DOI: 10.24143/2073-5529-2017-4-118-127
УДК 639.3.034

*Е. Н. Пономарева, А. Н. Неваленный, М. М. Белая, А. А. Красильникова*

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ МАТОЧНОГО СТАДА СТЕРЛЯДИ[1] [2]

Исследования по использованию криоконсервированной спермы стерляди для искусственного оплодотворения икры проводились на научной базе ЮНЦ РАН (Ростовская область). Объекты исследований – репродуктивные клетки (в том числе криоконсервированные), личинки, молодь стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). Половину партии икры, взятой от самки стерляди массой 1,7 кг, оплодотворяли нативной спермой (контроль), вторую часть – дефростированной (от двух самцов), хранившейся в жидком азоте при температуре –196 °С в течение трех лет (эксперимент). Процесс инкубации продолжался 5 суток при температуре воды 14,5–18,3 °С, суточные колебания в среднем – 1,9 °С. Оплодотворение икры в контроле составило 90 %, в эксперименте – 70 %. Эмбриональное развитие икры в контроле шло с небольшим опережением, но длительность эмбриогенеза в опыте укладывалась в пределы установленных норм. Процесс вылупления предличинок в контроле начался на один час раньше, чем в опыте и составил 75 и 60 % от заложенной на инкубацию икры соответственно. Отход за период выдерживания предличинок до перехода на смешанное питание был незначительным – 2 % в контроле и 3,4 % в опыте. По итогам теста «открытое поле» по реактивности центральной нервной системы молодь экспериментальной группы не отличалась от молоди контрольной партии, но динамика двигательной активности демонстрировала более интенсивную реакцию рыб на раздражители в эксперименте, что имеет большое значение при адаптации молоди к условиям естественных водоемов. В целом потомство, полученное от дефростированных половых клеток, не отличалось от потомства, полученного от нативной спермы, а по морфометрическим показателям, в частности по конечной массе, превосходило его. Результаты исследования подтверждают возможность и целесообразность использования половых клеток, хранившихся в жидком азоте, для искусственного воспроизводства и формирования ремонтно-маточных стад осетровых рыб.

**Ключевые слова:** биоразнообразие, криоконсервация, стерлядь, репродуктивные клетки, маточное стадо.

## Введение

Глобальной проблемой современной экологии является сокращение биоразнообразия. Из-за антропогенного воздействия происходит интенсивное обеднение природы. За последнее столетие с лица Земли исчезло до 25 тыс. видов высших растений и более 1 тыс. видов позвоночных животных [1].

В настоящее время охрана природы является одной из самых важных и имеющих мировое значение проблем. Без специальных мер охраны некоторые виды животных выжить не могут, и количество таких видов, в частности видов рыб, увеличивается с каждым годом.

Скорость сокращения видов устойчиво растет. Так, с 1600 по 1975 г. вымерло примерно 1,2 % животных, а к концу 1980-х гг. под угрозой вымирания находилось не менее 1 000 видов, что составляет около 8 % животных, обитающих на планете Земля. Сохранение такой тенденции может привести к тому, что к 2050 г. исчезнет до 50 % видов [2].

Природные и антропогенные факторы привели к тому, что многие виды рыб находятся на грани исчезновения, некоторые отнесены к разряду редких и исчезающих и внесены в Красные книги. Например, осетровые, белорыбица и другие популяции находятся в крайне депрессивном состоянии.

[1] Исследования проведены в рамках реализации гранта Президента Российской Федерации «Формирование маточных стад осетровых рыб с использованием криоконсервированных репродуктивных клеток (на примере стерляди)» МК-159.2017.11.

[2] Исследования по теме «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 (№ госрегистрации 01201354245)» выполнены в рамках Программы ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 годы.

В начале XX столетия стада осетровых рыб сохранялись в Азово-Черноморском и Каспийском бассейнах, а к началу XXI в. небольшое стадо осталось лишь в Каспийском море, но и оно исчезает быстрыми темпами. Именно поэтому особое беспокойство вызывает состояние осетровых рыб в этом регионе, где сосредоточено свыше 90 % мировых запасов. Из-за резкого сокращения природных запасов Россия уже 10 лет не ведёт промышленного лова осетровых рыб, остальные прикаспийские государства приняли мораторий на отлов этих рыб в последние 2–3 года [3].

В отсутствие естественного воспроизводства осетровых рыб важная роль отводится искусственному воспроизводству, которое в 1970–1980-х гг., после зарегулирования рек, имело основное значение в восстановлении численности природных популяций осетровых рыб [3]. Но и искусственное воспроизводство не способно полностью восстановить популяции в естественных водоемах.

Актуальность разработки и создания новых, экономически эффективных биотехнологий для аквакультуры и сохранения биоразнообразия гидробионтов возрастает. Особенно они необходимы для решения задач по спасению редких и исчезающих видов рыб.

Для восполнения сократившегося количества каспийских и азовских осетровых, сохранения и увеличения их промысловых запасов необходимо стремительное развитие искусственного воспроизводства осетровых, формирование высокопродуктивных маточных стад редких и исчезающих видов [4, 5].

Однако в настоящее время на рыбоводных заводах, вследствие дефицита производителей, наблюдается упрощенный подход к формированию маточных стад – использование близкородственных пар при скрещивании, что негативно влияет на качество потомства и структуру популяционного генофонда.

Существующие технологические схемы аквакультуры недостаточно эффективны. В случае массовых заболеваний, стихийных бедствий и техногенных катастроф рыбоводные заводы и рыбопитомники, хозяйства марикультуры окажутся неспособными обеспечить производство посадочного материала в необходимых количествах. Кроме того, для восстановления их работы потребуются значительные время и средства. Работа рыбоводных заводов по воспроизводству естественных популяций осложняется недостатком полноценных производителей рыб, особенно осетровых [6].

Широкие перспективы для сохранения и рационального использования генетических ресурсов открывает технология криоконсервации репродуктивных клеток животных, в том числе рыб.

Прогресс в области криобиологии, биологии развития, популяционной генетики и селекции рыб, а также в других областях науки позволяет приступить к созданию новых технологий аквакультуры, отличающихся более высокой экономической эффективностью и стабильностью. Важнейшим направлением этой деятельности являются формирование и содержание генофондных коллекций – как живых, так и сохраняемых в виде криоконсервированного репродуктивного материала, главным образом спермы.

В настоящее время криотехнологии являются стратегически важными, в том числе антикризисными технологиями, для решения проблем, связанных с сохранением генетического биоразнообразия рыб. Использование криоконсервированной спермы на заводах по искусственному воспроизводству, а также на предприятиях аквакультуры позволит сформировать генетически разнородное стадо, сократит площади и затраты на содержание самцов, следствием чего станет увеличение продукционного стада самок. Применение криоспермы возможно в любое время, без риска несвоевременного созревания производителей или получения от них половых продуктов ненадлежащего качества [7–20].

В связи с вышеизложенным ***целью исследования*** являлось изучение возможности создания маточного стада стерляди с использованием криоконсервированных репродуктивных клеток.

**Материалы и методы исследований**

Исследования проводились на научной базе поселка Кагальник Ростовской области с использованием уникальной научной установки № 73602 и Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов Южного научного центра РАН.

Объектом исследований служили репродуктивные клетки (в том числе криоконсервированные), личинки, молодь стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758).

Оценку качества спермы проводили методом микроскопирования с использованием шкалы Г. М. Персова (1953) [21] – регистрировали процентное соотношение спермиев с поступательным и колебательным движением и общего количества живых сперматозоидов, время жизни спермиев после их активации фиксировали с помощью секундомера [22].

Оплодотворение икры проводили по стандартной технологии [23].

В эксперименте использовали самку стерляди, от которой получили икру способом, разработанным С. Б. Подушкой (1986) [24]. Партию икры поделили пополам – одну часть оплодотворили нативной спермой, вторую – дефростированной от двух самцов, которая хранилась в жидком азоте в течение трех лет.

Масса самки, взятой для проведения эксперимента по искусственному оплодотворению, составила 1,7 кг, рабочая плодовитость – 20 000 шт. икринок, масса икры – 156 г. Половину икры оплодотворили нативной спермой (активность 95 %, время жизни 620 с) из расчета 10 мл/кг. Вторую половину оплодотворили дефростированной спермой (активность 70 %, время жизни 390 с). Так как при проведении криоконсервации и подготовительных работ к процессу оплодотворения сперма разбавляется в 4 раза, то дефростированной спермы было взято из расчета 40 мл/кг.

Обесклеивание икры осуществляли в аппаратах обесклеивания икры (АОИ) речным илом в течение 40 минут.

После отмывки икра была заложена на инкубацию в аппарат «Осетр», разделенный на две секции – контрольную и опытную. Аппарат установили в рыбоводный бассейн 1 × 1 с замкнутым циклом водоснабжения. Через сутки определяли процент оплодотворения [23].

В процессе инкубации контролировали гидрохимические показатели воды (температуру, насыщение воды кислородом, pH и др.). Во избежание заражения сапролегнией икру обрабатывали органическим красителем (фиолетовый К).

Учет вылупившихся предличинок в контрольной и опытной ячейках аппарата «Осетр» осуществляли сплошным поштучным методом. Затем часть предличинок (по 500 шт. от каждой партии) была отобрана для дальнейшего наблюдения и посажена на выдерживание в аквариумы из органического стекла объемом по 200 л. В период выдерживания поддерживались оптимальные условия среды.

После перехода на смешанное питание в аквариумы вносили живой корм – науплии артемии салина (*Artemia salina*).

Для подращивания молоди опытной и контрольной партий использовали пластиковые бассейны ИЦА-2 в системе замкнутого водоснабжения. Молодь кормили живым кормом. В этот контролировали состояние молоди и фиксировали отход в обеих партиях.

Через 10 суток после перехода молоди на активное питание обе партии молоди стерляди подвергали тестированию по методике «открытое поле» [25].

В качестве высокочастотного акустического раздражителя использовали удар частотой 800–2 000 Гц. Такие сигналы воспринимаются рыбами внутренним ухом. Следующим показателем был низкочастотный сигнал 20–150 Гц, который воспринимается боковой линией рыб. Еще один раздражитель – свет мощностью 250–300 люкс – воздействует на зрительные доли головного мозга.

Опыты проводили в трехкратной повторности, данные подвергали статистической обработке по Г. Ф. Лакину (1973) [26] и Ю. П. Адлер (1969) [27].

**Результаты исследования**

Степень оплодотворения икры в контрольной партии составила 90 %, в опытной партии – 70 %. Процесс инкубации продолжался 5 суток. В этот период очень важную роль играет температурный режим. Температура воды в период инкубации составила 14,5–18,3 °С, суточные колебания в среднем – 1,9 °С.

Эмбриональное развитие икры в контроле шло с небольшим опережением по сравнению с опытом, длительность эмбриогенеза в опыте укладывалась в пределы установленных норм.

Процесс вылупления предличинок в контроле начался на один час раньше, чем в опыте и составил 75 и 60 % соответственно от икры, заложенной на инкубацию.

За период выдерживания предличинок до перехода на смешанное питание отмечался незначительный отход – 2,0 % в контроле и 3,4 % в опыте. Морфометрические показатели предличинок представлены в табл. 1.

В конце периода выдерживания предличинки исследуемых партий незначительно отличались по морфометрическим показателям, т. е. различий в раннем онтогенезе выявлено не было. Достоверные различия были отмечены только в длине желточного мешка, что может указывать на большее содержание питательных веществ у группы личинок в опыте в конце периода выдерживания. Это свидетельствует о более интенсивном протекании обменных процессов в контроле по сравнению с опытом.

*Таблица 1*

**Морфометрические показатели предличинок стерляди**

| Показатель | Массовый выклев | | Переход на смешанное питание | |
|---|---|---|---|---|
| | Контроль | Опыт | Контроль | Опыт |
| Масса, мг | 12,32 ± 1,03 | 12,60 ± 0,82 | 23,61 ± 1,26 | 26,42 ± 6,2 |
| Длина, мм | 8,50 ± 0,25 | 8,58 ± 0,16 | 14,07 ± 0,94 | 14,59 ± 1,13 |
| Длина желточного мешка, мм | 3,28 ± 0,07 | 3,21 ± 0,10 | 2,43 ± 0,24* | 2,89 ± 0,38* |
| Высота желточного мешка, мм | 2,36 ± 0,14 | 2,38 ± 0,14 | 2,18 ± 0,23 | 2,47 ± 0,30 |

* Различия достоверны при $p \leq 0,05$.

Можно сделать предположение, что партия в опыте развивалась более сбалансированно, чем контрольная. Это согласуется с теорией этапности развития В. В. Васнецова (1953) [28]. Суть этой теории заключается в том, что в течение различных периодов онтогенеза развитие рыб идет не только постепенно и непрерывно, но и прерывисто, скачкообразно, сопровождясь резкими изменениями в строении систем органов. Эти морфологические изменения неразрывно связаны с изменениями биологических особенностей рыб. Следует отметить, что те организмы, которые по отдельным показателям опережают им подобные, меняют свое качество быстрее и являются более приспособленными к последующим условиям среды обитания [23, 29]. Видимо, личинки в опыте оказались более приспособленными к переходу на активное питание, чем особи в контроле.

Таким образом, личинки, полученные из дефростированной спермы, которая хранилась в жидком азоте, развивались нормально и не имели существенных отличий от личинок контрольной партии.

После перехода на активное питание в период подращивания в течение 10 суток отход составил в контроле 3,6 %, в опыте – 5,4 %. Морфометрические показатели молоди представлены в табл. 2.

*Таблица 2*

**Морфометрические показатели молоди стерляди**

| Показатель | Начало подращивания | | Конец подращивания | |
|---|---|---|---|---|
| | Контроль | Опыт | Контроль | Опыт |
| Масса, мг | 23,61 ± 1,26 | 26,42 ± 6,2 | 44,73 ± 13,92* | 56,5 ± 13,75* |
| Длина, мм | 14,07 ± 0,94 | 14,59 ± 1,13 | 21,27 ± 1,33 | 21,02 ± 1,71 |

* Различия достоверны при $p \leq 0,05$.

Согласно данным табл. 2, подрощенная молодь, полученная с использованием криоконсервированной спермы, набрала бóльшую конечную массу, чем молодь, полученная обычным способом.

Таким образом, глубокая заморозка спермы стерляди и ее хранение в жидком азоте при температуре –196 °С в течение трех лет не оказывает негативного влияния на качество дефростированных половых клеток, а также на эмбриональное развитие и морфометрические показатели личинок и молоди стерляди. Очевидно, что использование дефростированного материала для искусственного осеменения икры целесообразно в условиях недостатка производителей на осетровых рыбоводных предприятиях.

Сравнение изменений двигательной активности молоди стерляди, выращенной из нативной и дефростированной спермы, в ответ на различные раздражители – один из основных показателей пригодности технологии криоконсервации для использования в аквакультуре.

По литературным данным [25, 30–32], одна из основных причин гибели заводской молоди после выпуска в естественные водоемы – ее интенсивное выедание хищниками, которое практически не зависит от размера молоди, но связано со слабым развитием у таких рыб оборонительного поведения и способности быстро реагировать на внешние раздражители.

Результаты биологического тестирования молоди стерляди, полученной с использованием нативной и криоконсервированной спермы, представлены в табл. 3.

*Таблица 3*

**Изменение поведения молоди стерляди в исследуемых группах**

| Показатель | Контроль | Опыт |
|---|---|---|
| Ориентировочная активность | 18,91 ± 5,1 | 17,87 ± 8,1 |
| Фоновая активность | 14,11 ± 3,7 | 18,75 ± 8,95 |
| Низкочастотный раздражитель | 16,61 ± 8,3 | 20,23 ± 8,9 |
| Высокочастотный раздражитель | 15,07 ± 8,6 | 18,86 ± 6,05 |
| Свет | 10,85 ± 5,9 | 13,80 ± 8,2 |

Статистическая обработка показала, что между партиями в контроле и опыте нет достоверных различий ни в одном тесте. По средним значениям построен график изменения реакций молоди стерляди в ответ на разные воздействия (рис. 1).

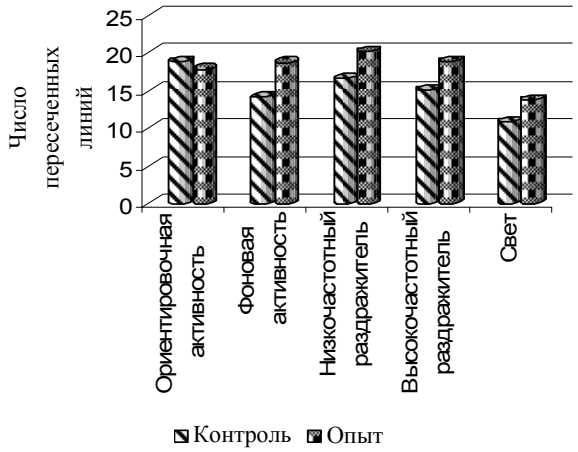


Рис. 1. Изменение двигательной активности молоди стерляди по результатам теста «открытое поле»

Отсутствие различий в поведении молоди в обеих партиях свидетельствует о нормальном развитии центральной нервной системы (ЦНС) стерляди. Однако необходимо проследить динамику реакций на раздражители (рис. 2).

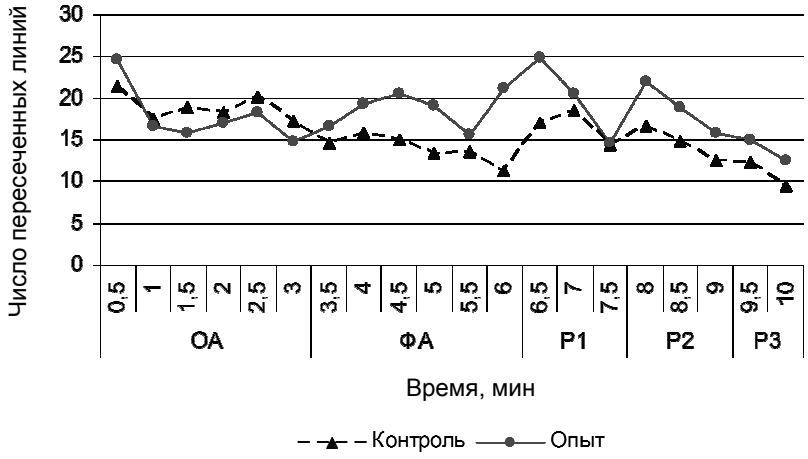


Рис. 2. Динамика двигательной активности молоди стерляди в опыте и контроле:
ОА – ориентировочная активность; ФА – фоновая активность;
Р1 – высокочастотный раздражитель (800–2 000 Гц);
Р2 – низкочастотный раздражитель (20–150 Гц);
Р3 – свет мощностью 250–300 люкс

На все тестовые раздражители реакция молоди в опыте несколько превышала реакцию в контроле. Динамика реактивности исследуемых групп свидетельствует о том, что в контрольной группе рыбы более возбудимы (ориентировочная активность, фоновая активность). Именно это является причиной более низких ответных реакций при возбуждении органа слуха (высокочастотный раздражитель) и рецепторов боковой линии (низкочастотный раздражитель).

**Заключение**

В ходе исследования были получены следующие результаты:

– потомство, полученное с использованием криоконсервированной спермы, которая хранилась в жидком азоте в течение трех лет при температуре –196 °С, имело нормальное эмбриональное и постэмбриональное развитие; существенных отличий от потомства в контрольной партии отмечено не было;

– по морфометрическим показателям, в частности по конечной массе, подрощенная молодь в опыте немного превосходила молодь в контроле;

– реактивность ЦНС «криомолоди» по итогам теста «открытое поле» не отличалась от реактивности ЦНС молоди контрольной партии. Вместе с тем динамика двигательной активности демонстрировала более интенсивную реакцию молоди в опыте на раздражители, что имеет большое значение при адаптации молоди к условиям естественных водоемов.

Таким образом, применение криоконсервированной спермы для искусственного оплодотворения икры не оказывает существенного влияния на качество потомства, что подтверждает целесообразность использования методов низкотемпературного консервирования для воспроизводства и формирования ремонтно-маточных стад на рыбоводных предприятиях.

*СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ*

1. *Багиров В. А., Эрнст Л. К., Насибов Ш. Н., Кленовицкий П. М., Иолчиев Б. С., Зиновьева Н. А.* Сохранение биоразнообразия животного мира и использование отдаленной гибридизации в животноводстве // Достижения науки и техники АПК. 2009. № 7. С. 54–56.

2. *Розанов С. И.* Место генетических криобанков в решении проблемы сохранения биоразнообразия // Биофизика живой клетки. 1994. Т. 6. С. 8–13.

3. *Васильева Л. М.* Современные проблемы осетроводства в России и мире // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. 2015. № 2 (6). С. 30–36.

4. *Пономарев С. В., Гамыгин Е. А., Никоноров С. И., Пономарева Е. Н., Грозеску Ю. Н., Бахарева А. А.* Технологии выращивания и кормления объектов аквакультуры юга России (справ., учеб. пособие). Астрахань: Нова плюс, 2002. 264 с.

5. *Пономарева Е. Н., Григорьев В. А., Сорокина М. Н., Корчунов А. А., Храмова А. В*. Технологии сохранения, воспроизводства и рационального использования морских биологических ресурсов в прибрежных зонах. Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2010. 58 с.

6. *Ананьев В. И., Манохина М. С*. К вопросу подготовки новой редакции научно-технической программы «Криобанк гидробионтов» на 2009–2014 гг. // Материалы конф. «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия (Пущино, 28–30 октября 2008 г). Биофизика живой клетки. Т. 9. Пущино, 2008. С. 15–16.

7. *Богатырева М. М*. Оптимизация методов криоконсервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб: автореф. дис. … канд. биол. наук. Астрахань, 2010. 20 с.

8. *Красильникова А. А*. Оптимизация методики криоконсервации спермиев рыб // VIII ежегод. конф. студ. и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ РАН (11–26 апреля 2012 г., г. Ростов-на-Дону): тез. докл. Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2012. С. 55–56.

9. *Красильникова А. А*. Универсальная методика подбора проникающих криопротекторов для разных видов рыб // X ежегод. науч. конф. студ. и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ РАН: тез. докл. (г. Ростов-на-Дону, 14–29 апреля 2014 г.). Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2014. С. 25–26.

10. *Красильникова А. А., Тихомиров А. М*. Совершенствование криобиологических подходов с целью повышения резистентности сперматозоидов рыб при низкотемпературном консервировании // Материалы Междунар. науч. конф. «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей» (г. Ростов-на-Дону, 1–3 октября 2014 г.). Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2014. С. 193–196.

11. *Красильникова А. А., Тихомиров А. М.* Объем замораживаемого образца как один из факторов выживаемости сперматозоидов осетровых видов рыб при криоконсервации // Естественные науки. 2014. №. 2. С. 62–69.

12. *Красильникова А. А.* Биотехнология низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток рыб // Окружающая среда и человек. Современные проблемы генетики, селекции и биотехнологии: материалы Междунар. науч. конф. и молод. науч. конф. памяти член.-кор. РАН Д. Г. Матишова (Ростов-на-Дону, 5–8 сентября 2016 г.). Ростов н/Д: ЮНЦ РАН, 2016. С. 534–536.

13. *Красильникова А. А., Тихомиров А. М.* Корреляция объемов эндоцеллюлярного протектора в криозащитных средах и внутриклеточной жидкости сперматозоидов осетровых рыб // Естественные науки. 2015. № 3 (52). С. 105–111.

14. *Красильникова А. А.* Совершенствование процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Астрахань, 2015. 24 с.

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

6. *Пономарева Е. Н., Богатырева М. М., Тихомиров А. М.* Повышение выживаемости половых клеток в процессе криоконсервации с использованием электростимуляции // Докл. Акад. наук. 2010. Т. 431, № 2. С. 264–265.

17. *Пономарева Е. Н., Красильникова А. А., Тихомиров А. М., Фирсова А. В*. Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток осетровых видов рыб // Юг России: экология, развитие. 2016. Т. 11, № 1. С. 59–68.

18. *Пономарева Е. Н., Красильникова А. А., Фирсова А. В., Белая М. М.* Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы // Рыбное хозяйство. 2017. № 4. С. 85–88.

19. *Cabrita E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cerezales S., Herráez M. P*. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives (Review) // Journal of Applied Ichthyology. 2010. Vol. 26, iss. 5. P. 623-635.

20. *Sampath Kumar J. S., Betsy C. J.* Cryopreservation of fish gametes and its role in enhancing aquaculture production. Book Chapter // Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture. 2015. P. 241-246.

21. *Персов Г. М*. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток осетровых // Докл. Акад. наук СССР. 1953. Т. 90, № 6. С. 1183–1185.

22. *Тихомиров А. М.* Результаты криоконсервации сперматозоидов севрюги с использованием разных криопротекторов // Консервация генетических ресурсов. Материалы XVI совещ. Пущино: ИБК РАН, 2002. С. 56–61.

23. *Иванов А. П.* Рыбоводство в естественных водоемах. М.: Агропромиздат, 1988. 367 с.

24. *А. с. СССР № 1412035*. Способ получения икры от самок осетровых рыб / Подушка С. Б.; заявл. 24.11.1986.

25. *Никоноров С. И., Витвицкая Л. В*. Эколого-генетические проблемы искусственного воспроизводства осетровых и лососевых рыб. М.: Наука, 1993. 251 с.

26. *Лакин Г. Ф*. Биометрия: учеб. пособие для ун-в и пед. ин-в. М.: Высш. шк., 1973. 343 с.

27. *Адлер Ю. П*. Введение в планирование эксперимента. М.: Металлургия, 1969. 155 с.

28. *Васнецов В. В.* Этапы развития костистых рыб // Очерки по общим вопросам ихтиологии. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953. С. 207–217.

29. *Мухачев И. С.* Биологические основы рыбоводства: учеб. пособие. Тюмень: Изд-во ТГУ, 2004. 300 с.

30. *Касимов Р. Ю.* Сравнительная характеристика поведения дикой и заводской молоди осетровых в раннем онтогенезе. Баку: Элм, 1980. 135 с.

31. *Кокоза А. А.* Методы и критерии качества молоди осетровых рыб, выращенной на осетровых рыбоводных заводах // Биологические основы осетроводства. М.: Наука, 1983. С. 178–190.

32. *Лукьяненко В. И., Касимов Р. Ю., Кокоза А. А.* Возрастно-весовой стандарт каспийских осетровых. Волгоград, 1984. 228 с.

Статья поступила в редакцию 30.08.2017

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

***Пономарева Елена Николаевна*** – Россия, 414056, Астрахань, Астраханский государственный технический университет, д-р биол. наук, профессор; профессор кафедры аквакультуры и рыболовства; kafavb@mail.ru.

***Неваленный Александр Николаевич*** – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; д-р биол. наук, профессор; профессор кафедры гидробиологии и общей экологии; nevalennyy@rambler.ru.

***Белая Мария Михайловна*** – Россия, 344006, Ростов-на-Дону; Южный научный центр Российской академии наук; канд. биол. наук; научный сотрудник; mashabogat@gmail.com.

***Красильникова Александра Андриановна*** – Россия, 414056, Астрахань, Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук; научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Биотехнологии сохранения и воспроизводства осетровых рыб»; alexandra.kras@yandex.ru.

*E. N. Ponomareva, A. N. Nevalennyy, M. M. Belaya, A. A. Krasilnikova*

## USING CRYOPRESERVED SPERM FOR CREATING STERLET BROOD STOCK

**Abstract.** The research on the sterlet roe artificial insemination using cryopreserved sperm was carried out in the research base of the RAS Southern Scientific Centre (the Rostov region). Reproductive cells (including cryopreserved cells), larvae, sterlet fry (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) were taken as an object of research. A half of the roe (1.7 kg) taken from female starlet was inseminated by native sperm (control group); another half was inseminated by defrosted sperm of two males, which was stored in liquid nitrogen at -196ºC during 3 years (pilot group). Incubation lasted 5 days at water temperature 14.5-18.2ºC, with daily fluctuations of temperature 1.9ºC. Roe insemination in the control group made 90%, in the pilot group – 70%. Roe embryonic growth in the control group was faster, but embryogenesis duration in the pilot group met the standard time limits. Hatching prolarvae in the control group started one hour earlier, than in the pilot group; it made 75% and 60% of all incubated roe, correspondingly. Waste during the period of larvae maturing before they pass to mixed feeding was negligible - 2% in the control group and 3.4% in the pilot group. According to the test results, "open field" of reactivity of the central nervous system in the pilot group fry didn't change from the control group fry, but more active response to stimuli was noted in the pilot group, which is very important for fry adaptation to the conditions in natural water basins. It was established that sterlet offspring obtained with use of defrosted sexual cells does not differ from the offspring obtained using native sperm and has higher morphometric characteristics. The test results prove the possibility and practicability of using sexual cells stored in liquid nitrogen for artificial restoration and formation of sturgeon fish broodstocks.

**Key words:** biodiversity, cryopreservation, sterlet, reproductive cells, broodstock.

*REFERENCES*

1. Bagirov V. A., Ernst L. K., Nasibov Sh. N., Klenovitskii P. M., Iolchiev B. S., Zinov'eva N. A. Sokhranenie bioraznoobraziia zhivotnogo mira i ispol'zovanie otdalennoi gibridizatsii v zhivotnovodstve [Preservation of biodiversity of the fauna and use of remote hybridization in livestock breeding]. *Dostizheniia nauki i tekhniki APK*, 2009, no. 7, pp. 54-56.

2. Rozanov S. I. Mesto geneticheskikh kriobankov v reshenii problemy sokhraneniia bioraznoobraziia [The role of genetic cryobanks in solving the problem of biodiversity preservation]. *Biofizika zhivoi kletki*, 1994, vol. 6, pp. 8-13.

3. Vasil'eva L. M. Sovremennye problemy osetrovodstva v Rossii i mire [Current problems of sturgeon breeding in Russia and in the world]. *Tekhnologii pishchevoi i pererabatyvaiushchei promyshlennosti APK – produkty zdorovogo pitaniia*, 2015, no. 2 (6), pp. 30-36.

4. Ponomarev S. V., Gamygin E. A., Nikonorov S. I., Ponomareva E. N., Grozesku Iu. N., Bakhareva A. A. *Tekhnologii vyrashchivaniia i kormleniia ob"ektov akvakul'tury iuga Rossii (spravochnoe, uchebnoe posobie).* Astrakhan, Nova plius, 2002. 264 p.

5. Ponomareva E. N., Grigor'ev V. A., Sorokina M. N., Korchunov A. A., Khramova A. V. *Tekhnologii sokhraneniia, vosproizvodstva i ratsional'nogo ispol'zovaniia morskikh biologicheskikh resursov v pribrezhnykh zonakh* [Techniques of preservation, reproduction and rational use of the sea biological resources in the coastal zones]. Rostov-on-Don, Izd-vo IuNTs RAN, 2010. 58 p.

6. Anan'ev V. I., Manokhina M. S. K voprosu podgotovki novoi redaktsii nauchno-tekhnicheskoi programmy «Kriobank gidrobiontov» na 2009–2014 gg. [To the question of the new editing of a scientific and technological program "Cryobank of hydrobionts" to 2009-2014]. *Materialy konferentsii «Kriokonservatsiia kak sposob sokhraneniia biologicheskogo raznoobraziia (Pushchino, 28–30 oktiabria 2008 g). Biofizika zhivoi kletki*. Vol. 9. Puschino, 2008. P. 15-16.

7. Bogatyreva M. M. *Optimizatsiia metodov kriokonservatsii spermy dlia sokhraneniia genofonda osetrovykh ryb: avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk* [Optimization of methods of sperm cryopreservation for saving sturgeon genepool. Abstract of dis. … cand. biol. sci]. Astrakhan, 2010. 20 p.

8. Krasil'nikova A. A. Optimizatsiia metodiki kriokonservatsii spermiev ryb [Optimization of the technique of cryopreservation of fish sperm cells]. *VIII ezhegodnaia konferentsiia studentov i aspirantov bazovykh kafedr IuNTs RAN (11–26 aprelia 2012 g., Rostov-na-Donu): tezisy dokladov.* Rostov-on-Don, Izd-vo IuNTs RAN, 2012. P. 55-56.

9. Krasil'nikova A. A. Universal'naia metodika podbora pronikaiushikh krioprotektorov dlia raznykh vidov ryb [Universal technique of selecting permeative cryoprotectors for different fish species]. *X ezhegodnaia nauchnaia konferentsiia studentov i aspirantov bazovykh kafedr IuNTs RAN: tezisy dokladov (g. Rostov-na-Donu, 14–29 aprelia 2014 g.).* Rostov-on-Don, Izd-vo IuNTs RAN, 2014. P. 25-26.

10. Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M. Sovershenstvovanie kriobiologicheskikh podkhodov s tsel'iu povysheniia rezistentnosti spermatozoidov ryb pri nizkotemperaturnom konservirovanii [Improving cryobiologic approaches to raise resistance of the sperm cells during low-temperature preservation]. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii «Aktual'nye voprosy rybnogo khoziaistva i akvakul'tury basseinov iuzhnykh morei» (g. Rostov-na-Donu, 1–3 oktiabria 2014 g.).* Rostov-on-Don, Izd-vo IuNTs RAN, 2014. P. 193-196.

11. Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M. Ob"em zamorazhivaemogo obraztsa kak odin iz faktorov vyzhivaemosti spermatozoidov osetrovykh vidov ryb pri kriokonservatsii [Volume of the frozen sample as one of the viability factors of sturgeon species during cryopreservation]. *Estestvennye nauki*, 2014, no. 2, pp. 62-69.

12. Krasilnikova A. A. Biotekhnologiia nizkotemperaturnogo konservirovaniia reproduktivnykh kletok ryb [Biotechnology of low-temperature conservation of reproductive fish cells]. *Okruzhaiushchaia sreda i chelovek. Sovremennye problemy genetiki, selektsii i biotekhnologii: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi kon-ferentsii i molodezhnoi nauchnoi konferentsii pamiati chlena-korrespondenta RAN D. G. Matishova (Ro-stov-na-Donu, 5–8 sentiabria 2016 g.).* Rostov-on-Don, IuNTs RAN, 2016. P. 534-536.

13. Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M. Korreliatsiia ob"emov endotselliuliarnogo protektora v kriozashchitnykh sredakh i vnutrikletochnoi zhidkosti spermatozoidov osetrovykh ryb [Correlation of volumes of endocellular protector in cryoprotective media and intracellular fluid of spermatozoa in sturgeon fishes]. *Estestvennye nauki*, 2015, no. 3 (52), pp. 105-111.

14. Krasil'nikova A. A. *Sovershenstvovanie protsessa kriokonservatsii reproduktivnykh kletok samtsov ryb: avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk* [Improving the process of reproductive cell cryopreservation in male fishes: Abstract of dis. … cand. biol. sci.]. Astrakhan, 2015. 24 p.

15. Matishov G. G., Ponomarev S. V., Bakaneva Iu. M., Bolonina N. V., Grozesku Iu. N., Kokoza A. A., Raspopov V. M., Ponomareva E. N., Fedorovykh Iu. V., Lagutkina L. Iu., Belaia M. M., Bakhareva A. A., Krasil'nikova A. A. *Spravochnik rybovoda. Innovatsionnye tekhnologii akvakul'tury iuga Rossii* [Fish breeder's manual. Innovative technologies of aquaculture in the South of Russia]. Rostov-on-Don, Izd-vo IuNTs RAN, 2013. 224 p.

16. Ponomareva E. N., Bogatyreva M. M., Tikhomirov A. M. Povyshenie vyzhivaemosti polovykh kletok v protsesse kriokonservatsii s ispol'zovaniem elektrostimuliatsii [Increasing viability of gametes during cryopreservation using electrostimulations]. *Doklady Akademii nauk*, 2010, vol. 431, no. 2, pp. 264-265.

17. Ponomareva E. N., Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M., Firsova A. V. Novye biotekhnologicheskie metody kriokonservatsii reproduktivnykh kletok osetrovykh vidov ryb [Modern biotechnological methods in cryopreservation of reproductive cells of sturgeon fishes]. *Iug Rossii: ekologiia, razvitie*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 59-68.

18. Ponomareva E. N., Krasil'nikova A. A., Firsova A. V., Belaia M. M. Kriokonservatsiia reproduktivnykh kletok ryb: istoriia i perspektivy [Cryopreservation of fish reproductive cells: history and prospects]. *Rybnoe khoziaistvo*, 2017, no. 4, pp. 85-88.

19. Cabrita E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cerezales S., Herráez M. P. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives (Review). *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, vol. 26, iss. 5, pp. 623-635.

20. Sampath Kumar J. S., Betsy C. J. Cryopreservation of fish gametes and its role in enhancing aquaculture production. Book Chapter. *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*, 2015, pp. 241-246.

21. Persov G. M. Dozirovanie spermiev kak sposob upravleniia oplodotvoreniem iaitsekletok osetrovykh [Dosing sperm cells as a control method of insemination of sturgeon ovicells]. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 1953, vol. 90, no. 6, pp. 1183-1185.

22. Tikhomirov A. M. Rezul'taty kriokonservatsii spermatozoidov sevriugi s ispol'zovaniem raznykh krioprotektorov [The results of stellate sturgeon sperm cells cryopreservation using different cryoprotectors]. Konservatsiia geneticheskikh resursov. Materialy KhVI soveshchaniia. Pushchino, IBK RAN, 2002. P. 56-61.

23. Ivanov A. P. *Rybovodstvo v estestvennykh vodoemakh* [Fish breeding in natural water basins]. Moscow, Agropromizdat, 1988. 367 p.

24. Podushka S. B. *Sposob polucheniia ikry ot samok osetrovykh ryb* [Method of obtaining roe from female sturgeon species]. Avtorskoe svidetel'stvo SSSR № 1412035, 1986.

25. Nikonorov S. I., Vitvitskaia L. V. *Ekologo-geneticheskie problemy iskusstvennogo vosproizvodstva osetrovykh i lososevykh ryb* [Ecological and genetic problems of artificial reproduction of sturgeon and salmon fishes]. Moscow, Nauka Publ., 1993. 251 p.

26. Lakin G. F. *Biometriia* [Biometry]. Moscow, Vysshaia shkola Publ., 1973. 343 p.

27. Adler Iu. P. *Vvedenie v planirovanie eksperimenta* [Introduction into the experimental design]. Moscow, Metallurgiia Publ., 1969. 155 p.

28. Vasnetsov V. V. *Etapy razvitiia kostistykh ryb* [Stages of development of bony fishes]. *Ocherki po obshchim voprosam ikhtiologii*. Moscow, Leningrad, Izd-vo AN SSSR, 1953. P. 207-217.

29. Mukhachev I. S. *Biologicheskie osnovy rybovodstva* [Biological backgrounds of fish breeding]. Tyumen, Izd-vo TGU, 2004. 300 p.

30. Kasimov R. Iu. *Sravnitel'naia kharakteristika povedeniia dikoi i zavodskoi molodi osetrovykh v rannem ontogeneze*. Baku, Elm Publ., 1980. 135 p.

31. Kokoza A. A. Metody i kriterii kachestva molodi osetrovykh ryb, vyrashchennoi na osetrovykh rybovodnykh zavodakh [Methods and criteria of quality in sturgeons grown in sturgeon fish ponds]. *Biologicheskie osnovy osetrovodstva.* Moscow, Nauka Publ., 1983. P. 178-190.

32. Luk'ianenko V. I., Kasimov R. Iu., Kokoza A. A. *Vozrastno-vesovoi standart kaspiiskikh osetrovykh* [Age/weight standard of the Caspian sturgeon]. Volgograd, 1984. 228 p.

The article submitted to the editors 30.08.2017

## *INFORMATION ABOUT THE AUTHORS*

***Ponomareva Elena Nikolaevna*** – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Doctor of Biology, Professor; Professor of the Department of Aquaculture and Fishery; kafavb@mail.ru.

***Nevalennyy Alexander Nickolaevich*** – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Doctor of Biology, Professor; Professor of the Department of Hydrobiology and General Ecology; nevalennyy@rambler.ru.

***Belaya Maria Mikhailovna*** – Russia, 344006, Rostov-on-Don; Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences; Candidate of Biology; Researcher; mashabogat@gmail.com.

***Krasilnikova Alexandra Andrianovna*** – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Candidate of Biology; Researcher of Laboratory "Biotechnology of Couservation and Reproduction of Valuable Fish Species"; alexandra.kras@yandex.ru.