

CONTRIBUȚII ÎN VEDEREA SPORIRII FECUNDITĂȚII ICREI ȘI EMBRIOGENEZEI TIMPURII ÎN CONDIȚIILE CONSERVĂRII SPERMEI DE CRAP PRIN REFRIGERARE

VERA GRANACI

Universitatea Agrară de Stat din Moldova

Abstract. The influence of antioxidants FH₂ and FH₃ on the biological integrity of the conserved by refrigeration (0-4°C) *Ciprinus carpio* semen material was studied. The addition of antioxidants in the milieu was contributed to increase of the frozen spermatozoids survival longevity with 33,33%, fecundity ability with 13,44 per cent (in case of FH₂) and with 10,30 per cent (in situation of FH₃) and yearly embryogenesis with 3,56 per cent and 2,34 per cent, respectively given with control variant.

Key words: antioxidants, fish semen material, biological integrity, conservation, refrigeration.

INTRODUCERE

Fecundația artificială pe scară industrială la crap și la alte ciprinide este folosită în exploatarea de producție și prezintă interes pentru obținerea icrelor fecundate de la reproducători cunoscuți, în lucrările de metisări, hibridări, în cazuri de împropățare a sîngelui, în aplicarea consangvinității, în cazul când se experimentează capacitatea de aclimatizare etc. Însă în activitatea întreprinderilor pentru reproducerea peștilor prin metoda fecundației *in vitro*, pot interveni unele dificultăți, condiționate de asincronia maturării și recoltării produselor sexuale (ovocitele și spermatozoizii). În alte cazuri materialul seminal recoltat de la masculii reproducători este de o calitate proastă, fapt care poate compromite operațiunea de fecundare. În multe situații se adună cantități suplimentare de spermă de o bună calitate în timp ce lipsesc ovocitele (icrele).

În legătură cu cele menționate prezintă interes perfecționarea procedeelelor de conservare și explorarea posibilităților de sporire a însușirilor biologice ale materialului spermatic în condiții *in vitro*, măsuri care ar asigura funcționarea normală a fluxului tehnologic de producere a puețului și utilizarea rațională a reproducătorilor genetic superiori., fapt care a argumentat studiul influenței antioxidantilor FH-2 și FH-3 asupra supraviețuirii și abilității fecundative a materialului seminal refrigerat (0 - +4°C), și embriogenezei timpurii la crap în condițiile fertilizării *in vitro*.

MATERIAL ȘI METODĂ

Stimularea gametogenezei la reproducători s-a realizat prin injecții intramusculare în partea dorsală, între începutul înotătoarei dorsale și linia laterală, în profunzime la cca 2 cm a soluției hipofizare.

Pentru evaluarea influenței antioxidantilor s-a pregătit soluția de bază în raport 0,5 mg. antioxidant + 10 ml mediu de bază, după care s-au preparat variante de mediu în ordinea descreșterii concentrației.

Pentru diluarea și conservarea materialului seminal s-a utilizat mediul sintetic (Nauc și colab., 1994) cu următoarea compoziție: tris-oximetil-aminometan – 3 g; 1,3 – butilenglicol - 15 ml; gălbenuș de ou de găină - 12,0 ml; apă bidistilată - 100 ml; pH-ul a fost condiționat la nivelul 8,0 cu soluție 0,1N acid tartric. Gradul de diluție a fost 1 : 2 = material seminal : mediu sintetic. Conservarea materialului seminal s-a efectuat în camera frigiderului la temperatura +4°C. Pentru a menține temperatura constantă flaconașele cu material seminal diluat s-au amplasat în pahare cu gheață acoperită cu vată.

Materialul seminal de la masculi a fost colectat prin masarea regiunii abdominale către orificiul genital. În același fel se procedează și cu femelele în vederea recoltării ovocitelor (icrei).

Examenul materialului seminal după recoltare s-a efectuat vizual la microscop după inițierea mobilității spermilor, în rezultatul diluării spermei cu soluții activatoare, conform metodelor general acceptate.

Pentru a studia influența antioxidanților asupra fecundității icrei și dezvoltării embrionare timpurii probe de spermă de la 3 femele au fost fecundate cu sperma obținută de la un crap-reproducător diluată cu cea mai bună variantă stabilită anterior conform indicilor de supraviețuire și probe paralele cu sperma diluată cu mediul de bază. Aprecierea rezultatelor fecundității s-a efectuat la 9 ore după fecundare.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Păstrarea spermei la temperaturi scăzute a fost descrisă pentru prima dată de Ovseanikov în anul 1886 (citată de Pojoga, 1997), fiind de atunci utilizată în piscicultură. Unul dintre factorii nocivi care intervin în condițiile conservării *in vitro* a materialului seminal și conduce la diminuarea supraviețuirii spermilor este procesul de peroxidare a lipidelor (Veronica Nauc, 1996; Tulcan, 2005). În normă peroxidarea lipidelor în sistemele vii are loc echilibrat și este menținută la un nivel stabil datorită proprietăților antioxidante proprii. Astfel, în condiții obișnuite sistemul antioxidant propriu al obiectelor biologice este suficient pentru menținerea proceselor de peroxidare a lipidelor în limitele stabilite de inofensivitate pentru structurile celulare. Însă, acest echilibru este relativ destabilizat în urma scăderii temperaturii până la nivele critice. În vederea atenuării acestui fapt, am experimentat proprietățile a doi compuși cu proprietăți antioxidante din clasa fenozanilor – FH₂ și FH₃ în componența medului de crioprotecție. Întrucât un factor important în fecundația icrelor este mobilitatea și viabilitatea spermilor, cunoașterea dinamicii acestor indici are importanță practică la efectuarea fecundației *in vitro* a icrelor. Rezultatele obținute sînt expuse în tabelul 1.

Tabelul 1

Influența preparatului FH₂ și FH₃ asupra mobilității spermilor în materialul seminal diluat

Varianta	Concentrația substanței experimentate în mediul de conservare, mg%	Mobilitatea, puncte	
		FH ₂	FH ₃
1(martor)	-	6,83±1,14	6,83±0,35
2	1,0	6,17±0,74	6,05±0,20
3	0,5	6,67±0,20	6,69±0,20
4	0,25	7,17±0,74	7,00±0,00
5	0,125	6,87±0,41	6,33±0,20
6	0,0625	6,57±0,41	5,50±0,35

Analiza datelor obținute (tab. 1.) denotă că la includerea compușilor experimentați în componența diluantului pentru materialul seminal de crap se observă o tendință de diferențiere a mobilității în funcție de concentrația preparatului în mediu chiar după diluare. Astfel, în mediul de bază (varianta 1) imediat după diluție se constată o tendință de diminuare a mobilității spermilor de la 7 puncte în sperma brută la 6,83 puncte în cea diluată. Concentrația antioxidantului de 1,0 mg% în mediu produce o diminuare bruscă comparativ cu martorul. Odată cu reducerea concentrației antioxidantului în mediul diluant mobilitatea spermilor se ameliorează. Cele mai bune rezultate se observă în cazul preparatului FH₂ (varianta 4) la nivelul concentrației de 0,25 mg%. La același nivel al concentrației preparatului FH₃,

mibilitatea este mai mică comparativ cu FH₂. La diminuarea concentrației antioxidantilor în continuare pînă la 0,0625 mg% mobilitatea spermilor începe să se micșoreze.

Cunoașterea duratei de supraviețuire a spermizilor are importanță practică la efectuarea fecundației *in vitro* a icrei și condiționează eficiența aplicării practice a acestei tehnologii în carpicultură (Veronica Nauc și colab., 1993; 1996; Nauc V. și colab., 1994).

Datele din literatura de specialitate denotă că la temperatura scăzută (0 - 4°C) crește durata păstrării spermilor, ceea ce permite conservarea spermei în vederea reproducerii artificiale a peștilor (Veronica Nauc și colab., 1992; Păcală și colab., 2006).

În conformitate cu datele din literatură prezentate, am continuat studiul nostru referitor la durata de supraviețuire a spermei diluată cu variante de medii ce conțineau diferite concentrații de FH₂ și FH₃ comparativ cu lotul martor (tab. 2. și tab. 3).

Din rezultatele prezentate (tab. 2) urmează durata maximă de supraviețuire a fost în varianta 4 și 5 experimentală, la valoarea concentrației de 0,25 – 0,125 mg%, și a constituit 96 ore. Datele stabilite prevalează varianta martor cu 33,33%. Atît în cazul concentrațiilor mai mari cît și mai mici a preparatului durata de supraviețuire fie este similară cu rezultatele stabilite în variantul martor, fie că este mai mică.

Conform datelor stabilite anterior cu privire la mobilitatea spermilor după diluție cît și privitor la supraviețuirea celulelor seminale concentrația optimală a preparatului FH₂ în mediul pentru diluarea materialului seminal de crap constituie 0,25 – 0,125 mg%.

Tabelul 2

Influența antioxidantului FH₂ asupra supraviețuirii materialului spermatic refrigerat

Concentrația FH ₂ în diluant, mg%	Mobilitatea spermilor după:					
	diluare	2,0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Mediul de bază	6,83±1,14	5,01±0,14	3,11±0,23	1,50±0,09	0,5±	-
1,0	6,17±0,74	5,11±0,08	2,09±0,12	0,55±0,18	-	-
0,5	6,67±0,20	5,13±0,17	3,33±0,17	1,50±0,11	0,53±0,013	-
0,25	7,17±0,74	6,50±0,11	4,25±0,18	2,50±0,11	1,50±0,09	0,53±0,11
0,125	6,87±0,41	5,11±0,12	3,25±0,20	2,25±0,18	1,0±0,00	0,5±0,00
0,0625	6,57±0,41	4,08±0,08	2,23±0,11	1,0±0,00	0,55±0,15	-

Conform datelor prezentate (tab. 2) durata maximă de supraviețuire a fost în varianta 4 și 5 experimentală, la valoarea concentrației de 0,25 – 0,125 mg%, și a constituit 96 ore. Datele stabilite prevalează varianta martor cu 33,33%. Atît în cazul concentrațiilor mai mari cît și mai mici a preparatului durata de supraviețuire fie este similară cu rezultatele stabilite în variantul martor, fie că este mai mică.

Conform datelor stabilite anterior cu privire la mobilitatea spermilor după diluție cît și privitor la supraviețuirea celulelor seminale concentrația optimală a preparatului FH₂ în mediul pentru diluarea materialului seminal de crap constituie 0,25 – 0,125 mg%.

Tabelul 3

Influența antioxidantului FH₃ asupra supraviețuirii materialului spermatic refrigerat

Concentrația FH ₃ în diluant, mg%	Mobilitatea spermilor după:					
	diluare	2,0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Mediul de bază	6,83±0,35	5,01±0,14	3,11±0,23	1,50±0,09	0,5±	-
1,0	6,05±0,20	5,01±0,18	2,49±0,20	0,35±0,11	-	-
0,5	6,69±0,20	5,48±0,27	2,33±0,07	1,57±0,21	0,33±0,19	-
0,25	7,00±0,00	6,00±0,00	4,15±0,13	2,53±0,21	1,33±0,19	-
0,125	6,33±0,20	5,00±0,00	3,33±0,20	2,05±0,14	1,53±0,12	0,5±0,00
0,0625	5,50±0,35	3,90±0,18	2,00±0,00	1,33±0,05	0,55±0,15	-

Datele din tabelul 3. demonstrează că sperma a supraviețuit cel mai bine în varianta 5, în care concentrația preparatului a constituit 0,125 mg%. Astfel concentrația optimală a preparatului FH₃ constituie 0,125 mg%.

Luînd în considerație datele din literatura de specialitate cu privire la factorii care concură la realizarea fecundației pentru a confirma rolul determinant al calității celulelor seminale în procesul fecundației icrei am evaluat acest indice, folosind pentru fertilizare sperma diluată și refrigerată cu variantele optimele 4 și 5 de mediu în care mobilitatea și supraviețuirea au prevalat lotul martor. Datele sînt prezentate în figura 1.

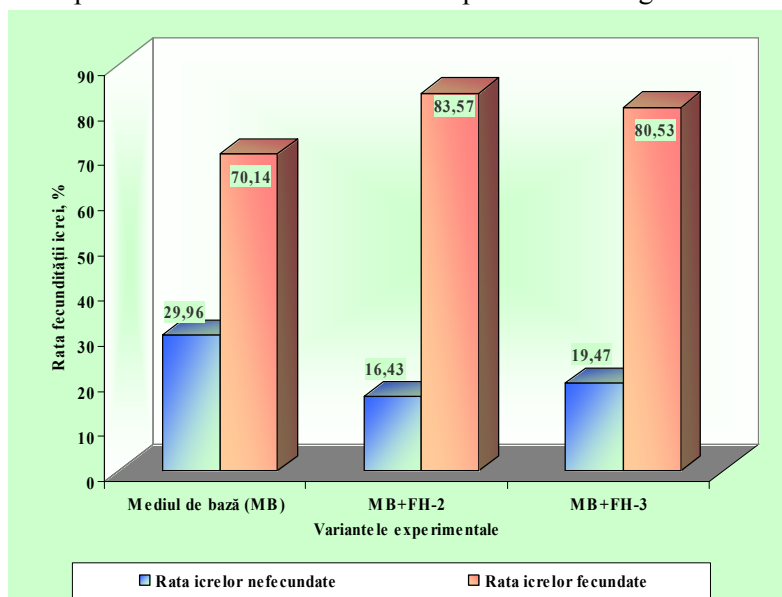


Fig. 1. Influența mediului asupra abilității fecundative a spermilor conservați prin refrigerare.

Analiza rezultatelor experimentale obținute relevă că suplimentarea mediului de diluare cu antioxidantul FH₂ a influențat esențial abilitatea de fecundare a spermilor diluați și conservați în condițiile refrigerării. Astfel, rata fecundității icrei în lotul martor a constituit 70,14% cedînd rezultatelor stabilite în lotului experimental II cu 13,43%, în care fecunditatea a fost de 83,57%.

În cazul celui de-al doilea antioxidant FH₃ rezultatele obținute privitor la abilitatea de fecundativă a spermilor diluați și refrigerați în prezența acestuia în mediu, este mai mare comparativ cu datele stabilite în lotul martor cu 10,39%. Comparată cu lotul II (FH-2) abilitatea fecundativă a spermilor este mai mică cu 3,04%.

Datele experimentale cu privire la rata fecundității icrei în varianta martor și cele experimentale relevă că introducerea preparatului FH₂ și FH₃ în mediul pentru diluarea și conservarea prin refrigerare a materialului seminal de crap a contribuit la sporirea menținerii mobilității și supraviețuirii spermilor în condițiile refrigerării. Astfel putem menționa că procesul de fecundare la pești fiind de durată foarte scurtă (până la una minută) este mult influențat de calitatea celulelor seminale.

Testarea dezvoltării embrionare timpurii a fost efectuată la stadiile de segmentare (morulă timpurie blastocist compact), gastrulare și eclozare a embrionilor timpurii. Datele obținute sînt prezentate în figura 2.

Razultatele experimentale (fig. 2) cu privire la dezvoltarea embrionară timpurie în variantele martor și experimentale în care materialul seminal a fost diluat cu mediu îmbogățit cu antioxidanți relevă că în perioada fecundare – eclozare (ruperea zonei pelucide și ieșirea embrionului din ea, vârsta 2-3 zile) se manifestă o tendință de supraviețuire a embrionilor mai mare în loturile experimentale.

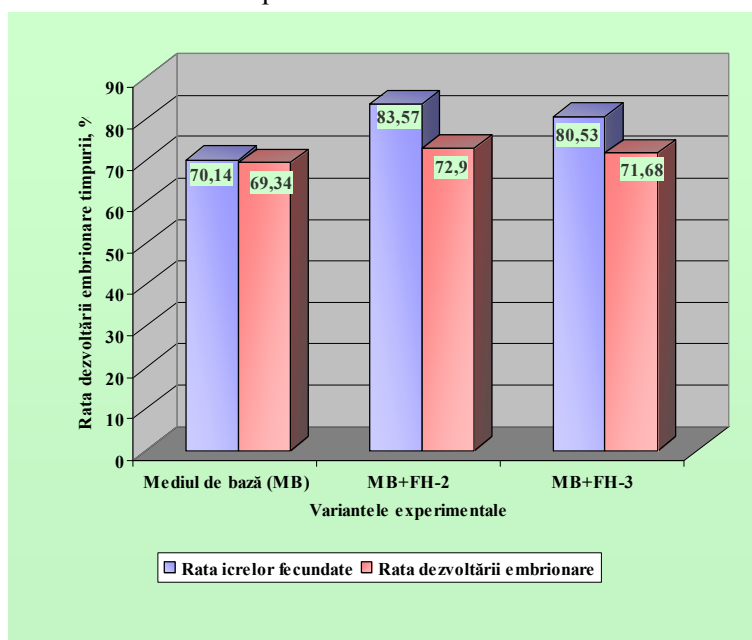


Fig. 5. Dezvoltarea embrionară timpurie în variantele experimentale și martor.

CONCLUZII

1. Includerea antioxidanților (FH₂ și FH₃) în componența mediului pentru diluarea materialului seminal de crap a contribuit la sporirea mobilității și duratei de supraviețuire a spermilor în condițiile conservării prin refrigerare (0- 4°C). 2. La înșămînțarea artificială a icrei cu material seminal diluat și refrigerat rata fecundității icrei a fost superioară în variantele experimentale care conțineau antioxidanți (FH₂ și FH₃) cu 13,42% și 10,39%, respectiv, comparativ cu mediul de bază. 3. Includerea antioxidanților în componența mediului pentru diluarea materialului seminal de crap a contribuit la majorarea moderată a menținerii viabilității embrionilor timpurii.

BIBLIOGRAFIE

1. Ladoși, Ioan. Embriotehologie animală. – Cluj-Napoca: Ed. Victor Melenti, 1999. – 200 p.
2. Nauc, Veronica. Crioconservarea spermei de crap (Ciprinus carpio L.). Autoref. tezei de doctor în biologie. – Chișinău: Secția poligrafie operativă a USM, 1996. – 20 p.
3. Nauc Veronica, Toderaș I., Boronciuc Gh. Contribuții asupra cercetării criobiologiei gameților de crap. – Ann. Conf. Șt. USM. – Chișinău, 1993. – p. 273.
4. Păcală, Nicolae, Bogdan Corbuli, Marian Dumitrescu. Biologia reproducerii peștilor. Timișoara: Edit. Parton, 2006. – 225 p.
5. Pojoga, I. Piscicultura modernă în apele interioare. – București: Cereș, 1977. – 365 p.
6. Tulcan Camelia Impactul crioconservării asupra sistemelor antioxidante ale celulei spermatice la specia canină. – Revista Politică Științei și Scientometrie. – Revista Politică Științei și Scientometrie- Număr special, 2005. – ISSN. – p- 1283 – 1293.
7. Наук, В.А., Борончук, Г.В., Гранач, В.Г., Наук В.В., Крепис О.И. Среда для криоконсервирования спермы рыб. Патент №2010513, Российская Федерация, 1994.