростированной спермы русского осетра: а – 5-балльная сперма; б – 4-балльная сперма

Аналогичные результаты получены при проведении исследований на сперме севрюги.

Установлено, что использование цианкобаламина в сочетании со средой Штайна улучшает рыболовные качества дефростированной спермы, что позволяет рекомендовать данный состав для криоконсервации половых клеток осетровых рыб на начальных этапах замораживания.

3.2. Подбор криопротекторов для глубокого замораживания половых клеток в жидком азоте

У спермиев осетровых имеются структурные и метаболические особенности, которые при неблагоприятных условиях (воздействии низких температур) резко меняют их криоустойчивость, поэтому работа с ними затруднительна (Ананьев и др., 1998). Составы криосред, показавшие хорошие результаты на этапе начальной заморозки (-20°C), не оказали необходимого протекторного действия при дальнейшем охлаждении образцов спермы (-196°C).

При оценке качества половых клеток русского осетра и севрюги после эквивибрации по выживаемости и времени жизни не удалось выявить оптимальный протектор в результате нестабильности системы сперма-протектор. Поэтому в дальнейшем проводили сравнение на конечном этапе – после дефростации половых клеток (рис. 3, 4).

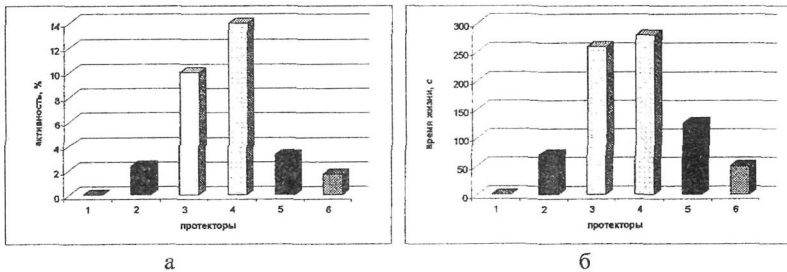


Рис. 3. Действие криопротекторов на сперму русского осетра после оттаивания: а – активность, %; б – время жизни, с

Отмечено, что после дефростации процент подвижных сперматозоидов русского осетра и время их жизни были выше в вариантах с использованием протекторов №№ 4 и 3 ($P < 0,05$), что позволяет использовать эти криосмеси для дальнейших исследований.

Результаты экспериментов на сперме севрюги представлены на рисунке 4.

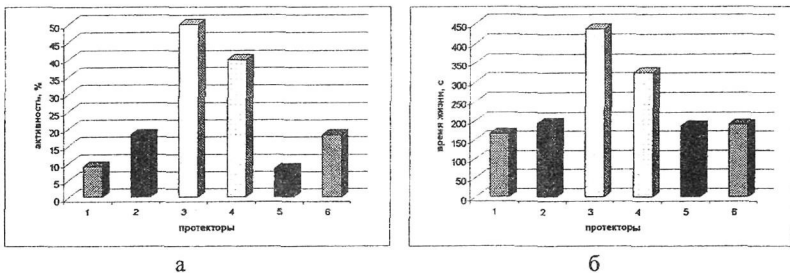


Рис. 4. Действие криопротекторов на сперму севрюги после оттаивания: а – активность, %; б – время жизни, с

Протекторы №3 и №4 оказывают наиболее благоприятное воздействие на выживаемость и время жизни сперматозоидов севриги, что подтверждается статистически ($P < 0,01$).

Температура нереста севриги выше, чем русского осетра, поэтому температура фазового перехода при замораживании у севриги выше, и ее репродуктивные клетки обладают меньшей криорезистентностью. В связи с этим для сохранения целостности половых клеток русского осетра в процессе низкотемпературного консервирования требуется более простой состав криопротектора – желток куриного яйца и ДМСО (протектор № 4), а для спермы севриги необходимо использовать также дополнительные протекторные вещества – маннит в количестве 0,98 г/л и сахарозу в количестве 1,71 г/л (протектор № 3).

Глава IV. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССА КРИОКОНСЕРВАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК ОСЕТРОВЫХ РЫБ

4.1. Исследование метода электростимуляции половых клеток осетровых рыб

Для улучшения проникновения протектора внутрь клеток проводились опыты по воздействию электрическим током на половые клетки осетровых рыб. Установлены оптимальные параметры электрического сигнала, при которых увеличивается выживаемость и время активности сперматозоидов: частота 20 Гц, амплитуда 150 мВ. Еще одной важной характеристикой является время воздействия раздражителем (рис. 5).

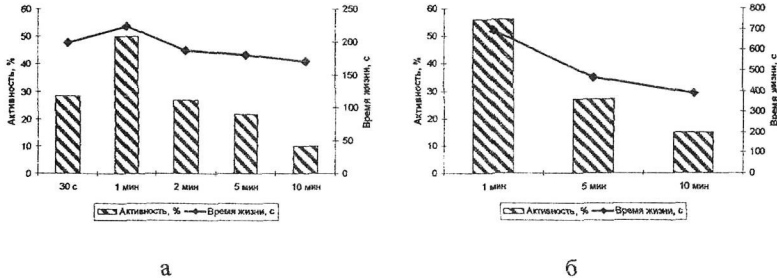


Рис. 5. Показатели качества дефростированной спермы в результате воздействия электрическим током: а – русский осетр; б – севриуга

Дефростированная сперма лучшего качества по обоим показателям получена при воздействии электрическим сигналом в течение 1 минуты, выживаемость сперматозоидов русского осетра составила 50%, время жизни - 290 с, севриги – 56% и 693 с, соответственно.

Исходя из этого, выдвигается гипотеза о том, что электрические раздражители определенных параметров (амплитуда, частота, время экспозиции) способны увеличивать проницаемость мембран спермиев для наиболее полного проникновения в них криопротекторов.

При добавлении протектора к сперме рыб происходит пассивный транспорт его компонентов в клетки. В присутствии электрического поля формируются ион-проводящие каналы, вследствие чего возникает активный транспорт веществ.

При приложении разности потенциалов к мембране происходит ее конформационная перестройка, заканчивающаяся появлением ион-проводящих каналов. Ионные каналы биомембран – специализированные, селективные поры, образованные белковыми молекулами, предназначенные для облегченной диффузии определенных ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-). Ионные каналы расположены в наружной клеточной мембране и мембранах ряда органелл, в частности митохондрий (Артохов, Ковалева, Шмелев, 1994).

Воздействие низкочастотным электрическим сигналом приводит к смене пассивного транспорта веществ через клеточную мембрану на активный транспорт. В результате действия электрическим током происходит расщепление компонентов протектора на ионы: положительно заряженные (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , H^+) и отрицательно заряженные (Cl^- , CO_3^{2-}), которые легко проникают через ион-проводящие каналы. Внутри клетки разноименно заряженные ионы притягиваются и вновь образуют криозащитный раствор, который замещает внутриклеточную жидкость.

Таким образом, происходит накопление протектора внутри клетки, что способствует снижению процесса кристаллизации, предохраняя клетки от разрушения.

4.2. Выведение протектора из репродуктивных клеток после криоконсервации спермы осетровых рыб

Возвращение клеток в изотонический раствор после контакта с гипертоническим раствором часто приводит к разрушению их мембран (постгипертоническому лизису). Поэтому перед возвращением репродуктивных клеток в условия нормальной жизнедеятельности необходимо удалять криопротектор из суспензии (Белоус и др., 1987).

В качестве отмывающего раствора, способного вывести протекторы из половых клеток осетровых рыб, применили физиологический раствор (концентрация 0,65%). Соотношение сперма:отмывающий раствор приняли как 1:1. Установлено, что для выведения протектора из клеток требуется не менее 7 минут, при этом наблюдается увеличение активности и времени жизни сперматозоидов. Результаты представлены на рисунке 6.

По результатам статистической обработки получены достоверные различия по использованию приема выведения протектора после дефростации ($P < 0,01$).

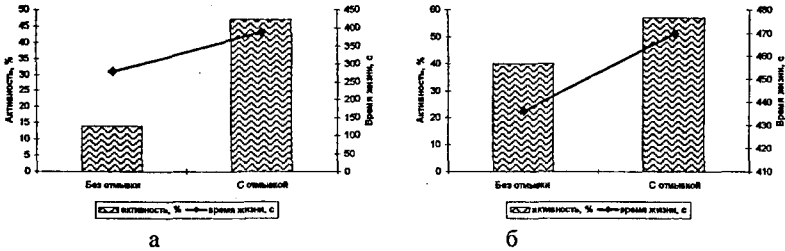


Рис. 6. Качество дефростированной спермы:
а – русский осетр; б- севрюга

Выведение криопротектора из половых клеток после дефростации оказывает положительное воздействие на качество биологического материала. Так, активность спермиев увеличивается в 3,4 раза для русского осетра и в 1,4 раза для севрюги, время жизни увеличивается в 1,4 раза у русского осетра и в 1,1 раза у севрюги.

4.3. Определение оптимальных параметров усовершенствованной схемы криоконсервации половых клеток осетровых рыб

Заключительным этапом при проведении исследований по усовершенствованию процесса низкотемпературного консервирования репродуктивного материала было выявление эффекта от использования двух новых приемов в одной технологической схеме. Результаты представлены на рисунке 7.

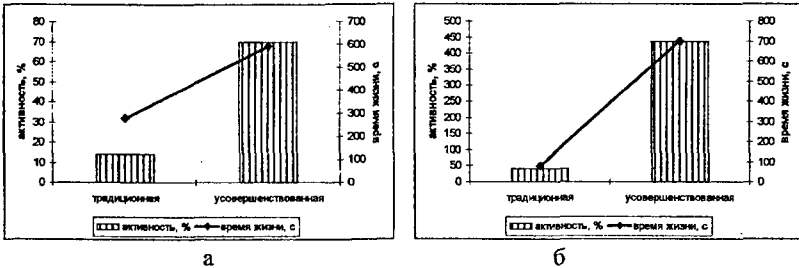


Рис. 7. Сравнение двух схем процесса криоконсервации:
а – русский осетр; б - севрюга

Каждое из новых звеньев процесса криоконсервации способствует улучшению качества спермы, однако применение их в совокупности дает наилучший эффект (табл. 2).

Изменение репродуктивных качеств дефростированной спермы
при использовании разных методов в процессе криоконсервации

Методы криоконсервации	Русский осетр		Севрюга	
	Активность, %	Время жизни, с	Активность, %	Время жизни, с
Применение оптимальных протекторов	14±0,29*	280±1,97**	40±0,15*	436±2,05**
Электростимуляция	50±0,10*	290±2,80**	56±0,11*	693±3,30**
Выведение протектора	47±0,21*	390±2,40**	57±0,25*	470±2,10**
Электростимуляция + выведение протектора	70±0,52*	593,3±2,94**	77±0,36*	700±2,43**

Примечание: *,** - различия достоверны при $P < 0,01$

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения электростимуляции половых клеток перед эквilibрацией и выведения протекторов из дефростированных клеток. Выживаемость спермиев после оттаивания составляет по усовершенствованной схеме 70-80%, в то время как по традиционной – 50%. Криоконсервированная сперма такого высокого качества может использоваться в рыбоводном процессе наравне с нативной.

Глава V. РЕЗУЛЬТАТЫ ОСЕМЕНЕНИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК ОСЕТРОВЫХ РЫБ ДЕФРОСТИРОВАННОЙ СПЕРМОЙ

Осеменение дефростированной спермой – завершающий этап, свидетельствующий об успешном проведении всех операций по замораживанию, хранению и оттаиванию криоконсервированного материала.

5.1. Оплодотворение икры дефростированной спермой в лабораторных условиях

При проведении экспериментов в лабораторных условиях были получены достаточные высокие результаты. Так, при осеменении икры дефростированной спермой оплодотворение составило 80-96% у русского осетра и 64-84% у севрюги. Оплодотворение тех же партий икры на осетровом рыбоводном заводе составило 75-80%. Полученные результаты свидетельствуют о высоком качестве криоконсервированной спермы.

5.2. Оплодотворение икры дефростированной спермой в условиях осетрового рыбоводного завода

При проведении аналогичных экспериментов в условиях рыбоводного предприятия на больших партиях икры возникает ряд затруднений, вследствие чего оплодотворяющая способность дефростированной спермы остается пока на низком уровне.

Для проведения эксперимента взяли самку русского осетра массой 17 кг, длина составила 115/133 см, рабочая плодовитость 187000 шт. икринок, масса икры 3,4 кг. Половину икры (1,7 кг) оплодотворили нативной спермой (активность 95%, время жизни 320 с) из расчета 10 мл на 1 кг икры – 17 мл. Вторую часть (1,7 кг) оплодотворили дефростированной спермой (активность 40%, время жизни 280 с). Так как при проведении криоконсервации и подготовительных работ к процессу оплодотворения разбавление спермы происходит в 4 раза, дефростированной спермы было взято из расчета 40 мл на 1 кг икры – 68 мл.

Процент оплодотворения в контрольной партии икры составил 90%, а в опытной партии – 30%. Процесс инкубации продолжался 5 суток, при температуре воды 14,5-18,5°C. Развитие икры в обеих партиях не отличалось от нормы.

Вылупление предличинок в контрольной партии началось на три часа раньше, чем в опытной, и составило 75% и 20% от заложенной на инкубацию икры, соответственно. Низкий процент выхода предличинок от икры в опыте связан с невысоким процентом оплодотворения.

На пятые сутки после вылупления предличинка начала переходить на смешанное питание живым кормом (дафнией). В этот период наблюдали незначительный отход, который составил 2,8% в контроле и 9,8% в опыте. Морфометрические показатели представлены в таблице 3.

Таблица 3

Морфометрические показатели предличинок русского осетра

Показатели	Массовый выклев		Переход на смешанное питание	
	контроль	опыт	контроль	опыт
масса, мг	15,32±1,03	15,60±0,82	27,6±1,26	30,4±6,2
длина, мм	10,50±0,25	10,58±0,16	16,07±0,94	16,59±1,13
длина желт. мешка, мм	3,78±0,07	3,71±0,10	2,83±0,24*	3,29±0,38*
высота желт. мешка, мм	2,66±0,14	2,68±0,14	2,48±0,23	2,77±0,30

Примечание: * - различия достоверны при $P < 0,05$

За период выдерживания предличинки исследуемых партий незначительно отличались по морфометрическим показателям. Достоверные различия отмечены лишь в длине желточного мешка, что может указывать на большее содержание питательных веществ у группы личинок в опыте в конце периода выдерживания.

После перехода на активное питание в период подращивания в течение 10 суток отход составил в контроле 6,6%, в опыте – 8,4%.

5.3. Поведенческие реакции молоди русского осетра, полученной из нативной и криоконсервированной спермы

Сравнение изменений двигательной активности молоди русского осетра в ответ на различного рода раздражители, выращенной из нативной и дефростированной спермы, является одним из основных показателей пригодности технологии криоконсервации для использования в аквакультуре.

Наиболее адекватным показателем реактивности молоди на раздражители является методика «открытое поле» (Никонов, Витивицкая, 1993), с помощью которой регистрируют реактивность ЦНС и, следовательно, готовность молоди к жизни в естественных водоемах.

Результаты биологического тестирования молоди русского осетра, полученной с использованием нативной и дефростированной спермы, представлены на рисунке 8.

Установлено, что между партиями в контроле и в опыте нет достоверных различий ни в одном тесте.

Молодь, полученная из криоконсервированной спермы, после длительного хранения в жидком азоте, не отличалась по реактивности ЦНС от контрольной партии. Вместе с тем динамика двигательной активности демонстрировала более интенсивную реакцию молоди в опыте на раздражители, что является важным при выпуске молоди в естественные водоемы.

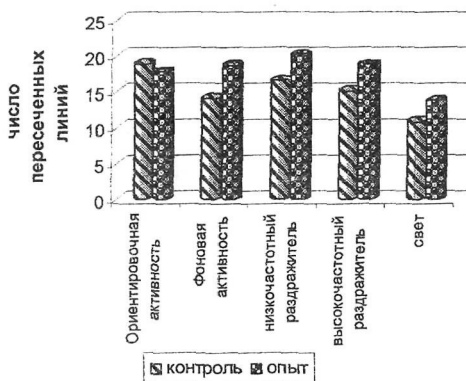


Рис. 8. Изменение двигательной активности молоди русского осетра в тесте «открытое поле»

Установлено, что между партиями в контроле и в опыте нет достоверных различий ни в одном тесте.

Молодь, полученная из криоконсервированной спермы, после длительного хранения в жидком азоте, не отличалась по реактивности ЦНС от контрольной партии. Вместе с тем динамика двигательной активности демонстрировала более интенсивную реакцию молоди в опыте на раздражители, что является важным при выпуске молоди в естественные водоемы.

Таким образом, применение криоконсервированной спермы по усовершенствованной технологии не оказывает негативного влияния на качество потомства и может применяться на рыбоводных предприятиях в условиях дефицита производителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения научных исследований по оптимизации методов криоконсервации половых клеток осетровых видов рыб были введены новые звенья в биотехнологию замораживания и длительного хранения биологического материала. Разработаны новые методы низкотемпературного консервирования спермы осетровых рыб, которые дают стабильные результаты и способствуют сохранению репродуктивных качеств половых клеток на высоком уровне.

Подобраны криосреды, предохраняющие от разрушений клетки на начальных этапах замораживания и во время краткосрочного хранения при температурах до -20°C , обеспечивающие выживаемость спермиев до 50% после дефростации.

При проведении исследований процесса глубокого замораживания и долгосрочного хранения при температуре -196°C подобраны оптимальные криопротекторы для русского осетра и севрюги. Установлено, что больший процент выживших активных спермиев русского осетра наблюдается при использовании в качестве протектора состава №4, а для севрюги – состава №3, что подтвердило гипотезу о видоспецифичности криосред и протекторов.

Установлено, что при использовании электростимуляции на этапе эквilibрации увеличивается проницаемость мембран, и криопротекторы, проникая внутрь клеток, предохраняют их от повреждений в процессе замораживания. Выживаемость сперматозоидов с применением электростимуляции после дефростации увеличивается по сравнению со спермой, замороженной по традиционной методике, в 1,5 раза.

При дефростации образцов спермы наблюдается разрушение мембран клеток вследствие постгипертонического лизиса. Для предотвращения данного явления в качестве отмывающего раствора использовали физиологический раствор (0,65% раствор NaCl). При этом выживаемость дефростированных половых клеток увеличилась в 1,4 раза для русского осетра и в 1,6 раза для севрюги, время жизни - в 1,5 раза у русского осетра и в 1,1 раза у севрюги.

В результате усовершенствования технологии криоконсервации половых клеток осетровых рыб удалось повысить выживаемость дефростированных спермиев до 70-80%, что значительно превышает выживаемость при использовании существующей технологии – 50%.

Проведение опытов по использованию криоконсервированного материала

для искусственного оплодотворения икры в лабораторных и заводских условиях подтвердило эффективность разработанных методов. В лабораторных испытаниях получена высокая степень оплодотворения — до 90%. При испытаниях на больших партиях икры в условиях рыбоводного завода получено оплодотворение дефростированной спермой 30% от контроля, которым служила нативная сперма, выход предличинки от икры составил 27% от контроля. Отмечено, что дефростированный генетический материал не оказывает негативного влияния на развитие осетровых рыб в раннем онтогенезе.

При проведении биологического тестирования молоди русского осетра методом «открытое поле» не выявлено достоверных различий в поведенческих реакциях на раздражители в контроле и опыте, что указывает на нормальное развитие центральной нервной системы молоди в опыте.

Усовершенствованная схема криоконсервации для сохранения генофонда осетровых рыб может быть использована для создания криобанков. Наличие в криобанках спермы высокого качества позволит использовать ее для искусственного воспроизводства осетровых рыб на рыбоводных предприятиях в условиях дефицита производителей.

ВЫВОДЫ

1. В результате исследований подобраны протекторы и оптимальный состав криосред, способствующий сохранению половых клеток в процессе низкотемпературного консервирования. Установлена видоспецифичность в подборе протекторов для спермы осетровых рыб.

2. Использование цианокобаламина (витамина В₁₂) в сочетании со средой Штайна на начальных этапах замораживания позволяет сохранить живые клетки осетровых рыб до 57%, что на 10% выше по сравнению с чистой средой Штайна.

3. Установлено увеличение показателей жизнеспособности дефростированных спермиев русского осетра при введении в криораствор протектора № 4 (БР — 80%, яичный желток — 10%, ДМСО — 10%), севриги — протектора № 3 (БР — 80%, сахара — 1,71 г/л, маннит — 0,98 г/л, яичный желток — 10%, ДМСО — 10%). При этом активность спермиев русского осетра составила 14%, время жизни — 270 с, севриги — 50% и 430 с, соответственно.

4. Установлено, что при воздействии электрическим сигналом прямоугольной формы частотой 20 Гц, амплитудой сигнала 150 мВ на этапе эквilibрации увеличивается проникновение протектора в клетки. При воздействии электрическим сигналом в течение 1 минуты выживаемость дефростированной спермы русского осетра составляет 50%, время жизни 290 с, севриги — 60% и 680 с, соответственно.

5. Показано, что выведение протектора из половых клеток после дефростации с использованием физиологического раствора оказывает положительное воздействие на качество биологического материала, при этом активность спермиев осетровых рыб увеличивается в 1,6 раза, время жизни в 1,5 раза.

6. Введение двух новых звеньев (электростимуляция и выведение протектора из дефростированных половых клеток) в процесс криоконсервации позволило усовершенствовать классическую биотехнологию замораживания и длительного хранения спермы осетровых рыб в жидком азоте и повысить выживаемость

спермиев в 1,5 раза.

7. Глубокое замораживание спермы осетровых рыб и хранение ее в жидком азоте при температуре -196°C в течение 2-х лет не оказывает негативного влияния на качество дефростированных клеток и их оплодотворяющую способность. При осеменении икры дефростированной спермой оплодотворение в лабораторных условиях у русского осетра составило 80-96%, в заводских условиях – 30%, выход личинок составил 20%.

8. Оценка поведенческих реакций молоди, полученной из криоконсервированной спермы, замороженной по новой технологической схеме, выявила различия в двигательной активности и не показала различий по реактивности ЦНС от контрольной партии ($P > 0,05$), что подтверждает физиологическую полноценность молоди, полученной от дефростированной спермы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для замораживания на начальных этапах и краткосрочного хранения спермы при температуре до -20°C рекомендуется использовать среду Штайна в сочетании с цианокобаламином в концентрации 0,5 мг/л.

2. Для глубокой заморозки и длительного хранения спермы осетровых рыб при температуре -196°C целесообразно использовать криорастворы следующего состава: № 4 для русского осетра (БР – 80%, яичный желток – 10%, ДМСО – 10%), № 3 для севрюги (БР – 80%, сахара – 1,71 г/л, маннит – 0,98 г/л, яичный желток – 10%, ДМСО – 10%).

3. Для увеличения проницаемости мембран половых клеток необходимо проводить электростимуляцию спермы прямоугольным электрическим сигналом частотой 20 Гц, амплитудой 150 мВ в течение 1 минуты.

4. При оттаивании образцов спермы и возвращении клеток в нормальные условия жизнедеятельности необходимо постепенное выведение криопротекторов в отмывающем растворе – 0,65% раствор NaCl.

5. Для получения стабильных результатов по выживаемости сперматозоидов после дефростации необходимо проводить криоконсервацию половых клеток осетровых рыб по усовершенствованной схеме.

6. Для оплодотворения яйцеклеток спермой, криоконсервированной по усовершенствованной технологии, рекомендуется использовать половые клетки высокого репродуктивного качества.

По теме диссертации опубликованы следующие работы

Публикации в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК РФ

1. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Антонова Н.А., Осипова В.П. Оптимизация процесса криоконсервации спермы осетровых рыб при использовании различных сред // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Т. 11, № 1(2). 2009. – С. 132-134.

2. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Тихомиров А.М. Повышение выживаемости половых клеток в процессе криоконсервации с использованием электростимуляции // Доклады академии наук, 2010. Т. 431, № 2. – С. 264-265.

1. Пономарева Е.Н., Сорокина М.Н., Храмова А.В., Богатырева М.М., Гаврилкин А.В. Подбор криопротекторов и оптимизация режимов охлаждения спермы русского осетра при криоконсервации. // Вестник КБГУ. Биологические науки. – Нальчик: Каб-Балк. ун-т, 2006. – С. 66-69.
2. Букин В.Г., Пономарева Е.Н., Богатырева М.М. Сохранение популяционного генофонда производителей осетровых рыб естественной генерации методами криоконсервации // Современные проблемы аридных и семиаридных экосистем юга России: Сборник научных статей/ Отв. ред. Г.Г. Матишов. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. – С. 563-572.
3. Ponomareva E.N., Bukin V.G., Bogatyreva M.M. Cryotechnologies of preservation of a genofund of sturgeon fishes. Science and Technology: International journal of scientific articles/ Association of universities of Pre-Caspian States. – Атырау: Атырау institute of oil and gas, 2006. – Issue.4. – P. 94-96.
4. Пономарева Е.Н., Тихомиров А.М., Богатырева М.М., Болонина Н.В. Результаты оплодотворения икры русского осетра и сеuryги дефростированной спермой. / Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных // Материалы международной научно-практической конференции. – Дубровицы: ВНИИЖ, 2007. – С. 478-480.
5. Тихомиров А.М., Богатырева М.М., Джаригазов Е.С. Влияние скоростей замораживания и оттаивания на качество спермы русского осетра. / «Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК» (2007, Москва). Международная научно-практическая конференция, 17-19 декабря 2007 г.: материалы и доклады/ ГНУ ВНИИР Россельхозакадемии. – М.: Изд-во Россельхозакадемии, 2007. – С. 308-310.
6. Тихомиров А.М., Богатырева М.М., Джаригазов Е.С. Влияние объемов, режимов замораживания и оттаивания на качество спермы русского осетра при криоконсервации. / «Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК» (2007, Москва). Международная научно-практическая конференция, 17-19 декабря 2007 г.: материалы и доклады/ ГНУ ВНИИР Россельхозакадемии. – М.: Изд-во Россельхозакадемии, 2007. – С. 311-313.
7. Богатырева М.М., Болонина Н.В., Пономарева Е.Н., Тихомиров А.М. Результаты хранения образцов спермы сеuryги // Вестник АГТУ. Рыбное хозяйство, 3 (44)/2008 (май-июнь). Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. – С. 22-25.
8. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Болонина Н.В., Лапухин Ю.А. Сохранение репродуктивных качеств спермы стерляди методами криоконсервации // Биотехнологические процессы и продукты переработки биоресурсов водных и наземных экосистем: Мат. I междунар. научно-практ. конф., посвященной 450-летию г. Астрахани (30 сентября – 3 октября 2008 г.). Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. – С. 33-35.
9. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Болонина Н.В., Тихомиров А.М. Повышение эффективности криоконсервации половых клеток сеuryги с помощью электростимуляции // Вестник АГТУ. Рыбное хозяйство, 1/2009. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2009. – С. 100-103.

10. Bogatyreva M.M., Ponomareva E.N. New methods of cryopreservation for conservation of the gene pool of sturgeon fishes // Book of abstracts of 6-th International symposium on Sturgeon: Harmonizing the relationships between Human activities and nature: the case of sturgeons (October 25-31, 2009 Wuhan, Hubei Province, China). Wuhan, 2009. – PP. 43-45.

11. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Тихомиров А.М., Джаригазов Е.С. Роль криобанка репродуктивного материала гидробионтов для поддержания биологического разнообразия и развития морских территорий: препринт-рекомендации. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2009. – 44 с.

12. Матишов Г.Г., Абраменко М.И., Балыкин П.А., Безгачина Т.В., Богатырева М.М., Григорьев В.А., Казарникова А.В., Каменцева О.М., Ковалева А.В., Коваленко М.В., Корчунов А.А., Лапухин Ю.А., Лужняк В.А., Павлович Г.М., Пономарева Е.Н., Старцев А.В., Стрижакова Т.В., Тихомиров А.М., Шестаковская Е.В. Ихтиофауна Азово-Донского и Волго-Каспийского бассейнов и методы ее сохранения / Под общей редакцией Г.Г. Матишова. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2009. – 272 с.