

БОЛЕЗНИ ВОДНЫХ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 639.3.09: 614.3

**АНАЛИЗ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И ОРГАНИЗАЦИЯ
ИХТИОПАТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА НА ПРЕДПРИЯТИЯХ
АКВАКУЛЬТУРЫ РОССИИ**

© 2012 г. П.П. Головин¹, Н.Н. Романова¹, Н.А. Головина², Л.Н. Юхименко¹

*1 – ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного
рыбного хозяйства», Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рыбное, 141821*

*2 – Дмитровский филиал ФГБОУ ВПО «Астраханского государственного технического
университета», Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рыбное, 141821*

Статья поступила в редакцию 20.04.2012 г.

Окончательный вариант 20.07.2012 г.

Дана аналитическая оценка эпизоотической ситуации сложившейся на рыбоводных предприятиях в регионах Российской Федерации, роли перевозок рыб в распространении заболеваний, их влияния на эффективность развития аквакультуры; представлена принципиальная схема современной системы организации ихтиопатологического мониторинга в рыбохозяйственной отрасли.

Ключевые слова: болезни, ихтиопатология, мониторинг, рыбы, рыбоводные хозяйства, эпизоотология

В системе Федерального агентства по рыболовству (Росрыболовства), находится 26 федеральных бюджетных государственных учреждений по рыболовству и сохранению водных биологических ресурсов, действует более 70 рыбоводных предприятий по воспроизводству ценных видов рыб, в том числе: 13 осетровых, 48 лососевых, по одному рыбзаводу для выращивания растительноядных и сиговых рыб, 5 смешанных и 3 группы НВХ (нерестово-выростных хозяйств) (Крайний, 2011). Кроме того, в Российской Федерации насчитывается около 1 400 рыбоводных предприятий (Калмыков, Белоусов, 2009), в число которых входят государственные, частные и фермерские хозяйства. Основной объем товарной рыбы в Российской Федерации (более 70%) представлен карпом, растительноядными рыбами, которых выращивают, преимущественно, прудовые рыбоводные предприятия, а также радужной форелью (около 20 тыс. т), основной объем которой получают в садковых хозяйствах Северо-Западного региона (Карелия, Ленинградская область), Западной Сибири и на Северном Кавказе, и осетровыми рыбами (ленский осетр и его гибриды с белугой и стерлядью, около 4-5 тыс. т), выращиваемыми в садково-бассейновых предприятиях на сбросных теплых водах энергетических объектов.

В последние два десятилетия в результате неоднократной реорганизации государственные структуры, ранее контролирующие эпизоотическую ситуацию в водоемах и рыбоводных хозяйствах (как в Минсельхозе РФ, так и в Росрыболовстве), были разрушены. В настоящее время контроль за эпизоотическим состоянием рыбоводных хозяйств возложен на Департамент ветеринарии Министерства сельского хозяйства и его региональные подразделения, в том числе и на диагностические межрегиональные центры (лаборатории), а также на Управление Россельхознадзора. Статистическая отчетная документация по болезням рыб обобщается и анализируется не в полном объеме и разрозненно. В связи с этим для ряда регионов страны информация по болезням рыб на

рыбохозяйственных предприятиях не соответствует действительности или отсутствует вообще.

Цель данной работы заключается в анализе эпизоотической ситуации и разработке предложений по организации современной системы ихтиопатологического мониторинга на предприятиях аквакультуры России.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В период с 2006 по 2011 гг. во ФГУП ВНИИПРХе выполнены мониторинговые исследования эпизоотического состояния рыбоводных предприятий различных регионов страны с применением классических методов ихтиопатологического исследования (Лабораторный..., 1983). Кроме того, при анализе данных были также использованы литературная база и результаты информационного поиска в глобальной сети Интернет на сайтах, содержащих информацию об эпизоотическом состоянии предприятий по воспроизводству водных биоресурсов и товарному выращиванию рыбы.

При разработке мер по оптимизации ихтиопатологического мониторинга и повышению его эффективности, схем мониторинговых исследований в основу был положен принцип использования современных способов диагностики болезней рыб и борьбы с ними как в отечественной, так и в мировой аквакультуре (Сборник инструкций..., 1998; Головин и др., 2005; Международное..., <http://www.edudic.ru/ves/1798>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным Международного эпизоотического бюро (МЭБ), мировая аквакультура по отдельным странам теряет от заболеваний гидробионтов в среднем от 6 до 20% продукции (более 3 млрд. долларов США) (Международное..., <http://www.edudic.ru/ves/1798>). Аналогичные потери (до 15-20%) имеют место и в аквакультуре России, где эпизоотическая ситуация по заболеваниям культивируемых рыб нестабильная и весьма напряженная.

За рубежом контроль за заболеваниями гидробионтов осуществляет Особая комиссия по водным животным при Международном эпизоотическом бюро (МЭБ). В список обязательно декларируемых в МЭБ болезней включено 13 заболеваний гидробионтов, в том числе для рыб - 5, для культивируемых моллюсков - 5 и 3 - для культивируемых ракообразных. Для рыб это: эпизоотический гемопозитический некроз, инфекционный гемопозитический некроз, вирусная болезнь симы, вирусная геморрагическая септицемия, весенняя виремия карпа. Кроме того, согласно классификации МЭБ к числу наиболее опасных заболеваний рыб отнесены герпесвирусная болезнь канального сома, вирусная энцефалопатия и ретинопатия, инфекционный некроз поджелудочной железы, инфекционная анемия атлантического лосося, иридовирусная болезнь красного пагра, иридовирусная болезнь белого осетра, эпизоотический язвенный синдром, бактериальная почечная болезнь, эдвардсиеллез канального сома, писцириккетсиоз атлантического лосося, гиродактилез лососевых, вызываемый *Gyrodactylus salaris* (European..., <http://www.fishpathogens.eu>).

В России перечень карантинных и особо опасных заболеваний рыб определен Приказом Департамента ветеринарии Минсельхоза РФ (Об утверждении..., [/www.mcx.ru/ministry...](http://www.mcx.ru/ministry...)) №173 от 29.09.2005 г., который, в соответствии

с действующим законодательством, зарегистрирован в Министерстве юстиции РФ как нормативно-правовой акт.

Согласно этому приказу в перечень особо опасных и карантинных заболеваний включено 13 болезней рыб: аэромоноз карпа, весенняя виремия карпа, некроз поджелудочной железы лососевых, бактериальная почечная болезнь лососевых, фурункулез лососевых, бранхиомикоз, гиродактилез, воспаление плавательного пузыря, миксобактериозы, филометроидоз, вирусная геморрагическая септицемия лососевых и инфекционный некроз гемопоэтической ткани, ботриоцефалез. Кроме этого, карантинные ограничения накладываются в случае возникновения новых опасных болезней, ранее не зарегистрированных на территории РФ (Приказ ..., 2006 <http://www.mcsx.ru/navigation /...>).

Проведенный нами анализ эпизоотической ситуации в России показал, что из этого списка в последние 5 лет на отечественных рыбоводных предприятиях наиболее широко распространен ботриоцефалез (в 17 регионах), аэромоноз и псевдомоноз (в 10 регионах), филометроидоз (в 4 регионах), воспаление плавательного пузыря (в 2 регионах) и весенняя виремия карпа (в 2 регионах). В 10 субъектах Российской Федерации в естественных водоемах сформировались природные очаги отдельных паразитарных и инфекционных заболеваний рыб. В прудовых и нерестово-выростных хозяйствах южных регионов страны - это лигулез, эргазилез, диплостомоз и аэромоноз. Вследствие этого на рыбоводных предприятиях, использующих эти водоемы в качестве водоисточника, периодически регистрируются вспышки вышеуказанных заболеваний.

Следует ожидать осложнения эпизоотической ситуации на осетровых рыбоводных предприятиях Нижнего Поволжья и Дона, где идет формирование маточных стад этих видов рыб и отработка интенсивных методов подращивания молоди для целей воспроизводства или выращивания товарной продукции. Для обеспечения эпизоотологического благополучия на таких предприятиях необходима своевременная диагностика и эффективные методы предупреждения, прежде всего, инфекционных заболеваний - вирусных и бактериальных, появление которых уже зарегистрировано в нескольких регионах России.

На водоемах Дальнего Востока это фурункулез лососевых рыб, периодически возникающий в хронической форме на основных нерестовых реках этого региона.

На Северо-Западе и других регионах России на форелевых и лососевых рыбоводных заводах выделены возбудители и зарегистрированы отдельные вспышки особо опасных вирусных инфекций (инфекционного некроза гемопоэтической ткани, вирусного некроза поджелудочной железы) (Рудакова, 2001, 2011; Shchelkunov et al. 2001; Завьялова и др., 2011).

В Карелии описан случай гиродактилеза форели, вызванного *Gyrodactylus salaricus*, особо опасного паразитарного заболевания регистрируемого в МЭБ (Евсеева и др., 2009) и представляющего серьезную угрозу для лососевых видов рыб.

В Центрально-Европейском и некоторых других регионах России и за рубежом (Казахстан, Финляндия) выявлены вспышки герпесвирусной болезни у осетровых рыб (Казарникова, Шестаковская, 2005; Щелкунов и др., 2007). Это заболевание обычно возникает и представляет серьезную проблему на осетровых предприятиях, где имеют место неблагоприятные (стрессовые) условия при подращивании молоди (переуплотненные посадки, наличие в поступающей воде

токсических веществ, неудовлетворительное качество используемых кормов). Нередко это заболевание осложняется бактериальной инфекцией – миксобактериозом.

В прудовых хозяйствах периодически возникают вспышки опасного грибкового заболевания карпа – бранхиомикоза. Против заболевания разработаны достаточно эффективные меры борьбы, но несвоевременная диагностика заболевания, и даже небольшая задержка с началом проведения лечебно-профилактических мер нередко приводят к высоким потерям. Эвтрофикация многих водоемов средней полосы европейской части России способствовала возникновению бранхиомикоза и у радужной форели при выращивании ее в садках на естественных водоемах.

Важнейшим фактором, влияющим на формирования эпизоотической ситуации в водоемах, является перевозка живой рыбы и других гидробионтов, как с целью акклиматизации, так и с целью товарного рыбоводства или спортивно-любительского рыболовства.

В настоящее время перевозка живой рыбы приняла массовый характер, причем не только внутри страны, но и из-за рубежа. Происходит завоз икры и рыбопосадочного материала форели из стран Западной Европы, декоративных рыб из Юго-Восточной Азии, Китая, Южной Америки. При этом должный контроль за эпизоотическим состоянием этих рыб, за соблюдением требуемых карантинных мероприятий не всегда выполняется по объективным и организационным причинам ведомственного характера. Следствие этого – появление вирусного инфекционного некроза гемопоэтической ткани (ИHN) лососевых рыб в Северо-Западном регионе страны, известных патогенных гельминтов – триенофорусы щук, а также опасных не только для рыб, но и для теплокровных животных и людей эустрангилиды европейского сома из южных регионов в водоемы средней полосы России. С декоративными рыбами в Россию завозятся новые штаммы паразитических простейших (*Costia necatrix*), бактерии (в т.ч. рода *Aeromonas*) и возбудители опасных вирусных инфекций (герпесвирус карпа кои) (Мышкин, Ражуков, 2012).

Поэтому для устойчивого функционирования и перспективного развития аквакультуры эпизоотическое благополучие рыбоводных предприятий и рыбопромысловых водоемов крайне важно. Для этого в стране необходимо восстановление ранее существовавшей в Минрыбхозе структуры, контролирующей эпизоотическое благополучие рыбоводных предприятий, организация системы ихтиопатологического мониторинга (СИМ).

Ихтиопатологический мониторинг, прежде всего, предполагает строго регламентированную периодичность проведения комплексных диагностических исследований на рыбоводных предприятиях в течение всего периода выращивания. Для их проведения подключаются сертифицированные ветеринарные лаборатории, а также специализированные лаборатории ветеринарных и рыбохозяйственных научно-исследовательских институтов с правом проведения диагностических исследований.

При этом проводимые исследования должны быть комплексными, включающие бактериологические, вирусологические, микологические, паразитологические и гидрохимические исследования, дополненные по необходимости качественными показателями водной среды и используемых кормов.

Центральным органом СИМ для управления мониторингом эпизоотического состояния рыбоводных предприятий страны должен стать Центр ихтиопатологического мониторинга при управлении аквакультуры Росрыболовства, который отвечал бы за своевременное поступление информации от территориальных управлений субъектов РФ и создание, а затем регулярное пополнение единого банка данных об эпизоотологической ситуации на рыбоводных предприятиях РФ и освещение их в сети Интернет на сайте управления аквакультуры Росрыболовства (рис.).

Основными объектами СИМ должны являться рыбоводные предприятия всех форм собственности, занимающиеся в субъектах РФ товарным выращиванием рыбы, воспроизводством водных биоресурсов, поставками отечественного и зарубежного рыбопосадочного материала, рекреационные рыбоводные хозяйства, а также водные объекты (внутренние водоемы и прибрежные морские участки), используемые для товарного выращивания рыбы или рыбопосадочного материала, рыбопромысловые водоемы.

Основной принцип функционирования СИМ заключается во взаимодействии подсистем мониторинга, обеспечивающих комплексность наблюдений за эпизоотической ситуацией на рыбоводных предприятиях и в естественных водоемах.

Центр СИМ осуществляет сбор информации от подведомственных ему структур (территориальных управлений Росрыболовства), ее обработку и анализ, размещение на сайте Росрыболовства, а также подготовку предложений для управленческих решений.

Обмен информацией между участниками СИМ осуществляется через информационный отдел Центра СИМ на сайте Управления аквакультуры Росрыболовства.

Финансирование СИМ осуществляется за счет средств бюджетов соответствующих уровней (федерального и регионального), внебюджетных средств участников СИМ, включая и средства рыбоводных предприятий.

Внедрение СИМ позволит на территории Российской Федерации выявить (определить) зоны, благополучные и неблагополучные по той или иной заразной болезни рыб, обозначить природные очаги эпизоотически опасных заболеваний. На основе полученных данных будет составлена единая (общероссийская) база данных и карта эпизоотической ситуации по болезням рыб.

СИМ будет способствовать также своевременной разработке планов лечебно-профилактических мероприятий по борьбе с болезнями рыб на предприятиях аквакультуры и их оперативной реализации, что позволит существенно снизить потери от заболеваний и повысить эффективность всего рыбохозяйственного комплекса страны.

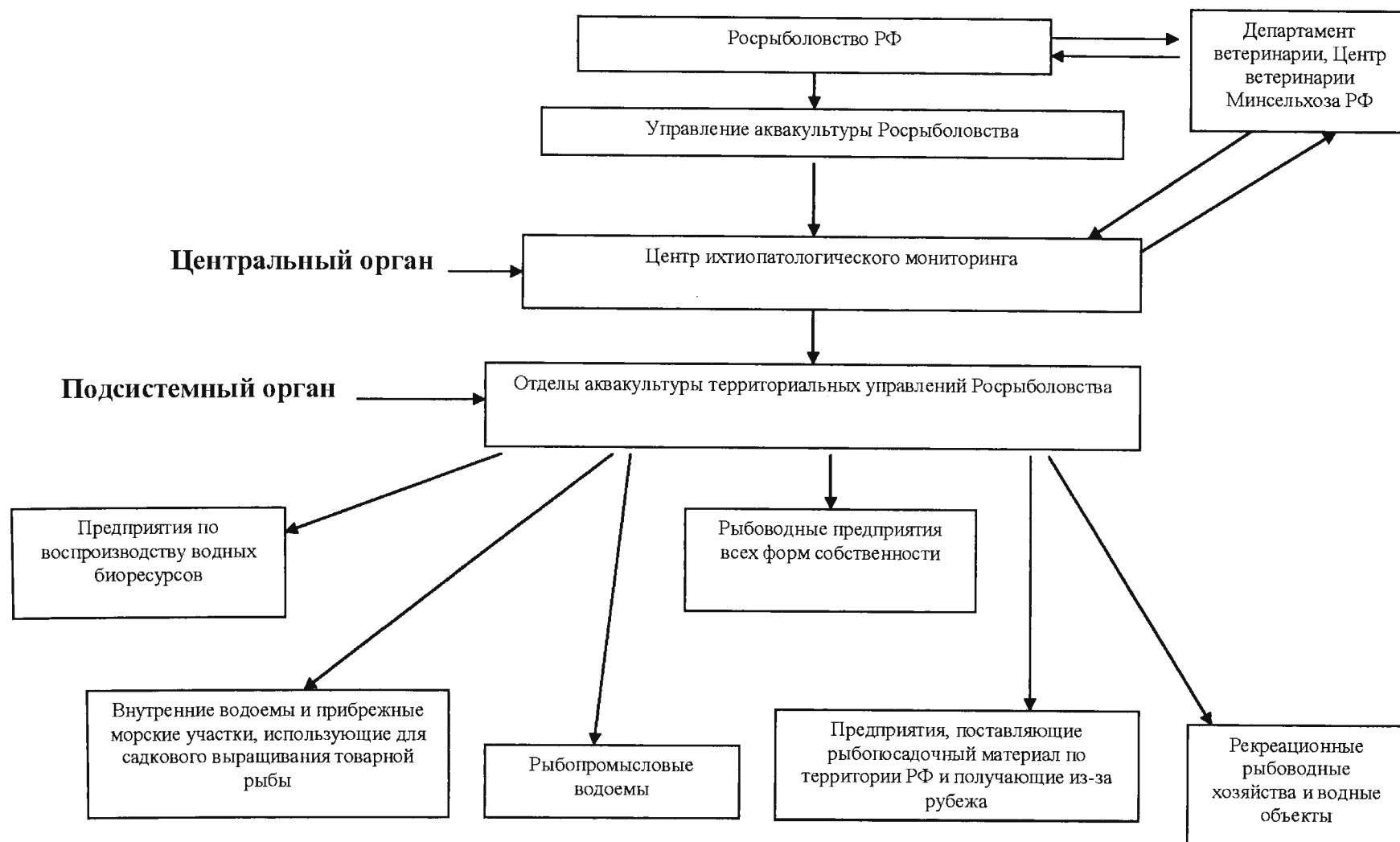


Рис. Предлагаемый проект структуры системы ихтиопатологического мониторинга.
Fig. The proposed structure project for the ichthyopathologic monitoring system.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ имеющихся ихтиопатологических материалов показывает, что эпизоотическая обстановка на рыбоводных предприятиях субъектов РФ остается достаточно сложной. Наиболее благополучна она по паразитарным заболеваниям, где применяется имеющийся комплекс эффективных лечебно-профилактических мероприятий, направленный на сдерживание численности возбудителей большинства инвазионных болезней.

Предупреждение незаразных болезней рыб также находится под контролем главных специалистов рыбоводных предприятий, и связано, в основном, с организационно-техническими мероприятиями и инициативой на местах по контролю за качеством водной среды и применяемых кормов.

Эпизоотическая ситуация по инфекционным заболеваниям объектов аквакультуры остается недостаточно изученной. Мониторинг инфекционных болезней в настоящее время осложнен нехваткой специалистов, сложным и относительно дорогостоящим диагностическим оборудованием, крайне ограниченным использованием экспрессных методов. За последние 15 лет в нашей стране резко сократилось число лабораторий, в которых проводятся диагностические комплексные исследования по болезням рыб, в том числе и в рыбохозяйственных НИИ. А там, где они сохранились, специалисты в области диагностики вирусных, бактериальных и микозных болезней единичны. Все это не позволяет в настоящее время объективно оценить эпизоотическую ситуацию в рыбоводных хозяйствах по инфекционным заболеваниям.

В связи с этим внедрение представленной СИМ наряду с повышением уровня диагностических исследований позволит усовершенствовать организационную систему мониторинговых ихтиопатологических исследований и создать единый полноценный банк данных по эпизоотическому состоянию предприятий аквакультуры всех форм собственности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Головин П.П., Головина Н.А., Романова Н.Н. Кадастр лечебных препаратов, используемых и апробированных в аквакультуре России и за рубежом. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. 56 с.

Евсеева Н.В., Барская Ю.Ю., Лебедева Д.И. Первый случай гиродактилеза радужной форели в аквакультуре Карелии / Сб. науч. Трудов ГосНИОРХ. «Проблемы ихтиопатологии в начале XXI века». С-Пб. 2009. Вып. 338. С. 71-76.

Завьялова Е.А., Кандрина Н.Ю., Ломакина Н.Ф., Гулюкин М.И. Индикация и идентификация некоторых особо опасных вирусов методом ПЦР. Сб. Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширен. Мат-лы III Междунар. конф., Борок, 18-22 июля 2011 г. М.: Из-во РГАУ - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2011. С. 112-115.

Казарникова А.В., Шестаковская Е.В. Основные заболевания осетровых рыб в аквакультуре. М.: Изд-во ВНИРО, 2005. 104 с.

Калмыков М.В., Белоусов В.И. Эпизоотическая ситуация по заразным болезням рыб в Российской Федерации и мониторинг безопасности рыбы и рыбопродукции за 2008 г. Сб. науч. тр. ГОСНИОРХ. Проблемы ихтиопатологии в начале XXI века. С-Пб., 2009. Вып. 338. С. 94-100.

Крайний А.А. Роль и место рыбохозяйственного комплекса в современной экономике Российской Федерации. Основные принципы государственной политики в

области рыболовства и сохранения водных биологических ресурсов. [http://fish.gov.ru/agency/ Documents/ материал 20 коллегии - 2011. pdf.](http://fish.gov.ru/agency/Documents/материал%20коллегии.pdf)

Лабораторный практикум по болезням рыб /В.А. Мусселиус, В.Ф. Ванятинский, А.А. Вихман и др.; под ред. В.А. Мусселиус. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 296 с.

Международное эпизоотическое бюро, <http://www.edudic.ru/ves/1798>.

Мышкин А., Ражуков Р. Золотая рыбка. Рукотворное чудо // Ихтиосфера. 2012. Вып. 14. С. 4-39.

Приказ «Об утверждении перечня карантинных и особо опасных болезней рыб» № 173 от 29. 09.2005 г. <http://www.mcх.ru/ministry/depatment/ phonebook/82.htm>.

Приказ Минсельхоза России от 20 февраля 2006 г. № 45. <http://www.mcх.ru/navigation/page/show/334.htm>.

Рудакова С.Л. Выделение и идентификация вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) от производителей нерки на Камчатке// Тез.докл. IV Регион, конф. по акт. проблемам экологии. Владивосток, 2001. С. 100-101.

Рудакова С.Л. К вопросу о бесконтрольных перевозках икры и личинок для выращивания рыб в рыбоводных хозяйствах России // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширен. Мат-лы III Междунар. конфер., Борок, 18-22 июля 2011 г. М.: Из-во РГАУ - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2011. С. 253-257.

Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, ч.1., 1998. 310 с.

Официальный интернет портал Министерства сельского хозяйства РФ, <http://www.mcх.ru/navigation/page/show/334.htm>

Щелкунов И.С., Щелкунова Т.П., Щелкунов А.И., и др. Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России // Российский вет. жур-л. Сельскохозяйственные животные. 2007. № 1. С. 10-12.

European community reference laboratory for fish diseases, <http://www.fishpathogens.eu>.

Shchelkunov I.S., Shchelkunova T.I., Kupinskaya O.A., Didenko L.V., Bykovsky A.F., Olesen N..J. Infectious hematopoietic necrosis (IHNV): the first confirmed finding in Russia. 10th Intern. Conf. EAFP. Diseases of fish and shellfish. Book of abstracts. Dublin.2001. P. 44.

THE ANALYSIS OF THE EPIZOOTIC SITUATION AND ICHTHYOPATHOLOGIC MONITORING ORGANIZATION AT THE ENTERPRISES OF AQUACULTURE IN RUSSIA

© 2012 y. P.P.Golovin¹, N.N.Romanova¹, N.A. Golovina², L.N.Yukhimenko¹

1 - All-Russian Scientific Research Institute of Freshwater Fisheries, p. Rybnoe, Moscow area

2 - Astrakhan State Technical University, p. Rybnoe, Moscow area

The analytical evaluation of epizootic situation at fish-farming enterprises in regions of the Russian Federation has been given. The role of fish transportation in diseases spread has been determined; the principal scheme of the up-to-date system for ichthyopathologic monitoring organization at fish-farming branch has been provided.

Key words: diseases, ichthyopathology, monitoring, fish, fish-farming, epizootology.

АКВАКУЛЬТУРА И ИСКУССТВЕННОЕ ВОСПРОИЗВОДСТВО

УДК 621.59:639.3.034:639.3/6

**ФОРМИРОВАНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ГЕННОГО БАНКА
СПЕРМЫ РЫБ (СОСТОЯНИЕ, РАЗВИТИЕ, ПЕРСПЕКТИВЫ)**

© 2012 г. Л.И. Цветкова, Н.Д. Пронина, О.Б. Докина,

А.В. Рекубратский, В.А. Парнышков

*ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного
рыбного хозяйства», Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рыбное, 141821*

Статья поступила в редакцию 22.03.12

Окончательный вариант 24.08.12

Представлены итоги многолетних исследований по проблеме «Криобанк». Разработаны эффективные технологии и криозащитные среды для замораживания спермы карповых, осетровых и лососевых рыб. Установлено влияние антифризных гликопротеинов на криоустойчивость спермы радужной форели, стальноголового лосося, карпа, осетров. В коллекции криобанка хранится около 2 000 тыс. образцов спермы и тканей разных видов рыб. Сроки хранения не снижают качества спермы.

Ключевые слова: криобанк, криоконсервация, замораживание спермы, криозащитные среды, генетическая коллекция, диспермный андрогенез, антифризные белки, электропорация.

Острейшей проблемой охраны природы, в том числе и современного рыбоводства, является сохранение генетического разнообразия рыб. Эта проблема важна как для редких и исчезающих видов, так и для объектов аквакультуры. Достигнутые успехи в консервации спермы рыб, позволяют подойти к решению проблемы создания в рыбоводстве банков криоконсервированной спермы, как это широко практикуется в животноводстве. Создание промышленных банков даст возможность поставить селекционно-племенную работу на качественно новый уровень. Сохраняемый в низкотемпературных банках генетический материал может быть использован в селекционных работах при выведении новых пород, для сохранения стандарта породы, получения гибридов, в том числе гибридов рыб, имеющих разные сроки созревания половых продуктов, для получения потомства при отсутствии или недостатке зрелых самцов, а также для обмена замороженной спермой между рыборазводными заводами. Наличие банков криоконсервированной спермы позволит селекционеру оперировать со значительно большим разнообразием генетического материала, обеспечивая тем самым более широкие возможности для синтетической селекции. Большие перспективы предоставляются и для работ по промышленной гибридизации, выявлению наиболее эффективных гетерозисных комбинаций и их быстрейшему внедрению. При этом обеспечение спермой для проведения селекционных работ и промышленной гибридизации может осуществляться централизованно из ограниченного числа низкотемпературных банков.

Основной задачей исследований по низкотемпературной консервации половых продуктов является усовершенствование базовых и разработка новых эффективных методов криоконсервации спермы рыб с целью сохранения генетического разнообразия редких, исчезающих рыб и промышленного получения жизнестойкого потомства объектов промысла и аквакультуры, создание банка криоконсервированной спермы, осуществление сбора коллекции спермы

генетически ценных видов рыб, а также разработка способов реализации сохраненной в криобанке генетической информации с использованием достижений молекулярной биологии и биологии развития.

На протяжении ряда лет на рыбоводных базах ВНИИПРХ проводилось выращивание карпа и осетров, полученных с использованием замороженной спермы. Оказалось, что потомства карпа, полученные с использованием криоконсервированной спермы, имели некоторые преимущества (массонакопление, выживаемость, плодовитость) по сравнению с полученными традиционным методом. Анализ гематологических (концентрация гемоглобина, белка, количество эритроцитов) и биохимических показателей мышц указывает на хорошее физиологическое состояние рыб. Аналогичные результаты получены и при выращивании осетров от личинки до восьмилетнего возраста на Конаковском живорыбном заводе. Проведение серии опытов по выращиванию молоди карпа по специально разработанной программе с использованием общего контроля на протяжении ряда лет показало преимущества потомков, полученных с помощью криоконсервированной спермы, по устойчивости к неблагоприятным условиям (соленость воды от 1 до 5%, температура воды 12-13°C и 35-37°C, острая и хроническая гипоксия, воздействие гексахлорциклогексана) по сравнению с контролем (Цветкова и др., 2001а).

В результате многочисленных экспериментов установлено, что криоустойчивость сперматозоидов в значительной степени зависит от условий содержания производителей. Нарушения кислородного и температурного режимов, кормления, передержки и пересадки производителей карповых и осетровых рыб приводят к неспособности спермиев переносить процедуры замораживания-оттаивания даже при использовании эффективных криозащитных сред. Отмечено, что сперма севрюги, стерляди, веслоноса, сазана, обитающих в естественных водоемах, более криоустойчива, чем у этих же видов рыб, выращенных в искусственных условиях. В связи с этим вопрос сертификации и стандартизации образцов замороженной спермы, хранящихся в криобанках, может быть решен только после стандартизации и соблюдения всех рыбоводных норм выращивания и содержания производителей.

Для решения вопроса о возможном влиянии метода криоконсервации спермы на полноту воспроизведения генетической структуры популяции провели изучение потомств карпа, полученных от одних и тех же производителей, с применением нативной и дефростированной спермы по четырем полиморфным белковым локусам – транферрина (Tf), двум локусам эстераз (Est-1, Est-2) и миогена (My-3). Проведенный электрофоретический анализ показал, что как в опыте, так и в контроле у потомков отмечены все возможные генотипы, а имеющиеся различия по частоте их встречаемости между опытной и контрольной группами не достоверны. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии влияния процесса криоконсервации спермы на генетическую гетерогенность получаемого потомства (Дёмкина и др., 1997; Дёмкина, Цветкова, 2000).

При использовании криоконсервированной спермы для воспроизводства рыб необходима оптимизация технологии осеменения, снижающей неблагоприятное влияние солей гипертонических криозащитных сред на яйцеклетки. При осеменении больших порций икры (250-650 г) дефростированную сперму разбавляли

в 100, 200, 300 раз активирующим раствором. Оказалось, что при осеменении икры сибирских осетров лучшие результаты получены при разбавлении спермы в 300, белуги в 200, карпа в 500 раз.

В экспериментах по осеменению криоконсервированной спермой промышленных партий икры карпа и сазана в России и икры веслоноса в США были достигнуты результаты оплодотворения, практически совпадающие и даже превышающие результаты оплодотворения нативной спермой в производственных условиях (Mims et al., 2011).

Таблица. Оплодотворяющая способность дефростированной спермы, %.

Table. Fertilizing ability of the defrosted sperm, %.

Вид рыб	Оплодотворяющая способность, %		
	Дефростированная сперма	Нативная сперма (контроль)	% от контроля
Русский осетр	91,2	89,1	102,4
Ленский осетр	93,8	95,6	98,1
Обский осетр	60,3	71,3	84,6
Стерлядь	91,8	87,2	105,3
Севрюга	71,7	-	-
Белуга	53,4	36,1	148,6
Форель	51,9	99,1	52,4
Карп	90 и более	90 и более	100 и более

В таблице приведены максимальные результаты оплодотворения икры дефростированной спермой, полученные при оценке качества криоконсервированной спермы перед закладкой в криобанк на длительное хранение. Условия осеменения, т.е. количество икры, спермы, активатора одинаковы для размороженной и нативной спермы. Результаты свидетельствуют о том, что при замораживании спермы высокого качества оплодотворяющая способность дефростированной спермы может быть на уровне нативной.

Опыты по определению оптимального соотношения икры и размороженной спермы, проведенные в лабораторных условиях, показали, что максимальный эффект по оплодотворению может быть достигнут при использовании $1 \cdot 10^6$ спермиев на икринку для карпа и от $1 \cdot 10^5$ до $2,5 \cdot 10^5$ – для осетра. Дальнейшее увеличение доз дефростированной спермы в 2-6 раз не привело к существенному повышению процента оплодотворения, а снижение доз недостаточно для получения нормального оплодотворения клеток.

Успех криоконсервации спермы определяется одновременным действием множества факторов: качеством нативной спермы, которое в значительной степени зависит от условий содержания производителей, качеством и количеством веществ, входящих в состав применяемой криозащитной среды, подбором видоспецифичных криопротекторов, режимом замораживания и оттаивания.

В результате исследования влияния этих факторов были разработаны криопротективные среды и практические приемы консервации спермы лососевых, карповых и осетровых рыб, обеспечивающие сохранение жизнеспособности до 70-90% сперматозоидов, которые изложены в технологии криоконсервации и хранения в низкотемпературном банке спермы рыб (Цветкова и др., 2001б).

Были испытаны криозащитные среды со сложными и простыми солевыми добавками. Оплодотворяющая способность спермиев сохранялась как при

замораживании в средах с большим количеством солей, так и с малым. Добавление в среды спермосана, глицина, простагландинов, фитогормона, АТФ, резорцина, формамида, вытяжки из слизи стрессоустойчивых рыб показало повышение криоустойчивости сперматозоидов при использовании АТФ, спермосана, фитогормона эпибрассинолида (Цветкова и др., 2006). Остальные добавки не дали значимого эффекта, так же, как и антиоксиданты токоферол и тонарол, использованные при криоконсервации спермы карпа.

Нами совместно с сотрудниками Института биофизики клетки РАН исследована возможность крипротективного влияния антифризных гликопротеинов (АФГП), выделенных из сыворотки крови атлантической трески и камбалы, мучного хрущака, гаммаруса, обеспечивающих их выживание после зимних минусовых температур, на криоустойчивость спермы радужной форели, стальноголового лосося, карпа, осетров. При использовании АФГП в криозащитных средах значительно снижаются внутриклеточные повреждения, повышается выживаемость и оплодотворяющая способность спермиев после дефростации (Каранова, Цветкова, 2002; Tsvetkova, et al., 2007).

В результате криоконсервирования в клетках могут возникнуть криоповреждения, причинами которых является образование в цитоплазме кристаллов льда, разрушающих внутриклеточные структуры. В процессе криоконсервации важно обнаружение летальных и нелетальных повреждений, которые возникают в клетке как на этапах перехода в состояние глубокого холодового анабиоза, так и последующем возврате к условиям нормотермии, при которых часть клеток обладает способностью репарировать эти повреждения.

Если среда оказывается токсичной для клеток или организмов, в них начинаются патологические процессы той или иной степени тяжести. При повреждениях клеток, вызванных различными причинами, развивается неспецифический «окислительный стресс», включающий развитие цепных реакций перекисного окисления липидов, образование супероксид-радикалов, повреждающих мембранные структуры клетки, а также генетический материал, а на более поздних стадиях изменение (как правило снижение) активности мембранно-связанных ферментов, а также ферментов антиокислительной защитной системы клетки. Для определения уровня криоповреждений сперматозоидов рыб нами разработан способ, ориентированный на метаболический критерий – интенсивность свободно-радикальных реакций. Способ позволяет определить криоповреждения перед закладкой проб на долгосрочное хранение в криобанк и способствует сокращению объема коллекции за счет выбраковки образцов низкого качества и расходов на обслуживание биохранилищ (Пат. № 2233142 опубл. в бюл. № 21, 27.07.2004; Мелехова и др., 2004; Цветкова и др., 2005).

С использованием разработанных методов создана единственная в Российской Федерации генетическая коллекция спермы и тканей, представленная почти 2 000 образцами спермы более 50 видов и популяций карповых, сиговых, осетровых и лососевых рыб. Общий объем спермы, хранящейся в криобанке, составляет около 20 л.

Для формирования коллекции отбираются образцы спермы и тканей, относящиеся к различным категориям селекционных достижений, в том числе внесенных в Государственные реестры, экспериментальных линий, а также редких и

исчезающих видов и популяций, внесенных в Красные книги России или региона, в списки видов, нуждающихся в особом режиме охраны.

Криобанк работает в экспериментальном режиме. Замороженная сперма используется в основном для специальных селекционных, биохимических и генетических исследований.

Проверка качества спермиев некоторых видов рыб, заложенных на хранение в криобанк в разные годы, показала в целом высокую сохранность клеток в исследованных образцах. Было установлено, что длительность хранения не снижает оплодотворяющую способность криоконсервированных сперматозоидов (Пронина, 2004).

ВНИИПРХ приступил к выполнению принципиально нового направления исследований – разработке способов реализации сохраненной в спермиях генетической информации с использованием методов молекулярной биологии и биологии развития. Начато изучение возможного сочетания методов диспермного андрогенеза и криоконсервации спермы для восстановления редких и исчезающих видов рыб. Комбинированное использование этих методов является альтернативным замораживанию эмбрионов подходом к сохранению биоразнообразия рыб. Данный подход позволяет получать потомство с исходным уровнем генетической изменчивости даже в том случае, если восстанавливаемый вид полностью вымер, а сохранилась только его криоконсервированная сперма. В предварительно проведенных опытах от некоторых видов осетровых рыб были получены жизнестойкие андрогенетические потомства (Грунина и др., 2011).

Сохранение генофонда различных видов рыб и их генетического разнообразия в настоящее время возможно с использованием в качестве генетического материала банков спермы и яйцеклеток близкородственных видов.

Другим методом, позволяющим сохранить полноценный генотип животного, является криоконсервация эмбрионов или яйцеклеток. Разработка таких методов позволила бы сделать радикальный шаг вперед в решении проблемы сохранения биоразнообразия.

Одна из основных задач в проблеме криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов заключается в доставке криопротекторных сред в цитоплазму и желтковую структуру, которые защищены оболочкой, становящейся особенно прочной у эмбрионов.

В этой связи перспективным подходом для доставки криопротектора через эмбриональные оболочки представляется использование электропорации, которая достигается с помощью серий электрических импульсов.

С 2010 г. при изучении возможности применения метода электропорации для криоконсервации эмбрионов рыб использовали оригинальную опытную модель электропоратора, созданную в лаборатории генетики и селекции ВНИИПРХ, который позволяет получить электрические импульсы с изменяемыми в широком диапазоне параметрами: напряжение от 12 до 60 В, длительность пачки импульсов от 5 до 120 м сек., интервал между пачками от 0,5 до 5 сек., частота импульсов от 20 до 100 кГц.

Положительные результаты электропорации по совокупности признаков (высокая частота проникновения красителя, показатели инкубации) были получены

при использовании следующих параметров: напряжение (U) – 19-24 В, интервал между импульсами (t) – 2,0-3,5 сек., продолжительность импульса (τ) – 20-40 м сек., частота заполнения импульса (F) – 40-50 кГц.

При изучении электропорации эмбрионов на стадии органогенеза использовались эмбрионы с уже обесклеенными по заводской технологии оболочками. Первые опыты показали, однако, что у эмбрионов на стадии органогенеза оболочки значительно прочнее. Электропорация с применением режимов, найденных в опытах с оплодотворенными яйцеклетками, оказалась неэффективной: раствор метиленового синего не проникал под оболочки. Увеличение напряжения до 60Вт привело к электропорации оболочек, у эмбрионов с высокой частотой наблюдалось проникновение красителя. Выход нормальных личинок из эмбрионов, подвергнутых успешной электропорации, оказался достаточно высоким (около 95%) и сопоставим с контролем.

Был проведен опыт по замораживанию эмбрионов, электропорированных в растворах разных криопротекторов. После оттаивания криоконсервированные эмбрионы оказывались полностью разрушенными, с лопнувшими оболочками.

Выживаемость эмбрионов, не подвергнутых замораживанию, в средах с метанолом и ДМСО после электропорации составила 100%. При сочетании в криосреде криопротекторов метанола и этиленгликоля, а также метанола и ДМСО выживаемость эмбрионов составила 94,6 и 98,2% соответственно. Электропорация в криозащитных средах с глицерином привела к гибели эмбрионов.

По результатам, полученным в опытах с оплодотворенными яйцеклетками и эмбрионами карпа, можно заключить, что электропорация позволяет растворам, содержащимся в криозащитных средах, проникать через оболочки к внутренним эмбриональным структурам; электропорация не вызывает существенной гибели эмбрионов. Эти данные открывают возможность использования метода электропорации в исследованиях по криоконсервации эмбрионов рыб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанные криотехнологии позволят создать страховые запасы спермы исчезающих и генетически ценных видов рыб. Важным и существенным способом реализации результатов является минимизация затрат на сохранение генофонда редких и исчезающих видов рыб.

Сохраняемый генетический материал может широко использоваться в селекционной работе: в пороодообразовании – криоконсервированная сперма генетически ценных самцов, которые погибли несколько лет назад; для получения жизнестойкого потомства; для гибридизации рыб при отсутствии самцов; в разработках по оптимизации технологии криоконсервации; для восстановления генотипов исчезающих видов рыб с использованием метода индуцированного андрогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Грунина А.С., Рекубратский А.В., Цветкова Л.И., Барминцев В.А., Васильева Е.Д. Восстановление генофондов исчезающих видов осетровых рыб с использованием метода диспермного андрогенеза // Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології. ТЕЗИ IV Міжнародної іхтіологічної конференції. Одеса, 2011. С. 76-81.

Демкина Н.В., Цветкова Л.И., Шарт Л.А. Генетическая гетерогенность потомств карпа, полученных с использованием криоконсервированной спермы // Рыбное хозяйство (сер. Аквакультура). Информационный пакет «Современная аквакультура: проблемы образования и освоения новейших технологий». 1997. Вып.1. С.79-80.

Демкина Н.В., Цветкова Л.И. Исследование генетической гетерогенности потомств карпа, полученных с использованием криоконсервированной спермы // IX Всероссийской конференция «Экологическая физиология и биохимия рыб», Ярославль, май 2000. Тезисы докладов. 2000. Т.1. С.79-80.

Каранова М.В., Цветкова Л.И. Криопротективные свойства антифризных гликопротеинов при замораживании спермы рыб. Избранные труды ВНИИПРХ (в четырех томах). Дмитров: «Север Подмосковья», 2002. Книга 1. Т. II. Ч. 2. С. 369-377.

Мелехова О.П., Цветкова Л.И., Коссова Г.В., Падалка С.М., Докина О.Б., Пронина Н.Д. Метаболический критерий для оценки жизнеспособности репродуктивного материала ценных видов рыб после криоконсервации // Труды Межд. биотехнологического центра МГУ им. М.В.Ломоносова / Биотехнология - охране окружающей среды. М.: Изд-во «Спорт и Культура», 2004. Ч. 1. С. 124-126.

Пронина Н.Д. Оценка качества криоконсервированной спермы рыб // Материалы Межд. конф. «Сохранение генетических ресурсов», С-П, 19-22 октября 2004. Цитология. 2004. Т. 46. № 9. С. 843-844.

Пат. № 2233142 (Россия). 7 А 61 D 19/02, А 01 К 61/00. Способ определения жизнеспособности спермы рыб после криоконсервации / Мелехова О.П., Цветкова Л.И., Докина О.Б., Коссова Г.В., Падалка С.М., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Заявл. 21.01.03, № 200.3101419; Оpubл. в бюл. № 21, 27.07.2004.

Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Трефилов А.Н. Метод криоконсервации спермы рыб – для сохранения геномов и получения жизнестойкого потомства // Науч.-практ. конф. «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России», Адлер, Россия, сентябрь, 24-27, 2001. Материалы докладов, Краснодар. 2001а. С. 116-117.

Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Технология криоконсервации и хранения в низкотемпературном банке спермы рыб. Сб. науч.-технол. и метод. документации по аквакультуре. М.: Изд-во ВНИРО, 2001б. С. 152-158.

Цветкова Л.И., Мелехова О.П., Докина О.Б., Коссова Г.В., Пронина Н.Д., Падалка С.М. Оценка уровня криоповреждений сперматозоидов рыб. Материалы Межд. науч. конф. «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных», Саранск, март 2005. Саранск: изд-во Мордовского ун-та, 2005. С. 253-255.

Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Зависимость жизнеспособности криоконсервированных спермиев карпа от рецептуры криозащитных сред при долговременном хранении Сб. науч. трудов ВНИИПРХ // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. М.: Компания Спутник +, 2006. Вып. 81. С. 41-45.

Mims S.D., Tsvetkova L.I., Wayman W.R., Horvath A., Urbanyi B. and Gomelsky B. 2011. Cryopreservation of Sturgeon and Paddlefish Sperm. In: Cryopreservation in Aquatic Species, 2 nd Edition. T.R. Tiersch and C.C. Green, editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. P. 366-380.

Tsvetkova L.I., Karanova M.V., Pronina N.D., Dokina O.B. Reproductive capacity of sturgeons' and carps' sperm frozen in the presence of antifreezing glycoproteins. The 1st International Workshop on the Biology of Fish Sperm Vodnany, Czech Republic. 29-31 August, 2007. P. 93-95.

**FORMATION OF THE LOW-TEMPERATURE GENE BANK
OF FISH SPERM (STATE, DEVELOPMENT, PROSPECTS)**

© 2012 y. L.I. Tsvetkova, N.D. Pronina, O.B. Dokina,

A.V.Rekubratsky, V.A.Parnyshkov

All-Russian Scientific Research Institute of Freshwater Fisheries, p. Rybnoe, Moscow area

Results of long-term investigations on the problem "Cryobank" have been given. Effective technologies and cryoprotective media for carps, sturgeons and salmons sperm freezing have been developed. Effect of antifreezing glycoproteins on sperm cryoresistance for rainbow trout, steelhead trout, carp, sturgeons has been determined. About 2000 tsd sperm samples and tissues of different fish species are being stored in the collection of the cryobank. The sperm quality is not degraded after long-term conservation.

Key words: cryobank, cryopreservation, sperm freezing, cryoprotective media, genetic collection, dispermic androgenesis, antifreezing proteins.