

## Кріоконсервування сперматозоїдів коропа (*Cyprinus carpio*, L. 1758), отриманих у переднерестовий період

К.І. Буцький, А.Ю. Пуговкін

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

## Cryopreservation of Carp Spermatozoa (*Cyprinus carpio*, L. 1758) Procured in Pre-Spawning Period

K.I. Butskiy, A.Yu. Puhovkin

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

Відтворення коропа в заводських умовах дозволяє керувати підготовкою плідників та отримувати гамети до початку природного нересту. Це дає можливість раніше зариблювати ставки та підвищувати рибпродуктивність, збільшуючи вегетаційний період цього літку, особливо у роки з пізньою та холодною весною. За таких умов гормональна стимуляція дозрівання плідників та отримання гамет можуть відбуватися за температури води, нижчої нерестового порогу, яка для коропа становить у середньому 16–18°C. На сьогодні маловивченим лишається питання кріостійкості гамет, отриманих за таких умов. Мета роботи – визначення частоти виживання після кріоконсервування сперматозоїдів коропа, отриманих у переднерестовий період.

Для дослідження було відібрано самців коропа масою 1–1,3 кг, яких витримували у басейні за температури води 13°C. Для стимуляції дозрівання гамет плідникам вводили внутрішньом'язово: гіпофіз сазана (2,5 мг/кг маси тіла) (Г) або суміш сурфакону (1 мкг/кг) та метоклопраміду (5 мг/кг) (СМ). Сперму отримували через 40 та 80 годин після ін'єкції та кріоконсервували за стандартною методикою [Є.Ф. Копейка, 1986]. Концентрацію сперматозоїдів визначали за допомогою камери Горяєва та фотоелектроколориметра за попередньо побудованою градуальною кривою. Рухливість сперматозоїдів оцінювали за допомогою світлового мікроскопа. Для оцінки статистичної значущості даних використовували критерій Стьюдента.

Експеримент проводили в два етапи: 1 – зі спермою, отриманою через 40 годин після стимуляції; 2 – зі спермою, отриманою через 80 годин після стимуляції. Рухливість нативної сперми на етапі 1 складала (73 ± 4) (СМ) і (77 ± 5) (Г); на етапі 2 – (72 ± 8) (СМ) і (73 ± 5)% (Г). Після розведення сперми кріозахисним середовищем рухливість сперматозоїдів знизилася до (56 ± 7)% (СМ) і (60 ± 5)% (Г) та до (70 ± 9)% (СМ) і (63 ± 4) % (Г) відповідно. Рухливість сперми після кріоконсервування для етапу 1 становила (13 ± 5)% (СМ) і (15 ± 4)% (Г), для етапу 2 – (17 ± 6)% (СМ) і (23 ± 8)% (Г). Концентрація сперматозоїдів дорівнювала (20,93 ± 1,56) млрд/мл (СМ) і (25,22 ± 2,78) млрд/мл (Г) та (43,69 ± 10,84) (СМ) і (43,89 ± 4,38) млрд/мл (Г) відповідно.

Концентрація сперматозоїдів, отриманих через 80 годин після стимуляції, незалежно від введеної речовини (Г та СМ) збільшилася майже в 2 рази порівняно з етапом 1, що свідчить про більш дозрілу сперму. Кращий результат кріоконсервування цієї сперми порівняно зі спермою, отриманою через 40 годин після стимуляції, обумовлений меншим ушкодженням клітин на етапі їх розведення кріозахисним середовищем.

Результати проведеного експерименту свідчать про те, що кріостійкість сперматозоїдів коропа залежить від ступеня їх зрілості.

The industrial reproduction of carps enables managing the breeder preparing and obtaining the gametes before the natural spawning period occurs. This allows to stock ponds with fish in earlier terms and augmenting its productivity, thereby increasing the growing season. This advantage is particularly noticeable during the late and cold spring. In such a case, a hormonal stimulation of breeder maturation and gamete procurement can occur at a water temperature below the spawning threshold, which is an average of 16–18°C for carp. The knowledge about the cryostability of the gametes, procured under such conditions, remains unclear. The purpose of the work was to determine the survival rate of post-cryo carp spermatozoa procured in pre-spawning period.

For research, the male carps weighing 1–1.3 kg were selected, and kept in pool at 13°C. To stimulate the gamete maturation, the breeders were injected intramuscularly with following preparations: wild carp pituitary gland (P) (2.5 mg / kg body weight) or a mixture of surfagon (1 µg / kg) and metoclopramide (5 mg / kg) (SM). Semen was obtained 40 and 80 hrs after injection and cryopreserved according to the standard method [E.F. Kopeika, 1986]. The concentration of sperm was determined using a Goryaev, chamber and a photoelectric colorimeter based on a pre-built calibration curve. A sperm motility level was evaluated visually with microscope. Student's t-test was used to assess the statistical significance of the data.

The experiment was conducted in two stages: at the stage 1 we used the sperm obtained 40 hours after stimulation, the sperm procured after 80 hours was the stage 2. The fresh sperm motility was 73 ± 4% (SM) and 77 ± 5% (P) at the stage 1, and 72 ± 8% (SM) and 73 ± 5% (P) at the stage 2. After sperm dilution with cryoprotective medium, the sperm motility decreased down to 56 ± 7% (SM) and 60 ± 5% (P) and down to 70 ± 9% (SM) and 63 ± 4% (P), respectively. The sperm motility after cryopreservation was 13 ± 5% (SM) and 15 ± 4% (P) for the stage 1 and 17 ± 6% (SM) and 23 ± 8% (P) for the stage 2. The sperm concentration was 20.93 ± 1.56 bln/ml (SM) and 25.22 ± 2.78 bln/ml (P) and 43.69 ± 10.84 bln/ml (SM) and 43.89 ± 4.38 bln/ml (P), respectively.

The concentration of sperm procured after 80-hour stimulation, regardless of the substance introduced (P and SM), was almost twice increased as compared with the stage 1, and thereby indicated more mature sperm. Higher result of such sperm cryopreservation in comparison with that, procured after 40-hour stimulation was stipulated by less damage of cells at the stage of their dilution with cryoprotective medium. These findings testify to the dependence of carp spermatozoa cryoresistance on their maturity degree.

