

МЕТОД КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ – ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ

О.Б. Докина, Л.И. Цветкова, Н.Д. Пронина, В.А. Миленко

ФГУП “Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства”, п. Рыбное, Дмитровского района, Московской области,
141821, Россия, E-mail: vniprh@mail.ru

Одним из перспективных путей сохранения генетического разнообразия рыб не только редких и исчезающих видов, но и объектов аквакультуры, признана криоконсервация спермы. Сформированные в криобанках коллекции геномов позволят наиболее полно сохранять наследственный потенциал и поддерживать генетическую гетерогенность видов, создавать страховые фонды спермы, получать потомство при отсутствии зрелых самцов, осуществлять обмен замороженным материалом между рыборазводными хозяйствами, использовать криоконсервированную сперму для научных, селекционных и промышленных целей.

Однако широкому применению замороженной спермы, в частности осетровых рыб, препятствует недостаточная эффективность существующих методов криоконсервации, что выражается в довольно низкой выживаемости и оплодотворяющей способности сперматозоидов. В обзоре публикаций по криоконсервированию спермы осетровых рыб за 1990-е годы и начало 2000-х годов, проведенному Р. Биллардом и коллегами /1/, сообщалось, что в среднем по приводимым разными авторами данным уровень оплодотворения икры криоконсервированной спермой составляет 20%. Для успешной криоконсервации спермы необходима разработка видоспецифичных технологий глубокого замораживания, но это потребует проведения большого количества экспериментов для каждого вида рыб.

За последние три года лабораторией криобиологии ВНИИПРХ разработан унифицированный метод криоконсервации спермы, пригодный для разных видов осетровых рыб. В результате проведенных исследований были установлены состав унифицированной криозащитной среды и основные технологические приемы криоконсервации, применение которых обеспечивает сохранение приемлемого уровня оплодотворяющей способности размороженных клеток (в пределах 40-80% в зависимости от качества нативной спермы) (табл. 1).

Замораживание спермы, разбавленной в необходимом соотношении криозащитной средой, осуществляется в хлорвиниловых пробирках в парах жидкого азота по трехэтапной программе (вначале со скоростью 2-5 °С/мин, затем - 10-20 °С/мин с последующим погружением в жидкий азот).

Немедленно после размораживания пробирок в водяной бане криоконсервированная сперма разбавляется активирующим раствором и используется для осеменения икры.

Таблица 1. Качество образцов криоконсервированной спермы осетровых рыб, заложённых на хранение в криобанк *

Год закладки образцов	Вид рыбы	Подвижность размороженной спермы, %	Оплодотворение икры		
			% оплодотворения	% от контроля	
2003	Ленский осетр	20	55,2	-	
		40	62,7	-	
	Русский осетр	10	38,3	-	
		30	46,3	-	
		-	78,0	97,6	
		40	59,0	-	
	Белуга	80	43,3	-	
		60	50,7	-	
		60	53,8	-	
		10	64,2	-	
2004	Байкальский осетр	3	47,1	-	
		15	59,0	-	
		30	57,5	79,5	
	Ленский осетр	30	63,7	88,1	
		15	69,9	> 100	
		40	64,0	92,3	
		30	51,6	76,7	
		15	42,9	-	
		30	44,6	-	
	Стерлядь	10	64,6	-	
		10	44,9	73,5	
	Белуга	40	53,8	96,8	
		30	59,8	> 100	
		20	68,7	> 100	
		30	92,3	> 100	
		10	44,8	61,5	
2005	Ленский осетр	10	77,9	95,6	
		20	63,5	87,1	
		20	59,8	70,0	
		40	66,4	77,8	
		30	72,3	97,4	
		40	73,3	98,9	
		Обский осетр	10	72,6	89,0
			60	50,8	98,3
	Русский осетр	40	53,5	> 100	
		30	53,8	> 100	
		40	62,3	> 100	

* В 2003 и 2004 гг. сперма замораживалась в средах, близких по составу к унифицированной среде, поскольку криоконсервация образцов для криобанка осуществлялась одновременно с исследованием экспериментальных сред.

Особое внимание при разработке метода уделялось оптимизации качественного и количественного состава протективной среды как важнейшего фактора обеспечения защиты сперматозоидов от повреждающего действия низких температур.

Подбор компонентов среды и определение их содержания проводились с учетом данных по химическому составу спермы, семенной плазмы и полостной жидкости самок. В ходе работ во время нерестовых сезонов 2003-2005 гг. было испытано более 200 экспериментальных сред, из которых была выявлена наиболее эффективная среда, стабильно обеспечивавшая криозащиту сперматозоидов разных видов осетровых рыб и поэтому применявшаяся для замораживания генетического материала, предназначенного для долгосрочного хранения в криобанке ВНИИПРХ.

При использовании многих экспериментальных сред оплодотворение икры криоконсервированной спермой достигало более 80-90%. В табл. 1 приводятся лишь результаты проверок качества образцов спермы перед закладкой в криобанк. Повторные ежегодные проверки показывают, что хранение в течение 1-14 лет практически не снижает оплодотворяющую способность замороженных клеток. Результаты по оплодотворению икры и выклеву личинок, как правило, оказывались близкими по значению. Очевидно, процедуру криоконсервации выдерживают клетки с высокой жизнеспособностью, поэтому для оценки действия экспериментальных сред достаточно учета процента оплодотворения икры.

В целом, полученные результаты указывали на достаточно высокие для спермы осетровых рыб протективные свойства унифицированной криозащитной среды и хорошую воспроизводимость результатов ее испытаний в пределах каждого опыта. Довольно большой разброс в этих результатах между опытами (от 40 до 80% оплодотворения) определенно связан с разным качеством половых продуктов (при точном соблюдении технологии замораживания-оттаивания и одинаковых условиях осеменения и инкубации икры).

Первые результаты проверки эффективности разработанного метода криоконсервации спермы осетровых рыб в производственных условиях показали возможность сохранения оплодотворения икры размороженной спермой на том же уровне, что и в лабораторных испытаниях (табл. 2).

Таблица 2. Результаты осеменения икры криоконсервированной спермой осетровых рыб в промышленных условиях

Год консервации спермы	Вид рыбы	Количество икры, г	Объем спермы, мл	Объем активатора, мл	Разбавление спермы активатором	Оплодотворение икры	
						% оплодотворения	% от контроля
2003	Белуга	100	7,5	750	1:100	48,8	-
2004	Сибирский осетр (смесь спермы самцов разных популяций)	100	1,5	150	1:100	16,5	24,4
			3	300	1:100	48,3	71,6
			4,5	300	1:70	21,0	31,1
	Ленский осетр	100	3	300	1:100	50,0	95,1
6			300	1:50	69,1	> 100	
2005	Ленский осетр (смесь спермы)	300	9	900	1:100	58,0	98,3
			13,5	1350	1:100	58,7	> 100
			18	1800	1:100	75,2	> 100

Однако технология осеменения больших порций икры требует дальнейшего совершенствования, в частности подбора оптимальных объемов спермы и активатора для разных количеств икры.

В целом изложенные результаты позволяют надеяться, что разработанный метод криоконсервации спермы осетровых рыб может успешно применяться как для сохранения генофонда (их естественных популяций), так и для решения задач аквакультуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Billard R., Cosson J., Noveiri S.B., Pourkazemi M.* Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review // *Aquaculture*. - 2004. - V. 236. -P. 1-9.