

---

# ФІЗІОЛОГІЯ ТА БІОХІМІЯ РИБ

---

УДК 597.443:621.59

## ДО ПИТАННЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ АМЕРИКАНСЬКОГО ВЕСЛОНОСА

В.Ю. Філіпов, О.М. Третяк, Л.П. Бучацький

Інститут рибного господарства НААН України

---

*Досліджено можливість кріоконсервації сперми американського веслоноса *Polyodon spathula* (Walbaum) за допомогою розробленого дегідратаційно-вітрифікаційного методу. Визначено умови кріоконсервації біооб'єкта: підбрано середовища, кріоконсерванти та режими заморожування-відтавання. Збереженість розморожених статевих клітин за початкової активності нативних сперматозоїдів 95% становила 60%.*

---

В умовах сучасної аквакультури України значні перспективи для розвитку вітчизняного осетрівництва належать рибогосподарському освоєнню унікального представника ряду осетроподібних із фільтраційним типом живлення північноамериканського інтродуцента — веслоноса *Polyodon spathula* (Walb.) [1].

Зважаючи на певну генетичну однорідність та обмежену кількість вихідного племінного матеріалу веслоноса в рибогосподарських підприємствах України набула актуальності проблема підтримання необхідного рівня гетерогенності інтродуцента в сформованих ремонтно-маточних стадах. Комплексність та достатня ефективність виконання цих робіт має забезпечуватись завдяки поєднанню результатів молекулярно-генетичних досліджень із можливостями сучасних кріобіотехнологій, що дають змогу накопичувати в спермосховищах кріоконсервовані гамети веслоноса різного походження із подальшим спрямованим використанням збереженого генетичного матеріалу для практичних потреб рибницьких господарств та в процесі селекційно-племінної роботи [2].

Практикуються різні способи низькотемпературної консервації сперми риб, які залежно від низки технологічних параметрів самого процесу кріоконсервації, виду риб, приладного забезпечення, фізіологічного стану плідників об'єктів риборозведення та особливостей їх під-

готовки до відбору статевих продуктів, фізико-хімічного режиму водного середовища під час підготовчого утримання риб, а також під впливом інших чинників, можуть обумовлювати істотні відмінності показників збереженості деконсервованого біологічного матеріалу.

Результати експериментів із використанням різних способів кріоконсервації сперми веслоноса характеризуються широким діапазоном коливань ключових показників: рівень збереженості розморожених сперматозоїдів в успішно проведених дослідженнях перебував у межах 50–90% за тривалості зберігання ними здатності до поступального руху після активації у воді в межах 3–7 хв [3–5]. Проте в окремих дослідженнях використовували обмежену кількість експериментального матеріалу, що не сприяло об'єктивній оцінці результатів робіт.

Мета наших досліджень — апробація розробленого дегідратаційно-вітрифікаційного методу на спермі веслоноса з орієнтовною оцінкою складових частин та етапів процесу кріоконсервації біооб'єкта: температурної адаптації, відбору кріоконсерванта, режиму заморожування-відтавання, способу кріоконсервації в цілому.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на базі повносистемного ставового господарства

“Гірський Тікич” ВАТ “Черкасирибгосп”, яке мало статус племрепродуктора з розведення веслоноса.

Для відбору статевих продуктів використовували вирощених у ставах різновікових повторно дозрілих риб. З метою стимулювання дозрівання гонад плідників застосовували лютеїнізуючий релізінг гормон LHRH-A. Відбір сперми від плідників здійснювали за допомогою катетера.

Підготовку та розбавлення сперми кріозахисним середовищем, підібраним за стандартними методиками, виконували відповідно до відомих інструкцій [3, 6]. Одержані еякуляти охолоджували до 5°C, до охолоджених еякулятів за безперервного перемішування додавали охоложене до тієї самої температури захисне середовище в об'ємному співвідношенні 1:1. Розбавлені у захисному середовищі охолоджені еякуляти еквілібрували в холодильнику за температури 5°C впродовж 0,5 год. Спермодози розфасовували в пластикові контейнери (пробірки) місткістю 2 мл, які герметизували і переносили на лід. Після закінчення процесу формування спермодоз пробірки протирали насухо і встановлювали в диск заморозувача.

Реєстрацію зміни температури зразків біооб'єкта проводили хромель-копелевою термопарою за допомогою мультиметра ЕС890G фірми МАХТЕСН із точністю до 0,2°C.

Застосовували метод пасивного охолодження термоблока в горловині Дьюара [6, 7]. Програма заморожування біооб'єкта полягала у послідовних етапах, а саме: в температурному діапазоні від 5–15°C швидкість охолодження становила 2–3°C/хв, на наступному етапі зі зниженням температури від –15 до –70°C швидкість охолодження зростала до 15–20°C /хв, після чого пробірки з біооб'єктом повільно занурювали у рідкий азот.

Відтавання контейнерів із замороженим біооб'єктом відбувалось у водяній бані за температури 40°C. Для активації розмороженої сперми використовували ставову воду. Збереженість сперматозоїдів перевіряли в кожній пробі не менше 3 разів і обчислювали середні значення. Оцінку рухливості активованих у воді

сперматозоїдів на різних технологічних етапах проводили за допомогою візуального методу з використанням оптичної апаратури зі збільшенням біооб'єкта в 20 разів [3, 6].

У процесі виконання експериментів вивчали фізико-хімічні параметри водного середовища рибницьких місткостей із плідниками веслоноса за загальноприйнятими у рибництві методиками.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Температура води під час проведення робіт з одержання статевих продуктів від самців веслоноса змінювалась у межах 14,0–15,1°C за відсутності зниження значень цього показника в період витримування риб після виконання гормональної ін'єкції. Вміст розчиненого у воді кисню перебував на рівні 5,2–5,7 мг/л. Водневий показник — рН води коливався в межах 8,4–8,7. Інші хімічні показники води в період гормональної стимуляції та витримування плідників не перевищували межі рибницьких норм. Отже, умови середовища в процесі проведення рибницьких робіт слід загалом оцінити як сприятливі для ефективного дозрівання статевих продуктів плідників веслоноса.

Маса тіла використаних у експериментах повторно дозрілих самців веслоноса становила 10,42–13,98 кг. Плідники позитивно відреагували на одноразове введення препарату LHRH-A, проте у найбільшій за масою риби показник об'єму еякуляту був найменшим (19 мл) і таким, що істотно поступається середнім багаторічним значенням для цієї розмірно-вікової групи самців веслоноса. У двох інших риб об'єм одержаного еякуляту характеризувався близькими значеннями і становив 37 та 39 мл. Відбір сперми від риб здійснювали через 28–29 год після проведення гормональної ін'єкції. Зціджування сперми за допомогою катетера давало змогу одержувати чистий біологічний матеріал без домішок сечі та фекалій риб. У окремих плідників основна маса сперматозоїдів зберігала здатність до активного поступального руху у воді в середньому близько 4,5–6 хв. Найменше значення цього показника зареєстровано у самця веслоноса

з незвично малим об'ємом одержаного еякуляту, що разом та зважаючи на інші показники якості нативної сперми можна розцінювати як ознаку недостатнього рівня репродуктивної підготовленості цієї риби (табл. 1).

Загальноприйнятим критерієм оцінки ефективності кріоконсервації статевих клітин тварин є показник збереженості деконсервованого біологічного матеріалу. Збереженість оцінюється як відношення кількості рухливих сперматозоїдів до їх загальної чисельності. На цей показник значною мірою впливають початкова якість біооб'єкта, склад і спосіб застосування кріоконсерванта, обраний режим заморожування-відтавання. При послідовній реалізації процесу кріоконсервації біооб'єкта зазвичай відбувається зниження його збереженості на кожному з технологічних етапів.

Ефективність приготовленого середовища визначали через співвідношення показників збереженості розбавленої сперми до нативної. Для оцінки ефективності технологічного етапу температурної адаптації порівнювали показники збере-

женості сперматозоїдів після 30-хвилинного витримування за температури 5°C у середовищі, що не містить кріопротектор, зі збереженістю нативної розбавленої сперми до її охолодження. Ефективність застосування кріопротектора оцінювали через співвідношення збереженостей сперматозоїдів у середовищі з кріопротектором і без нього. Ефективність вибору режиму заморожування визначали за допомогою зіставлення показників збереженості сперматозоїдів до і після заморожування. Ефективність обраного способу кріоконсервації обчислювали через співвідношення збереженостей деконсервованих сперматозоїдів до нативних (табл. 2).

Як видно з табл. 2, збереженість деконсервованих сперматозоїдів за початкової їх активності у нативній спермі 95% становила 60%. При цьому ефективність процесу кріоконсервації в цілому перебувала на рівні 63,2%. Тривалість зберігання розмороженими сперматозоїдами здатності до активного поступального руху після активації у воді в різних пробах становила близько 3,5–4,5 хв. Наве-

Таблиця 1. Деякі показники, що характеризують якість нативної сперми плідників веслоноса

Номер плідника	Маса риб, кг	Об'єм еякуляту, мл	pH сперми	Осмотичний тиск плазми, мОсмол/кг	Частка рухливих сперматозоїдів у воді, %	Період активного руху сперматозоїдів, хв
1	12,13	37	8,0	420	95	5,0
2	10,42	39	7,9	450	95	6,0
3	13,88	19	8,2	390	85	4,5

Таблиця 2. Середні показники збереженості біооб'єкта (S) та ефективності окремих технологічних етапів процесу кріоконсервації сперми веслоноса (W)

Технологічний етап	Показник стану біооб'єкта з початковою часткою активної рухливості сперматозоїдів 95%	
	S, %	W, %
Температурна адаптація	89	93,7
Застосування кріопротектора	78	87,6
Процес заморожування	60	76,9
Процес кріоконсервації в цілому	60	63,2

Примітка. Систематична похибка вимірювання становить 5%.

дені дані вказують на досить позитивний ефект застосованого дегідратаційно-вітрифікаційного методу та підібраних режимів кріоконсервації сперми американського веслоноса.

Необхідність оцінки ефективності реалізації складових етапів процесу кріоконсервації зумовлена потребою зниження втрат збереженості біооб'єкта на кожному з аналізованих етапів. Це можливо за умов отримання нативних сперматозоїдів із більш високими значеннями початкової активності і за допомогою підвищення ефективності кожної з ланок у технологічному ланцюзі за оптимізації параметрів, які впливають на збереженість біооб'єкта у циклі низькотемпературної кріоконсервації.

Слід відмітити, що всі використані в експериментах самці веслоноса характеризувались відносно невисокими репродуктивними показниками за об'ємом еякуляту та тривалістю зберігання нативними сперматозоїдами здатності до активного поступального руху після активації у воді (див. табл. 1). З наукової літератури ж відомо, що максимальні значення цих показників у веслоноса можуть досягати відповідно понад 80 мл та до 10 хв [4, 5]. Певний негативний вплив на якість статевих продуктів використаних у експериментах риб, цілком імовірно, могли справляти умови нагулу в період формування гонад, активність та обрані дозування гормонального препарату, запізнала реакція на гормональну ін'єкцію, індивідуальні функціональні особливості відтворювальної системи плідників та деякі інші чинники. Вказані обставини можна оцінити як такі, що здатні опосередковано зменшувати ефективність кожного з відомих способів кріоконсервації сперми риб.

Слід зауважити, що, зважаючи на відносну генетичну однорідність племінного матеріалу веслоноса в господарствах України, вважаємо за доцільне провести серію завезень кріоконсервованої сперми

цього інтродуцента з інших європейських країн за умов наявності там плідників іншого походження. Актуальним завданням залишається і додаткове завезення в Україну замороженої сперми веслоноса, одержаної в аквацентрах США. Зазначені заходи, підкріплені відповідним генетичним контролем, сприятимуть формуванню високопродуктивних племінних стад веслоноса на тривалу перспективу.

Зважаючи на високу вірогідність використання в роботах зі штучного відтворення веслоноса збережених у замороженому вигляді гамет існує необхідність комплексного вивчення якості одержаних у такий спосіб нащадків риб, що вочевидь сприятиме підвищенню ефективності селекційно-племінної роботи з цим перспективним об'єктом товарного осетрівництва.

## ВИСНОВКИ

За результатами експериментів показано можливість використання дегідратаційно-вітрифікаційного методу кріоконсервації в роботах зі спермою веслоноса. Проаналізовано показники збереженості біооб'єкта та ефективності окремих технологічних етапів процесу кріоконсервації сперми цього представника осетроподібних риб. Збереженість деконсервованих сперматозоїдів за їх початкової активності в нативній спермі 95% становила до 60%. Тривалість зберігання розмороженими сперматозоїдами здатності до активного поступального руху у воді перебувала в межах 3,5–4,5 хв, що можна вважати задовільним результатом.

Позитивні показники за результатами експериментів з низькотемпературного зберігання гамет веслоноса є підставою для проведення завчасної спрямованої заготівлі та диференційованого використання накопиченого в спермосховищах генетичного матеріалу, що сприятиме підвищенню ефективності селекційно-племінної роботи з цим новим об'єктом осетрівництва.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Третяк О.М. Система науково обґрунтованого розвитку аквакультури веслоноса в Україні // Рибогосподарська наука України. — 2010. — № 2. — С. 3–25.
2. Третяк О.М. Рибницько-біологічні основи формування та експлуатації племінних стад веслоноса в умовах інтродукції // Рибогосподарська наука України. — 2009. — № 3. — С. 4–20.

3. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб. — М.: ВНИИПРХ, 1997. — 10 с.
4. Третьак О.М. Біотехнологічні аспекти відтворення веслоноса (*Polyodon spathula* (Walbaum)) в Україні // Рибогосподарська наука України. — 2008. — № 4. — С. 79–84.
5. Пат. 50896 Україна. Спосіб криоконсервації сперми американського веслоноса / І.І. Грициняк, М.В. Гринжівський, В.О. Черепнін, Є.Ф. Копейка, С.І. Дрокін. Опубл. 25.06.2010. — Бюл. № 12.
6. Горбунов Л.В., Бучацький Л.П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных: монография. — К., 2005. — 325 с.
7. Пат. 6417 Україна. Пристрій для криоконсервації біологічних об'єктів тваринного та рослинного походження / Л.В. Горбунов, В.І. Кабачний, Н.І. Горбунова, М.В. Гринжівський. Опубл. 16.05.2005. — Бюл. № 5.

### К ВОПРОСУ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ АМЕРИКАНСКОГО ВЕСЛОНОСА

В.Ю. Филиппов, А.М. Третьак, Л.П. Бучацкий

Исследована возможность криоконсервации спермы американського веслоноса *Polyodon spathula* (Walbaum) с помощью разработанного дегидратационно-витрификационного метода. Определены условия криоконсервации биообъекта: подобраны среды, криоконсерванты и режимы замораживания-оттаивания. Сохранность размороженных половых клеток при исходной активности нативных сперматозоидов 95% составляла 60%.

### TO THE QUESTION OF CRYOPRESERVATION OF SPERM OF THE AMERICAN PADDLEFISH

V. Filipov, O. Tretyak, L. Buchatsky

There has been studied a possibility of cryopreservation of sperm of the American paddlefish *Polyodon spathula* (Walbaum) with the aid of the developed dehydration-vitrification method. Conditions of the bioobject cryopreservation were determined: media, cryopreservatives, and freezing-thawing regimes were selected. Preservation of defrosted gametes at an initial activity of the native spermatozooids of 95% was 60%.

УДК 576.858.13

## ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ КЛІТИН НИРОК КОРОПА, УРАЖЕНИХ СуНВ-3

М.І. Майстренко, Н.М. Матвієнко, Л.П.Бучацький

Інститут рибного господарства НААН України

*Представлено результати електронно-мікроскопічного дослідження репродукції герпесвірусу кої в нирках коропа (*Cyprinus carpio*). Отримані дані свідчать про подібність морфологічних змін у клітинах нирки коропа до змін, які притаманні вірусам герпесу інших тварин та людини.*

Вірус герпесу корошових риб СуНВ-3 спричиняє висококонтагіозну емерджентну інфекцію як у звичайного (*Cyprinus carpio*), так і у декоративного коропа кої.

Спалахи вірусної інфекції, зумовленої КНВ, у коропа реєструються весною і восени за температури води 18–26°C. Смертність риб від цієї інфекції в аквакультури сягає 80–90% [1]. Перші ознаки

хвороби проявляються у коропів через 5 днів після інфікування, ще через 2 дні після цього починається їх масова загибель. Через 10–12 днів після інфікування загибель риб досягає плато і цей рівень смертності зберігається ще 10–12 днів. До вірусу більш сприйнятливі мальки коропа віком 1–3 місяці, масою 2,5–6 г, ніж дорослі риби вагою понад 230 г. Хворі коропи перебувають біля поверхні води,