

На правах рукописи



КРАСИЛЬНИКОВА АЛЕКСАНДРА АНДРИАНОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССА КРИОКОНСЕРВАЦИИ
РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК САМЦОВ РЫБ**

06.04.01 – рыбное хозяйство и аквакультура

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Астрахань – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Южный научный центр Российской академии наук (ФГБУН «ЮНЦ РАН») и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханский государственный технический университет» (ФГБОУ ВПО «АГТУ»)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Пономарев Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

Ходоревская Раиса Павловна, доктор биологических наук,
ФГБНУ «Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства»,
лаборатория морских рыб, ведущий научный сотрудник

Козлов Владимир Иванович, доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)»,
кафедра Биоэкологии и ихтиологии, профессор

Ведущая организация: ФГБНУ «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства», г. Ростов-на-Дону

Защита диссертации состоится «24» декабря 2015 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.009.13 при Астраханском государственном университете по адресу: 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет» по адресу: 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20а, и на сайте: <http://www.asu.edu.ru>

Автореферат разослан «__» октября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



А.С. Дулина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Повышенный интерес к криобиологии связан с нарастающим антропогенным воздействием на водные экосистемы, что особенно сильно повлияло на состояние популяций рыб. Одним из главных источников формирования и поддержания запасов ценных видов рыб является их искусственное воспроизводство. Однако в настоящее время на рыбодобывающих заводах наблюдается упрощенный подход к формированию маточных стад, вследствие дефицита производителей. Использование близкородственных пар при скрещивании чревато потерей природного генетического полиморфизма, инбридингом и, как следствие, значительным снижением адаптивного потенциала популяции (Мюге, Барминцева, 2011). Использование криоконсервированной спермы на заводах по искусственному воспроизводству, а также предприятиях аквакультуры, позволит получать генетически разнородное потомство, сократит площади и затраты на содержание самцов, тем самым позволив увеличить продуктивное стадо самок (Чипинов, Богатырева, 2011; Пономарева и др., 2014). Применение криоспермы возможно в любое время, без риска несвоевременного созревания производителей или получения от них половых продуктов ненадлежащего качества.

Таким образом, криоконсервация репродуктивных клеток самцов рыб является актуальным направлением в стратегии сохранения генетического биоразнообразия, а также развития рыбного хозяйства и аквакультуры.

Степень ее разработанности. Существенный вклад в создание криотехнологий, пригодных для сохранения спермы рыб внесли Л.И. Цветкова, Е.Ф. Копейка, С.И. Савушкина, Э.Н. Гахова, В.И. Ананьев, Б.Б. Дзюба, С.И. Дрокин, А.М. Тихомиров, А.А. Андреев, М. Rodina, G. Maise, R. Billard, V. Harvey, F. Lahnsteiner, O. Linhart, E. Cabrita, S. Martinez-Paramo, K.J. Rana, T.R. Tiersh совместно с их учениками и коллегами. Однако до сих пор качество дефростированной спермы не соответствует рыбодобывающим показателям для целей воспроизводства вследствие разнообразия морфологии сперматозоидов. Улучшение качества криоконсервированного репродуктивного материала наиболее актуально

для сохранения генофонда ценных видов рыб. В связи с этим нуждаются в пересмотре ряд установленных ранее положений, конкретизация которых может способствовать повышению выживаемости спермиев рыб после двойного температурного шока и получению надежной технологии, пригодной для использования в промышленных масштабах.

Цель и задачи исследований. Целью работы явилось совершенствование процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб и оценка качества криопотомства.

Поставленная цель определила решение следующих задач:

- исследовать кристаллообразование полостной жидкости эякулята и протоплазмы сперматозоидов;
- определить объем внутриклеточной жидкости в сперматозоидах рыб;
- проверить эффективность изменения объемов эндоцеллюлярного протектора в криозащитной среде в зависимости от количества внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб;
- изучить влияние объемов замораживаемого материала на выживаемость клеток после дефростации;
- установить возможность применения альтернативных способов подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию;
- осуществить оплодотворение нативной икры спермой, замороженной по усовершенствованной методике;
- дать сравнительную оценку качества предличинок, личинок и молоди рыб, полученных с использованием дефростированной спермы и по традиционной технологии.

Научная новизна. В настоящей работе впервые выявлена зависимость необходимого количества протектора проникающего действия в криозащитных средах от объема внутриклеточной жидкости в сперматозоидах рыб. Установлена эффективность снижения объема эндоцеллюлярного протектора в криозащитном растворе в зависимости от объема свободной внутриклеточной воды в составе протоплазмы сперматозоидов осетровых видов рыб и белорыбицы с це-

лью повышения их выживаемости после криоконсервации. Впервые научно обосновано влияние объема замораживаемого материала на выживаемость клеток после дефростации. Экспериментально доказано преимущество использования малых объемов замораживаемого материала при криоконсервации семенной жидкости рыб. Впервые установлена возможность применения альтернативных способов подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию в виде тонких пленок. Дефростированной спермой, замороженной по усовершенствованной методике, проведено оплодотворение нативной икры русского осетра и получено жизнестойкое потомство. Проанализированы поведенческие реакции предличинок, личинок и молоди, полученных с использованием дефростированных репродуктивных клеток самцов русского осетра.

Теоретическая и практическая значимость. Диссертационная работа является экспериментально-практическим исследованием, результаты которого могут быть использованы для повышения выживаемости сперматозоидов рыб при криоконсервации, что может лечь в основу создания криобанка хозяйственно-ценных, аборигенных, уникальных и исчезающих видов рыб для пополнения численности их популяций. Сохраненный генетический материал может быть задействован в технологическом процессе на рыбоводных заводах России. Усовершенствованная методика криоконсервации генетического и репродуктивного материала гидробионтов откроет большие возможности для создания новых экономически эффективных биотехнологий, сделает более результативными природоохранные мероприятия по спасению редких и исчезающих видов рыб.

Положения, выносимые на защиту.

1. Корректировка количества протектора проникающего действия в криозащитных средах для осетровых рыб и белорыбицы в зависимости от объема свободной внутриклеточной воды в сперматозоидах.
2. Зависимость выживаемости сперматозоидов рыб при криоконсервации от объема замораживаемого материала.

3. Сравнительная оценка поведенческих реакций предличинок, личинок и молоди рыб, полученных с помощью дефростированных репродуктивных клеток самцов рыб, и по традиционной технологии.

Апробация результатов исследования. Основные материалы диссертационной работы были представлены и обсуждались на Ежегодных конференциях студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН (г. Ростов-на-Дону, 2011-2014 гг.), II Региональной конференции молодых ученых и инноваторов «Инно-Каспий» (г. Астрахань, 2011), Международной научной конференции «Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения» (г. Ростов-на-Дону, 2011), VI специализированной выставке «Образование – инвестиции в успех – 2011» при Министерстве образования и науки Астраханской области (г. Астрахань, 2011), региональной научно-практической конференции «Исследования молодых ученых – вклад в инновационное развитие России» в рамках Международной научной школы для молодежи «Школа научно-технического творчества и концептуального проектирования» (г. Астрахань, 2011), инновационных молодежных конвентах Ростовской области (г. Ростов-на-Дону, 2011, 2012), Международной научной конференции «Инновационные технологии в управлении, образовании, промышленности «АСТИНТЕХ-2012» (г. Астрахань, 2012), Всероссийском конкурсе научно-исследовательских работ студентов и аспирантов в области химических наук и наук о материалах по направлению «Экология и ресурсосберегающее производство (в т. ч. мониторинг и прогноз состояния атмосферы и гидросферы)» (г. Казань, 2012), Международных научных конференциях научно-педагогических работников Астраханского государственного технического университета (г. Астрахань, 2012, 2014, 2015), VII Международной конференции «Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона» (г. Керчь, 2012), Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2013, 2015), российской агро-промышленной выставке «Зо-

лотая осень - 2013» (г. Москва, 2013), научно-практической конференции с международным участием «Интенсивная аквакультура на современном этапе развития» (г. Махачкала, 2013), Международной заочной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (г. Сыктывкар, 2014), Международной научной конференции, приуроченной к пятилетию открытия базовой кафедры ЮНЦ РАН «Технические средства аквакультуры» в ДГТУ «Рациональное использование и сохранение водных биоресурсов (г. Ростов-на-Дону, 2014), Международной научной конференции «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей» (г. Ростов-на-Дону, 2014), Международной научной конференции «World Aquaculture-2015» (г. Чеджу, Корея, 2015).

Исследования были проведены в рамках Программы базового бюджетного финансирования Южного научного центра РАН по темам: «Биотехнологии аквакультуры – основа рационального природопользования в южных морях России» (№ госрег. 01201153670), «Оценка современного состояния, анализ процессов формирования водных биоресурсов южных морей России в условиях антропогенного стресса и разработка научных основ технологии реставрации ихтиофауны, сохранения и восстановления хозяйственно-ценных видов рыб» (№ госрег. 01201354245); программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Поддержка инноваций и разработок» по теме «Создание криобанка – репродуктора на основе новых биотехнологических методов глубокой заморозки клеток рыб для обеспечения промышленных и фермерских хозяйств» (№ госрег. 01201265589); ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», ГК №14.604.21.0129 по теме «Разработка методов и технологий мониторинга, управления и сохранения биологического разнообразия водных экосистем южных регионов России» (№ госрег. 114111940059, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0129).

Личный вклад автора в работу заключается в сборе и анализе литературных данных по исследуемой проблеме, непосредственном выполнении экспе-

риментальных работ по всем разделам диссертационной работы, обработке результатов, проведении анализа и обобщения полученной информации, представлении полученных результатов в виде устных докладов на научных мероприятиях и подготовке публикаций по выполненной работе.

Публикации. По материалам исследований опубликована 21 научная работа, отражающая основное содержание диссертации, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК Министерства образования и науки РФ, и 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа представлена на 149 страницах компьютерного текста, состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, содержит 49 рисунков и 5 таблиц. Список литературных источников содержит 362 наименования, в том числе 205 на иностранных языках.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В главе рассмотрены различия в строении сперматозоидов рыб, факторы, влияющие на их подвижность, применение криотехнологий в рыбном хозяйстве и аквакультуре. Анализ литературных данных показал, что ряд установленных ранее положений нуждаются в пересмотре для повышения выживаемости спермиев рыб после двойного температурного шока и получения надежной технологии, пригодной для использования в производственных условиях.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили с 2010 по 2015 гг. в лаборатории Водных биоресурсов и аквакультуры Отдела Водных биологических ресурсов бассейнов южных морей ФГБУН «ЮНЦ РАН» и научно-исследовательской лаборатории «Криотехнологии в аквакультуре» при кафедре «Аквакультура и водные биоресурсы» ФГБОУ ВПО «АГТУ».

Материал для исследований был получен на научно-экспедиционной базе Южного научного центра РАН в пос. Кагальник, ФГБУ «Донской осетровый завод» (Ростовская область), ООО АРК «Белуга», Биоаквапарк – научно-

технический центр аквакультуры ФГБОУ ВПО «АГТУ», Чаганском рыбопитомнике и Александровском осетровом рыбоводном заводе ФГБУ «Севкаспрыбвод» (Астраханская область) в периоды нерестовых кампаний.

Объектом исследования служили репродуктивные клетки самцов русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833), сибирского осетра ленской популяции (*Acipenser baerii* Brandt, 1869), белуги (*Huso huso* Linnaeus, 1758), стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758), речного окуня (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758), сазана (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), карпа (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758), белого амура (*Stenopharyngodon idella* Cuvier and Valenciennes, 1844), белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes, 1844), пестрого толстолобика (*Hypophthalmichthys nobilis* Richardson, 1845), белорыбицы (*Stenodus leucichthys* Gldenstdt, 1772).

Схема научных исследований представлена на рисунке 1.

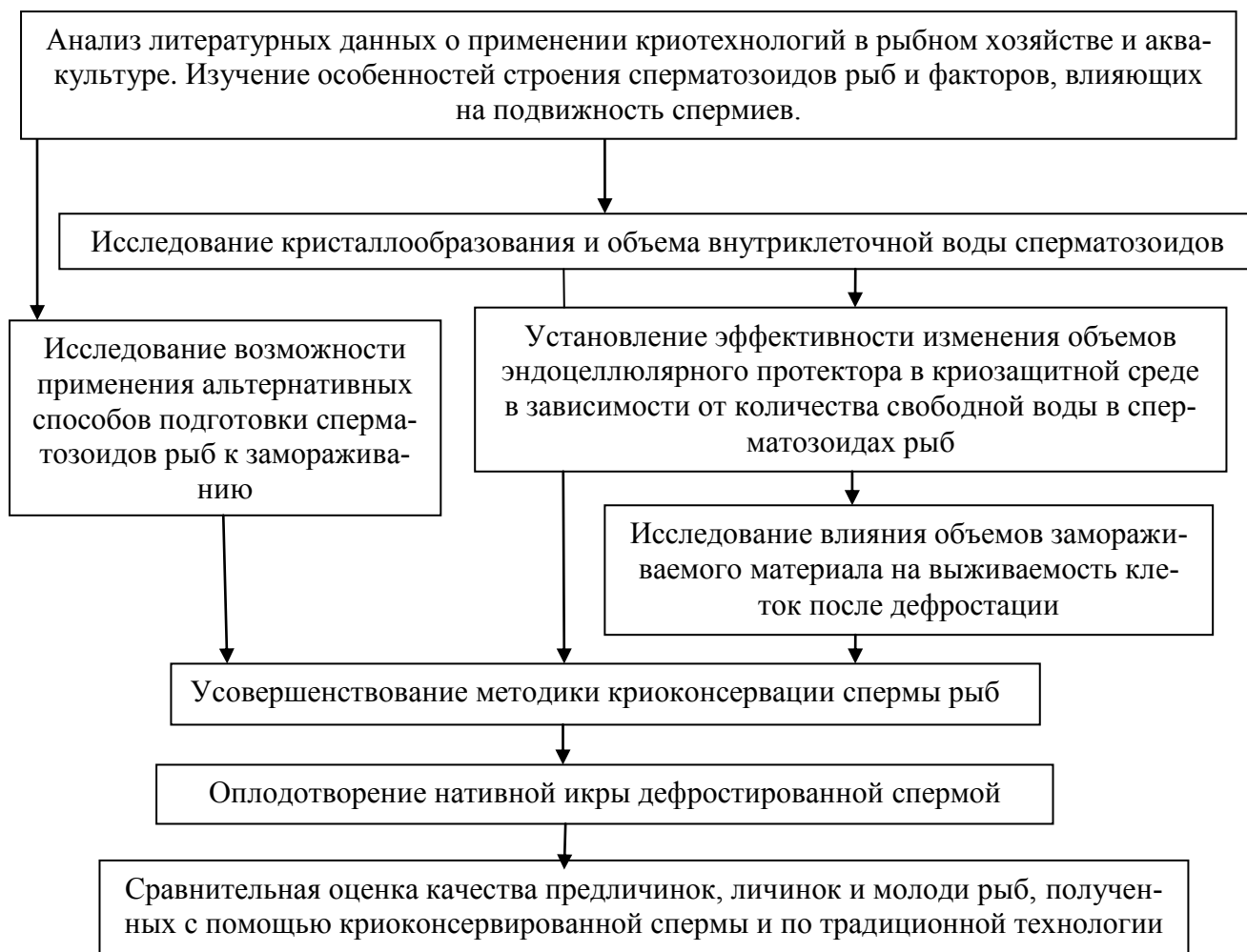


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Для съемки и анализа кристаллообразования камеру Фукса-Розенталя с мазком исследуемого раствора, накрывали покровным стеклом и размещали в пенопластовой кювете, в которую подавали жидкий азот со скоростью 2°C/сек. Объем внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб определяли весовым методом.

Криоконсервацию репродуктивных клеток самцов рыб проводили согласно стандартной методики (Богатырева, 2010; Белая, Тихомиров, 2013). В экспериментальном блоке по определению влияния объема емкости для замораживания на качество дефростированных клеток использовали разные объемы пробирок Эппендорфа – 0,5 мл, 0,75 мл, 1,5 мл и 2 мл, а также проводили замораживание в виде гранул 45 и 130 мкл. При криоконсервации семенной жидкости в виде пленок использовали металлические (из алюминия) и пластиковые (полимерное стекловолокно (фиберглас) с покрытием из поливинилхлорида) сетки. При определении возможности замораживания сперматозоидов без криопротектора посредством высушивания, каплю семенной жидкости помещали на органическое стекло, делали мазок, сушили в термостате, далее замораживали со скоростью 150°C/сек. Выходным показателем являлось время жизни сперматозоидов.

Оплодотворение дефростированной спермой русского осетра, замороженной в виде гранул объемом 45 мкл, хранившейся в жидком азоте 2 года, проводили в производственных условиях полусухим способом. Контролем служила икра, оплодотворенная по стандартной заводской технологии (нативной спермой). Инкубация проходила в аппарате «Осетр» в течение 6 дней. Поведенческие реакции предличинок, личинок и молоди оценивали в тесте «открытое поле» (А.с. 1814201; Витвицкая и др., 1990; Никоноров, Витвицкая, 1993). В качестве раздражителей применяли свет, освещенностью 20 лк (P1), низкочастотный прямоугольный сигнал (20 Гц) (P2), свет, освещенностью 100 лк (P3), высокочастотный прямоугольный сигнал (300 Гц) (P4) и виброакустический раздражитель (P5).

Значимость различий устанавливали по t-критерию Стьюдента (Ивантер, Коросов, 2011) и F-критерию Фишера (Фишер, 1954).

В процессе экспериментальных работ проведено 400 опытов по исследованию кристаллообразования и определению объема внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб, 300 опытов по изменению объема эндоцеллюлярного протектора в криозащитной среде, 600 опытов по исследованию влияния объема замораживаемого материала на выживаемость клеток после дефростации, 120 опытов по применению альтернативных способов подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию, оплодотворение дефростированной спермой в производственных условиях партии яйцеклеток (2250 шт. икринок), 60 опытов по оценке поведенческих реакций предличинок, личинок и молоди, полученных с помощью дефростированных репродуктивных клеток самцов рыб.

Глава 3. ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК РЫБ

3.1 Исследование кристаллообразования жидкостей и определение объема внутриклеточной воды в сперматозоидах рыб

3.1.1 Кристаллообразование биологических жидкостей

Установлено, что различные по составу растворы при снижении температуры образуют разные по форме и размерам кристаллы. При замораживании полостной жидкости и протоплазмы наблюдали явное отличие кристаллов свободной и связанной внутриклеточной воды.

3.1.2 Выделение свободной воды в сперматозоидах рыб

При выделении свободной внутриклеточной воды наименьшие объемы отмечены у представителей семейства осетровых. У представителей семейства карповых наибольшие объемы выделены у белого амура, наименьшее – у разных пород карпа – разбросанночешуйчатого и чешуйчатого. Белорыбица занимает промежуточное положение. Уровень оводненности репродуктивных клеток самцов речного окуня (семейство окуневые) приближен к спермиям белого амура. Спермии костистых рыб устроены более сложно (Дроздов, Иванков, 1999; Mattei, 1991; Jamieson, 1991; 1999; 2009), с большим числом органелл, что и объясняет большое содержание внутриклеточной воды.

Сводные экспериментальные данные по объемам свободной воды в протоплазме спермиев рыб представлены на рисунке 2.

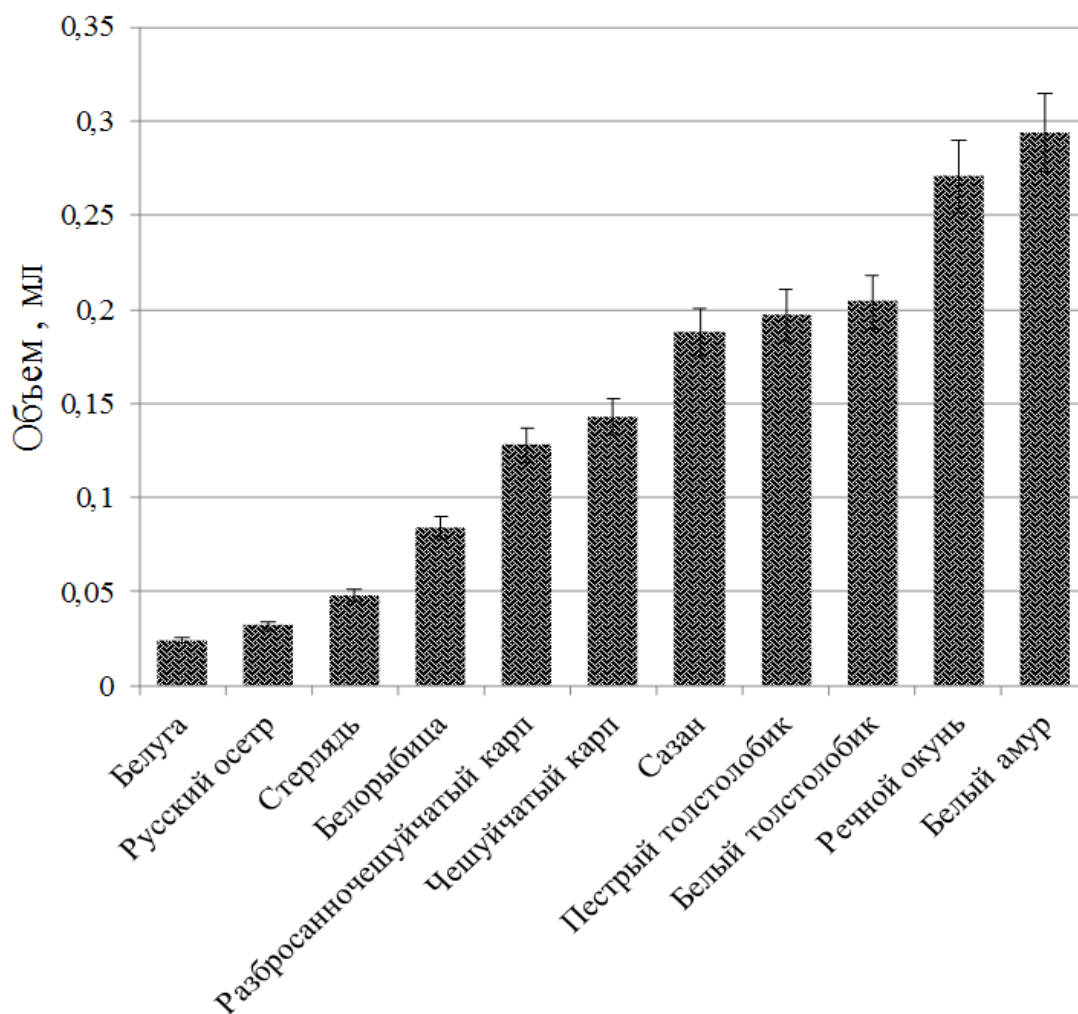


Рисунок 2 – Объем свободной воды в 1 мл спермы рыб

3.2 Изменение объема эндоцеллюлярного протектора в криозащитной среде в зависимости от объема внутриклеточной воды в сперматозоидах

В криозащитной среде, включающей многокомпонентный физиологический раствор, сахарозу, маннит, диметилсульфоксид (ДМСО) и желток куриного яйца, на основании полученных данных о содержании свободной внутриклеточной воды, было скорректировано содержание ДМСО (для сперматозоидов белуги его количество составило 3%, для русского осетра – 4%, для стерляди – 5%, для белорыбицы – 8 %).

На рисунке 3 представлены результаты экспериментов по корректировке содержания эндоцеллюлярного протектора в составе криозащитных сред для осетровых видов рыб и белорыбицы.

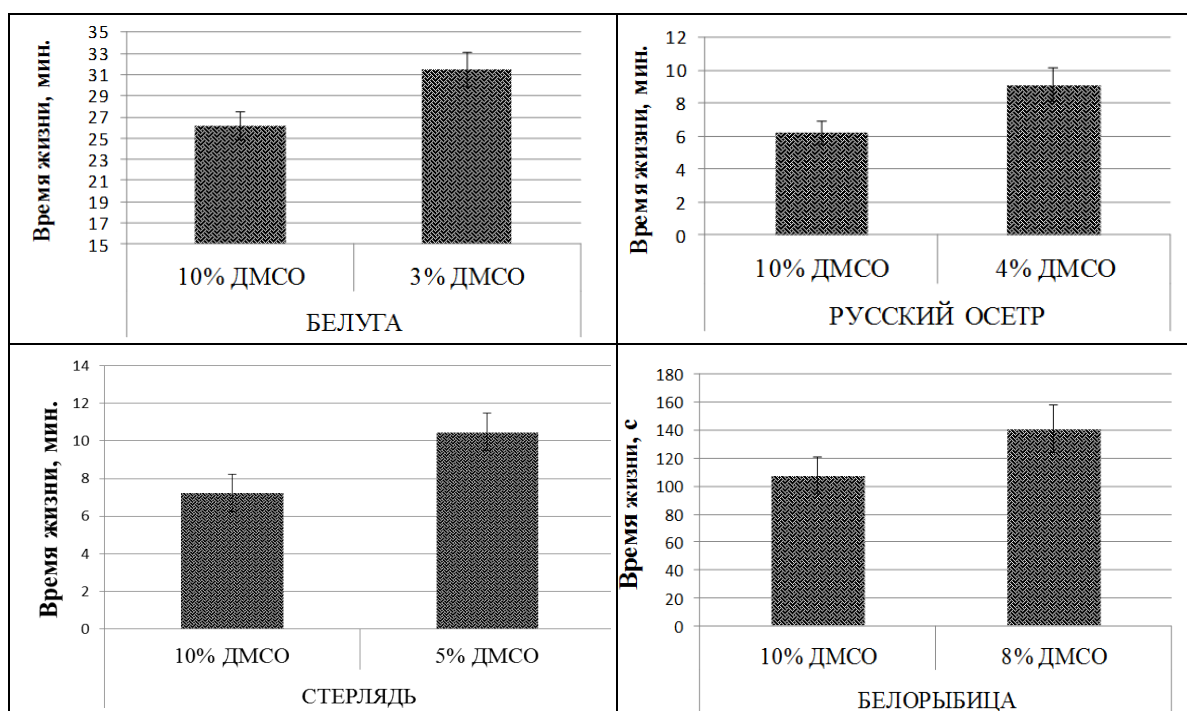


Рисунок 3 – Время жизни сперматозоидов рыб после дефростации
Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,05$

Установлена эффективность снижения объемов отравляющих веществ в составе криозащитной среды, что в свою очередь уменьшило токсическое действие последней на объект и привело к повышению времени жизни дефростированных клеток у белуги на 20,23%, у русского осетра – на 47,33%, у стерляди – на 45%, у белорыбицы – 30,56%.

3.3 Исследование влияния объема замораживаемого материала на выживаемость репродуктивных клеток рыб после дефростации

При криоконсервации семенной жидкости в пробирках Эппендорфа разного объема продолжительность жизни клеток уменьшалась обратно пропорционально объему замораживаемого материала (рисунок 4). Это связано с тем, что объект небольшой вместимости имеет меньший температурный градиент, т.е. понижение температуры в образце во время замораживания происходит более равномерно, по сравнению с контейнерами больших объемов, в которых клет-

ки, расположенные в разных точках замораживаемого образца, охлаждаются с существенно различающимися скоростями.

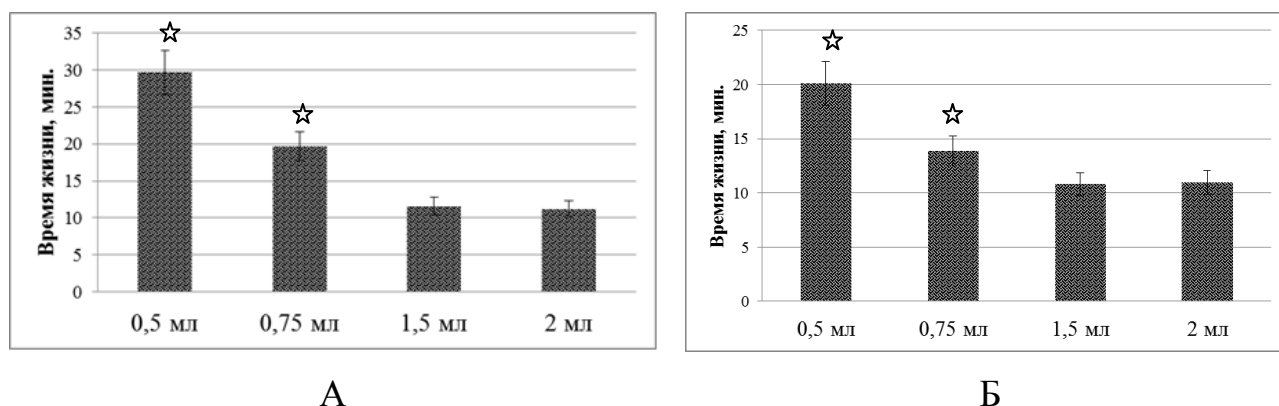


Рисунок 4 - Зависимость времени жизни сперматозоидов от объема контейнера для замораживания

(А - сибирский осетр ленской популяции; Б – русский осетр)

Примечание: * - различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,05$

Аналогичная картина происходит и при оттаивании ампул. Дефростация образцов меньшего объема происходит быстрее, т.е. и разброс скоростей при размораживании минимален. В больших пробирках распределение температуры при размораживании происходит неравномерно: содержимое ампулы, находящееся ближе к периферии уже имеет жидкую фракцию, в то время как «сердцевина» образца еще не растаяла.

Результаты замораживания репродуктивных клеток самцов русского осетра и белорыбицы на фторопластовой пластине в виде гранул объемом 45 мкл и 130 мкл представлены на рисунке 5.

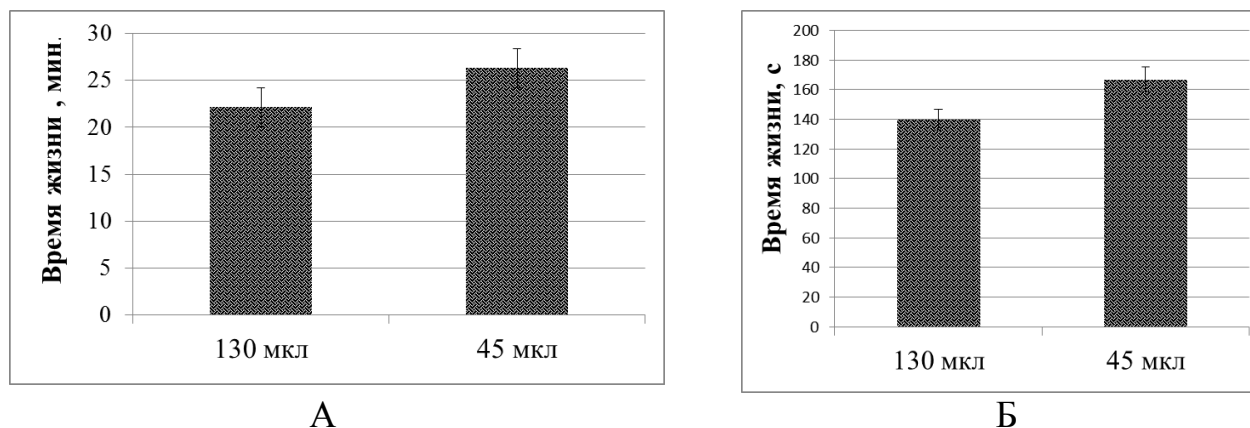


Рисунок 5 – Выживаемость сперматозоидов при замораживании на фторопластовой пластине в виде гранул (А – русский осетр, Б – белорыбица)

При анализе времени жизни спермиев русского осетра вновь прослеживается тенденция к увеличению выживаемости клеток при уменьшении объема криоконсервируемого материала. При замораживании в гранулах 45 мкл время жизни клеток составило $26,3 \pm 2,1$ мин., что в 1,2 раза больше, чем в 130 мкл гранулах ($22,1 \pm 1,9$ мин.) и в 1,3 раза больше, чем в 0,5 мл ампуле ($20,1 \pm 2,6$ мин.).

Аналогичные результаты получены при замораживании на фторопластовой пластине семенной жидкости белорыбицы (рисунок 5Б) – в грануле объемом 45 мкл выявлена лучшая выживаемость сперматозоидов.

Таким образом, с увеличением объема замораживаемого образца сохранность замороженных-оттаянных репродуктивных клеток рыб снижается. Установлена обратная зависимость между объемом замораживаемого материала и выживаемостью дефростированной спермы.

3.4 Альтернативные способы подготовки сперматозоидов рыб к замораживанию

В настоящее время совершенствование методов низкотемпературного консервирования идет путем оптимизации существующих методов, применения комбинированных методов, а также поиска новых подходов к переводу клеток в состояние покоя. Такие разработки открывают новые перспективы консервации биоматериалов как для разработки фундаментальных основ, так и для практического применения в целях воспроизводства.

Была исследована возможность замораживания семенной жидкости осетровых рыб в виде «тонкой пленки» на сетках, изготовленных из разных материалов, т.к. при нанесении семенной жидкости на каркас сетки образуется тонкая пленка и возможен эффект витрификации (стеклования). Анализ двигательной активности сперматозоидов после дефростации показал эффективность применения данного способа подготовки семенной жидкости к низкотемпературному консервированию. Время жизни во всех опытных образцах составило больше 14 минут, что свидетельствует о пригодности заморожено-оттаянных репродуктивных клеток для рыбоводных целей (рисунок 6).

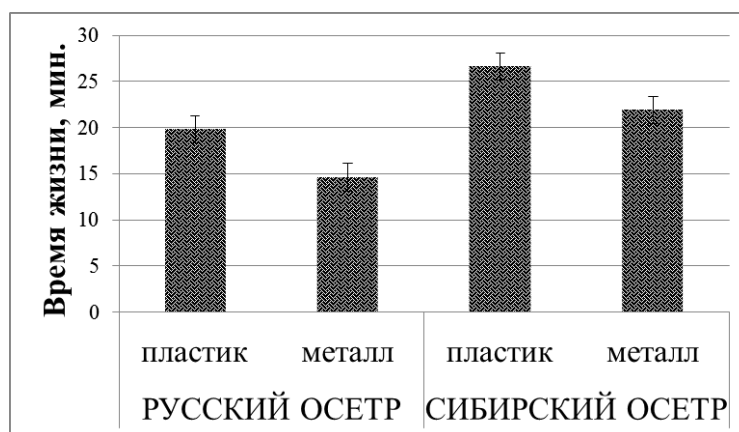


Рисунок 6 – Время жизни сперматозоидов при замораживании на сетках из разных материалов

При замораживании спермы на пластиковых сетках продолжительность жизни репродуктивных клеток самцов оказалась наибольшей, однако статистически значимых различий между использованием пластиковых и металлических сеток не было выявлено ни у русского осетра ($t_{кр.} = 1,83$), ни у сибирского осетра ленокской популяции ($t_{кр.} = 1,62$).

Анализ результатов работ по высушиванию мазка спермы в термостате выявил следующую закономерность – чем меньше температура, при которой сушились образцы, тем больше активность спермиев после их активации водой, не зависимо от времени нахождения в термостате. Наибольшее время жизни спермиев отмечено при высушивании 5-6 мин. при температуре 20°C. После размораживания и активации препаратов, при среднем времени жизни – 41 ± 5 с наблюдали колебательные движения у 20% спермиев, подтверждая, что при селективном действии низких температур выживают наиболее жизнеспособные спермии. Видимо, предварительное обезвоживание клеток вызвало структурные повреждения основной массы спермиев, связанные с дегидратацией. Данный способ подготовки клеток к криоконсервации требует доработки и совершенствования, но факт получения жизнеспособных сперматозоидов свидетельствует о возможности применения данной методики.

Глава 4. Получение жизнеспособных особей из криоконсервированной спермы русского осетра

Оплодотворение нативной икры репродуктивными клетками самцов, хранившимися в жидком азоте – завершающий этап, подтверждающий эффективность разработанной методики.

4.1 Оплодотворение нативной икры дефростированной спермой

При оплодотворении икры нативной и дефростированной спермой получены следующие результаты. Процент оплодотворения в опытной партии составил 50%, в контрольной – 80%. Смертность за период подращивания в опытных и контрольных партиях существенно между собой не различалась и составила 7 и 5%, соответственно. В таблице 1 представлены размерно-массовые характеристики подращиваемой молоди.

Таблица 1 – Морфометрические показатели предличинок, личинок и молоди русского осетра

Возраст	Масса, мг		Длина, мм	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1 день (предличинка)	8,9 ± 0,28*	10,5 ± 0,22*	12,3 ± 0,21*	14,2 ± 0,2*
8 дней (личинка)	38,2 ± 0,55*	45,0 ± 0,30*	20,7 ± 0,21	21,4 ± 0,34
15 дней (молодь)	43,8 ± 0,33*	47,5 ± 0,33*	24,0 ± 0,15*	25,2 ± 0,13*

Примечание: различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,001$

Экземпляры, полученные с применением размороженной спермы, при анализе морфометрических показателей имели преимущество, по сравнению с молодь, полученной по традиционной технологии.

4.2 Оценка поведенческих реакций предличинок, личинок и молоди, полученных с помощью дефростированных репродуктивных клеток самцов рыб

Результаты тестирования предличинок, личинок и молоди русского осетра, полученных с применением криоконсервированной и нативной спермы представлены на рисунке 7.

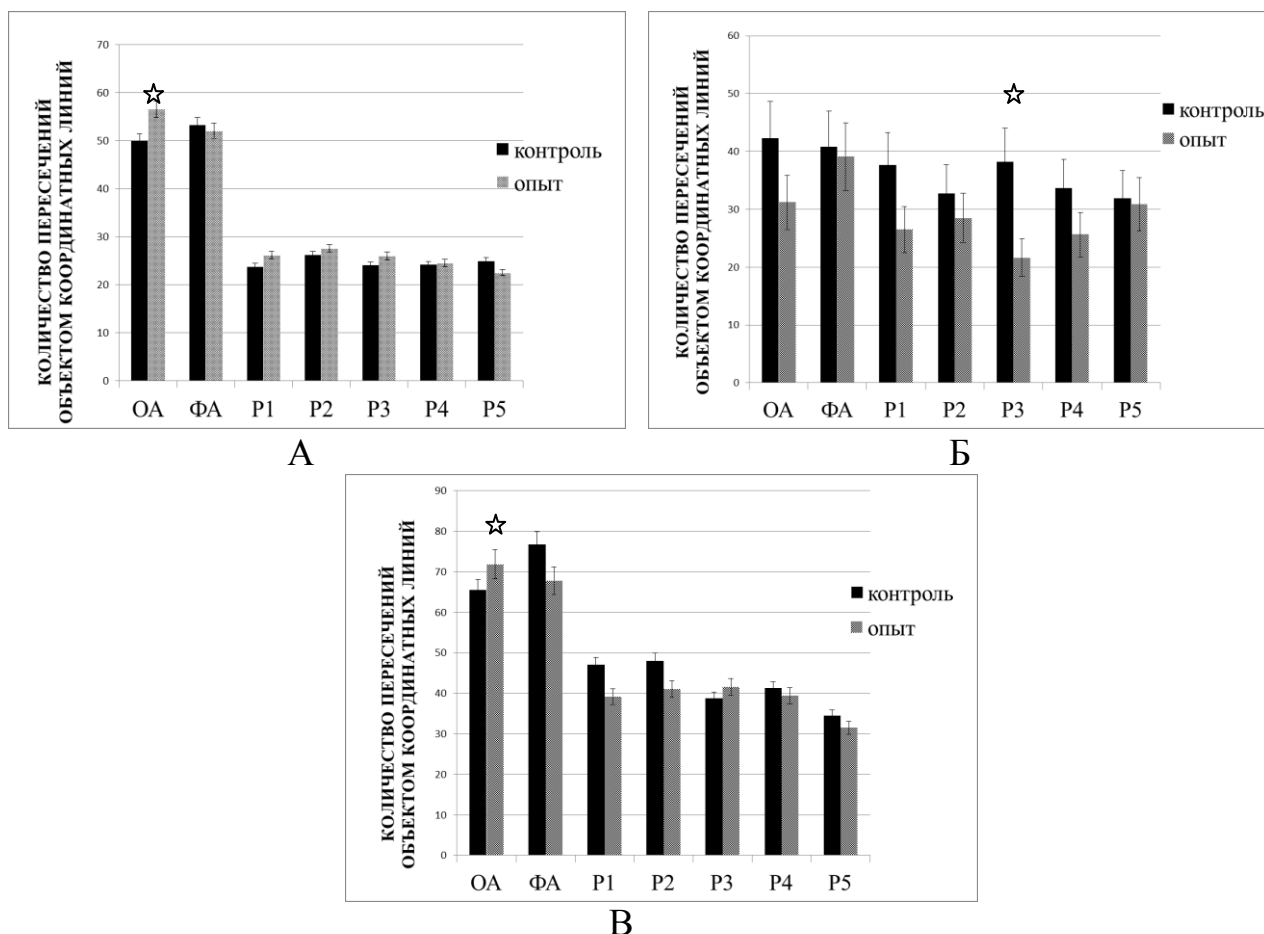


Рисунок 7 – Ответные реакции русского осетра в тесте «открытое поле»

А – предличинки, Б – личинки, В - молодь

Примечание: * - различия достоверны при уровне значимости $\alpha=0,05$

Особи обеих партий адекватно реагировали на предложенные раздражители классической реакцией затаивания.

Полученное крио-потомство оказалось жизнеспособным и по реактивности центральной нервной системы и рецепторного комплекса иногда превосходило контрольную партию. Небольшая разница в развитии предличинок, личинок и молоди рыб в опытной и контрольной партиях может быть следствием разницы в криоустойчивости субпопуляций замораживаемых клеток (Beirão et al., 2011). Однако при оценке совокупности реакций особей, полученных по традиционной технологии и с использованием дефростированной спермы, различий между группами не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе научных исследований выявлено различие в кристаллообразовании свободной и связанной внутриклеточной воды. Установлено различное содержание свободной воды у представителей разных семейств рыб. На основании полученных данных, скорректировано количество протектора проникающего действия в криозащитных средах для осетровых рыб и белорыбицы, что в свою очередь уменьшило токсическое действие последней на объект и привело к повышению времени жизни дефростированных клеток у белуги на 20,23%, у русского осетра – на 47,33%, у стерляди – на 45%, у белорыбицы – 30,56%. Полученные результаты позволяют рекомендовать корректировку концентрации проникающих протекторов в криозащитном растворе в зависимости от количества внутриклеточной воды для повышения выживаемости репродуктивных клеток рыб после двойного температурного шока.

Исследовано влияние объема замораживаемого материала на выживаемость сперматозоидов после дефростации, как одного из способов повышения устойчивости клеток к процедуре криоконсервирования, эффект которых дополнял бы защитное действие криопротекторов. При криоконсервации семенной жидкости в пробирках Эппендорфа продолжительность жизни дефростированных спермиев уменьшалась обратно пропорционально объему замораживаемого материала. При криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб при высоких скоростях замораживания на фторопластовой пластине в гранулах 45 мкл время жизни спермиев русского осетра увеличилось в 1,2 раза, чем в 130 мкл гранулах и в 1,3 раза по сравнению с 0,5 мл ампулой Эппендорфа. Полученные результаты позволяют сделать вывод о преимущественном использовании меньшего объема при низкотемпературном консервировании спермы рыб.

Показана эффективность замораживания семенной жидкости на сетках в виде тонкой пленки. Время жизни сперматозоидов осетровых видов рыб во всех опытных образцах составило больше 14 мин. При подготовке к замораживанию репродуктивных клеток самцов белорыбицы путем высушивания мазка

спермы в термостате, среднее время жизни клеток после дефростации составило 41 ± 5 с.

При оплодотворении в производственных условиях икры дефростированной спермой русского осетра, замороженной в виде гранул объемом 45 мкл, хранившейся 2 года в жидком азоте, процент оплодотворения составил в опыте 50%, в контроле – 80%. Полученное крио-потомство оказалось жизнеспособным. Более того, рыбы, полученные с применением криоспермы, при анализе морфометрических показателей имели небольшое преимущество, по сравнению с особями, полученными по традиционной технологии. По совокупности реакций предличинок, личинок и молоди, полученных по классической технологии и с использованием дефростированной спермы, различий не выявлено.

Таким образом, проведенные исследования по совершенствованию процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб показали преимущества предлагаемых приемов и могут быть рекомендованы для использования в производственных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Различные по составу растворы образуют при глубокой заморозке разные по форме и размерам кристаллы. При замораживании биологических жидкостей (полостная жидкость и протоплазма) наблюдали отличие кристаллов свободной и связанной внутриклеточной воды.

2. Установлено различное содержание свободной внутриклеточной воды у представителей разных семейств рыб. Наименьшее ее содержание у представителей семейства осетровых, наибольшее – у карповых. Белорыбица занимает промежуточное положение.

3. Показана эффективность снижения объемов протектора проникающего действия в составе криозащитной среды, что в свою очередь уменьшило токсическое действие последней на объект и привело к повышению времени жизни дефростированных клеток у белуги на 20,23%, у русского осетра – на 47,33%, у стерляди – на 45%, у белорыбицы – на 30,56%.

4. Установлена обратная зависимость между объемом замораживаемого материала и выживаемостью дефростированной спермы. С увеличением объема образца сохранность замороженных-оттаянных клеток снижается.

5. Показана эффективность замораживания семенной жидкости на сетках в виде тонкой пленки. Время жизни сперматозоидов осетровых рыб во всех опытных образцах составило больше 14 мин. При замораживании обезвоженных в термостате образцов спермиев среднее время жизни клеток после дефростации составило 41 ± 5 с, что свидетельствует о необходимости продолжения исследований в данном направлении.

6. При получении жизнеспособных особей с использованием дефростированной спермы, хранившейся 2 года в жидком азоте, процент оплодотворения в опытной партии составил 50%, в контрольной – 80%. Рыбы, полученные с применением криоспермы, при анализе морфометрических показателей имели преимущество, по сравнению с особями, полученными по традиционной технологии.

7. При оценке совокупности реакций предличинок, личинок и молоди, полученных по классической технологии и с использованием криоконсервированной спермы, различий не выявлено.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При приготовлении криозащитных сред рекомендуется добавлять криопротектор проникающего действия: для семенной жидкости белуги – 3%, для русского осетра – 4%, для стерляди – 5%, для белорыбицы – 8%.

2. При проведении процедуры замораживания рекомендуется использовать наименьший объем замораживаемого материала.

3. При заготовке репродуктивных клеток в промышленных объемах для длительного хранения в криобанке рекомендуется использовать фторопластовую пластину.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

Публикации в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ

1. Тихомиров, А.М. Разработка криозащитных сред для низкотемпературного консервирования сперматозоидов белорыбицы (*Stenodus leucichthys* *Güldenstädti*, 1772) в целях сохранения генофонда / А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева, **А.А. Красильникова** // Вестник АГТУ. Серия Рыбное хозяйство. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2011. – № 1. – С. 58-62.
2. **Красильникова, А.А.** Объем замораживаемого образца как один из факторов выживаемости сперматозоидов осетровых видов рыб при криоконсервации / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров // Естественные науки. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2014. – № 2 (47). – С. 62-69.
3. **Krasilnikova, A.A.** Alternative methods of preparation of fish sperm to freeze at ultra-high values of cooling rate / **A.A. Krasilnikova**, А.М. Tikhomirov // Вестник АГТУ. Серия Рыбное хозяйство. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2014. – № 2. – С. 72-78.
4. **Красильникова, А.А.** Корреляция объемов внутриклеточной жидкости сперматозоидов и эндоцеллюлярного протектора в криозащитных средах для осетровых рыб / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров // Естественные науки. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2015. – № 3 (52). – С. 96-102.
5. Пат. 2540598 Российская Федерация. МПК А 01 N, 1/02 (2006.01). С2. Способ снижения низкотемпературного скачка растворов криопротекторов / Андреев А.А., Садикова Д.Г., Пономарева Е.Н., **Красильникова А.А.**, Белая М.М.; заявитель и патентообладатель Астраханский государственный технический университет (ФГБОУ ВПО АГТУ), Южный научный центр Российской академии наук (ФГБУН ЮНЦ РАН). – № 2013125414/13; заявл. 31.05.2013; опубл. 10.02.2015, Бюл. № 4. – 5 с.

Публикации в других изданиях

6. **Красильникова, А.А.** Разработка методики низкотемпературного консервирования спермиев белорыбицы (*Stenodus leucichthys* *Güldenstädti*, 1772) / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева // Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения: материалы Международной научной конференции (27 – 30 сентября 2011 г., Ростов-на-Дону). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 66-67.
7. **Красильникова, А.А.** Подбор среды для криоконсервации сперматозоидов белорыбицы / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева // VII Ежегодная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: Тезисы докладов (11-25 апреля 2011 г., г. Ростов-на-Дону). – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 27.
8. **Красильникова, А.А.** Низкотемпературное консервирование сперматозоидов белорыбицы / **А.А. Красильникова** // II региональная конференция молодых ученых и инноваторов («Инно-Каспий»): сб. статей по итогам конф. (18-22 апреля 2011, Астрахань) / под общей редакцией Н.Т. Берберовой, А.В.

Котельникова; Астрахан. гос. техн. ун-т. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2011. – С. 38-41.

9. **Красильникова, А.А.** Создание криопротектора для спермы белорыбицы / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева // VII Ежегодная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: Тезисы докладов (11-25 апреля 2011 г., г. Ростов-на-Дону). – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 28-29.

10. **Красильникова, А.А.** Оптимизация методики криоконсервации спермиев рыб / **А.А. Красильникова** // VIII Ежегодная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: Тезисы докладов (11-26 апреля 2012 г., г. Ростов-на-Дону). – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2012. – С. 55-56.

11. **Красильникова, А.А.** Создание низкотемпературного банка по сохранению репродуктивного материала редких и исчезающих видов рыб Южного Федерального округа / **А.А. Красильникова** // Инновационные технологии в управлении, образовании, промышленности «АСТИНТЕХ-2012». «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («У.М.Н.И.К.»): материалы Международной научной конференции (10-12 мая 2012 г.) / М.Ф. Булатов. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2012. – С. 75-77.

12. Матишов, Г.Г. Справочник рыбовода. Инновационные технологии аквакультуры юга России / Г.Г. Матишов, С.В. Пономарев, Ю.М. Баканева, Н.В. Болонина, Ю.Н. Грозеску, А.А. Кокоза, В.М. Распопов, Е.Н. Пономарева, Ю.В. Федоровых, Л.Ю. Лагуткина, М.М. Белая, А.А. Бахарева, **А.А. Красильникова**. – Ростов-на-Дону, Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – 224 с.

13. Пономарева, Е.Н. Криоконсервация репродуктивного материала рыб: разработки Южного научного центра Российской академии наук / Е.Н. Пономарева, А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева, **А.А. Красильникова** // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона: материалы VII Международной конференции. Керчь, 20-23 июня 2012 г. – Керчь: ЮгНИРО, 2012. – Т. 2. – С. 55-58.

14. **Красильникова, А.А.** Опыт замораживания семенной жидкости осетровых рыб в виде «пленки» / **А.А. Красильникова** // IX Ежегодная научная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: тезисы докладов конференции (г. Ростов-на-Дону, 11-24 апр. 2013г.). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – С.38-39.

15. **Красильникова, А.А.** Эффективность криоконсервации сперматозоидов рыб при замораживании в контейнерах разных объемов / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров, Е.Н. Пономарева // Биология – наука XXI века: 17-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21-26 апреля 2013 г.). Сборник тезисов. 2013. – С. 344.

16. **Красильникова, А.А.** Влияние объемов замораживания на выживаемость дефростированной спермы осетровых рыб / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров // Интенсивная аквакультура на современном этапе развития: Научно-практическая конференция с международным участием. г. Махачкала, 1-4 октября 2013 г. – Махачкала: «Эко-пресс», 2013. – С. 69-73.

17. **Красильникова, А.А.** Универсальная методика подбора проникающих криопротекторов для разных видов рыб / **А.А. Красильникова** // X Ежегодная научная конференция студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН: тезисы докладов (г. Ростов-на-Дону, 14–29 апреля 2014 г.). – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2014. – С. 25-26.
18. **Красильникова, А.А.** Зависимость концентрации проникающих криопротекторов от объемов «свободной» воды в спермиях различных видов рыб / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. Материалы Международной заочной научно-практической конференции (24 марта 2014 г. Россия – Украина). – Сыктывкар, 2014. – С. 50-54.
19. **Красильникова, А.А.** Эффективность низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток осетровых рыб при различных скоростях замораживания и оттаивания / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров // Рациональное использование и сохранение водных биоресурсов: материалы Международной научной конференции, приуроченной к пятилетию открытия базовой кафедры ЮНЦ РАН «Технические средства аквакультуры» в ДГТУ (г. Ростов-на-Дону, 17–18 февраля 2014 г.). – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2014. – С. 118-120.
20. **Красильникова, А.А.** Совершенствование криобиологических подходов с целью повышения резистентности сперматозоидов рыб при низкотемпературном консервировании / **А.А. Красильникова**, А.М. Тихомиров // Материалы Международн. науч. конф. «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей» г. Ростов-на-Дону 1-3 октября 2014. – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2014. – С. 193-196.
21. **Krasilnikova, A.A.** Universal method of selecting a concentration of penetrating cryoprotectants during cryopreservation of fish sperm / **A.A. Krasilnikova**, А.М. Tikhomirov // World Aquaculture 2015. Jeju, Korea, May 26 - 30, 2015. Meeting Abstract. – P. 341.