



Результаты оценки самцов реверсивных самцов радужной форели по активности и оплодотворяющей способности сперматозоидов при разных сроках хранения спермы

<https://doi.org/10.36038/0131-6184-2025-33-90-120-125>
EDN: WHFDPL

Научная статья УДК 639.3.03

Зинченко Александр Александрович – аспирант, научный сотрудник Лаборатории селекции рыб, Ленинградская область, Ломоносовский р-н, пос. Ропша, Россия
E-mail: ziza988@gmail.com

Шиндавина Нина Ивановна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории селекции рыб, Ленинградская область, Ломоносовский р-н, пос. Ропша, Россия
E-mail: n.shindavina@yandex.ru

Федеральный селекционно-генетический центр рыбоводства (филиал ФГБУ «Главрыбвод»)

Адрес: Россия, 188514, Ленинградская область, Ломоносовский р-н, пос. Ропша, Стрельнинское шоссе, стр. 4

Аннотация. Показана возможность длительного хранения спермы реверсивных самцов радужной форели с сохранением активности сперматозоидов и их оплодотворяющей способности. Оценку проводили методом диаллельных скрещиваний отдельных самок с отдельными самцами. Уровень оплодотворения был выше при осеменении икры в буферном растворе, чем в воде, особенно при длительном сроке хранения спермы.

Ключевые слова: самцы-реверсы, хранение спермы, активность, оплодотворяющая способность

Для цитирования: Зинченко А.А., Шиндавина Н.И. Результаты оценки самцов реверсивных самцов радужной форели по активности и оплодотворяющей способности сперматозоидов при разных сроках хранения спермы // Рыбное хозяйство. 2025. № 3. С. 120-125.
<https://doi.org/10.36038/0131-6184-2025-3-120-125>

THE RESULTS OF THE EVALUATION OF MALE REVERSIBLE RAINBOW TROUT MALES BY THE ACTIVITY AND FERTILIZING ABILITY OF SPERMATOZOA AT DIFFERENT PERIODS OF SPERM STORAGE

Alexander A. Zinchenko – postgraduate student, researcher at the Laboratory of Fish Breeding, Leningrad region, Lomonosovsky district, village Ropsha, Russia

Nina I. Shindavina – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher at the Fish Breeding Laboratory, Leningrad region, Lomonosovsky district, village Ropsha, Russia

Federal Breeding and Genetic Center of Fish Farming (branch of the Federal State Budgetary Institution Glavrybvod)

Address: Russia, 188514, Leningrad region, Lomonosovsky district, village Ropsha, Strelinskoe highway, p. 4

Annotation. The possibility of long-term storage of sperm from sex-reversed males of rainbow trout with preservation of sperm activity and their fertilizing ability is shown. The assessment was carried out by the method of diallelic crosses of individual females with individual males. The fertilization rate was higher when eggs were inseminated in buffer solution than in water, especially with a long shelf life of sperm.

Keywords: sex-reversed males, sperm storage, activity, fertilizing ability

For citation: Zinchenko A. A., Shindavina N.I. (2025). The results of the evaluation of male reversible rainbow trout males by the activity and fertilizing ability of spermatozoa at different periods of sperm storage. // Fisheries. 2025. No. 3. Pp. 120-125. <https://doi.org/10.36038/0131-6184-2025-3-120-125>

Таблицы и рисунки – авторские / The tables and drawings were made by the author

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в товарном форелеводстве повсеместно пользуется спросом однополой посадочный материал, состоящий из одних самок. Преимущество такого производства очевидно: отсутствие раннего созревания самцов, которое сопровождается задержкой в росте и появлением неприглядных вторичных половых признаков. Для получения однополой рыбы используют сперму самцов-реверсентов, которые имеют генотип самок (XX), но при этом продуцируют сперму. Метод получения таких самцов был разработан во второй половине прошлого века, в настоящее время широко известен, им пользуются как за рубежом, так и в отечественной аквакультуре [1-5].

Необычный генотип самцов отразился на морфологии рыб: семенники не имеют открытых протоков для выхода спермы. Пока остается неясным как генотип может отражаться на качестве спермы. Работы по изучению качества спермы у реверсивных самцов пока не многочисленны. В основном они касаются изучения параметров спермы, таких как: концентрация, осмоляльность, pH, содержание АТФ, а также состав семенной плазмы [6-8]. Одна из работ была посвящена сравнительной оценке качества спермы обычных и реверсивных самцов по одному из важнейших критериев – оплодотворяющей способности спермиев. В этой работе было также установлено, что сперма сохраняла фертильность в течение 72 часов [7]. В ряде работ была показана возможность хранения спермы реверсов радужной форели в течение непродолжительного периода: от нескольких часов до нескольких дней [9; 10]. Во всех приведенных работах применяли солевой раствор, похожий по минеральному составу на семенную жидкость, благодаря которой сперматозоиды остаются неподвижными весь период хранения. Самый длительный срок хранения – 7 суток, при котором не снижалась оплодотворяющая способность сперматозоидов, наблюдали при добавлении

раствора StorFish, IMV, France [9]. Ни в одной из работ мы не встречали сообщений о хранении спермы в чистом виде. Подобного рода исследования представляют большой научный интерес, а также могут способствовать повышению эффективности использования реверсов.

Цель нашей работы состояла в сравнительной оценке спермы нормальных и реверсивных самцов по оплодотворяющей способности, а также – определение продолжительности хранения спермы с сохранением ее оплодотворяющей способности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу проводили в Федеральном селекционно-генетическом центре рыбоводства (п. Ропша, Ленинградская область) с декабря 2024 г. по февраль 2025 года.

Объект исследования – реверсивные самцы в возрасте 2-х лет породы форели Рофор. Весь жизненный цикл рыб содержали на уличном модуле установки замкнутого водоснабжения (УЗВ) при естественном фотопериоде и сезонных колебаниях температуры от 4 до 15 °С. Среднегодовая температура в разные годы оставалась на уровне $9 \pm 0,1$ °С.

Самцов вскрывали, извлекали гонады, измельчали и освобождали сперму от их остатков, продавливая через сито (1мм). Хранили сперму отдельно от каждого самца в стеклянных ($d = 90$ мм) или пластиковых ($d = 85$ мм) чашках Петри в холодильнике при температуре 5 °С, закрытых крышками.

Активность сперматозоидов оценивали сразу после ее извлечения и перед осеменением икры по двум показателям: продолжительности поступательного движения (с), и количестве подвижных спермиев (%). Активность измеряли с помощью секундомера, процент подвижных спермиев определяли визуально в поле зрения микроскопа.

В качестве среды для осеменения использовали воду и буферный раствор известный под



названием D532 [11]. В его состав входят: 24,2 г Трис + 22,5 г глицин + 1,1 г CaCl_2 + 73,1 г NaCl на 10 л дистиллированной H_2O ($\text{pH}=9,0$). Контролем служила вода, поступающая в инкубационный цех. Раствор готовили накануне его использования, а перед применением выравнивали температуру раствора с температурой воды.

В ходе изучения активности и оплодотворяющей способности спермы, при разных сроках ее хранения, было поставлено 4 эксперимента. Во всех случаях применяли метод диаллельных скрещиваний, в котором использовали сперму 3-5 самцов и икру 1-4-х самок форели Рофор. При отцеживании икры проводили тестирование полостной жидкости на отсутствие загрязнения содержимым лопнувших яйцеклеток [12; 13]. От каждой самки брали порции по 200-250 икринок и осеменяли спермой отдельных

самцов. Для этого отмеряли мерной пипеткой по 0,2 мл спермы, добавляли 2 мл разбавителя «StorFish», быстро и тщательно размешивали и полученную взвесь смешивали с икрой. Затем добавляли воду или буферный раствор, в качестве среды для осеменения. Контролем служила сперма генетических самцов. Икру каждого варианта скрещиваний инкубировали отдельно.

Критерием оплодотворяющей способности сперматозоидов использовали показатель количества оплодотворенных икринок на стадии пигментации глаз у эмбрионов относительно исходного количества осемененной икры (%).

Статистический анализ проводили по стандартным методикам [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперимент 1. Продолжительность хранения спермы 1 сутки. Осеменение в воде.

В опыте использовали пять самцов и четыре самки. В результате полных диаллельных скрещиваний были образованы 20 семей. В качестве контроля использовали совокупные данные, полученные при оценке пяти генетических самцов с теми же самками. Результаты проверки активности сперматозоидов перед осеменением икры, а также результаты их оценки по уровню оплодотворения икры представлены в таблице 1.

У всех опытных самцов уровень оплодотворения икры был выше, по сравнению с контролем, а у самцов 954, 955 и 956 это преимущество достигало достоверного уровня ($p=0,1$). Различия по этому признаку между реверсивными самцами составляли от 8 до 15% и не были достоверными. Диапазон колебаний минимальных и максимальных значений у отдельных самцов с разными самками сильно различался: от 10% (самец 954) до 50% (самец 953). У самцов 952 и 953 активными были не все спермии, как у остальных рыб, а 60 и 80%, соответственно, также у них был меньше процент оплодотворения, но различия по этому признаку не достигали достоверного уровня.

Эксперимент 2. Продолжительность хранения спермы 2 суток. Осеменение в воде и в растворе.

Сравнивали варианты полных диаллельных скрещиваний четырех самцов с тремя самками. Контроль – средний показатель по результатам скрещиваний четырех генетических самцов с теми же самками. Результаты изложены в таблице 2.

Оценка спермы перед ее использованием показала, что после двух суток хранения качество спермы сохранилось на высоком уровне: количество подвижных спермиев у всех самцов составляло 100% в воде и в растворе, но



в растворе активность клеток была более продолжительной. При осеменении икры в воде уровень оплодотворения икры у реверсов был на 20-30% выше, чем в контроле, при этом, как и в первом опыте, наблюдали большие различия в вариантах скрещиваний одних и тех же самцов с разными самками: от 20% (самец 2р) до 41% (самец 3р). При осеменении икры в растворе процент оплодотворения был стабильно высоким и на 4-15% выше, чем в воде, а различия между вариантами скрещиваний одного самца с разными самками значительно меньше: от 3 до 12% (самцы 3р и 1р, соответственно).

Эксперимент 3. Продолжительность хранения спермы 6 и 8 суток. Осеменение в растворе.

Для оценки всех самцов использовали икру одной самки. Контролем служила свежеприготовленная смесь спермы 4-х генетических самцов, проверенная на активность (табл. 3). Самцы 956 и 954 ранее участвовали в скрещиваниях в эксперименте 1.

После восьми суток хранения у самца 954 число подвижных спермиев в воде сократилось на 30%, а у самца 956 активность была полностью утрачена (см. табл. 1).

При замене воды раствором показатели подвижности почти во всех случаях возраста-

ли, особенно заметно у самца 6р: с 1% до 40%. У самца 956, сперма которого была полностью неподвижна в воде, в растворе наблюдали появление активности у 10% сперматозоидов. Несмотря на различия в количестве подвижных спермиев у разных самцов, процент оплодотворения был стабильно высоким и сопоставимым с контролем.

Эксперимент 4. Продолжительность хранения спермы 10 суток. Осеменение в воде и в растворе.

Для оценки четырех реверсивных самцов использовали икру одной самки. Контроль – свежеприготовленная смесь спермы трех генетических самцов.

При осеменении икры в воде лучший результат по проценту оплодотворения, сопоставимый с контролем, был у самца 1068. Сперма этого самца сохранила также самый высокий уровень активности в воде и в растворе: 60 и 100%, соответственно (табл. 4).

При оценке спермы самца 1069 в воде не было обнаружено ни одного подвижного сперматозоида, однако при осеменении икры в воде уровень оплодотворения составил 54%. Возможно это объясняется тем, что при отцеживании самки небольшое количество полостной жидкости оставалось в порции икры.

Таблица 1. Показатели активности и оплодотворяющей способности сперматозоидов после 1-х суток хранения / **Table 1.** Indicators of sperm activity and fertilizing ability after 1 day of storage

№№ самца	Количество подвижных спермиев в воде, %	Время активного состояния, с	Количество оплодотворенных икринок, %	
			$\bar{X} \pm m_x$	Мин-макс
952	60	14	59±4,4	46-65
953	80	16	59±10,5	34-84
954	100	15	67±2,2	61-71
955	100	15	74±5,8	58-84
956	100	17	71±7,8	56-86
контроль	100	17	46±4,5	36-63

Таблица 2. Показатели активности и оплодотворяющей способности сперматозоидов после 2-х суток хранения / **Table 2.** Indicators of sperm activity and fertilizing ability after 2 days of storage

№№ самца	Количество подвижных спермиев в воде, %		Время активного состояния, с		Количество оплодотворенных икринок, %			
	вода	раствор	вода	раствор	Осеменение с водой		Осеменение с раствором	
					$\bar{X} \pm m_x$	Мин-макс	$\bar{X} \pm m_x$	Мин-макс
1р	100	100	16	24	83±8,9	70-100	95±3,5	88-100
2р	100	100	15	21	91±6,7	78-98	95±2,3	91-99
3р	100	100	16	25	83±12,8	58-99	96±0,9	94-97
4р	100	100	15	19	81±9,7	62-92	96±1,5	94-99
контроль	100	100	14	23	61±7,8	53-69	97±0,8	96-98

Перед осеменением мы проверили активность спермиев этого самца в полостной жидкости самки, от которой использовали икру. Количество подвижных спермиев – 70%, продолжительность движения – 29 секунд. По-видимому, остатков полостной жидкости, окружающей яйцеклетки, оказалось достаточно для того, чтобы стимулировать активность сперматозоидов при добавлении воды или раствора.

При осеменении икры в растворе процент оплодотворения во всех вариантах, включая контроль, составлял 98-100%, что на 24-46% выше, чем при использовании воды, а различия между всеми вариантами оценки не превышали 2%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и содержание реверсантов занимает длительное время и требует больших финансовых затрат, чем содержание генетических самцов. За время проведения нерестовой кампании нет возможности многократного использования реверсированных по полу самцов. Таким образом, они представляют собой более дорогостоящий ресурс. По этим причинам разработка метода более длительного хранения спермы дает возможность многократного использования и способствует более экономному использованию спермы. Также длительное хранение (от 8 до 10 суток) позволяет осуществлять проверку самцов по оплодотворяющей

способности с последующим отбором лучших реверсантов по качеству половых продуктов.

Согласно полученным нами данным, сперматозоиды реверсивных самцов способны сохранять оплодотворяющую способность от двух до десяти суток, несмотря на снижение количества подвижных спермиев.

В нашей работе не было обнаружено четко выраженной связи между процентом подвижных спермиев и уровнем оплодотворения икры. Эти данные согласуются с результатами исследований, проведенных другими авторами [15].

Важно отметить, что неподвижность спермиев в воде не всегда является свидетельством их полной нежизнеспособности. Часть этих клеток может сохранять активность и оплодотворяющую способность и проявлять ее в условиях другой среды: буферного раствора или полостной жидкости. Это показано нами на примере самцов 956 и 1069 в экспериментах 3 и 4, соответственно.

В работе показана необходимость использования буферного раствора вместо воды в качестве среды для осеменения икры. Эти данные подтвердили результаты, полученные нами ранее при оценке оплодотворяющей способности спермы реверсивных самцов [16].

При хранении спермы во многих случаях используют способ, при котором сперму помещают в полиэтиленовый мешочек, наполняют его

Таблица 3. Показатели активности и оплодотворяющей способности сперматозоидов после 6-ти и 8-ми суток хранения / **Table 3.** Indicators of sperm activity and fertilizing ability after 6 and 8 days of storage

№№ самца	Срок хранения спермы, сутки	Количество подвижных спермиев в воде, %		Время активного состояния, с		Количество оплодотворенных икринок, %
		вода	раствор	вода	раствор	
5р	6	80	80	15	19	96
6р	6	1	40	11	19	97
954	8	60	80	15	21	98
956	8	0	10	–	19	97
контроль	0	100	100	15	22	97

Таблица 4. Показатели активности и оплодотворяющей способности сперматозоидов после 10-ти суток хранения / **Table 4.** Indicators of sperm activity and fertilizing ability after 10 days of storage

№№ самца	Количество подвижных спермиев в воде, %		Время активного состояния, с		Количество оплодотворенных икринок, %	
	вода	раствор	вода	раствор	вода	раствор
1067	15	90	15	26	53	99
1068	60	100	18	29	72	98
1069	0	60	–	22	54	100
контроль	100	100	18	25	74	98

кислородом и хранят в холодильнике [17]. Испытанный нами метод хранения спермы в чашках Петри был более прост и оказался не менее надежен. Данный способ хранения спермы дает возможность многократного ее использования. При длительном хранении (от 8 до 10 суток) возможна проверка спермы на оплодотворяющую способность и последующий отбор самцов лучших по качеству половых продуктов.

Полученные нами результаты носят предварительный характер, поскольку при оценке длительного хранения спермы использовали небольшое количество экземпляров. Из восьми самцов, сперму которых хранили от 6 до 10 суток, у трех рыб количество подвижных спермиев в воде снижалось к этому времени до 0-1%, в то время как у других четырех самцов половые клетки сохраняли высокие показатели активности: от 60 до 80%. Это указывает на возможность дальнейшего проведения испытаний более длительных сроков ее хранения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Вклад в работу авторов: **А.А. Зинченко** – сбор, обработка и анализ данных, подготовка статьи, итоговая проверка; **Н.И. Шиндавина** – идея работы, сбор, обработка и анализ данных, подготовка статьи.

The authors declare that there is no conflict of interest. Contribution to the work of the authors: **A.A. Zinchenko** – collection, processing and analysis of data, preparation of the article, final review; **N.I. Shindavina** – idea of the work, collection, processing and analysis of data, preparation of the article.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ/ LITERATURE AND SOURCES

1. Johnstone R., Simpson T.H., Youngson A.F. Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*. 1978. V. 13. P. 115-134.
2. Метальникова К.В. Регуляция пола у радужной форели // Рыбное хозяйство. М., 1991. №2. С. 35-40. ISSN 0131-6184
3. Metalnikova K.V. Sex regulation in rainbow trout // Fisheries. Moscow, 1991. №2. pp. 35-40. ISSN 0131-6184
4. Feist G., Yeoh C.G., Fitzpatrick M.S., Schreck C.B. (1995). The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 alpha-methyltestosterone and 11 beta-hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*. 131 (1-2) Pp.145-152
5. Nynca J, Kuźmiński H, Dietrich GJ, Hliwa P, Dobosz S, Liszewska E, Karol H, Ciereszko A. (2012). Biochemical and physiological characteristics of semen of sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Theriogenology*. Jan 1;77(1):174-83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.039>. Epub 2011 Sep 14. PMID: 21924466.
6. Judycka S., Nynca J., Hliwa P., Ciereszko A. Characteristics and Cryopreservation of Semen of Sex-Reversed Females of Salmonid Fish. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 964. <https://doi.org/10.3390/ijms22020964>
7. Nynca J, Kuźmiński H, Dietrich G J, Hliwa P, Dobosz S, Liszewska E, Karol H, Ciereszko A. (2012). Changes in sperm parameters of sex-reversed female rainbow trout during spawning season in relation to sperm parameters of normal males. *Theriogenology*. V.77. Pp. 1381-1389
8. Geffen A.J., & Evans J.P. (2000). Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 182(1-2), 61-72. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00248-3).
9. Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F., Nash J.P. (2003). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 2004. 234. Pp.1-28. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.12.006>.
10. Haffray P., Sambroni E., Enright W.J., Driancourt M.A., Mikolajczyk T., Rault P., Breton B. (2008). Efficiency of Gonazon™ in rainbow trout, the first officially approved inducer of evaluation in the EU. *Cybio*. 32. Pp. 312-313.
11. Kobayashi T., Fushiki S., Ueno K. Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-ph artificial seminal plasma. *Environ. Biol. Fishes* 2004, 69. Pp. 419-425.
12. Billard R. (1992). Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes // *Aquaculture*. V. 100. N.2. Pp. 263-298
13. Wojtczak M., Kowalski R., Dobosz S., Goryczko K., Kuźmiński H., Glogowski J., Ciereszko A. (2004). Assessment of water turbidity for evaluation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg quality // *Aquaculture*. V. 242. Pp. 617-624.
14. Шиндавина Н.И., Никандров В.Я., Мосеева Е.В., Янковская В.А. Оценка самок радужной форели по качеству икры: тестирование на наличие в икре содержимого лопнувших икринок // Рыбное хозяйство. №3. 2013. С. 81-85.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия. 1980. – М.: Высш. школа. 293 с.
16. Lakin G.F. (1980). *Biometrics*. Moscow: Higher School. 293 p.
17. Levanduski M.J., Cloud J.G. (1988). Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: Effect of non-mobile sperm on fertility. *Aquaculture* 75. Pp.171-179.
18. Шиндавина Н.И., Мосеев А.Г., Никандров В.Я. Эффективность использования солевого раствора при искусственном осеменении икры радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1772) и ладожской палии палии *Salvelinus lepechini* (Gmelin 1788) // Рыбное хозяйство. 2023. №2. С. 96-100. <https://doi.org/10.37663/0131-6184-2023-2-96-100>
19. Shindavina N.I., Moseev A.G., Nikandrov V.Ya. (2023). The effectiveness of insemination of trout eggs *Oncorhynchus Mykiss* using salt solution is artificially iridescent (Walbaum, 1772) *Salvelinus lepechini* field not *Ladoga field* (Gmelin 1788) // Fisheries. №2. Pp. 96-100. <https://doi.org/10.37663/0131-6184-2023-2-96-100>
20. Billiard R. (1981). Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 23 (1-4). Pp. 287-293

Материал поступил в редакцию/ Received 24.04.2025
Принят к публикации / Accepted for publication 15.05.2025