

Ключевые слова:
криоконсервация,
криобанк, криопротектор,
карповые рыбы

Keywords:
cryopreservation, cryobank,
cryoprotectant, cyprinid fishes

Оптимизированные технологии крупномасштабной криоконсервации спермы карповых рыб

DOI

Кандидат химических наук

О.Б. Докина – ведущий научный сотрудник;

кандидат сельскохозяйственных наук – **К.В. Ковалев** – заведующий лабораторией;

Н.Д. Пронина – главный специалист;

В.А. Миленко – специалист; Лаборатория криобиологии Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»);

В.Н. Коваленко – доцент кафедры «Технология продуктов питания и холодильная техника» Дмитровского рыбохозяйственного технологического института (филиал) ФГБОУ ВО «АГТУ»

@ olgadokina@mail.ru;
silur5@mail.ru;
proninatasha@rambler.ru

OPTIMIZED TECHNOLOGIES FOR LARGE-SCALE CRYOPRESERVATION OF CYPRINIDS SPERM

Candidate of Chemical Sciences **O.B. Dokina** – Leading Researcher;

Candidate of Agricultural Sciences - **K.V. Kovalev** – Head of the laboratory;
N.D. Pronina – Chief Specialist;

V.A. Milenko – Specialist;

Laboratory of Cryobiology of the Freshwater Fisheries Branch of the *VNIRO Federal State Budgetary Institution ("VNIIPRH")*;

V.N. Kovalenko – Associate Professor of the Department of Food Technology and Refrigeration Technology of the *Dmitrov Fisheries Technological Institute (branch) of the AGTU*

The need for optimization of technologies of fish sperm cryopreservation is conditioned by instability of fresh sperm quality. Presented protocols of cyprinids sperm cryopreservation have been optimized following the results of experiments carried out on varied-quality biomaterial. These protocols ensure with high effectiveness both freezing big volumes of sperm under laboratory and field conditions. Effectiveness of the protocol with two-stage freezing regime in addition has been confirmed by results of cryopreservation of cyprinids sperm samples for addition to the collection of low-temperature gene bank of VNIIPRKH for the last four years.

ВВЕДЕНИЕ

Криотехнологии, получившие широкое распространение во всем мире, стали незаменимым инструментом для сохранения и восстановления генетического разнообразия видов.

В самом крупном в России низкотемпературном генетическом банке Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») разработаны

и успешно применяются высокоэффективные технологии криоконсервации спермы осетровых и карповых рыб, которые, в случае использования половых продуктов высокого качества, обеспечивают сохранение оплодотворяющей способности замороженной спермы на уровне нативной [1]. Образцы криоконсервированной спермы из коллекции криобанка часто используются в рыбохозяйственной

практике для получения потомства в отсутствие зрелых самцов, восстановления редких и исчезающих видов, получения промышленных гибридов, в других селекционных исследованиях.

Тем не менее, потребность в оптимизации технологий криоконсервации спермы рыб остается актуальной в связи с непостоянством качества используемой нативной спермы, обусловленным влиянием окружающей среды и условий содержания производителей на процесс сперматогенеза.

Данная работа является продолжением ранее проведенного исследования, публикация результатов которого содержала также краткую историю разработки и детальный обзор способов криоконсервации спермы карповых рыб, применяемых в мировой практике в последние два десятилетия [2].

Представляемые протоколы криоконсервации спермы карповых рыб, оптимизированные на основании результатов экспериментов, проведенных на материале разного качества, обеспечивают с высокой эффективностью как замораживание больших объемов спермы в лабораторных и полевых условиях, так и быстрый сбор образцов в условиях экспедиции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сперму и икру карповых рыб, выращенных в опытном селекционно-племенном хозяйстве «Якоть» «ВНИИПРХ», получали в соответствии с действующими нормативами [3]. Объектами исследования были: сперма и икра сазана амурского, сазана волжского, карпа линейного, карпа московского чешуйчатого, карпа московского разбросанного, карпа загорского чешуйчатого.

Транспортировка половых продуктов осуществлялась при температуре 1-5°C в термосумке с хладоэлементами. Качество нативной спермы, после ее активации технологической водой, оценивалось по подвижности, определяемой под микроскопом (Микромед-3 LED M, Микромед, Россия) при увеличении в 300-400 раз по процентному отношению клеток с прямолинейно поступательным движением к общему количеству клеток в поле зрения. В экспериментах использовались образцы спермы с подвижностью от 50 до 100%.

Перед криоконсервацией, охлажденная до 10-12°C, сперма разбавлялась охлажденной до той же температуры экспериментальной криозащитной средой в объемном отношении 1:1 или 1:2. Среда добавлялась к сперме по каплям при непрерывном перемешивании. Полученная суспензия (сперма+криозащитная среда) разливалась в криопробирки объемом 1,5 мл, которые сразу или после эквilibрации в течение 0-70 минут устанавливались вертикально на диск из фольгированного гетинакса с отверстиями для пробирок, снабженный датчиком (АТТ-2006, Актаком, Россия), регистрирующим температуру спермы в пробир-

Потребность в оптимизации технологий криоконсервации спермы рыб обусловлена непостоянством качества используемой нативной спермы. Представленные протоколы криоконсервации спермы карповых рыб, оптимизированные на основании результатов экспериментов, проведенных на биоматериале разного качества, обеспечивают с высокой эффективностью замораживание больших объемов спермы как в лабораторных, так и полевых условиях. Эффективность протокола с двухэтапным режимом замораживания дополнительно подтверждена результатами криоконсервации образцов спермы карповых рыб для пополнения коллекции низкотемпературного генетического банка ВНИИПРХ в течение последних четырех лет.

ке. Сперма карповых рыб замораживалась в парах жидкого азота (LN₂) при постепенном погружении диска в криогенную ёмкость с LN₂ по следующей программе: I этап: от +10 до -15°C со скоростью 1-2°C/мин; II этап: от -15 до -196°C с плавно увеличивающейся скоростью до 15-20°C/мин. В упрощенном протоколе криоконсервации замораживание криопробирок с разбавленной спермой осуществлялось в парах LN₂ на полистироловой рамке с прикрепленной к ней фольгой («плотике»), плавающим на поверхности LN₂ в полистироловом ящике, в течение 10-25 минут. После хранения в LN₂ в течение 0,5-3 ч, размораживание пробирок с криоконсервированной спермой проводилось в водном термостате (BIO WB-4Ms, BIOSAN, Латвия) при температурах 30-50°C в течение 45-75 секунд.

Оценка эффективности использованных экспериментальных криозащитных сред и технологических параметров протоколов проводилась путем определения подвижности и оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы. Подвижность оттаявшей спермы, после ее активации 0,1%-ным раствором гидрокарбоната натрия (сода), определялась таким же образом, как подвижность нативной спермы. Оплодотворение икры в лабораторных условиях осуществлялось на чашках Петри в трехкратной повторности. Размороженная сперма, разбавленная активатором в объемном отношении 1:100 (одна пробирка, содержащая 1,5 мл суспензии, т.е. 0,75 мл спермы, на 75 мл активирующего раствора), выливалась на икру (100-150 шт.) при одновременном рассеивании икры колонковой кисточкой по дну чашки. Через 1 мин. икра промывалась водой и помещалась в термостат (MIR-254, SANYO, Япония) для инкубации при температуре 20°C. Процент оплодотворения определялся на стадии гастрюлы. Контролем при оплодотворении служила нативная сперма.

Для приготовления криозащитных сред использовались следующие реактивы: сахароза

(SIGMA, США), α -D-глюкоза (SERVA, Германия), инозитол (ACROS ORGANICS, США), метанол (ВЕКТОН, Россия), этиленгликоль, хлорид натрия, хлорид калия (ЛАВЕРНА, Россия).

Расчет доверительных интервалов для средних значений процента развития оплодотворенной икры, при уровне значимости 5%, проводился с помощью надстройки статистического анализа данных MS Excel «Анализ данных».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В любой технологии криоконсервирования ключевую роль, в обеспечении сохранения жизнеспособности и оплодотворяющей способности клеток, играет состав используемой криозащитной среды. Поэтому оптимизация протокола криоконсервации спермы карповых рыб, применяемого нами в последние пять лет [1], предполагала вначале выявление наиболее эффективного состава и концентраций компонентов, разработанной ранее, сре-

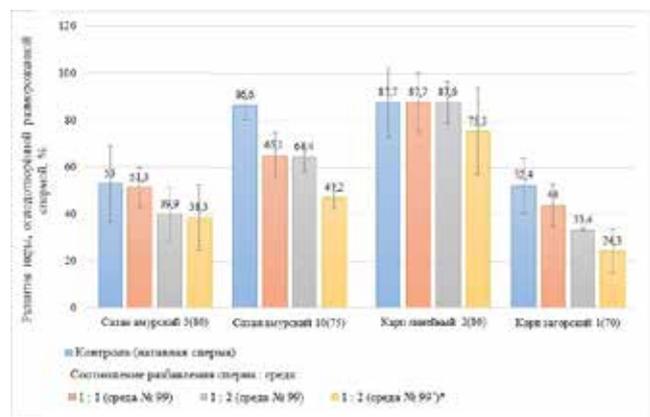


Рисунок 1. Влияние соотношения разбавления спермы средой на результаты криоконсервации (время эквilibрации суспензии сперма+среда 0-5 мин, замораживание на диске, температура оттаивания замороженной спермы - 40°C, время оттаивания - 60 сек). Среда No 99' содержит в водном растворе 0,375% сахарозы, 0,263% NaCl, 15% метанола и 4,5% этиленгликоля. При разбавлении спермы средой No 99' в соотношении 1:2 концентрации компонентов в получаемой суспензии сохраняются теми же, что при разбавлении средой No 99 в соотношении 1:1.

Figure 1. Influence of dilution ratio (sperm+protective medium) on cryopreservation results (equilibration time of sperm: protective medium suspension - 0-5 min, freezing on the disk, thawing temperature of frozen sperm - 40°C, thawing time - 60 s). The medium N 99' is aqueous solution consisting of 0,375% sucrose, 0,263% NaCl, 15% methanol and 4.5% ethylene glycol. By dilution of sperm with medium N 99' in dilution ratio 1:2, suspension components concentrations are kept the same as by dilution with medium N 99 in dilution ratio 1:1.

ды, которая в водном растворе 0,1% сахарозы и 0,35% хлорида натрия содержала два проникающих криопротектора: метанол и этиленгликоль в пределах концентраций, соответственно, 20-24% и 3-6% (в массовых долях) [2]. Наиболее высокое защитное действие среды наблюдалось при совместном использовании этих спиртов, что свидетельствовало о проявлении эффекта синергизма. Результаты проведенных опытов по оптимизации состава этой среды, в которых сравнивалось действие конкретных концентраций данных криопротекторов, а также природы и концентраций различных сахаров и солей (выбранных на основании анализа литературных сведений о составе наиболее эффективных разбавителей для спермы карповых рыб [4-6]), сведены в таблицу 1. Действие опытных сред сравнивалось по наиболее достоверному показателю - проценту оплодотворения икры криоконсервированной спермой. Подвижность размороженной спермы, как показатель жизнеспособности клеток в целом, составляющая в среднем 15-30%, не всегда коррелировала как с процентом оплодотворения ею икры, так и с подвижностью нативной спермы.

В опыте 1 по замораживанию смеси спермы высокого качества, собранной от пяти самцов сазана амурского (подвижность нативной спермы составляла 100%), лучшие результаты оплодотворения икры криоконсервированной спермой (90-91%) были получены при использовании сред с приблизительно одинаковой осмоляльностью, содержащих как 0,35% NaCl, так и 0,3% KCl в растворе 0,1% сахарозы с различными процентными соотношениями метанола и этиленгликоля в вышеупомянутых пределах концентраций (среды №№ 31, 20 и 65). Почти также эффективны (84-89% оплодотворения икры) были подобные среды на основе 3,5% глюкозы. При исключении сахаров из состава растворов, более сильное снижение криозащитного действия наблюдалось для сред, содержащих 0,3% KCl по сравнению с 0,35% NaCl. Удаление и сахаров, и солей приводило к резкому падению криозащитных свойств, что подтверждало необходимость присутствия этих веществ в среде.

Опыт 2 по криоконсервации смеси спермы невысокого качества, собранной от четырех самцов карпа линейного (подвижность нативной спермы составляла около 70%), показал целесообразность увеличения концентрации сахара в среде только в случае отсутствия в ней соли, причем более предпочтительным было присутствие 3,5% сахарозы по сравнению с 3,5% глюкозы. И, в целом, все среды на основе сахарозы проявляли немного более сильные криозащитные свойства, чем их аналоги с теми же концентрациями глюкозы.

В опыте 3, проведенном на индивидуальной сперме двух самцов карпа московского чешуйчатого с подвижностью 100%, было показано отсутствие необходимости в повыше-

Таблица 1. Влияние состава криозащитной среды на оплодотворяющую способность размороженной спермы / **Table 1.** Influence of protective medium composition on post-thawed sperm fertility

№ опыта, вид рыбы, подвижность нативной спермы	№ среды*	Состав среды (массовая доля компонентов в водном растворе, %)						Оплодотворение икры размороженной спермой		
		сахара	глюкоза	инозит	NaCl	KCl	метанол	этиленгликоль	средний % развития	% от контроля
1 Сазан амурский (смесь спермы 5 самцов) 100%	19	0,1			0,35		24	6	86,4 ± 7,5	117,5
	31	0,1			0,35		24	3	90,1 ± 6,5	122,6
	20	0,1			0,35		20	6	91,1 ± 2,0	123,9
	38	0,1			0,35		20	3	86,9 ± 15,2	118,2
	61		3,5		0,35		24	6	88,0 ± 10,0	119,7
	62		3,5		0,35		24	3	84,3 ± 11,2	114,6
	63		3,5		0,35		20	6	86,5 ± 15,1	117,7
	64		3,5		0,35		20	3	87,7 ± 13,8	119,3
	65	0,1				0,3	24	6	90,0 ± 11,3	122,4
	66	0,1				0,3	24	3	61,2 ± 22,5	83,3
	67	0,1				0,3	20	6	71,6 ± 12,9	97,4
	68	0,1				0,3	20	3	71,1 ± 12,2	96,7
	70		3,5			0,3	24	6	88,0 ± 14,9	119,8
	71		3,5			0,3	24	3	85,7 ± 6,8	116,6
	72		3,5			0,3	20	6	89,9 ± 5,6	122,4
	73		3,5			0,3	20	3	87,7 ± 1,2	119,3
	74					0,35	24	6	83,2 ± 22,7	113,2
	75					0,35	20	6	79,6 ± 3,2	108,3
	76						0,3	24	6	53,0 ± 38,4
77						0,3	20	6	62,1 ± 44,8	84,4
78							24	6	17,0 ± 20,6	23,1
79							20	6	12,0 ± 7,5	16,3
контроль									73,5	
2 Карп линейный (смесь спермы 4 самцов) 70%	20	0,1			0,35		20	6	57,6 ± 38,7	116,8
	38	0,1			0,35		20	3	38,6 ± 7,3	78,3
	87	1,5			0,35		20	6	60,5 ± 10,2	122,7
	88	1,5			0,35		20	3	53,1 ± 13,5	107,7
	89	3,5			0,35		20	6	58,3 ± 23,5	118,2
	90	3,5			0,35		20	3	61,9 ± 24,1	125,5
	91		0,1		0,35		20	6	50,7 ± 32,6	102,9
	92		0,1		0,35		20	3	37,2 ± 25,4	75,5
	93		1,5		0,35		20	6	44,8 ± 3,3	90,9
	94		1,5		0,35		20	3	47,1 ± 16,5	95,5
	63		3,5		0,35		20	6	48,1 ± 18,4	97,5
	64		3,5		0,35		20	3	49,5 ± 10,8	100,4
	83	0,1					20	6	1,7 ± 2,0	3,4
	95	1,5					20	6	12,7 ± 25,5	25,7
96	3,5					20	6	42,3 ± 17,5	85,9	
97		0,1				20	6	3,1 ± 8,8	6,3	
98		1,5				20	6	32,8 ± 6,5	66,6	
85		3,5				20	6	33,5 ± 6,9	67,9	
контроль									49,3 ± 11,3	
3 Карп московский чешуйчатый (самец 1) 100%	20	0,1			0,35		20	6	91,0 ± 5,1	108,9
	99	0,5			0,35		20	6	93,5 ± 7,8	111,8
	87	1,5			0,35		20	6	93,1 ± 12,7	111,4
	89	3,5			0,35		20	6	91,5 ± 2,4	109,5
	91		0,1		0,35		20	6	88,6 ± 8,9	106,0
	100		0,5		0,35		20	6	91,9 ± 14,8	110,0
	93		1,5		0,35		20	6	89,6 ± 10,0	107,2
	63		3,5		0,35		20	6	87,2 ± 9,7	104,3
	101			0,1	0,35		20	6	84,8 ± 2,3	101,5
	102			0,5	0,35		20	6	89,9 ± 11,4	107,5
103			1,5	0,35		20	6	87,2 ± 10,1	104,4	
104			3,5	0,35		20	6	88,6 ± 4,9	106,0	
контроль									83,6 ± 10,8	
(самец 2) 100%	20	0,1			0,35		20	6	88,1 ± 4,6	106,8
	99	0,5			0,35		20	6	90,0 ± 13,1	109,0
	87	1,5			0,35		20	6	85,6 ± 8,4	103,7
	89	3,5			0,35		20	6	87,9 ± 6,2	106,5
	91		0,1		0,35		20	6	82,3 ± 9,9	99,8
	100		0,5		0,35		20	6	87,1 ± 2,3	105,5
	93		1,5		0,35		20	6	86,2 ± 7,7	104,4
	63		3,5		0,35		20	6	82,5 ± 4,0	99,9
	101			0,1	0,35		20	6	84,4 ± 16,9	102,3
	102			0,5	0,35		20	6	89,9 ± 5,7	108,9
103			1,5	0,35		20	6	85,1 ± 6,0	103,1	
104			3,5	0,35		20	6	79,3 ± 5,7	96,1	
контроль									82,5 ± 13,7	

Таблица 1. Влияние состава криозащитной среды на оплодотворяющую способность размороженной спермы (продолжение) / **Table 1.** Influence of protective medium composition on post-thawed sperm fertility

№ опыта, вид рыбы, подвижность нативной спермы	№ среды*	Состав среды (массовая доля компонентов в водном растворе, %)						Оплодотворение икры размороженной спермой		
		сахара	глюкоза	инозит	NaCl	KCl	метанол	этиленгликоль	средний % развития	% от контроля
4 Карп МР (смесь спермы 4 самцов) 60%	105	0,5			0,35		20	3	71,7 ± 11,3	82,9
	106	1			0,35		20	3	77,7 ± 11,3	89,9
	107		0,5		0,35		20	3	84,0 ± 1,8	97,2
	108		1		0,35		20	3	69,3 ± 14,3	80,1
	109			0,5	0,35		20	3	74,8 ± 8,4	86,5
	110			1	0,35		20	3	75,1 ± 24,9	86,9
	111	0,5				0,3	20	3	83,3 ± 3,4	96,3
	112	1				0,3	20	3	79,1 ± 14,7	91,5
	113		0,5			0,3	20	3	84,4 ± 7,3	97,6
	114		1			0,3	20	3	79,1 ± 3,2	91,5
	115			0,5		0,3	20	3	80,1 ± 18,3	92,7
	116			1		0,3	20	3	82,3 ± 6,1	95,2
						контроль			86,5 ± 2,1	
	117	0,5				0,35	24	6	95,2 ± 4,6	95,9
	118	0,5				0,35	24	3	94,1 ± 3,4	94,8
	99	0,5				0,35	20	6	96,8 ± 4,1	97,6
5 Сазан волжский (смесь спермы 5 самцов) 95%	105	0,5			0,35	20	3	95,9 ± 2,4	96,6	
	119		0,5		0,35	24	6	94,4 ± 5,0	95,1	
	120		0,5		0,35	24	3	89,9 ± 5,7	90,6	
	100		0,5		0,35	20	6	92,9 ± 11,0	93,6	
	107		0,5		0,35	20	3	95,8 ± 6,2	96,5	
	121	0,5				0,3	24	6	98,0 ± 5,9	98,8
	122	0,5				0,3	24	3	90,0 ± 8,1	90,7
	123	0,5				0,3	20	6	96,8 ± 3,4	97,6
	111	0,5				0,3	20	3	85,9 ± 18,5	86,6
	124		0,5			0,3	24	6	98,1 ± 4,3	98,9
	125		0,5			0,3	24	3	95,2 ± 5,3	95,9
	126		0,5			0,3	20	6	96,6 ± 4,0	97,3
	113		0,5			0,3	20	3	81,0 ± 23,0	81,6
					контроль			99,2 ± 3,3		
6 Карп загорский (смесь спермы 2 самцов) 50%	75				0,35	20	6	84,4 ± 26,1	101,6	
	132					0,35	20	6	74,5 ± 32,5	89,6
	133	0,5					20	6	14,4 ± 25,7	17,3
	134		0,5				20	6	8,3 ± 10,8	10,0
	135	0,5			0,15		20	6	72,6 ± 17,4	87,3
	136	0,5				0,15	20	6	40,3 ± 20,6	48,5
	137		0,5		0,15		20	6	84,4 ± 2,7	101,6
	138		0,5			0,15	20	6	70,3 ± 30,0	84,6
	99	0,5			0,35		20	6	85,6 ± 7,3	103,0
	127	0,5				0,35	20	6	71,9 ± 25,5	86,6
	100		0,5		0,35		20	6	85,3 ± 13,9	102,6
	128		0,5			0,35	20	6	82,0 ± 25,5	98,7
	95	1,5					20	6	19,8 ± 36,0	23,8
	98		1,5				20	6	58,0 ± 44,8	69,8
96	3,5					20	6	80,9 ± 5,6	97,4	
85		3,5				20	6	88,9 ± 15,4	106,9	
					контроль			83,1 ± 15,0		
7 Сазан амурский (сперма 1 самца) 70%	19	0,1			0,35	24	6	84,7 ± 16,6	96,8	
	20	0,1			0,35	20	6	75,1 ± 23,9	85,9	
	139		0,1		0,35	24	6	77,1 ± 10,5	88,2	
	91		0,1		0,35	20	6	78,0 ± 9,8	89,1	
	117	0,5			0,35	24	6	78,4 ± 11,9	89,6	
	99	0,5			0,35	20	6	85,1 ± 18,4	97,3	
	119		0,5		0,35	24	6	79,3 ± 10,6	90,7	
	100		0,5		0,35	20	6	82,4 ± 8,4	94,2	
						контроль			87,5 ± 3,6	
8 Карп загорский чешуйчатый (смесь спермы 6 самцов) 65%	19	0,1			0,35	24	6	11,3 ± 17,9	22,0	
	20	0,1			0,35	20	6	26,2 ± 7,5	51,0	
	139		0,1		0,35	24	6	29,4 ± 22,1	57,2	
	91		0,1		0,35	20	6	46,4 ± 28,6	90,3	
	117	0,5			0,35	24	6	43,7 ± 29,7	85,0	
	99	0,5			0,35	20	6	57,6 ± 22,3	112,1	
	119		0,5		0,35	24	6	26,7 ± 29,8	51,9	
	100		0,5		0,35	20	6	54,6 ± 35,3	106,3	
	140	3,5			0,35	24	6	49,7 ± 6,2	96,8	
	89	3,5			0,35	20	6	67,2 ± 25,8	130,7	
	141	3,5			0,35	18	6	56,2 ± 33,1	109,3	
	142	3,5			0,35	15	6	65,1 ± 44,8	126,6	
	61		3,5		0,35	24	6	42,6 ± 50,0	82,8	
	63		3,5		0,35	20	6	61,0 ± 21,1	118,6	
143		3,5		0,35	18	6	60,6 ± 22,2	117,8		
144		3,5		0,35	15	6	53,3 ± 28,8	103,7		
					контроль			51,4 ± 17,7		

Примечание: * в таблице используется рабочая нумерация сред

нии концентрации сахаров в криозащитной среде до 3,5% при замораживании спермы высокого качества. Наиболее высокие степени оплодотворения икры оттаявшей спермой достигались при использовании сред (на основе 0,35% NaCl, 20% метанола и 6% этиленгликоля), содержащих 0,5% сахара, причем более предпочтительно сахарозы (среда № 99), чем глюкозы или инозита.

Небольшое усиление протективного действия сахаров в концентрации 0,5% (по сравнению с концентрацией 1%) в средах и с 0,35% NaCl, и с 0,3% KCl, на основе 20% метанола и 3% этиленгликоля, вновь проявилось в опыте 4 по криоконсервации смеси спермы четырех самцов карпа московского, разбросанного с подвижностью 60%. Кроме того, при использовании той же смеси спермы и среды № 99, было предпринято сравнение двух режимов замораживания: обычного, на диске и на «плотике» в течение 15 мин, которые обеспечили достижение практически одинаковой высокой степени оплодотворения икры оттаявшей спермой (средние значения, соответственно, 86,1% и 84,6%).

В опыте 5 по замораживанию смеси спермы пяти самцов сазана волжского с подвижностью 95% самые высокие результаты оплодотворения икры криоконсервированной спермой (на уровне нативного контроля) обеспечивали сочетания концентраций метанола и этиленгликоля, соответственно, 24% и 6%, а также – 20% и 6%, в средах на основе 0,5% сахара (и сахарозы, и глюкозы), как с 0,35% NaCl, так и с 0,3% KCl. Влияние природы сахаров и солей на успех криоконсервации, в данном случае, нивелировалось при получении в целом высоких показателей по оплодотворению, как это часто происходит при замораживании спермы очень хорошего качества.

Различное влияние хлоридов натрия и калия на криоустойчивость клеток проявилось в опыте 6 по замораживанию смеси спермы двух самцов карпа загорского с подвижностью 50%. Содержание NaCl в концентрациях как 0,15%, так и 0,35% в средах на основе 20% метанола и 6% этиленгликоля, как в присутствии 0,5% сахара (сахарозы или глюкозы), так и без сахаров, обеспечивало в итоге получение существенно более высоких процентов оплодотворения икры оттаявшей спермой, чем содержание KCl в тех же концентрациях. Кроме того, опыт вновь подтвердил целесообразность увеличения концентрации сахара в среде до 3,5% только в случае отсутствия в ней соли.

Выявленная предпочтительность присутствия в криозащитных средах 0,35% NaCl и 0,5% сахара опять проявилась в опыте 7 при замораживании спермы среднего качества (70% подвижных клеток), полученной от сазана амурского. При этом самое высокое протективное действие оказала среда № 99 с концентрацией метанола 20% и концентрацией этиленгликоля 6%.

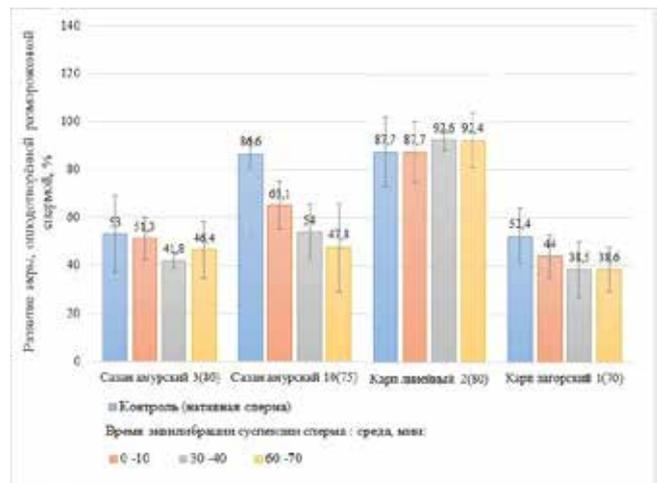


Рисунок 2. Влияние времени эквипирации суспензии сперма+среда на результаты криоконсервации (среда No 99, соотношение разбавления сперма: среда 1:1, замораживание на диске, температура оттаивания замороженной спермы – 40°С, время оттаивания – 60 сек)

Figure 2. Influence of equilibration time of sperm+protective medium suspension on cryopreservation results (medium N 99, dilution ratio sperm: protective medium 1:1, freezing on the disk, thawing temperature of frozen sperm – 40°С, thawing time – 60 s)

Это же соотношение концентраций данных криопротекторов было более эффективным по сравнению с соотношением 24% и 6% в средах на основе 0,35% NaCl, при всех испытанных концентрациях (0,1%, 0,5% и 3,5%) как сахарозы, так и глюкозы в опыте 8 по замораживанию смеси спермы шести самцов карпа загорского с подвижностью 65%.

Анализ полученных данных показывает, что самым высоким, стабильным протективным действием на сперму карповых рыб разного качества при замораживании обладает криозащитная среда № 99, содержащая в водном растворе 0,5% сахарозы, 0,35% хлорида натрия, 20% метанола и 6% этиленгликоля.

С использованием этой оптимизированной среды была предпринята проверка эффективности технологических параметров, ранее применяемого протокола криоконсервации спермы карповых рыб [1; 2], а также оценка возможности реализации упрощенного режима замораживания на «плотике», пригодного для экспедиционной работы. Результаты четырех проведенных опытов по отдельным этапам процесса криоконсервации представлены на рисунках 1-4. Опыт 1 проводился на смеси спермы трех самцов сазана амурского с 80% подвижных клеток, опыт 2 – на смеси спермы десяти самцов сазана амурского с подвижностью 75%, опыт 3 – на смеси спермы двух самцов карпа линейного с подвижностью 80%, опыт 4 – на сперме одного самца карпа загорского чешуйчатого с подвижностью 70%.

Таблица 2. Оценка качества образцов спермы карповых рыб, криоконсервированных в среде No 99, перед закладкой в криобанк / **Table 2.** Estimation of quality of cyprinids sperm samples cryopreserved with medium N 99 before putting in cryobank

Вид рыбы (дата)	No самца		Подвижность спермы, %		Оплодотворяющая способность спермы, %		
	Подвижность спермы, %	нативная	размороженная	нативная (контроль)	размороженная	% от контроля	
Сазан волжский (4.06.19)	1	80	25	92,8	95,7	103,1	
	2	60	25	94,1	94,9	100,9	
	3	70	30	92,5	93,1	100,6	
	4	70	25	90,6	85,1	93,9	
	5	70	30	96,1	92,1	95,8	
	6	70	20	98,0	93,0	94,9	
	7	80	30	95,7	87,9	91,8	
Карп московский разбросанный (MP) (11.06.19)	1	70	-	98,0	96,7	98,7	
	2	80	-	90,5	96,0	106,1	
	3	70	-	96,5	91,8	95,1	
	4	70	-	94,6	85,7	90,6	
	5	80	-	96,9	90,5	93,4	
Карп ЗУ-НК (11.06.19)	1	80	-	97,6	97,1	99,5	
	2	70	-	98,2	90,5	92,2	
	3	80	-	97,6	89,1	91,3	
Сазан волжский (9.06.20)	1961	80	15	92,3	80,8	87,5	
	1947	90	20	88,9	80,0	90,0	
	1957	80	20	91,8	92,7	101,0	
	1940	90	15	95,0	94,4	99,4	
	1944	70	15	98,3	90,7	92,3	
	1953	70	20	100	96,8	96,8	
	1949	60	25	93,9	90,5	96,4	
	1962	70	15	95,1	89,7	94,3	
Карп MP (9.06.20)	1955	70	10	92,3	94,7	102,6	
	1	80	15	95,8	90,6	94,6	
Карп цветной (2-7.07.20):							
красно-белый, кохаку вуалевый металлик	1	60	15	97,0	96,9	99,9	
	2	80	15	94,9	96,1	101,3	
	3	90	15	95,6	94,8	99,2	
	4	90	35	96,6	94,8	98,1	
Сазан амурский (20.05.21)	1	90	20	91,9	80,6	87,7	
Сазан волжский (9.06.22)	3446	90	30		89,8	97,8	
	1940	70	35		84,3	91,8	
	1955	70	30		95,3	103,8	
	1944	80	35		88,6	96,5	
	1953	80	30		83,0	90,4	
	3423	80	35		86,8	94,6	
	1957	90	40	91,8	93,2	101,5	
	3442	70	25		91,6	99,8	
	1949	80	30		89,4	97,4	
	3439	70	35		83,7	91,2	
	1947	90	30		85,4	93,0	
	1961	90	25		83,3	90,7	
	1962	70	35		84,3	91,8	
	3441	70	30		79,2	86,3	
Карп цветной (16.06.22):							
белый металлик	1	100	30	-	97,5	-	
трехцветный металлик	2	100	30	-	100,0	-	
трехцветный разбросанный	3	100	30	-	97,7	-	
Карп MP (17.06.22)	1	100	-		98,0	98,4	
	2	100	-		96,2	96,6	
	3	100	-		89,2	89,6	
	4	100	-		92,3	92,7	
	5	100	-	99,6	99,1	99,5	
	6	100	-		98,8	99,2	
	7	100	-		90,4	90,8	
	8	90	-		97,9	98,3	
	9	100	-		94,5	94,9	
	10	100	-		96,8	97,2	
Карп московский чешуйчатый (17.06.22)	1	90	-		97,7	99,5	
	2	100	-		99,8	101,6	
	3	90	-		98,1	99,9	
	4	100	-		98,1	99,9	
	5	100	-		98,1	99,9	
	6	100	-	98,2	98,3	100,0	
	7	90	-		100,0	101,8	
	8	80	-		97,0	98,8	
	9	100	-		95,0	96,7	
	10	100	-		98,8	100,6	
	11	100	-		96,4	98,2	
	12	80	20	96,0	94,7	98,6	
	13	80	30	94,2	97,0	103,0	
	14	80	30	94,9	97,3	102,5	
Карп цветной (22.06.22):							
золотой линейный	1	70	20	92,1	89,6	97,3	
	2	90	20	93,5	93,2	99,7	
розово-оранжевый разбросанный	1	70	25	97,6	95,7	98,0	
розово-черный разбросанный	1	70	20	94,5	94,4	99,9	
трехцветный линейный	2	70	20	94,1	94,5	100,4	
трехцветный чешуйчатый	1	70	15	96,3	97,9	101,7	
1	70	20	94,4	94,3	99,9		

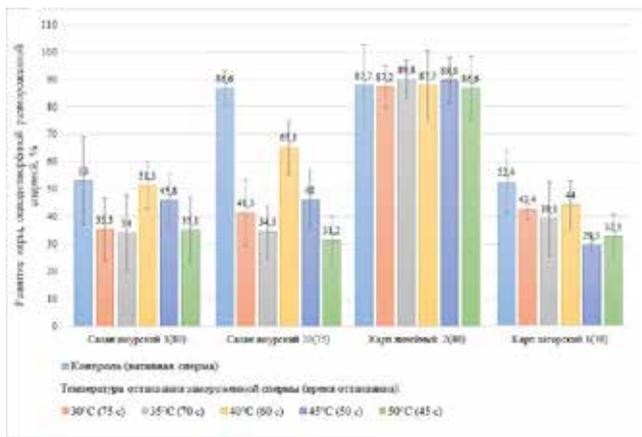


Рисунок 3. Влияние режима оттаивания на результаты криоконсервации (среда No 99, соотношение разбавления сперма: среда 1:1, время эквilibрации суспензии сперма+среда 0-5 мин, замораживание на диске)

Figure 3. Influence of thawing regime on cryopreservation results (medium N 99, dilution ratio sperm: protective medium 1:1, equilibration time of sperm+protective medium suspension - 0-5 min, freezing on the disk)

Сравнение, в обычно применяемом протоколе, различных соотношений разбавления спермы криозащитной средой № 99, при замораживании двух различных смесей спермы сазана амурского и индивидуальной спермы одного самца карпа загорского, в опытах 1, 2 и 4 показало, по результатам оплодотворения икры криоконсервированной спермой, предпочтительность использования соотношения 1:1 (рис. 1).

В тех же опытах, на следующем этапе данного протокола, было подтверждено отсутствие необходимости в длительной (30-70 мин) эквilibрации суспензии сперма+среда, как это и было установлено ранее. Согласно наблюдаемой тенденции, наибольшую оплодотворяющую способность сохраняла сперма, криоконсервированная после эквilibрации в течение 0-10 мин, т.е. заполнение криопробирок должно осуществляться сразу после разбавления спермы средой, без промедления (рис. 2).

Оптимальные технологические параметры этапа оттаивания – температура 40°C и продолжительность 60 сек – оказались такими же, как в обычно применяемом протоколе (рис. 3).

При использовании упрощенного протокола криоконсервации, на «плотике», в этих же опытах была подтверждена избыточность длительной (90-105 мин) эквilibрации суспензии сперма+среда. При продолжительности замораживания от 10 до 20 мин данный протокол обеспечивал сохранение практически такой же оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы, как при замораживании по двухэтапной программе на диске в обычно применяемом протоколе. При этом

прослеживалась тенденция к повышению сохранности клеток при уменьшении времени замораживания до 10 мин (рис. 4).

Дополнительные испытания данного протокола, в сравнении с обычным протоколом замораживания на диске, проведенные на индивидуальной сперме высокого качества от трех самцов карпа загорского, обеспечили достижение практически одинаковой высокой степени оплодотворения икры размороженной спермой и подтвердили достаточность минимального времени замораживания (средние проценты оплодотворения для трех самцов, полученные при замораживании на диске и на «плотике» в течение 10 мин, соответственно, 92,3 и 96,2; 90,7 и 94,5; 91,0 и 92,0).

В опытах 1, 2 и 4, проведенных на сперме среднего качества, удалось установить различия во влиянии рассмотренных технологических параметров на успех криоконсервации. В опыте 3, при замораживании спермы высокого качества, эти различия были нивелированы в условиях сохранения криоконсервированной спермой такой же оплодотворяющей способности, как у нативной спермы в контроле. Тем не менее, полученные в этом опыте результаты послужили подтверждением эффективности действия оптимизированной криозащитной среды.

Эффективность данной среды, при использовании обычно применяемого протокола замораживания на диске, дополнительно иллюстрируют также результаты криоконсервации образцов спермы карповых рыб для пополнения коллекции криобанка (табл. 2).

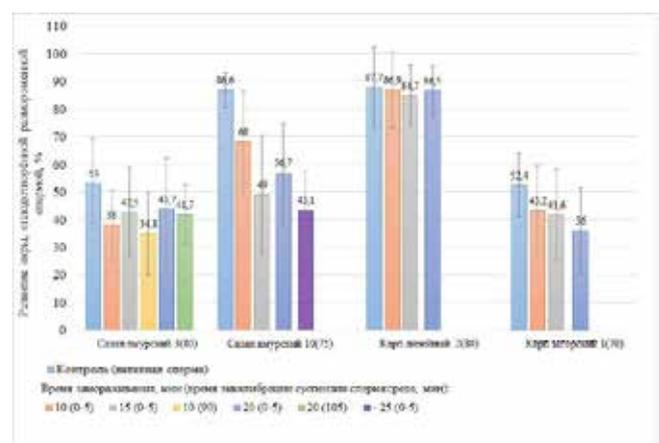


Рисунок 4. Влияние параметров замораживания на «плотике» на результаты криоконсервации (среда No 99, соотношение разбавления сперма: среда 1:1, температура оттаивания замороженной спермы – 40°C, время оттаивания – 60 сек)

Figure 4. Influence of parameters of «raft»-freezing on cryopreservation results (medium N 99, dilution ratio sperm: protective medium 1:1, thawing temperature of frozen sperm - 40°C, thawing time - 60 s)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили оптимизировать технологические параметры двух протоколов криоконсервации спермы карповых рыб, отличающихся режимами замораживания. Более предпочтительным, как в лабораторных условиях, так и в полевых, является протокол с двухэтапной программой замораживания на диске, позволяющей одновременно замораживать большой объем спермы (до 100 мл), который включает следующие этапы.

Транспортировка половых продуктов осуществляется при температуре 1-5°C в термосумке с хладоэлементами. Качество нативной спермы, после ее активации водой, оценивается по подвижности. Для криоконсервации отбираются образцы с подвижностью $\geq 60\%$.

Перед криоконсервацией, охлажденная до 10-12°C, сперма разбавляется в объемном отношении 1:1 охлажденной до той же температуры криозащитной средой, содержащей в водном растворе 0,5% сахарозы, 0,35% хлорида натрия, 20% метанола и 6% этиленгликоля (в массовых долях). Среда добавляется к сперме по каплям при непрерывном перемешивании.

Полученная суспензия сперма + криозащитная среда разливается в криопробирки объемом 1,5 мл, которые незамедлительно, без эквilibрации, устанавливаются вертикально на диск из фольгированного гетинакса с отверстиями для пробирок, снабженный датчиком, регистрирующим температуру спермы в пробирке. Замораживание криопробирок осуществляется в парах LN₂, при постепенном погружении диска в металлический сосуд с LN₂, по следующей программе: I этап: от +10 до -15°C со скоростью 1-2°C/мин; II этап: от -15 до -196°C с плавно увеличивающейся скоростью до 15-20°C/мин.

Размораживание пробирок с криоконсервированной спермой проводится в водном термостате при температуре 40°C в течение 60 секунд.

Оценка эффективности криоконсервации проводится путем определения подвижности и оплодотворяющей способности размороженной спермы.

В полевых условиях, при замораживании небольших объемов спермы, может использоваться упрощенный протокол криоконсервации, включающий эти же этапы, с тем отличием, что замораживание криопробирок с разбавленной спермой осуществляется в парах LN₂ на полистироловой рамке, с прикрепленной к ней фольгой («плотике»), плавающим на поверхности LN₂ в полистироловом ящике, в течение 10 минут.

Оптимизированные, в ходе проведенных исследований, протоколы позволят обеспечить эффективное применение метода криоконсервации спермы карповых рыб для целей сохранения водных биоресурсов и селекции в товарной аквакультуре.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад в работу авторов: **О.Б. Докина** – идея работы, участие в проведении экспериментов, подготовка статьи, **К.В. Ковалев** – участие в проведении экспериментов, окончательная проверка статьи, **Н.Д. Пронина** – участие в проведении экспериментов, **В.А. Миленко** – участие в проведении экспериментов, **В.Н. Коваленко** – статистическая обработка данных.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Contribution to the work of the authors: **O.B. Dokina** – the idea of the work, participation in conducting experiments, preparation of the article, **K.V. Kovalev** – participation in conducting experiments, final verification of the article, **N.D. Pronina** – participation in conducting experiments, **V.A. Milenko** – participation in conducting experiments, **V.N. Kovalenko** – statistical processing data.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ / REFERENCES AND SOURCES

1. Докина О.Б. Эффективные технологии криоконсервации спермы карповых и осетровых рыб / О.Б. Докина, К.В. Ковалев, Н.Д. Пронина, В.А. Миленко // Новейшие генетические технологии для аквакультуры. Мат-лы Всероссийской науч.-практ. конф. с межд. участием (Москва, 29-31 января 2020 г). – М.: «Перо», 2020. – С. 119-134.

1. Dokina O.B., Kovalev K.V., Pronina N.D., Milenko V.A. Effective technologies of cyprinids and sturgeons sperm cryopreservation // Recent genetic technologies for aquaculture. Materials of the All-Russian scientific-practical conf. with international participation (Moscow, January 29 – 31, 2020). – Moscow, 2020. – Pp. 119-134.

2. Докина О.Б. Усовершенствованная технология криоконсервации спермы карпа в крупномасштабном криобанке / О.Б. Докина, Н.Д. Пронина, К.В. Ковалев, В.А. Миленко, Л.И. Цветкова // Рыбное хозяйство. – 2019. – № 5. – С. 97-105.

2. Dokina O.B., Pronina N.D., Kovalev K.V., Milenko V.A., Tsvetkova L.I. Improved technology of carp sperm cryopreservation in large-scale cryobank // Fisheries. – 2019. – No 5. – Pp. 97-105.

3. Сборник нормативно-технологической документации по товарному рыбоводству. – М.: Агропромиздат, 1986. – Т. 1. – 254 с.

3. Collection of regulatory and technological documentation on commercial fish farming. – М.: Agropromizdat, 1986. – Vol. 1. – 254 p.

4. Bernath G., Zarski D., Kása E., Staszny Á., Várkonyi L., Kollár T., Hegyi Á., Bokor Z., Urbányi B., Horváth Á. Improvement of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cryopreservation using a programmable freezer // General and Comparative Endocrinology. – 2016. – V.237. – Pp. 78-88. DOI 10.1016/j.ygcen.2016.08.013

5. Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. 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. – 2007. – V.54. – Pp. 251-257. DOI 10.1016/j.cryobiol.2007.02.003

6. Horváth Á., Urbányi B. Cryopreservation of sperm of some European Cyprinids and Percids // Aquaculture America 2002, San Diego, California, January 27-30, 2002. – Book of Abstracts. – P. 300.