

ЗАВИСИМОСТЬ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЕЛЯДИ (*Coregonus peled*) ОТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ХРАНЕНИЯ

Н. В. Смешливая, С. М. Семенченко

ФГУП «Государственный научно-производственный центр рыбного хозяйства», г. Тюмень
NSmeshlivaya@mail.ru

В статье приводятся данные о зависимости фертильности половых клеток речной формы пеляди от продолжительности хранения в воздушной среде. Установлено, что зрелая икра с сопутствующей овариальной жидкостью при хранении во влажной воздушной среде и температуре 0,5–1,0 °С не снижает свою фертильность в течение первых трех суток. Сперма, хранящаяся в аналогичных условиях, не утрачивает оплодотворяющей способности не менее двух суток с момента отбора. Показано, что последующее снижение фертильности икры при хранении тесно связано с нарушением процесса ее оводнения после активации, а снижение оплодотворяющей способности хранящихся спермиев сопряжено с затуханием их двигательной активности.

Ключевые слова: речная форма пеляди, икра, сперма, фертильность, хранение, продолжительность движения спермиев.

Введение

В рыбоводной практике периодически возникает потребность в хранении икры или спермы рыб. Принципиальная возможность относительно кратковременного хранения половых продуктов позволяет их транспортировать до момента оплодотворения, а также получать оплодотворенную икру при индивидуальной асинхронности «созревания» самцов и самок в случае дефицита производителей. Поэтому изучение взаимосвязи фертильности зрелых половых клеток рыб с длительностью их хранения имеет как научный, так и практический интерес. В частности, эта проблема актуальна и для сиговых рыб (*Coregonidae*), являющихся объектами массового искусственного воспроизводства.

В производственном процессе рыбоводы чаще сталкиваются с необходимостью хранения икры, чем спермы. Это связано с тем, что у сиговых при продолжении выдерживания самок после перехода гонад на V стадию зрелости икра способна к эффективному оплодотворению в течение всего 3–5 сут [1].

Кроме того, по нашим наблюдениям, у большинства видов этого семейства из отечественной ихтиофауны происходит неконтролируемое вытекание зрелой икры через 2–4 сут после овуляции. Хранение икры в снулой или умерщвленной самке возможно только в течение нескольких часов [2]. Поэтому сохранение зрелой икры для последующих рыбоводных работ необходимо проводить вне тела самки в сопутствующей овариальной жидкости. С дефицитом спермы сиговых рыб рыбоводы сталкиваются относительно редко, так как самцы находятся в «текущем» состоянии весь нерестовый период, что позволяет их использовать в рыбоводном процессе многократно. Биотехника хранения спермы становится актуальной при проведении селекционно-племенной работы и в случае перевозки ее для промышленной гибридизации.

Таким образом, для оптимизации технологии хранения и транспортировки рыб необходимо выяснить, как долго половые продукты сиговых рыб сохраняют способ-

ность к оплодотворению после их получения.

Цель исследования — выявить зависимость фертильности половых продуктов сиговых рыб от продолжительности их хранения во влажной воздушной среде при слабоположительной температуре.

Ранее продолжительность хранения икры сиговых в теле умерщвленных рыб подробно изучалась А. Н. Кузьминым [2]. Хранение половых продуктов самцов и самок чира, речной и озерной пеляди после их сбора частично рассматривалось Л. В. Кугаевской [3].

Материал и методика

Материалом для исследования служили половые продукты речной формы пеляди из Обского бассейна. Опыты проводили в октябре 2013 г. на базе сбора икры «Рахтынья» во время массового нереста (р. Ляпин — приток р. Северной Сосьвы, Березовский р-н, ХМАО).

С икрой пеляди выполнено три экспериментальные серии, включающие 28 опытов. В каждой серии использовали икру, отцеженную от одной самки, находящейся на V стадии зрелости. Около 2000 икринок от каждой самки с сопутствующей овариальной жидкостью помещали в один слой в отдельную сухую чашку Петри, в которой проходило ее дальнейшее хранение в изотермическом ящике при температуре 0,5–1,0 °С. Температуру измеряли при помощи электронного термометра с выносным датчиком с точностью 0,1 °С. Об изменении фертильности хранящейся икры судили по доле оплодотворенных нормально развивающихся икринок в пробе с известной длительностью хранения. Для этого с интервалом в одни сутки из чашки изымали по 200 икринок и осеменяли сухим способом смесью свежей спермы от 4–7 самцов. Объем спермы, используемой в каждом опыте, равнялся 0,1 мл. Температура воды, добавляемой при активации икры, составляла 0,5–1,0 °С; используемой для оводнения — 0,5–3,0 °С.

Первая проба отбиралась непосредственно перед размещением икры на хранение и служила контролем ее первоначального качества. В связи с тем, что оплодотворяемость икры в контроле превышала 99 %, при отражении результатов опытов контрольная величина не учитывалась. Оплодотворяемость икры определяли на стадии среднеклеточной морулы методом бокового микроскопирования [4].

Для оценки изменения качества спермы при ее хранении было проведено три серии, включающие 28 опытов. Объем эякулята одного самца речной пеляди недостаточен для проведения отдельной серии опытов. В связи с этим в каждой серии использовали смесь спермы от 10–15 самцов. Сперму отцеживали насухо в чашку Петри. При этом следили за тем, чтобы в пробу не попадали кровь, вода, фекалии или чешуя. После тщательного перемешивания сперму делили при помощи пипетки-дозатора на 9 порций объемом 1,5 мл каждая. Затем порции заливали в пластиковые пробирки объемом 10,5 мл и плотно закрывали пробкой. Пробирки со спермой хранили в изотермическом ящике при температуре 0,5–1,0 °С. Динамику качества спермы в процессе хранения оценивали по изменению ее оплодотворяющей способности. С этой целью порции хранящейся спермы с суточным интервалом последовательно использовали для осеменения свежих порций икры от одной полноценной самки. Сперму в пробирке перед использованием обязательно перемешивали. Количество икры в порции — около 200 шт., объем спермы — 0,1 мл. В качестве контроля служила икра, используемая в опытах, осемененная смесью свежей спермы от 4–5 самцов. Контрольная оценка качества икры осуществлялась для каждого опыта отдельно.

В каждом опыте полученная величина оплодотворяемости отражает не только текущую способность спермиев к оплодотворению, но и фертильность икринок, используемых для тестирования спермы. Поэтому

для того чтобы отразить в результатах долю икринок, неоплодотворенных именно в связи со снижением качества спермы при хранении, в каждом опыте за 100%-ю оплодотворяемость условно принималась величина, полученная после вычитания из общей оплодотворяемости икры контрольного значения этого показателя для конкретного опыта. Оплодотворяемость икры в контроле составляла от 87 до 99 %, со средним значением 96 %.

Количество оплодотворенной нормально развивающейся икры в опытах со спермой определялось так же, как и в опытах с хранением икры. Первая проба отбиралась перед началом хранения. В течение каждого опыта параллельно регистрировали продолжительность поступательного движения, общую продолжительность движения, долю движущихся спермиев по стандартной методике [5].

Результаты исследования и их обсуждение

Икра. Доля оплодотворенной икры речной пеляди сразу после отцеживания из самки во всех трех сериях была на уровне 99–100 % (рис. 1). В последующие четверо суток хранения доля оплодотворенных икринок в трех сериях незначительно сократилась в среднем до 96 %, в диапазоне 94–98 %. При хранении качество икры снижалось в каждой из серий опытов с разной интенсивностью. В частности, в первой серии опытов оплодотворяемость икры начала существенно снижаться только через семь суток хранения и достигла 90 %, что всего на 10 % ниже первоначального значения. Через восемь суток хранения икра в этой серии не оводнилась и, как результат, оплодотворенные икринки в опыте не обнаружены. Во второй серии оплодотворяемость икры через шесть суток хранения снизилась до 92 %, через семь суток — до 0 %. Так же как и в первой серии, нулевая оплодотворяемость сопровождалась нарушением про-

цесса оводнения икры. В третьей серии опытов качество икры в процессе ее хранения снижалось интенсивнее, чем в двух предыдущих. Так, через пять суток хранения доля оплодотворенных икринок в опыте составляла 58 %, через шесть суток — 11 %. При этом часть икры не оводнилась. Через семь суток хранения оплодотворенной икры в опыте не обнаружено, вся икра не оводнилась. Как следует из результатов опытов, временной интервал, в течение которого икра пеляди сохраняет способность к эффективному оплодотворению, составляет не менее трех суток при температуре, близкой к 0 °С. Вероятно, результаты хранения на протяжении 5–7 сут определяются индивидуальным состоянием икры на момент ее отцеживания. Методика эксперимента не предусматривала регистрацию момента овуляции икры у каждой из опытных самок. Поэтому не исключено, что возраст зрелых ооцитов, отсчитываемый с момента наступления V стадии зрелости, у использованных самок отличался. Это обстоятельство может объяснить наблюдаемые различия результатов в каждой из серий опытов. При хранении икры свыше 7 сут икра полностью утрачивает способность к оплодотворению. Утрата способности к оплодотворению сопровождается нарушением процесса оводнения икры. Следовательно, предварительная оценка способности нормального оводнения икры после периода хранения может служить экспресс-тестом ее фертильности перед использованием в рыбоводном процессе.

По данным Л. В. Кугаевской [3], икра чира, речной и озерной форм пеляди способна к оплодотворению на уровне контроля только первые 6–8 ч после изъятия из самки при низкой температуре хранения. Можно предположить, что такие серьезные различия с нашими результатами объясняются разной методикой опыта. К сожалению, в работе автора условия хранения не описаны.

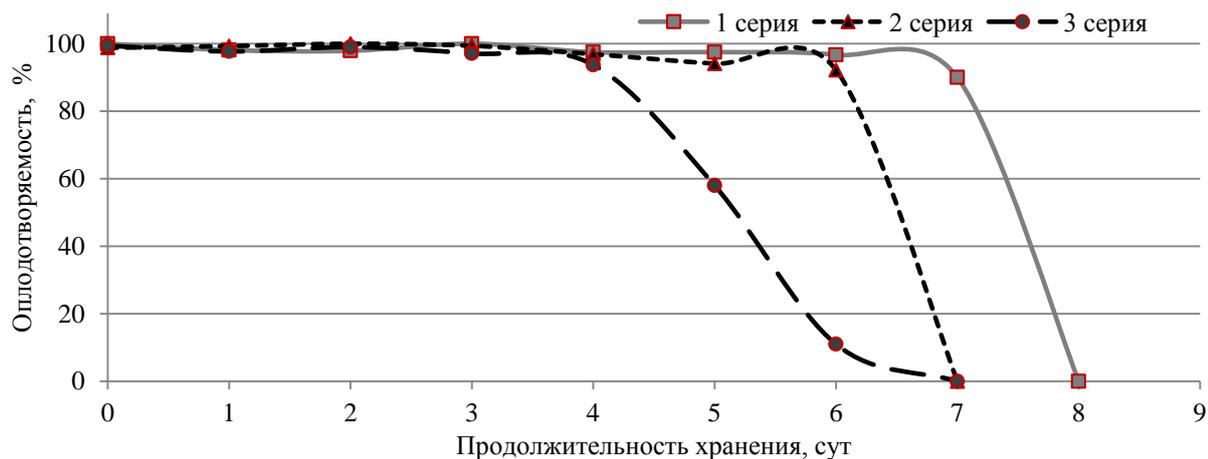


Рисунок 1 — Способность к оплодотворению икры речной формы пеляди при различных сроках хранения в овариальной жидкости при температуре 0,5–1,0 °С

Сперма. Как и следовало ожидать, в опытах при увеличении продолжительности хранения оплодотворяющая способность и продолжительность движения спермиев постепенно снижались. Кроме того, сокращение продолжительности движения сопровождалось и уменьшением доли движущихся спермиев. Во всех сериях наблюдалась высокая доля оплодотворенных икринок до тех пор, пока в опытных пробах спермы четко выделялся период поступательного движения, а доля движущихся спермиев была не менее 80 % (рис. 2, таблица). В частности, в первой серии в течение шести суток хранения продолжительность поступательного движения спермиев была в пределах 80–110 с, доля движущихся — выше 80 %, в этот период доля оплодотворенных икринок в пробах составляла 99–100 %. Во второй и третьей сериях опытов доля оплодотворенных икринок, продолжительность поступательного движения и доля движущихся спермиев на уровне контроля сохранялись в течение трех и четырех суток соответственно. С увеличением продолжительности хранения в сериях происходило резкое сокращение доли поступательно двигающихся спермиев, что проявлялось в снижении их оплодотворяющей способности. Так, в первой серии на шестые сутки хранения продолжительность поступательного движения спермиев составляла 93 с,

оплодотворяемость — 100 %. Через сутки в пробе наблюдалось только колебательное движение у 50 % спермиев, а доля оплодотворенных икринок снизилась до 69 %. Аналогичная картина наблюдалась во второй и третьей сериях. В частности, отсутствие поступательного движения во второй и третьей сериях наблюдалось на четвертые и пятые сутки хранения соответственно. В эти же дни отмечался спад оплодотворяющей способности спермиев на 16 и 21 % соответственно в сравнении со значением за предыдущие сутки хранения. При последующем хранении в течение 1–3 сут в пробах наблюдалось только колебательное движение незначительной части спермиев (10–25 %). В этот же период доля оплодотворенных икринок резко сократилась во всех сериях до 5–15 %. В частности, в первой серии на восьмые сутки хранения продолжительность колебательного движения составляла 98 с у 10 % спермиев, а оплодотворяющая способность спермиев — 15 %. Во второй и третьей сериях на седьмые сутки хранения продолжительность колебательного движения составляла 34 с у 10 % и 56 с у 25 % спермиев соответственно, а доля оплодотворенных икринок в пробах — 5 и 13 % соответственно. При полном отсутствии двигательной активности спермиев во всех трех сериях оплодотворенные икринки не отмечались. Так, в

первой серии отсутствие оплодотворенных икринок в опыте наблюдалось на девятые сутки хранения, во второй и третьей — на восьмые сутки. Тесная связь между двига-

тельной активностью спермиев и их способностью к оплодотворению ранее показана рядом автором для рыб вообще и для сиговых в частности [6–8].

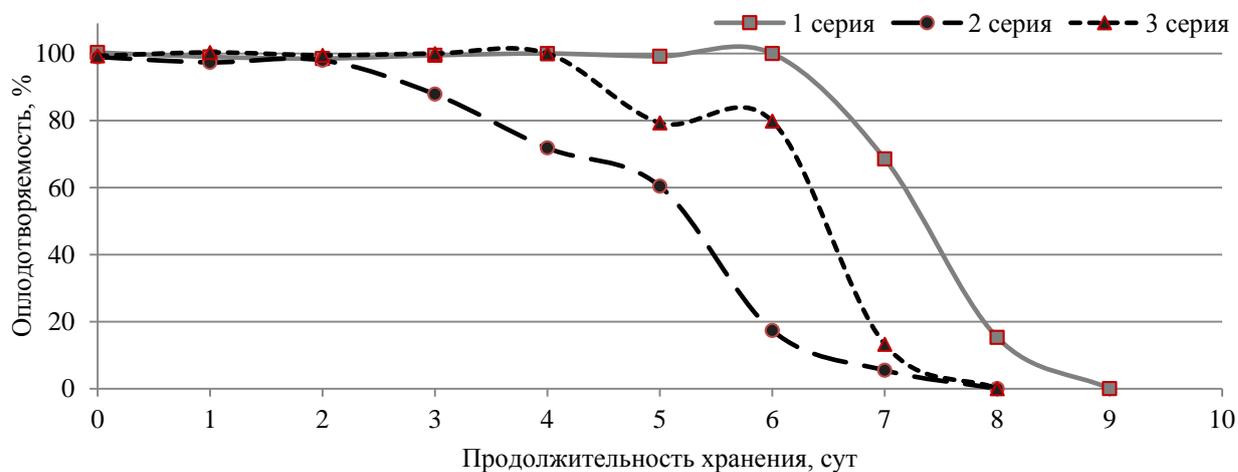


Рисунок 2 — Динамика оплодотворяющей способности спермиев речной формы пеляди в процессе хранения в воздушной среде при температуре 0,5–1,0 °С.

Величины оплодотворяемости приведены с учетом контрольных значений этого показателя для каждого опыта (см. раздел «Материал и методика»)

Динамика оплодотворяющей способности, продолжительности движения и доли движущихся спермиев речной формы пеляди в процессе хранения в воздушной среде при температуре 0,5–1,0 °С

Продолжительность хранения, сут	1 серия				2 серия				3 серия			
	Продолжительность движения спермиев, с		Доля движущихся спермиев, %	Доля оплодотворенной икры*, %	Продолжительность движения спермиев, с		Доля движущихся спермиев, %	Доля оплодотворенной икры*, %	Продолжительность движения спермиев, с		Доля движущихся спермиев, %	Доля оплодотворенной икры*, %
	поступательного	общего			поступательного	общего			поступательного	общего		
0	97	192	95	100	90	228	95	99	127	205	95	99
1	105	210	95	99	110	250	95	97	131	198	95	100
2	89	241	95	99	124	208	95	98	185	210	95	99
3	110	240	90	99	89	210	90	88	109	224	90	100
4	111	250	90	100	0	120	80	72	84	124	90	100
5	79	214	90	99	0	110	80	60	0	161	80	79
6	93	237	80	100	0	50	50	17	0	100	70	80
7	0	118	50	69	0	34	10	5	0	56	25	13
8	0	98	10	15	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—

* Доля оплодотворенной икры в опыте приведена с учетом контрольных значений этого показателя для каждого опыта.

Таким образом, по результатам трех серий опытов, при хранении в описанных условиях, сперма речной пеляди не утрачивает оплодотворяющей способности не менее двух суток. Постепенное снижение качества спермы происходит при длительности хранения от 3 до 8 сут. Оплодотворение икры спермой, хранящейся свыше 8 сут, не происходит. Снижение оплодотворяющей способности спермиев при хранении сопровождается уменьшением их двигательной активности в момент активации.

По данным Л. В. Кугаевской [3], оплодотворяющая способность спермиев речной пеляди, хранящихся в сухих емкостях при температуре 1,5–2,5 °С, сохраняется на уровне контроля 97,5–98,2 % в течение пяти суток. Аналогичный результат был получен нами в первой серии опытов.

Анализ результатов опытов позволяет дать практические рекомендации для отработки биотехники хранения половых продуктов сиговых рыб. В частности, при необходимости можно эффективно использовать для рыбоводных целей икру и сперму пеляди, хранящуюся в сухой посуде при температуре, близкой к 0 °С (например, на смоченном льду), не менее трех суток. При использовании спермы после более длительного хранения (4–6 сут) целесообразно предварительно оценивать двигательную активность сперматозоидов, а при работе с икрой — оценивать ее способность к оводнению.

Данные рекомендации были апробированы авторами на половых продуктах муксуна, доставленных с базы сбора «Томкатка» (р. Обь, Октябрьский р-н, ХМАО) до лаборатории отдела воспроизводства рыбных запасов ФГУП «Госрыбцентр» (г. Тюмень) в ноябре 2008 г. Зрелая икра и сперма хранились во влажной воздушной среде в изотермическом ящике при температуре 0,2–1,0 °С, при этом качество половых продуктов не снижалось в течение 6 сут от момента сбора.

Выводы

1. При хранении зрелой икры речной формы пеляди во влажной воздушной среде и температуре 0,5–1,0 °С ее фертильность не снижается не менее первых трех суток. Стабильно высокая способность к оплодотворению икры сохраняется на протяжении не менее четырех суток. Период снижения фертильности икры приходится на 5–7 сут. Икра, хранящаяся свыше семи суток, не оплодотворяется.

2. Сперма речной формы пеляди, хранящаяся во влажной воздушной среде и температуре 0,5–1,0 °С, не утрачивает оплодотворяющей способности не менее двух суток с момента отбора. Постепенное снижение оплодотворяющей способности спермы происходит при длительности хранения от трех до восьми суток. Сперма, хранящаяся свыше восьми суток, не способна обеспечить оплодотворение икры.

3. Снижение фертильности икры при хранении тесно связано с нарушением процесса ее оводнения после активации, а снижение оплодотворяющей способности хранящихся спермиев сопряжено с затуханием их двигательной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головкин Г. А., Кузьмин А. Н. Биология пеляди и биотехника ее разведения. — М., 1963. — 54 с.
2. Кузьмин А. Н. Опыт оплодотворения икры сиговых после смерти самок // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. — 1961. — Т. 51. — С. 60–64.
3. Кугаевская Л. В., Сергиенко Л. Л. Экологические требования сиговых к некоторым факторам внешней среды: тез. докл. // Третье Всесоюз. совещ. по биологии и биотехнике разведения сиговых рыб. — Тюмень, 1985. — С. 85–89.
4. Черняев Ж. А., Коваленко В. И., Кружалина Е. И., Овчинникова Т. И., Дмитриев И. Л. Методические указания по сбору и хранению икры сиговых рыб на временных рыбоводных пунктах, ее транспортировке и инкубации. — М.: ИЭМЭЖ, 1987. — 82 с.

5. Казаков Р. В. Определение качества половых продуктов самцов рыб: метод. указания. — Л., 1978. — 15 с.
6. Турдаков А. Ф. Воспроизводительная система самцов рыб. — Фрунзе: Илим, 1972. — 280 с.
7. Казаков Р. В., Волощенко Б. Б. Сравнительная характеристика качества спермы гибрида пеляди с чиром и родительских видов при разведении в водоемах Северо-Запада // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. — 1979. — Т. 139. — С. 94–105.
8. Гинзбург А. С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. — М., 1968. — 355 с.

SUMMARY

The article presents data on the dependence of fertility of mature sexual products of *Coregonus peled* on the duration of their storage in the humid air. The experiment showed that mature eggs with concomitant ovarian fluid, when stored in humid air at a temperature of 0.5–1.0 °C, did not reduce their fertility during the first three days. Sperm which is stored in humid air and at a temperature of 0.5–1.0 °C maintains its fertility for at least two days after the extraction. It has been demonstrated that reduced fertility of eggs during storage is closely related to violation of its hydration process after activation, and reduced fertility ability of sperm is connected with attenuation of their motion activity

Keywords: *Coregonus peled*, eggs, sperm, fertility, storage, motion activity of sperm.