

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА
(ФГУП «ГОСРЫБЦЕНТР»)

Биология, биотехника разведения
и состояние запасов сиговых рыб

BIOLOGY, BIOTECHNOLOGY OF BREEDING AND
CONDITION OF COREGONID FISH STOCKS

Восьмое международное научно-производственное совещание

(Россия, Тюмень, 27-28 ноября 2013 года)

VIII International Scientific and Practical Workshop

(Tyumen, Russia, November, 27-28, 2013)

Материалы совещания

Научное издание

Под общей редакцией

доктора биологических наук А.И. Литвиненко,
доктора биологических наук Ю.С. Решетникова

Тюмень
ФГУП «Госрыбцентр»
2013

Первозванский, В. Я. Рыбы водоемов района Костомукшского железорудного месторождения. - Петрозаводск ; Карелия, - 1986. – 216 с.

Правдин, И. Ф. Сиги водоемов Карело-финской ССР. - М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1954. - 376 с.

Решетников, Ю. С. Биологическое разнообразие и изменение экосистем // Биоразнообразие. Степень таксономической изученности. - М. : Наука, 1994. - С. 77-86.

Решетников, Ю. С. Современные проблемы изучения сиговых рыб // Вопр. ихтиологии. - 1995. - Т. 35, № 2. - С. 156-174.

Решетников, Ю. С. Сиговые рыбы / Ю. С. Решетников, А. А. Лукин // Биоресурсы Онежского озера. – Петрозаводск : Карельский НЦ РАН, 2008. - С. 121-175.

Савосин, Д. С. Многотычинковый сиг *Coregonus lavaretus* (L.) водоемов Карелии : Автореф. канд. дис. – Петрозаводск, 2010. - 22 с.

Стерлигова, О. П. Биология рыб озера Тулос / О. П. Стерлигова, Н. В. Ильмаст, С. П. Китаев, В. Я. Первозванский // Сб. ст. «Проблемы лососевых на Европейском Севере». – Петрозаводск : КарНЦ РАН, 1998. - С. 171-179.

Стерлигова, О. П. Экосистема Сямозера : биологический режим и использование / О. П. Стерлигова, В. Н. Павлов, Н. В. Ильмаст, С. А. Павловский, С. Ф. Комулайнен, Я. А. Кучко. – Петрозаводск : Карельский НЦ РАН, 2002. – 120 с.

Титова, В. Ф. Многотычинковый сиг Сямозера. – Петрозаводск : Карелия, 1973. - 97 с.

COREGONID FISH OF WATER BODIES IN THE REPUBLIC OF KARELIA

Sterligova O.P., Ilmast N.V., Savosin D.S.

Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (IB KRC RAS)

Summary

It is shown that in the water bodies of Karelia there is one Coregonid fish species - *Coregonus lavaretus*. Coregonid fish is represented by different ecological forms that differ in lifestyle, nutrition and growth rate, location and date of spawning.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМЫ БАЙКАЛЬСКОГО ОМУЛЯ

Суханова Л.В.¹, Глызина О.Ю.¹, Смирнов В.В.², Смирнова-Залуми Н.С.¹

¹*Лимнологический институт СО РАН*

²*Байкальский музей ИНЦ СО РАН,*

e-mail lsukhanova@yandex.ru

Криоконсервация клеток включает замораживание и хранение клеток при низкой температуре, обеспечивающее их жизнеспособность после оттаивания,

осуществляемого после длительного хранения (в теории, вплоть до 3000 лет). Обычно для таких целей используют замораживание в жидком азоте (-196°C). Сохранение спермы от индивидуумов, обладающих желательными качествами, позволяет поддерживать разнообразие популяций и видов. Замороженные клетки зародышевого пути могут быть использованы для «оживления» находящихся под угрозой исчезновения популяций, помогая сохранению пропорций между определенными генотипами. Создание банков спермы таких популяций станет со временем важным элементом программ, направленных на сохранение видов находящихся под угрозой вымирания (Ciereszko, 2011). Кроме того, открываются большие возможности для научно-исследовательских и аквакультурных экспериментов, предполагающих получение потомства от конкретных особей или гибридного потомства от популяций и видов репродуктивно разобщенных во времени и/или пространстве. Все перечисленное актуально и для байкальских сиговых рыб. Соответственно осенью 2012 г. нами предприняты эксперименты по замораживанию спермы байкальских сиговых в жидком азоте и ее использованию в искусственном оплодотворении. Опыты проводились на базе Большереченского рыбоводного завода в третьей декаде октября, на особях омуля посольской популяции.

Успех криоконсервации сперматозоидов рыб определяется целым рядом факторов, включая: сбор качественной спермы, условия уравнивания спермы в разбавляющем растворе, выбор криопротектантов, режим заморозки/оттаивания и условия оплодотворения. Хотя основные принципы могут быть применимы к любому виду рыб, оптимизация протокола необходима для каждого отдельного вида (Koreika et al., 2007). Задачей эксперимента было не только получить качественно замороженный материал, но подобрать для конкретного объекта легковоспроизводимые в полевых условиях известные методические приемы, не предполагающие использование сложного оборудования. Соответственно за основу взята наиболее простая методика, уже зарекомендовавшая себя в опытах с разными видами рыб, в т.ч. и сиговыми (Ciereszko et al., 2008; Nynca et al., 2012). Поскольку еще одним важным моментом было получение максимального количества половых продуктов от одной особи, опыты проводили как со спермой, так и с суспензией сперматозоидов, полученных из молок тех же вскрытых рыб.

Качество замораживаемых сперматозоидов зависит от их подвижности, которая быстро падает при хранении. Чтобы минимизировать время, прошедшее между этапами отбора и замораживания, половые продукты отбирались от небольшого количества самцов за один прием, так, чтобы время хранения не превышало 1 часа. Все манипуляции проводили при температуре от 1 до 3°C. Сперму выдавливали легким нажатием на анальное отверстие рыбы. Далее рыба вскрывалась, аккуратно извлеченные молоки разрезались на небольшие фрагменты и протирались через капроновую сетку с ячейкой 0,5 мм. Использовались сухие чистые охлажденные емкости с хорошим доступом воздуха (стаканчики), в которые образец помещался тонким слоем и охлаждался до 1 - 5 °C. Удобно также использовать для таких целей ледяную баню. В полевых условиях очень важно предотвратить попадание в образцы спермы таких загрязните-

лей, как моча и фекалии. Загрязнение небольшими количествами крови не столь существенно.

Далее половые продукты смешивались с разбавляющим раствором, включающим вещества, обеспечивающие сохранение жизнеспособности клеток (рН, осмос, ионный состав, энергетические соединения) и криопротектанты. Использование разбавляющих растворов также частично смягчает падение качества сперматозоидов, если отсутствуют условия для быстрой заморозки. Криопротектанты защищают клетки как снаружи, так и изнутри. Чтобы предотвратить осмотический шок клеток, охлажденный разбавляющий раствор медленно вливают по стенке медленно вращающегося флакона с охлажденной до той же температуры спермой. Уравновешивание спермы в разбавляющем растворе, содержащем криопротектанты должно обеспечить проникновение последних в сперматозоиды. Наиболее часто сперму рыб разбавляют в соотношении 1:3. Продолжительность уравновешивания зависит от конкретного вида животных. Так, сперму млекопитающих выдерживают до нескольких часов, сперму птиц уравновешивают менее чем 20 минут, а при подготовке спермы рыб достаточно нескольких секунд. Причем, в случае со спермой рыб чаще всего не требуется сложных растворов для разбавления. Например, можно использовать простой раствор глюкозы в смеси с криопротектантом. В нашем случае отобранная сперма смешивалась с 0,3М раствором глюкозы в 10% метаноле в соотношении 1:3 (сперма : разбавитель) (Ciereszko et al., 2008; Nynca et al., 2012). В методику внесены некоторые модификации: 1) в раствор криопротектора добавлен Трис HCl буфер до конечной концентрации 50 мМ; 2) опробованы разные объемы заморозки и емкости для замораживания (криосоломины объемом 0,5 мл и криопробирки объемом 2,0 и 4,0 мл) (таблица). Однако, чем больше объем, тем труднее достигнуть одинаковых условий одновременно во всем объеме, особенно при заморозке и оттаивании. Емкости объемом больше 5 мл обычно не используются для криоконсервации. Важно не заполнять емкости полностью. Лучше оставлять свободным не менее $\frac{1}{4}$ объема, чтобы осталось свободное пространство для увеличения образца при замерзании.

Перед помещением образцов непосредственно в жидкий азот проводилась заморозка в парах азота на плавающей в жидком азоте пенопластовой платформе - плотике, поверхность которого на 3-4 см возвышалась над поверхностью жидкости. Криосоломины объемом 0,5 мл и криопробирки объемом 2,0 и 4,0 мл помещались в горизонтальном положении на поверхность платформы, с промежутками между емкостями не менее 0,5 см, и выдерживались в парах азота соответственно 5, 10 и 15 мин. с последующим перемещением непосредственно в жидкий азот.

Качество замораживания проверялось наиболее показательным способом, а именно по эффективности оплодотворения икры половозрелых «текучих» самок оттаявшей спермой (табл.). Оттаивание производилось вращением емкостей со спермой в водяной бане при 40 °С. Криосоломины объемом 0,5 мл вращались в бане 5 сек., а пробирки объемом 2,0 и 4,0 мл – до появления жидкой фазы, а затем вынимались из бани, и содержимое перемешивалось переворачиванием до полного оттаивания образца. Далее все работы по искусственному

оплодотворению и дальнейшему развитию икры проводили в соответствии с рекомендациями, разработанными для сиговых рыб (Методические указания..., 1987; Черняев, 1968).

Таблица - Результаты эксперимента по оплодотворению икры байкальского омуля криоконсервированной спермой (омуль x омуль)

	Половые продукты самца омуля	Икра омуля (объединенная порция от 3-х половозрелых самок)	Количество нормально развивающихся эмбрионов, 30 суток после оплодотворения (в %)
Не подвергавшиеся замораживанию половые продукты самца (контроль; соотношение сперма/раствор криопротектора = 1:3)	Сперма 2 мл	~50 мл	84
Криоконсервированные половые продукты самца (соотношение сперма/раствор криопротектора = 1:3)	Сперма в криосоломинах 0,5 мл x 4 шт. = 2мл	~50 мл	65
	Молоки в криопробирках 2,0 мл x 1 шт. = 2мл	~50 мл	55
	Молоки в криопробирках 4,0 мл x 0,5 шт. = 2мл	~50 мл	61

Полученные величины % оплодотворения опытных партий икры свидетельствуют, что для байкальских сиговых рыб пригодна опробованная методика криоконсервации половых продуктов (см. табл.). Очевидно, что могут замораживаться максимальные из рекомендуемых объемы спермы. Благодаря простоте, методика вполне может быть воспроизведена в полевых условиях на нерестилищах сиговых рыб и минимально оборудованных рыбоводных пунктах.

Инкубация икры, контрольной и оплодотворенной с использованием замороженной спермы, осуществлялась в экспериментальной установке Пресноводного аквариального комплекса (ПАК), организованного совместно Лимнологическим институтом и Байкальским музеем СО РАН. Установка представляет собой пластиковые емкости объемом 0,5 - 1,0 л, имитирующие аппараты Вейса, подключенные к проточной байкальской воде требуемой температуры. Параметры инкубации и выклева из контрольной и опытной партий икры и по-

следующего развития личинок и молоди практически не отличались, что также свидетельствуют о положительных результатах проведенных экспериментов.

Авторы выражают глубокую признательность за помощь в организации и проведении работ сотрудникам Байкальского филиала ФГУП Госрыбцентр (г. Улан-Уде) и филиала ОАО Востсибрыбцентр - Большереченский рыболовный завод (с. Большая Речка, Республика Бурятия). Эксперименты по криоконсервации половых продуктов байкальских сиговых рыб проводятся в рамках бюджетной темы ЛИН СО РАН № VI.50.1.4 «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии на примере рыб, губок и ассоциированной с ними микрофлоры». Работа выполнена при поддержке программы РАН «Виварии коллекции клеточных культур, уникальных штаммов бактерий, микроорганизмов, коллекций растений», грантов РФФИ № 10-04-01583-а, № 13-04-10148-К.

Список литературы

Методические указания по сбору и хранению икры сиговых рыб на временных рыболовных пунктах, ее транспортировке и инкубации. - М. : МИН-РЫБХОЗ СССР, ИЭМЭЖ им. А.Н.Северцова АН СССР, ЦПАУ Главрыбвода, 1987.

Черняев, Ж. А. Эмбриональное развитие байкальского омуля. - М. : Наука, 1968. - 91 с.

Ciereszko, A. Application of semen cryopreservation to maintaining biodiversity of endangered animal species populations. In: Water biodiversity assessment and protection (edited by M. Jankun, G. Furgata-Selezniow, M. Wozniak, A. Wisniewska), 2011. – P. 35-42.

Ciereszko, A., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Sobocki, M., Hliwa, P., Kuźmiński, H., Dobosz, S., Słowińska, M., Nynca, J. Characterization and cryopreservation of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) semen from Lake Łebsko, Poland // Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie, 173, №1, 2008.- P. 59-65.

Kopeika, E., Kopeika, J, Zhang, T., Cryopreservation of fish sperm. In Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. From series: Methods in Molecular Biology, Vol. 368. Day, John G.; Stacey, Glyn (Eds.), 2nd ed. 2007, XI, 347 p.

Nynca, J., Dietrich, G. J., Fopp-Bayat, D., Dietrich, M. A., Słowińska, M., Liszewska, E., Karol, H., Martyniak, A., Ciereszko, A. Quality parameters of fresh and cryopreserved whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) semen //Journal of Applied Ichthyology (Special Issue: Proceedings of the Third International Workshop on the “Biology of Fish Gametes”: Budapest, Hungary, 7–9 September 2011), 28, № 6, 2012. - P.934–940.

CRYOPRESERVATION OF BAIKAL CISCO SPERM

Sukhanova L.V.¹, Glyzina O.Yu.¹, Smirnov V.V.², Smirnova-Zalumy N.C.¹

Summary

Protocol used for sperm cryopreservation of the Baikal Lake cisco, *Coregonus migratorius* Georgi was provided. Sperm and suspension of sperm cells prepared from testes were used. The quality of cryopreserved sperm was tested by fertilization. The methods are simple and can be used in the field.

ТЕМПЕРАТУРНЫЕ УСЛОВИЯ ПЕРЕХОДА НА АКТИВНОЕ ПИТАНИЕ ЛИЧИНОК СИГОВЫХ РЫБ

Семенченко С.М., Смешливая Н.В.

ФГУП «Государственный научно-производственный центр
рыбного хозяйства» (ФГУП «Госрыбцентр»)

Введение

Начало активного питания существенно влияет на физиологическое состояние и последующее развитие личинок сиговых рыб. Известно, что даже трёхдневное голодание ранних личинок байкальского омуля отрицательно отражалось на их последующем росте (Семенченко, 1988). В условиях искусственного воспроизводства своевременное начало кормления личинок сиговых во многом определяет качество посадочного материала. На рыбоводных заводах в конце инкубации температура воды часто является фактором, лимитирующим начало активного питания личинок. Поэтому целью данного исследования являлась оценка влияния температуры на способность ранних личинок сиговых потреблять пищу из внешней среды. Ранее величины ниже него температурного порога начала питания для личинок этого семейства были ориентировочно определены Л. Л. Сергиенко и Л. В. Кугаевской (1990). Однако для дальнейшей оптимизации рыбоводного процесса с учётом современных технологических возможностей имеющиеся сведения требуют уточнения. Кроме того, соответствующие данные по ряду таксонов приводятся впервые.

Материал и методика

Экспериментальные работы проводились в лаборатории отдела ФГУП «Госрыбцентр» (г. Тюмень) в апреле-июне 2013 г. Материалом для исследования служили личинки сиговых рыб Обского бассейна и оз. Байкал: тугуна *Coregonus tugun*, озёрной и речной форм пеляди *C. peled*, сига-пыжьяна *C. lavaretus pidschian*, муксуна *C. muksun*, чира *C. nasus*, гибрида речной формы пеляди и чира, байкальского озёрно-речного сига *C. lavaretus pidschian*. Материал был доставлен в лабораторию в виде развивающейся икры на завершающем этапе эмбрионального развития (подвижное состояние жаберно-челюстного аппарата). Икра сиговых рыб Обь-Иртышского бассейна поступила из Сузгунского инкубационного цеха (г. Тобольск), икра озёрно-речного бай-