

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
Государственное научное учреждение
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ИРРИГАЦИОННОГО РЫБОВОДСТВА

Сборник научных трудов

Научные основы
сельскохозяйственного рыбководства:
состояние и перспективы развития



Москва - 2010

УДК 639.3
ББК 47.2

Рецензенты: д.с.-х.н., профессор Козин Р.Б., Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии (МГАВМиБ) им. К.И.Скрябина.
д.б.н., профессор Панов В.П., Российский государственный аграрный университет - Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева (РГАУ – МСХА им. К.А.Тимирязева)

Научные основы сельскохозяйственного рыбоводства: состояние и перспективы развития. Сборник научных трудов. /ГНУ ВНИИ ирригационного рыбоводства – Москва, 2010. – 452 с.

Редакционная коллегия: Серветник Г.Е., Новоженин Н.П., Шишанова Е.И., Шульгина Н.К.

Ответственный за выпуск: Серветник Г.Е.

Все статьи приведены в авторской редакции

ISBN

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОТЕХНОЛОГИИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ МАТОЧНЫХ СТАД ОСЕТРОВЫХ РЫБ

© 2010 С.И.Савушкина

Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного
рыбоводства Россельхозакадемии

В данной статье представлены рыбоводные и физиологические характеристики осетровых рыб, полученных с использованием криоконсервированной спермы. Маточное стадо сибирского осетра было сформировано в течение 8 лет и имело высокое репродуктивное качество. Подвижность спермы производителей сибирского осетра-крио была на уровне 90-100%

Ключевые слова: осетровые рыбы, воспроизводство, маточное стадо, криоконсервация спермы, репродуктивные качества, физиологическая характеристика

Савушкина Светлана Ильинична, доктор биологических наук, заведующая лабораторией инновационных технологий объектов сельскохозяйственного рыбоводства. E-mail: savushkinasi@mail.ru

Разработка технологий низкотемпературной консервации спермы различных видов рыб перспективна для сохранения и восстановления редких, исчезающих видов рыб, а также для сохранения биоразнообразия объектов аквакультуры. Проблема мобилизации и сохранения генофонда рыб включена в Концепцию развития рыбного хозяйства Российской Федерации на период до 2020 года, где сформулированы цели, задачи, направления и способы обеспечения интересов России в сфере эффективного использования, охраны и воспроизводства водных биологических ресурсов и повышения конкурентоспособности рыбной продукции [1].

Учитывая важность проблемы сохранения генофонда объектов аквакультуры, нами проводится научно-исследовательская работа по совершенствованию криотехнологий консервации спермы рыб для искусственного воспроизводства и в, частности, осетровых рыб. Это обусловлено тем, что в настоящее время популяции осетровых рыб находятся в критическом состоянии: практически отсутствует промысловое, значительно снизилось естественное воспроизводство, увеличивается потенциал искусственного рыборазведения [2, 3, научные конференции по осетровым рыбам 2004, 2006, Каспий – 2008].

Пополнение естественных запасов путем искусственного воспроизводства осетровых рыб в 60-70 гг. прошлого столетия удалось сохранить весь видовой спектр популяций осетровых. При этом к концу 70-х - началу 80-х годов доля «заводских» осетровых рыб в уловах составляло 30-40%. В настоящее время численность популяций каспийских осетров на 60-80% формируется за счет искусственного разведения [4, 5].

Учитывая кризисное состояние естественных популяций осетровых рыб, весьма выгодно использовать криоконсервированную сперму. Использование для искусственного осеменения икры рыб заморожено-оттаянной спермы дает возможность обслужить одним лучшим производителем маточное стадо в разных хозяйствах. Такую организацию применения криоконсервированной спермы рыб следует рекомендовать рыбоводным хозяйствам с недостаточным количеством высококачественных производителей.

Вместе с тем следует отметить, что в настоящее время не удается достичь качества заморожено-оттаянной спермы рыб до уровня рыбоводных нормативов. Однако отдельные работы показывают получение до 90% (от контроля) оплодотворения производственных партий икры сибирского осетра [6]. В наших исследованиях использование криозащитной среды С-3 и С-4 для замораживания спермы сибирского осетра позволяет получать оплодотворяемость икры 60-70%.

Потомство сибирского осетра, при воспроизводстве которого использована криоконсервированная сперма (в дальнейшем осетр-крио), имеет более высокие продуктивные качества за счет увеличения содержания самок (62,5%). Это преимущество позволяет наряду с более высоким темпом роста и массой тела (половой диморфизм), получать также и такой высокопитательный продукт как черная икра.

В настоящее время известны работы по замораживанию спермы 200 видов рыб. Как правило, качество заморожено-оттаянной спермы различных видов рыб определяется по оплодотворяемости икры, реже - по количеству личинок после эмбриогенеза. Наиболее полно изучено потомство рыб-крио у карпа (три поколения) и сибирского осетра [5, 6].

Для правильного использования замороженно-оттаянной спермы осетровых рыб при искусственном воспроизводстве и получения потомства представлены обобщенные результаты многолетних исследований (1998-2008 гг.). В данной работе представлен способ формирования маточного стада осетровых рыб, при воспроизводстве которого использована криоконсервированная сперма сибирского осетра.

Для успешной работы при ведении племенного дела в рыбоводных хозяйствах необходимы следующие требования:

- оценка имеющегося стада и отбор племенного ядра (возрастной, пластический, репродуктивный, меристический, физиологический, состояние здоровья и др.);
- целенаправленное выращивание ремонтного и формирование маточного стада с оценкой рыб на всех этапах онтогенеза;
- подбор производителей для воспроизводства.

На основе этих критериев проведена работа с потомством сибирского осетра, полученного с использованием заморожено-оттаянной спермы. Базой для проведения исследований являлись производственные условия племенного участка Конаковского завода товарного осетроводства (Тверская обл.). Исследования осуществляли на производителях сибирского осетра ленской и байкальской популяции. Средняя масса сибирских самцов ленской и байкальской популяции составляли в среднем 7,0 кг и 6,5 кг (8-9 лет), соответственно. Самки ленской популяции этого же возраста имели среднюю массу 9,5 кг (10,0, 9,5 и 9,0 кг), байкальской популяции – в среднем 9,6 кг. Производители, участвующие в эксперименте, соответствовали рыбоводному стандарту и генетическому паспорту вида [7].

За период исследований было использовано 10-15 самцов сибирского осетра ленской и байкальской популяции для индивидуальных скрещиваний с применением криотехнологии. Основная характеристика нативной спермы самцов осетровых рыб представлена в табл. 1.

Таблица 1. Качество спермы сибирских осетров в период нереста

Показатели	Ленский осетр	Байкальский осетр
Концентрация спермы, млн./мкл	1,41	1,39
pH	7,0	7,0
Общая площадь головки спермия, псe1 (1×10^6 мм)	2747,5	2581,5
Подвижность спермы, %	90	100

Физиолого-биохимические показатели качества нативной спермы сибирских осетров обеих популяций практически на одном уровне: pH спермы в пределах 7,0-7,1, активность дегидрогеназ в среднем 16,5-17,5 мин. Сперматозоиды ленских осетров более крупные, по сравнению с клетками байкальского осетра на 6,4%, а их концентрация выше лишь на 1,4% (табл. 1).

Наряду с самцами проведена оценка качества икры осетра ленской и байкальской популяции, используемой в опытах (n=10). Икра, используемая для осеменения соответствовала рыбоводным нормативам: легкое сцеживание, однородный темно-серый цвет, овариальная жидкость прозрачная, без сгустков крови. Средняя масса икринок (n=90 шт.) составляла 14,1 мг (колебания по отдельным самкам 13,0-15,1 мг) Диаметр икры колебался в пределах 2,5-3,2 мм и составил в среднем 2,6 мм. Приклеивание оплодотворенной икры наступало через 15-20 минут, что свидетельствует о использовании в опытах созревшей икры.

Икра самок (300-400 г) была оплодотворена нативной (контроль) и криоконсервированной (опыт) спермой сибирских осетров в соответствии с методическим пособием [8]. Сперматолитический анализ осетровых рыб до и после

криоконсервации проводили по общепринятым методам, стадии развития икры (эмбриогенез) определяли по классификации Т.А.Детлаф, А.С.Гинзбург [9]. Рыбоводно-биологическая оценка потомства сибирского осетра, полученного с использованием криоконсервированной и нативной спермы (в дальнейшем осетр-крио) проведена по пластическим, меристическим, физиолого-биохимическим и цитологическим параметрам на разных этапах онтогенеза. Выращивание потомства и формирование маточного стада вели в условиях осетрового завода в соответствии с технологическими нормами [10].

Чистая линия молоди сибирского осетра была получена с использованием криоконсервированной и нативной спермы самцов ленской популяции при оплодотворении производственной порции икры самок ленской популяции. Подвижность заморожено-оттаянной спермы ленских осетров составляла 10-40%, а процент оплодотворения ею икры составил 17,7 против 79,6% в контроле, где была использована нативная сперма. Стадии развития эмбрионов сибирских осетров в обоих вариантах были одинаковыми, но различались в количественном отношении. Выклев предличинок осетров в опыте и контроле начался одновременно и продолжался у осетров-крио 30 часов, а у рыб в контроле 39 часов, при их выходе 5,1 и 21,0%, соответственно. Качественный состав погибшей икры за период инкубации, определенный по методу Марти (1964), в обоих вариантах был различным (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика отхода эмбрионов сибирского осетра после инкубации

Показатели	Осетр-крио		Осетр	
	шт.	%	шт.	%
Ранние стадии развития	17136	30,06	9699	17,01
Невыклюнувшиеся личинки	1920	3,36	576	1,01
Личинки, хвостом вперед	960	1,68	310	0,54
Не всплывшие личинки	240	0,42	354	0,62

Дальнейшее выращивание сибирского осетра-крио проводили в бассейнах при производственной плотности посадки рыб. Анализ рыбоводных показателей выявил преимущества в темпе роста осетров, полученных с использованием криоконсервированной спермы. Их средняя масса тела на первом году жизни (7 месяцев) составила 250,0 г против 170,0 г у осетров в контроле.

При этом физиологическое состояние осетров-крио отличались более высоким содержанием гемоглобина в крови (7,3 против 6,9 г% в контроле), количеством эритроцитов и гематокрита. Концентрация белка в сыворотке их крови составляла 5,8 г%, а количество иммунокомпетентных клеток (моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов и базофилов) было достоверно выше, чем у осетров в контрольном варианте.

Двухгодовики и трехлетки сибирского осетра-крио ленской популяции также отличались более высокими рыбоводными показателями по сравнению с таковыми у рыб контрольного варианта, где использовалась свежая сперма (табл. 3).

Таблица 3. Рыбоводные показатели двухгодовиков и трехгодовиков сибирских осетров

Показатели	Двухгодовики		Трехгодовики	
	Осетр-крио	Осетр	Осетр-крио	Осетр
Средняя масса, кг	0,93±0,08	0,84±0,08	3,42±0,10	3,10±0,15
Длина тела, см	51,50±1,90	49,20±3,40	65,30±1,40	63,90±1,70
Коэффициент упитанности	0,70	0,67	0,67	0,70

Причем, масса тела чистой линии (ленские) осетров-крио была выше, чем у рыб в контроле на 10,7%, а у трехгодовиков осетра-крио это преимущество составляло 10,3%.

Гематологические исследования двухгодовиков и трехгодовиков сибирского осетра обнаружили увеличение концентрации гемоглобина (Hb) в крови осетров-крио, по сравнению с осетрами контроля, на 14,6%, а гематокрита –на 16,1% (табл. 4). У трехгодовиков осетра-крио также отмечено повышение концентрации гемоглобина на 16,4%, а гематокрита - на 6,5%.

Таблица 4. Характеристика крови двухгодовиков и трехгодовиков сибирского осетра

Показатели	Двухгодовики		Трехгодовики	
	Осетр-крио	Осетр	Осетр-крио	Осетр
Hb, г%	5,50±0,41	4,80±0,30	7,10±0,67	6,10±0,26
Гематокрит, %	30,80±1,80	26,60±1,30	31,20±1,90	29,30±1,40
СКГЭ, %	17,85±1,21	18,04±1,00	22,70±1,30	20,80±1,10
КБ, г%	2,80±0,10	3,10±0,30	3,80±0,30	2,80±0,20

Кислород-переносящая функция эритроцитов в крови двухгодовиков (СКГЭ) осетра-крио и осетров в контроле практически были на одном уровне (17,8-18,0%). У трехгодовиков сибирского осетра ленской популяции в обоих вариантах эти показатели были выше, чем у двухгодовиков, что свидетельствует о более высоком уровне гомеостаза осетров старшего возраста. Концентрация белка (КБ) в крови осетров была на достаточно высоком уровне во всех вариантах (2,8-3,8 г%). При этом существенное преимущество отмечено у трехгодовиков осетра-крио по сравнению с осетрами контроля на 35,7%, что свидетельствует о более высоком уровне пластического обмена.

Первое разделение сибирских осетров по полу было проведено в возрасте 45 месяцев (четырёхлетки) в период бонитировки. Пол рыб и половозрелость самок определяли по биопсии гонад. Все исследуемые самки осетров-крио и контрольного варианта находились в начальной стадии созревания - 2 стадия зрелости (конец ноября). Самцы осетров-крио уступали самкам-крио по массе тела (5,02 против 7,4 кг) и коэффициенту упитанности, который составил 1,4 против 1,1 (табл. 5).

Таблица 5. Морфометрическая характеристика сибирских осетров-четырёхгодовиков

Показатели	Ленский осетр			
	самки		самцы	
	осетр-крио	осетр	осетр- крио	осетр
Масса тела, кг	7,4±0,80	7,2±0,41	5,2±0,20	6,0±0,10
Длина тела, см	80,5±3,10	80,0±4,90	77,0±4,50	77,5±3,70
Коэффициент упитанности	1,42±0,05	1,35±0,01	1,10±0,01	1,28±0,09

Качество спермы осетров-крио характеризовалось высокой подвижностью спермиев, достигающей 80-100%. Общий объем эякулята составил в среднем 60 мл.

Самки-четырёхгодовики осетров-крио ленской популяции по массе тела отличались незначительно от самок, выращенных по традиционной технологии. Разница по этому показателю составила у них лишь 100-200г.

Сперма самцов-пятигодовиков осетра-крио, по-прежнему, имела высокую подвижность сперматозоидов (100%). Самки осетра-крио имели икру на 2 стадии созревания, как и в контроле. Соотношение самцов и самок осетра-крио в опыте составляло 37,5 и 62,5%, соответственно, а у осетров в контроле - 46 и 54%.

За период зимовки прирост массы тела самок осетров-пятигодовиков всех исследуемых групп был незначительным и составил в среднем 300 г (табл.6). При этом средняя масса тела самок-крио ленской популяции превышала лишь на 200 г осетров контрольного варианта

Таблица 6. Рыбоводно-биологическая характеристика самцов и самок пятигодовиков сибирского осетра

Показатели	Ленский осетр			
	самки		самцы	
	осетр-крио	контроль	осетр-крио	контроль
Масса тела, кг	7,70±0,7	7,50±0,4	5,8±0,7	6,20±0,5
Длина тела, см	81,0±5,9	81,6±7,5	78,0±7,3	78,8±5,8
Коэффициент упитанности	1,40±0,1	1,37±0,1	1,35±0,1	1,53±0,1

Гематологические исследования крови самок-пятигодовиков ленского осетра-крио и рыб контрольного варианта показали, что весной концентрация гемоглобина в крови осетров обеих групп была невысокой и колебалась в пределах 4,5-6,0 г%.

В летний и осенний периоды выращивания осетров-шестилеток различных групп отмечено значительное увеличение массы тела. Прирост массы тела у осетров-крио и обычных осетров ленской популяции был самым высоким и составил у самок 2,4-2,6 кг, а у самцов -1,0-1,8 кг.

Наряду с этим отмечена высокая концентрация белка в крови самок (6,0-6,2г%) обоих вариантов, что обусловлено повышением температуры воды в бассейнах (климатическое повышение) до 20⁰С и усилением интенсивности питания (табл. 7). В результате увеличилась концентрация глобулинов в крови самок до 70% за счет активизации иммунной системы. Следует отметить, что белковый коэффициент у самок-крио был выше, что свидетельствует о преимуществе у них белкового роста.

Таблица 7. Белковый состав сыворотки крови самок-шестилеток сибирского осетра

Показатели	Ленский осетр	
	Опыт	Контроль
Общий белок, г%	6,21	6,00
Содержание альбуминов, г%	1,85	1,70
- %	29,85	28,30
Содержание глобулинов, г%	4,36	4,30
- %	70,15	71,70
Белковый коэффициент (БК)	0,42	0,39

Выращенное маточное стадо самцов и самок шестигодовиков осетров-крио характеризуется высокими показателями массы тела (8,7-10,1 кг - самки и 6,8-7,0 кг - самцы) и коэффициентами упитанности (табл. 8).

Таблица 8. Морфофизиологическая характеристика сибирских осетров-шестигодовиков

Показатели	Ленский осетр			
	Осетр-крио		Контроль (осетр)	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Масса тела, кг	10,12±0,9	6,8±0,32	10,10±1,0	7,0±0,50
Длина тела l, см	102,7±8,5	101,0±9,1	103,3±8,1	101,6±9,5
Длина тела L, см	114,7±9,1	107,0±8,5	116,0±10,2	113,0±8,5
Обхват тела O, см	49,3±3,5	-	49,7±4,1	-
Индекс обхвата O/L, %	48,3±2,4	-	41,7±3,5	-
К уп.	0,92±0,04	0,66±0,03	0,88±0,05	0,67±0,04

Самки сибирского осетра-крио и самки в контроле созрели одновременно в шестигодовалом возрасте при массе тела 10,1 кг. Количество икры от одной самки осетра-крио составляло в среднем 0,6 кг, рабочая плодовитость достигала 30,1 тыс.шт., а оплодотворяемость икры была на уровне 73,6%. У самок сибирского осетра в контроле, эти показатели были несколько ниже, а разница составляла лишь 1-5%.

Таким образом, применение криоконсервированной спермы осетровых рыб в рыборазведении показало определенную эффективность при формировании маточного стада для племенных целей. Положительные стороны полученного маточного стада-крио заключаются в том, что потомство имеет преимущества в количестве самок-крио и их физиолого-биохимическом статусе. Морфометрические и пластические параметры осетров-крио соответствуют виду сибирского осетра, а репродуктивные качества производителей соответствуют рыбоводным нормативам. Производители сибирского осетра (самцы и самки) успешно используются для воспроизводства на племенном участке осетрового завода.

Длительное хранение спермы в жидком азоте (с исходным уровнем подвижности сперматозоидов) позволяет заготавливать сперму от высококачественных производителей и использовать ее для осеменения икры осетровых рыб независимо от срока нереста самок, для промышленных целей и транспортировки ее на любые расстояния. Это позволит устранить недостаток высококачественных производителей для получения жизнестойкой молоди в фермерских хозяйствах, а также обеспечить ее выпуск в естественные водоемы и водоемы аквакультуры.

Сравнительный анализ на основе многолетних данных (1998-2008 гг.) потомства чистой линии ленской популяции сибирского осетра-крио показал ее соответствие племенным качествам. Полученные результаты работы позволяют рекомендовать использование криоконсервированной спермы осетровых рыб для формирования маточного стада в племенных хозяйствах и этим способствовать быстрейшему улучшению рыбоводства.

Однако недостаточная разработка технологического процесса криоконсервации спермы осетровых рыб и невысокая сохранность живых оттаянных сперматозоидов отражается на оплодотворяемости икры и количестве выхода личинок осетров-крио. В связи с этим необходимо дальнейшее глубокое изучение технологических приемов и совершенствование методов криоконсервации спермы рыб, направленных на повышение сохранности живых замороженно-оттаянных сперматозоидов, способных к оплодотворению икры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Концепция развития рыбного хозяйства Российской Федерации до 2020 года // Рыбные ресурсы, 2008. -С.3-18.
2. Баранникова И.А., Никаноров С.И., Белоусов А.Н. Проблема сохранения осетровых России в современный период // Межд. конф.: Осетровые на рубеже XXI века / Тез.докл. –Астрахань: КаспНИРХ, 2000. -С.7-8.
3. Эрнст Л.К., Багиров В.А., Насибов Ш.Н. Криоконсервации семени и его роль в сохранении биоразнообразия животных // Мат. Международной научно-практической конференции Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных. -Дубровицы-Быково, 2007. -С.35-40.
4. Баранникова И.А., Никаноров С.И., Белоусов А.Н. Проблема сохранения осетровых России в современный период //Межд. конф. Осетровые на рубеже XXI века / Тез.докл. –Астрахань: КаспНИРХ, 2000. -С.7-8.
5. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Козовкова Н.А. Низкотемпературные генные банки // Рыбоводство и рыбное х-во. -2004. -№1. -С.79.
6. Савушкина С.И. Интенсивное воспроизводство рыб в разных водоемах с использованием биотехнических приемов // Автореф. дис. докт. биолог. наук. -Лесные Поляны Московской области, 2004. -40 с.
7. Мюге, Барминцева, Расторгуев и др. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации вида / Генетика. -2008. -Т.44. -С.913-919.
8. Цветкова Л.И., Савушкина С.И., Титарева, Петрова Т.Г., Кузовкова Н.А., Кушнерова С.В. Рыбоводно-биологические нормативы выращивания сибирского осетра (технология). -М.:ВНИИПРХ., 1997. -20 с.
9. Детлаф Т.А., Гинзбург А.С. Зародышевое развитие осетровых рыб (севрюги, осетра и белуги) в связи с вопросами их разведения. -М.: АН СССР, 1954. -235 с.
10. Петрова Т.Г., Кузовкова Н.А., Кушнерова С.В. Рыбоводно-биологические нормативы выращивания сибирского осетра (технология). -М.:ВНИИПРХ.,1997. -20с.

THE USING OF CRYOTECHNOLOGIE BY FORMATION OF PRODUCTION HERD OF STUGERON FISH

© 2010 S.I.Savushkina

All-Russian Scientific Research Institute of Irrigational Fish Breeding
of the Russian Academy of Agricultural Sciences

Fish breeding and physiological characteristics of stugeron fish bred with the use of cryoconservation sperm are presented in the article. The production herd of sibirien stugeron had been formed for 8 yaers and had a high reproduction quality. The fertility of sperm of sibirien stugeron-cryo was 90-100%.

Key words: stugeron fish, development, production herd, cryoconservation sperm, reproduction quality, physiological characteristic

Savushkina Svetlana Ilyinichna, Doctor of Biology, Head of the Laboratory of Innovative Technologies of Agricultural Fish Culture. E-mail: savushkinasi@mail.ru