

РЫБНОЕ ХОЗЯЙСТВО И АКВАКУЛЬТУРА

УДК 639.3.034:639.331.2

ВЛИЯНИЕ pH НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ДВИЖЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ И ОПЛОДОТВОРЯЕМОСТЬ ИКРЫ СИГОВЫХ РЫБ COREGONIDAE

Н. В. Смешливая¹, С. М. Семенченко^{1,2}

¹Тюменский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («Госрыбцентр»),
625023, Россия, г. Тюмень

²ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья»,
625003, Россия, г. Тюмень

*Исследовано влияние pH на продолжительность движения сперматозоидов и оплодотворяемость икры трех видов сиговых рыб Обь-Иртышского бассейна: речной формы пеляди *Coregonus peled*, сига-пыжьяна *C. lavaretus pidschian* и чира *C. nasus*. У исследованных видов не выявлено видовой специфики влияния pH среды на активацию сперматозоидов, их двигательную активность и оплодотворяемость икры. Диапазон pH воды, обеспечивающий активацию сперматозоидов, составляет от 4 до 11 ед. Максимальная продолжительность движения сперматозоидов отмечена при pH среды в диапазоне от 6 до 9 ед. Оплодотворение икры сиговых рыб происходит в интервале pH воды от 5,5 до 11 ед. Максимальная оплодотворяемость икры отмечена при pH от 6 до 9 ед. Середина диапазона, благоприятного как для двигательной активности сперматозоидов, так и оплодотворяемости икры, смещена в щелочную сторону. Статистически достоверной корреляции продолжительности двигательной активности сперматозоидов и оплодотворяемости икры с величиной pH в диапазоне от 6 до 9 ед. не выявлено.*

Ключевые слова: сиговые рыбы; сперматозоид; икра; pH; активация сперматозоидов; движение сперматозоидов; оплодотворяемость

Введение

Подвижность сперматозоидов является важным свойством, функционально определяющим их способность к оплодотворению. Продолжительность движения сперматозоидов в первую очередь связывают с температурой среды [1–3]. Однако, как показывает ряд исследований [1; 4–6], на двигательную способность сперматозоидов существенно влияют и другие факторы среды, в частности pH и минерализация воды. Большинство исследований посвящено влиянию pH среды на подвижность сперматозоидов осетровых [1; 7], лососевых [7–9] и карповых [10;

11] рыб. Влияние pH среды на подвижность сперматозоидов сиговых рыб не исследовано. Ранее было показано влияние pH на оводнение икры и ее конечный диаметр [12]. Однако влияние pH воды при оплодотворении на фертильность половых продуктов у сиговых рыб не изучено.

Цель — изучить влияние pH среды на продолжительность движения сперматозоидов и способность к оплодотворению икры сиговых рыб Обь-Иртышского бассейна.

Исследование направлено на совершенствование биотехники сбора икры сиговых рыб посредством оптимизации одного из основных факторов среды — водородного показателя.

© Н. В. Смешливая, С. М. Семенченко

Материал и методика исследования

Материалом для исследования служили половые продукты речной формы пеляди *C. peled* (Gmelin, 1789), сига-пыжьяна *C. lavaretus pidschian* (Gmelin, 1788) и чира *C. nasus* (Pallas, 1776). Исследования проводили в октябре 2015 г. на рыбоводном пункте «Рахтынья» на р. Ляпин в бассейне р. Северной Сосьвы (Ханты-Мансийский автономный округ). Производителей отлавливали в период нерестовой миграции. После отлова рыбу выдерживали в садках до созревания гонад. Половые продукты получали методом прижизненного отцеживания. Продолжительность двигательной активности спермиев для каждого вида оценивали по стандартной методике [13]. На покровное стекло помещали приблизительно 0,01 мл спермы и добавляли 0,1 мл воды для активации сперматозоидов. Момент соприкосновения сперматозоидов с водой считали началом движения. В каждом опыте регистрировали два показателя: продолжительность поступательного движения и общую продолжительность движения сперматозоидов [13]. Значение pH воды в опытах изменяли от 3,5 до 12,0 ед., в диапазоне от 4,0 до 12,0 ед. pH изменяли с шагом в 1 ед. Каждая экспериментальная серия состояла из шести опытов со спермой одного вида при заданном значении pH. В каждом опыте серии использовали сперму одного из шести самцов.

При определении влияния pH среды на фертильность половых продуктов в каждом опыте использовали смесь икры трех самок и смесь спермы трех самцов исследуемых видов. Каждая серия с экспериментальным значением pH состояла из трех опытов. Порцию икры помещали в воду с экспериментальным значением pH, затем в течение 2–3 с добавляли порцию спермы и перемешивали. Объем воды составлял 25 мл, объем порции спермы — 50 мкл, количество икринок в порции — 150–200 шт. Значение pH воды в опытах изменяли в диапазоне от 5 до 10 ед. с шагом в 0,5 ед., от 10 до 12 ед. — с шагом в 1 ед. Измерение проводили портативным pH-метром Ohaus ST-10. По оконча-

нии опыта значение pH воды не отклонялось от заданной величины более чем на 0,2 ед. Продолжительность каждого опыта составляла 5 мин. Затем икру промывали водой с нейтральным значением pH. Дальнейшее ее развитие происходило в воде с нейтральным значением pH. Оплодотворяемость икры определяли на стадии среднеклеточной морулы методом бокового микрофотографирования [14].

Температура воды в опытах составляла $4,0 \pm 0,5$ °C. Для достижения экспериментальных значений pH воды применяли серную кислоту и натрия гидроксид. Вода, используемая в опытах, относилась к гидрокарбонатному классу кальциевой группы со слабой минерализацией, pH — 6,8 ед.

Для определения влияния pH воды на продолжительность движения сперматозоидов сиговых рыб было проведено по 30 серий, включающих 174 опыта. Для определения влияния pH на фертильность половых продуктов было проведено 39 серий, включающих 117 опытов.

Результаты исследования и их обсуждение

Активация сперматозоидов происходила в широком диапазоне pH. При этом величина pH влияла как на продолжительность двигательной активности, так и на долю подвижных сперматозоидов. Максимальная продолжительность двигательной активности у сперматозоидов исследованных видов была отмечена в интервале pH воды 6–9 ед. Статистически достоверная корреляция продолжительности двигательной активности сперматозоидов с величиной pH в данном диапазоне не выявлена ($r = 0,11$; $P < 0,95$). Так, средние величины продолжительности общего и поступательного движения сперматозоидов пеляди в интервале значений pH 6–9 ед. составляли 209 ± 13 и 84 ± 4 с; сига-пыжьяна — 277 ± 14 и 102 ± 3 с; чира — 300 ± 10 и 115 ± 5 с соответственно (рис. 1 и 2). Кроме того, в данном интервале pH наблюдалась максимальная доля подвижных сперматозоидов — более 95 % (рис. 3).

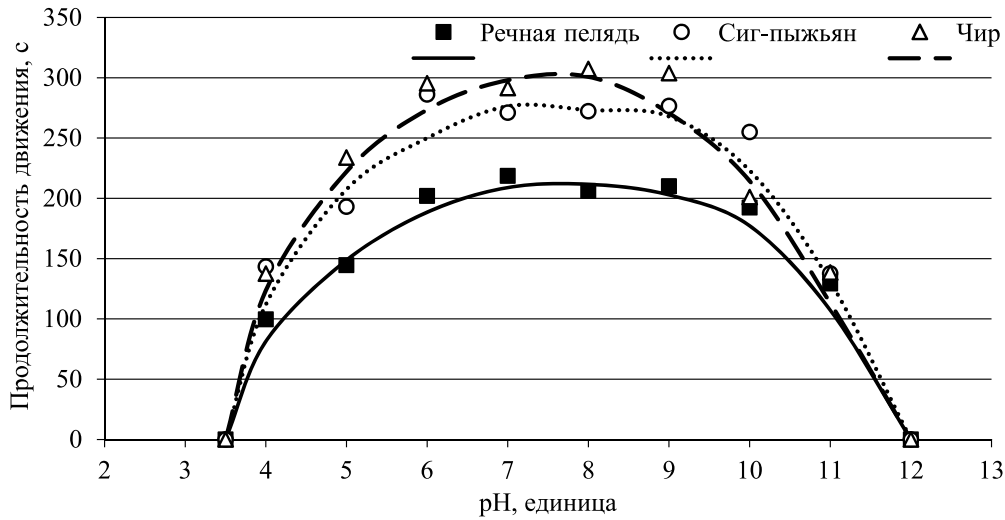


Рисунок 1 — Зависимость продолжительности общего движения сперматозоидов речной пеляди, сига-пыжьяна и чира от рН.

Линии получены «сглаживанием» арифметической скользящей средней по трем значениям

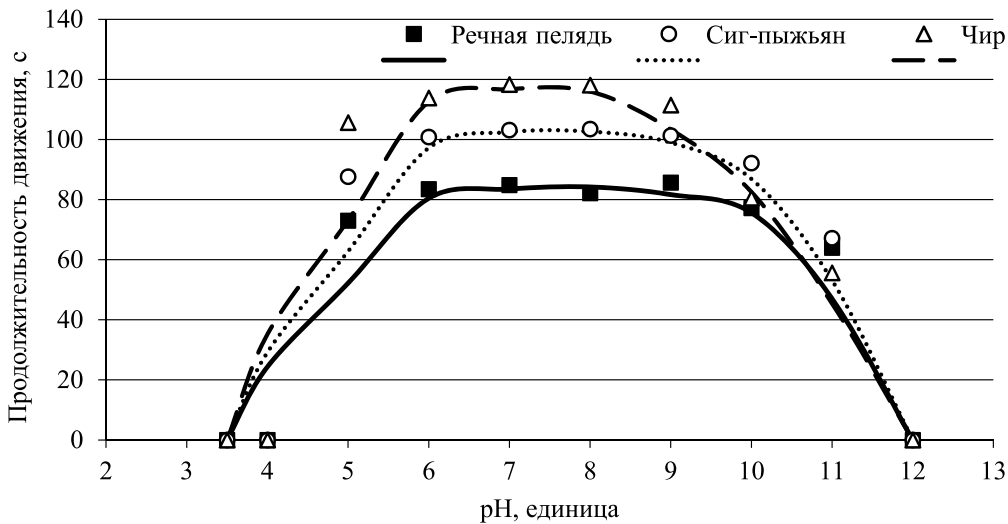


Рисунок 2 — Зависимость продолжительности поступательного движения сперматозоидов речной пеляди, сига-пыжьяна и чира от рН.

Линии получены «сглаживанием» арифметической скользящей средней по трем значениям

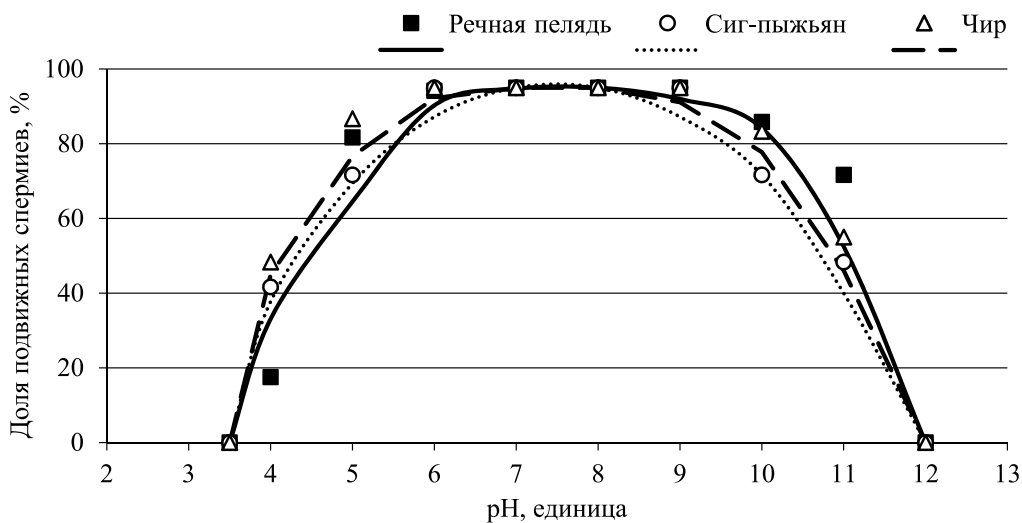


Рисунок 3 — Зависимость доли подвижных сперматозоидов речной пеляди, сига-пыжьяна и чира от рН.

Линии получены «сглаживанием» арифметической скользящей средней по трем значениям

Статистически достоверное снижение продолжительности движения и доли подвижных сперматозоидов происходило при смещении pH в более кислую или щелочную сторону от указанного интервала. В частности, при pH 5 ед. продолжительность общего движения сперматозоидов у исследованных рыб в среднем сократилась в 1,4 раза; продолжительность поступательного движения — 1,2 раза (табл. 1), доля подвижных сперматозоидов уменьшилась до 70–80 %. При снижении pH до 4,0 ед. поступательное движение сперматозоидов отсутствовало. Колебательное движение отмечали только у 20–50 % сперматозоидов со средней продолжительностью у пеляди 100 ± 6 с; у сига-пыжьяна — 143 ± 6 с; у чира — 138 ± 2 с. До завершения двигательной активности в кислой среде наблюдали агглютинацию сперматозоидов. При снижении pH

воды до 3,5 ед. движение сперматозоидов отсутствовало во всех опытах.

При смещении pH в щелочную зону негативное влияние на двигательную активность сперматозоидов проявлялось с 10 ед. При этом значении отмечали уменьшение продолжительности общего и поступательного движения сперматозоидов в среднем в 1,2 раза по сравнению с интервалом 6–9 ед. Доля подвижных сперматозоидов снизилась до 80 %. При pH среды 11 ед. продолжительность общего и поступательного движения сперматозоидов сократилась у пеляди до 129 ± 10 и 64 ± 3 с; у сига-пыжьяна — до 138 ± 10 и 67 ± 3 с; у чира — до 139 ± 15 и 81 ± 7 с. Доля подвижных сперматозоидов составляла 60 %. При дальнейшем увеличении pH до 12 ед. двигательная активность сперматозоидов отсутствовала.

Таблица 1 — Средняя продолжительность общего (А) и поступательного (Б) движения сперматозоидов сиговых рыб в воде с различным значением pH, с

pH, единица	Речная пелядь		Сиг-пыжьян		Чир	
	А	Б	А	Б	А	Б
3,5	0	0	0	0	0	0
4,0	100 ± 6	0	143 ± 6	0	138 ± 12	0
5,0	145 ± 7	73 ± 4	193 ± 7	88 ± 4	234 ± 9	106 ± 5
6,0	202 ± 18	84 ± 3	286 ± 18	101 ± 3	295 ± 16	114 ± 7
7,0	219 ± 13	85 ± 3	271 ± 13	103 ± 3	292 ± 9	118 ± 4
8,0	206 ± 12	82 ± 6	272 ± 12	104 ± 4	307 ± 7	118 ± 5
9,0	210 ± 11	86 ± 4	277 ± 11	101 ± 3	304 ± 8	112 ± 5
10,0	192 ± 12	77 ± 4	255 ± 12	92 ± 2	201 ± 13	81 ± 7
11,0	129 ± 10	64 ± 3	138 ± 10	67 ± 3	139 ± 15	56 ± 3
12,0	0	0	0	0	0	0

Примечание. Средние значения приведены с ошибкой средней величины.

Влияние активной реакции среды на фертильность икры сиговых рыб, вероятно, не имеет видовой специфики. Наиболее высокая оплодотворяемость отмечалась в диапазоне pH от 6 до 9 ед. и составляла 92–95 %. В данном интервале у всех исследованных видов не выявлено статистически достоверной связи величины pH с оплодотворяемостью икринок в опытах ($r = -0,32$; $P < 0,95$) при среднем значении у пеляди — 93 %, сига-пыжьяна — 92 %, чира — 95 % (рис. 4). При снижении pH до 5,5 ед. отмечено уменьшение оплодотворяемости до 48–66 %. Дальнейшее снижение pH

до 5,0 ед. привело к отсутствию оплодотворенных икринок во всех опытах. При этом наблюдали нарушение формирования плазменного бугорка после оводнения, которое выражалось в уменьшении его размеров по сравнению с нормой вплоть до полного его отсутствия.

В интервале pH от 9,5 до 11,0 ед. доля оплодотворенных икринок в опытах снизилась с 81–91 % до 8–16 %. При pH 12 ед. оплодотворенные икринки в опытах не отмечены.

Таким образом, интервал максимальной продолжительности движения сперматозоидов и оплодотворяемости икры у сиговых рыб

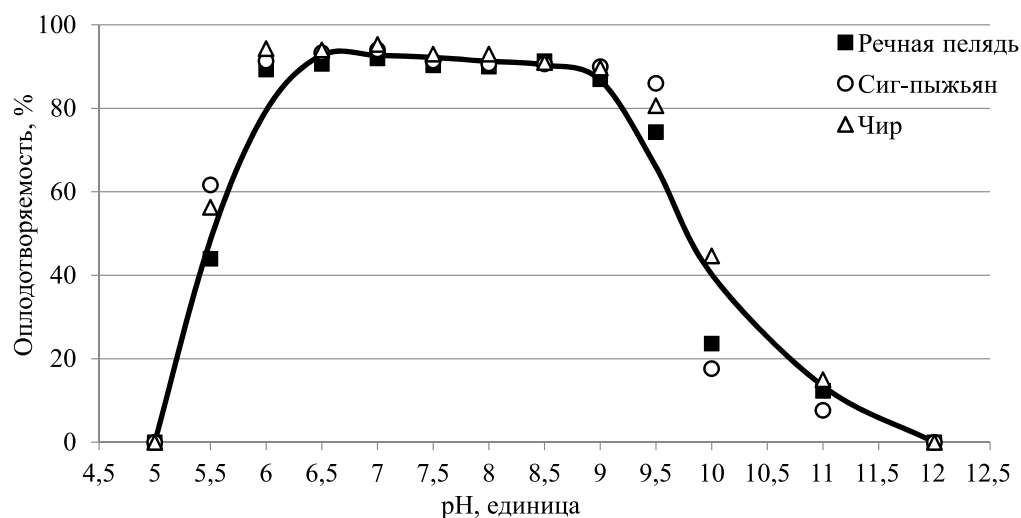


Рисунок 4 — Влияние pH на оплодотворяемость икры речной пеляди, сига-пыжьяна и чира. Каждой точкой обозначен средний результат трех опытов в серии. Линия получена «сглаживанием» объединенных результатов опытов по трем видам арифметической скользящей средней по трем значениям

одинаков и находился в пределах от 6 до 9 pH. Середина диапазона, благоприятного как для двигательной активности сперматозоидов, так и для оплодотворяемости икры, смещена в щелочную сторону. Нижняя пороговая величина pH среды, при которой происходит активация сперматозоидов, составила 4,0 ед.; нижняя пороговая величина оплодотворяемости икры выше и составила 5,5 ед. Верхняя пороговая величина pH активации сперматозоидов и оплодотворяемости икры в опытах совпала и составила 11 ед.

В целом полученные результаты имеют сходство с данными для других систематических групп рыб. В частности, рядом авторов были установлены пороговые значения pH, вызывающие активацию сперматозоидов лососевых и краповых рыб, — от 5,0–6,5 до 12–13 ед. [2; 6; 7]. При этом максимальную продолжительность движения сперматозоидов лососевых рыб наблюдали при pH 8–9 ед. [2; 8]. Для других видов рыб также показана высокая двигательная активность сперматозоидов в слабощелочной среде 8–9 ед. [1].

В Обь-Иртышском бассейне сбор икры сиговых рыб происходит на озерах со слабокислой средой [15] — до 5,5 ед. Результаты исследования позволяют обосновать необходимость коррекции активной реакции воды, используемой при оплодотворении в технологическом процессе, до уровня не менее 6,0 ед.

Выводы

1. Видовой специфики влияния pH среды на продолжительность движения сперматозоидов и оплодотворяемость икры у речной пеляди, сига-пыжьяна и чира не обнаружено.
2. Сперматозоиды исследованных видов активируются в диапазоне значений pH среды от 4 до 11 ед.
3. Икра исследованных видов способна к оплодотворению в диапазоне значений pH от 5,5 до 11 ед.
4. В диапазоне pH 6–9 ед. способность к оплодотворению икры, а также двигательная активность сперматозоидов у исследованных видов находятся на высоком уровне при отсутствии зависимости от активной реакции среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alavi S.M.H., Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review // *Cell Biology International*. 2005. № 29. P. 101–110.
2. Турдаков А. Ф. Воспроизводительная система самцов рыб. Фрунзе: Илим, 1972. 280 с.
3. Смешливая Н. В., Семенченко С. М. Влияние температуры на продолжительность движения сперматозоидов сиговых рыб Coregonidae Обь-Иртышского бассейна // *Биология внутренних вод*. 2016. № 2. С. 68–73.
4. Effect of pH, osmolality and temperature on sperm motility of pink cusk-eel (*Genypterus blacodes* (Forster, 1801) / K. Dumorné [et al.] // *Aquaculture Reports*. 2018. № 11. P. 42–46.

5. Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish *Larimichthys polyactis* / Le Minh H. [et al.] // *Journal of Environmental Biology*. 2011. № 32. P. 271–276.
6. Öğretmen F., Gölbaşı S., Inanan B.E. Inhibitory effect of K⁺ and Ca²⁺ concentrations, pH, and osmolality of activation solution on motility of shabut (*Barbus grypus* Heckel, 1843) spermatozoa // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2014. № 38. P. 245–252.
7. Cosson J., Linhart O. Paddlefish, *Polyodon spathula*, spermatozoa: Effects of potassium and pH on motility // *Folia zoologica*. 1996. № 45. P. 361–370.
8. Kutluyer F. Role of pH on the initiation of sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Çoruh trout (*Salmo coruhensis*) // *BAUN Fen Bil. Enst. Dergisi*. 2018. № 20 (1). P. 421–429.
9. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa / M. Wojtczak [et al.] // *Aquaculture*. 2007. № 270. P. 259–264.
10. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of Na⁺/H⁺ exchanger / T. Marian [et al.] // *Cytometry*. 1997. № 27. P. 374–382.
11. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa / C. Redondo-Muller [et al.] // *Molecular Reproduction and Development*. 1991. № 29. P. 259–270.
12. Смешливая Н. В., Семенченко С. М. Влияние водородного показателя среды на диаметр оводненных яиц сиговых рыб рода *Coregonus* // *Вестн. рыбохозяйственной науки*. 2014. Т. 1, № 4. С. 73–77.
13. Казаков Р. В. Определение качества половых продуктов самцов рыб: метод. указания. Л.: ГосНИОРХ, 1978. 15 с.
14. Черняев Ж. А. Эмбриональное развитие байкальского омуля. М.: Наука, 1968. 91 с.
15. Сергиенко Л. Л. Озера южной тайги и биотехника разведения сиговых рыб / под ред. д-ра биол. наук. А. И. Литвиненко. Тюмень, 2014. 176 с.

EFFECTS OF pH ON DURATION OF SPERM MOTILITY AND RATE OF SUCCESSFUL FERTILIZATION OF WHITEFISH (*COREGONIDAE*) SPAWN

N.V. Smeshlivaya¹, S.M. Semenchenko^{1,2}

¹ Tyumen Branch of Federal State Budgetary Scientific Institution
“Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography”,
625023 Tyumen, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
“State Agrarian University of Northern Zauralye”,
625003 Tyumen, Russia

*We investigated the effects of pH on duration of sperm motility and rate of successful fertilization of spawn of three whitefish species in the Ob-Irtysh River Basin, such as river peleds (*Coregonus peled*), Siberian whitefishes (*C. lavaretus pidschian*) and broad whitefishes (*C. nasus*). We detected no species specificity of effects of pH of the environment on sperm activation, its motility, and rate of successful fertilization of spawn of the species under investigation. The water pH values ensuring sperm activation range from 4 to 11 units. The maximum duration of sperm motility was observed at pH within the range from 6 to 9 units. Whitefish spawn is normally fertilized at water pH within the range from 5.5 to 11 units. Fertilization of the spawn was most successful at pH from 6 to 9 units. The mid-range favourable both for sperm motility and spawn fertilization was shifted toward alkalinity range. We detected no statistically reliable correlation between duration of sperm motility and fertilization of spawn within the pH range from 6 to 9 units.*

Key words: whitefishes; sperm cell; spawn; pH; sperm activation; sperm motility; fertilization

REFERENCES

1. Alavi S.M.H., Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*. 2005. No.29. P. 101–110.
2. Trudakov A.F. [Reproductive system of male fishes]. Frunze: Ilim, 1972. 280 p. (In Russ.)
3. Smeshlivaya N.V., Semenchenko S.M. [Effects of temperature on duration of sperm motility

- in whitefishes (*Coregonidae*) of the Ob-Irtysh River Basin]. *Biology of Inland Waters*. 2016. No.2. P. 68–73. (In Russ.)
4. Dumorné K., Contreras I.P., Rodríguez P.U., Risopatron J., Figueroa E., Lee Estevez M., Díaz R., Farías J. Effect of pH, osmolality and temperature on sperm motility of pink cusk-eel (*Genypterus blacodes* (Forster, 1801)). *Aquaculture Reports*. 2018. No.11. P. 42–46.
 5. Le Minh H., Lim H.K., Min B.H., Park M.S., Son M.H., Lee J.U., Chang Y.J. Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish *Larimichthys polyactis*. *Journal of Environmental Biology*. 2011. No.32. P. 271–276.
 6. Öğretmen F., Gölbaşı S., Inanan B.E. Inhibitory effect of K^+ and Ca^{2+} concentrations, pH, and osmolality of activation solution on motility of shabut (*Barbus grypus* Heckel, 1843) spermatozoa. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2014. No.38. P. 245–252.
 7. Cosson J., Linhart O. Paddlefish, *Polydora spathula*, spermatozoa: Effects of potassium and pH on motility. *Folia zoologica*. 1996. No.45. P. 361–370.
 8. Kutluyer F. Role of pH on the initiation of sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Çoruh trout (*Salmo coruhensis*). *BAUN Fen Bil. Enst. Dergisi*. 2018. No.20 (1). P. 421–429.
 9. Wojtczak M., Dietricha G.J., Słowińska M., Dobosz S., Kuźmiński H., Ciereszko A. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture*. 2007. No.270. P. 259–264.
 10. Marian T., Kraszna Z., Balkay I., Emri M., Tron L. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of Na^+/H^+ exchanger. *Cytometry*. 1997. No.27. P. 374–382.
 11. Redondo-Muller C., Cosson M.P., Cosson J., Billard R. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. *Molecular Breeding and Development*. 1991. No.29. P. 259–270.
 12. Smeshlivaya N.V., Semenchenko S.M. [Effects of pH factor on hydrated whitefish (*Coregonus*) eggs diameter]. *Bulletin of Fisheries Science*. 2014. V. 1, No.4. P. 73–77. (In Russ.)
 13. Kazakov R.V. [Quality assessment of reproductive products in male fishes: Methodical guidelines]. Leningrad: State Research Institute of Lake and River Fisheries, 1978. 15 p. (In Russ.)
 14. Chernyaev Zh. A. [Embryonic development of the Arctic cisco]. Moscow: Nauka, 1968. 91 p. (In Russ.)
 15. Sergienko L.L. [Lakes in Southern taiga and whitefish breeding bioengineering]. Edited by A.I. Litvinenko. *Advanced Doctorate of Biology*. Tyumen, 2014. 176 p. (In Russ.)

Об авторах

Смешливая Наталья Владимировна,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Тюменский филиал ФГБНУ «ВНИРО»
(«Госрыбцентр»)
625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 33
(3452) 41-69-13; nvsmeshlivaya@gmail.ru

Семенченко Сергей Михайлович,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Тюменский филиал ФГБНУ «ВНИРО»
(«Госрыбцентр»)
625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 33
(3452) 41-69-13; SemSM07@yandex.ru
доцент кафедры водных биоресурсов
и аквакультуры
ФГБОУ ВО «Государственный аграрный
университет Северного Зуралья»
625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7

About the Authors

Natalya Vladimirovna Smeshlivaya,
Ph. D. of Biological Sciences,
Leading Research Fellow
Tyumen Branch of Federal State Budgetary
Scientific Institution “Russian Federal Research
Institute of Fisheries and Oceanography”
33, Odesskaya, Tyumen 625023
+7 3452 41-69-13; nvsmeshlivaya@gmail.ru

Sergey Mikhailovich Semenchenko,
Ph. D. of Biological Sciences,
Leading Research Fellow
Tyumen Branch of Federal State Budgetary
Scientific Institution “Russian Federal Research
Institute of Fisheries and Oceanography”
33, Odesskaya, Tyumen 625023
+7 3452 41-69-13; SemSM07@yandex.ru
Associate Prof. at the Department of Aquatic
Bioresources and Aquaculture
Federal State Budgetary Educational Institution
of Higher Education “State Agrarian University
of Northern Zauralye”
7, Respubliki str., Tyumen 625003