



Оптимизированная технология крупномасштабной криоконсервации спермы осетровых рыб

Научная статья
УДК 57.086.13:597.442:639.3.034

<https://doi.org/10.36038/0131-6184-2025-3-147-160>
EDN: ZYCETV

Докина Ольга Борисовна – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории криобиологии, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, Россия
E-mail: olgadokina@mail.ru

Ковалев Константин Викторович – кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией криобиологии, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, Россия
E-mail: silur5@mail.ru

Пронина Наталья Дмитриевна – главный специалист лаборатории криобиологии, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, Россия

Попов Дмитрий Алексеевич – специалист лаборатории криобиологии, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, Россия

Корабельникова Ольга Валерьевна – кандидат биологических наук, ведущий специалист лаборатории криобиологии, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, Россия

Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)

Коваленко Владимир Николаевич – доцент кафедры «Технология продуктов питания и холодильная техника», Дмитровский рыбохозяйственный технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «АГТУ», Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, Россия

Инкубация икры, оплодотворенной криоконсервированной спермой, в термостате /
Incubation of eggs fertilized with cryopreserved sperm in a thermostat

Адреса:

1. **Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)** – Россия, 141821, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, д. 40А
2. **Дмитровский рыбохозяйственный технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «АГТУ»** – Россия, 141821, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, д. 36

Аннотация. Для сохранения генетического разнообразия осетровых рыб, при искусственном воспроизводстве, все более актуальным становится использование образцов криоконсервированной спермы, хранящейся в криобанках. Наблюдаемой тенденцией к снижению качества семенного материала из рыбоводных хозяйств обусловлена необходимость совершенствования технологий криоконсервации. На основании результатов экспериментов, проведенных в течение шести лет на эякулятах разного качества, оптимизирована, разработанная нами ранее, базовая технология криоконсервации спермы осетровых рыб. Применение оптимизированной технологии позволит высокоэффективно замораживать большие объемы спермы для целей воспроизводства и сохранения биоразнообразия.

Ключевые слова: криоконсервация, криобанк, криопротектор, сперма, осетровые рыбы

Для цитирования: Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Попов Д.А., Корабельникова О.В., Коваленко В.Н. Оптимизированная технология крупномасштабной криоконсервации спермы осетровых рыб // Рыбное хозяйство. 2025. № 3. С. 147–160. <https://doi.org/10.36038/0131-6184-2025-3-147-160>

OPTIMIZED TECHNOLOGY OF LARGE-SCALE CRYOPRESERVATION OF STURGEON SPERM —

Olga B. Dokina – Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Cryobiology, Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district

Konstantin V. Kovalev – Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Cryobiology Laboratory, Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district

Natalia D. Pronina – chief Specialist of the Cryobiology Laboratory, Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district

Dmitry A. Popov – Specialist of the Cryobiology Laboratory, Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district

Olga V. Korabelnikova – Candidate of Biological Sciences, leading Specialist of the Cryobiology Laboratory, Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district

Branch for Freshwater Fisheries of «VNIRO» («VNIIPRH»)

Vladimir N. Kovalenko – Associate Professor of the Department of Food Technology and Refrigeration, **Dmitrov Fish-industry Technological Institute (Branch) of «ASTU»**, Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district

Addresses:

1. **Branch for Freshwater Fisheries of «VNIRO» («VNIIPRH»)** – Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district, 141821, village Rybnoye, 40А
2. **Dmitrov Fish-industry Technological Institute (Branch) of «ASTU»** – Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district, 141821, village Rybnoye, 36

Annotation. To preserve the genetic diversity of sturgeon during artificial reproduction, the use of cryopreserved sperm samples stored in cryobanks is becoming increasingly important. The observed trend towards a decrease in the quality of seed material from fish farms determines the need to improve cryopreservation technologies. Based on the results of experiments conducted over six years on ejaculates of varying quality, the basic technology for cryopreservation of sturgeon sperm that we had previously developed was optimized. The use of optimized technology will allow for the highly efficient freezing of large volumes of sperm for reproductive and biodiversity conservation purposes.

Keywords: cryopreservation, cryobank, cryoprotectant, sperm, sturgeons

For citation: Dokina O.B., Kovalev K.V., Pronina N.D., Popov D.A., Korabelnikova O.V., Kovalenko V.N. (2025). Optimized technology of large-scale cryopreservation of sturgeon sperm // Fisheries. No. 3. Pp. 147–160. <https://doi.org/10.36038/0131-6184-2025-3-147-160>

Рисунки и таблицы – авторские / The drawings and tables were made by the author

ВВЕДЕНИЕ

Проблема сохранения генетического разнообразия осетровых рыб в настоящее время продолжает оставаться не просто актуальной, а становится крайне острой не только из-за дегенерации и исчезновения природных популяций, но и в связи с явной тенденцией к ухудшению качества семенного материала из рыбоводных хозяйств [1-3]. В этой ситуации криоконсервация спермы, сбор и хранение ее образцов в криобанках представляются едва ли не единственным путем решения данной проблемы.

Крупнейший в рыбной отрасли России низкотемпературный генетический банк Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») располагает, собранной за 35 лет, уникальной коллекцией криоконсервированной спермы осетровых рыб: более 700 образцов 15 видов и популяций, общим объемом более 20,5 литров. Образцы из коллекции востребованы в рыбохозяйственной практике и регулярно используются для получения потомства при дефиците самцов, получения гибридов, в генетических исследованиях. Успех в данных мероприятиях зависит от качества замороженной спермы, которое определяется ее исходной криоустойчивостью и эффективностью используемой технологии криоконсервации.

Применение, разработанной к 2003 г. в лаборатории криобиологии ВНИИПРХ, базовой технологии криоконсервации спермы осетровых рыб позволяло, при использовании высококачественных половых продуктов, получать оплодотворение икры размороженной спермой, близкое к нативному контролю [4; 6]. Однако потребность в дальнейшем совершенствовании этой технологии [5; 6] была вызвана необходимостью работы с нативной спермой недостаточно высокого качества, которое само по себе имеет первостепенное значение для успеха криоконсервации.

Представляемые в данной статье результаты исследования, проведенного в последние несколько лет на материале разного качества, позволяют рекомендовать оптимизированный протокол криоконсервации больших объемов спермы осетровых рыб, пригодный для создания ее страховых запасов в криобанках и последующего промышленного использования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сперму и икру осетровых рыб, содержащихся на базе отдела «Конаковский» Филиала по пресноводному рыбному хозяйству ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»), получали в соответствии с действующими нормативами [7]. Половые продукты транспортировали в криобанк в изотермическом контейнере с хладоэлементами при температуре 1-5 °С. Качество нативной спермы, активированной технологической водой, оценивали под микроскопом (Микромед-3 LED M) по подвижности, определяемой как процент клеток с прямолинейным поступательным движением. В экспериментах использовались образцы спермы с подвижностью от 60 до 90%.



Криопробирки с разбавленной спермой, установленные на диск замораживателя / Cryovials with diluted sperm placed on a freezer disk

Для криоконсервации сперму разбавляли в объемном отношении 1:1, 1:2 или 1:3 экспериментальной криозащитной средой, которую добавляли по каплям, при перемешивании, при температуре 10-12 °С. Суспензию сперма-среда разливали в криопробирки объемом 1,5 мл, которые после эквilibрации в течение 5-80 минут устанавливали вертикально на диск замораживателя. Температура суспензии в пробирках контролировалась датчиком (АТТ-2006). Замораживание осуществляли в парах жидкого азота (LN₂) при постепенном погружении диска в криогенный сосуд с LN₂ по следующей программе: I этап: от +10 до -15 °С со скоростью 2-3 °С/мин; II этап: от -15 до -196 °С с плавно увеличивающейся скоростью до 20-25 °С/мин. В упрощенном протоколе криоконсервации замораживание криопробирок осуществляли в течение 10-20 мин. в парах LN₂ на «плотике» (пенопластовой рамке, 15×20 см, затянутой фольгой), плавающим на поверхности LN₂ в пенопластовом ящике.

Пробирки с криоконсервированной спермой размораживали в водном термостате (ВЮ WB-4Ms) при температурах 30-50 °С в течение 45-80 сек.

Эффективность криоконсервации оценивали по подвижности криоконсервированной спермы, степени оплодотворения ею икры и выклеву личинок. Подвижность размороженной спермы определяли таким же образом, как подвижность нативной спермы. Оплодотворяющую способность определяли в лабораторных условиях в трехкратной повторности. Размороженную сперму, разбавленную в объемном отношении 1:100 технологической водой (4,5 мл суспензии из трех пробирок, т.е. 2,25 мл спермы, на 225 мл воды), выливали на икру (3-5 г) в пластмассовой миске. После перемешивания в течение 2 мин. икру промывали водой и распределяли на три чашки Петри, которые помещали в термостат (MIR-254, SANYO) для инкубации при температуре 16-18 °С. Процент оплодотворения определяли на стадии 4 бластомеров, а также – на стадии нейрулы. Контролем при оплодотворении служила нативная сперма, разбавленная в том же отношении (2,25 мл спермы на 225 мл воды).

Графическое представление показателей нативной и размороженной спермы, а также расчет стандартной ошибки для средних значений процента развития оплодотворенной икры, при уровне значимости 5%, осуществляли с помощью программы MS Excel. Значимость различий между выбранными парами экспериментальных криозащитных сред устанавливали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность методов криоконсервации спермы рыб в значительной степени определяется качеством нативного материала, на которое влияют кормовая база, качество воды и другие условия содержания самцов. Наблюдаемое нами в последние годы неуклонное снижение качества спермы осетровых рыб, выращиваемых в рыбоводных хозяйствах, отмечаемое также другими исследователями [1-3], потребовало проверки и корректировки технологических параметров, разработанного ранее, протокола криоконсервации [6].

В проведенном исследовании оценка действия каждого из проверяемых параметров проводилась, главным образом, по оплодотворяющей способности криоконсервированных образцов. При этой оценке, определяемой также качеством используемой икры, основную трудность представляла характерная низкая воспроизводимость результатов, обычно наблюдаемая при работе с гаметами невысокого качества. Поэтому выявление наиболее эффективного состава и концентраций компонентов криозащитной среды, играющей ключевую роль в сохранении жизнеспособности и оплодотворяющей способности клеток при низкотемпературной консервации, проведено путем статистической обработки результатов оценки 23 экспериментальных сред. В средах, на основе водного раствора хлорида калия и метанола, варьировалось содержание определенных сахаров и амидов, показавших, по итогам предыдущих исследований, лучшие криозащитные свойства среди других веществ этих классов. Составы данных сред и результаты их использования в обычно применяемом протоколе сведены в таблицу 1. Действие различных сред в 24 опытах, проведенных на сперме разных видов осетровых, оценивалось по наиболее объективному показателю – степени оплодотворения икры криоконсервированной спермой, выраженной в процентах от оплодотворения нативной спермой в контроле.

Для сравнения эффективности криозащитного действия сред в выбранных парах были составлены выборки упомянутых показателей из всех опытов, в которых испытывались обе среды. Средние показатели по выборке для рассматриваемых пар сред представлены в таблице 2. Значимость различий между средами по выборкам показателей для данных пар проверяли по *t*-критерию Стьюдента.

Предпринятое на первом этапе сравнение действия природы и концентраций сахаров в экспериментальных средах выявило предпочтительность использования сахарозы, по сравнению с глюкозой и инозитом, практиче-

Таблица 1. Влияние состава криозащитной среды на оплодотворяющую способность размороженной спермы / **Table 1.** Influence of protective medium composition on post-thawed sperm fertility

Дата	Вид рыбы, подвижность нативной спермы	Обозначение состава среды*	Оплодотворение икры размороженной спермой	
			средний % развития	% от контроля
11.01.2019	Стерлядь (сперма 1 самца) 60%	С01	81,7 ± 3,2	98,9
		С05	67,9 ± 1,7	82,2
		Г01	66,6 ± 2,5	80,6
		Г05	52,3 ± 6,2	63,3
		И01	70,5 ± 1,0	85,4
		И05	42,4 ± 4,4	51,3
		контроль	82,6 ± 3,9	
12.04.2019	Сибирский осетр (смесь спермы 3 самцов) 70%	С01	86,4 ± 1,8	99,0
		С03	87,0 ± 4,0	99,7
		Г01	84,9 ± 0,4	97,3
		Г03	84,9 ± 3,3	97,3
		И01	82,9 ± 2,4	95,0
		И03	83,3 ± 2,5	95,4
		контроль	87,3 ± 2,0	
05.2019	Стерлядь волжская (сперма 1 самца) 90%	С03	29,9 ± 4,3	64,6
		Г03	40,1 ± 7,4	86,6
		И03	28,7 ± 7,4	62,0
		контроль	46,3 ± 3,5	
9.01.2020	Русский осетр (сперма 1 самца) 70%	С03	78,4 ± 6,2	82,8
		С03ФА	85,4 ± 5,5	90,2
		С03АА	70,4 ± 3,1	74,3
		контроль	94,7 ± 1,0	
21.02.2020	Стерлядь (сперма 2 самцов) 90%	С01	63,5	92,0
		С03	54,0	78,3
		С01ФА	72,4	104,9
		С03ФА	62,9	91,2
		С03АА	67,7	98,1
		контроль	69,0	
		С01	67,9	103,5
		С03	55,7	84,9
		С01ФА	76,8	117,1
		С03ФА	57,5	87,7
		С03АА	79,3	120,9
		контроль	65,6	
4.03.2020	Сибирский осетр (сперма 1 самца) 70%	С01	73,3 ± 4,5	99,3
		С03	67,8 ± 1,6	91,9
		Г01	84,3 ± 4,2	114,2
		Г03	69,5 ± 11,1	94,2
		И01	72,0 ± 8,9	97,6
		И03	84,1 ± 4,0	114,0
		С03ФА	62,6 ± 2,6	84,8
		С03АА	82,1 ± 7,0	111,2
		И03ФА	58,0 ± 2,5	78,6
		И03АА	79,1 ± 1,4	107,2
		С01ФА	71,3 ± 5,2	96,6
		контроль	73,8 ± 6,3	
4.03.2020	Бестер (сперма 1 самца) 60%	С01	67,7 ± 5,3	78,8
		С03	58,2 ± 4,2	67,8
		Г01	67,0 ± 1,9	78,0
		Г03	47,7 ± 5,3	55,5
		И01	66,6 ± 3,8	77,5
		И03	50,8 ± 5,1	59,1

Таблица 1. Продолжение / **Table 1.** Continuation

Дата	Вид рыбы, подвижность нативной спермы	Обозначение состава среды*	Оплодотворение икры размороженной спермой	
			средний % развития	% от контроля
4.03.2020	Бестер (сперма 1 самца) 60%	И03	50,8 ± 5,1	59,1
		С03ФА	51,2 ± 5,6	59,6
		С03АА	60,9 ± 6,3	70,9
		И03ФА	49,7 ± 4,6	57,9
		И03АА	55,0 ± 4,6	64,0
		С01ФА	61,6 ± 3,1	71,7
		контроль	85,9 ± 3,4	
16.12.2020	Белуга (сперма 1 самца) 70%	С01	18,7 ± 5,8	23,3
		С01ФА	33,8 ± 3,5	42,2
		С01АА	33,9 ± 1,8	42,3
		С03	16,8 ± 3,1	21,0
		С03ФА	38,2 ± 3,3	47,7
		С03АА	39,0 ± 3,6	48,7
		контроль	80,1 ± 5,7	
16.12.2020	Калуга (сперма 1 самца) 80%	С01ФА	63,9 ± 7,7	79,8
		С01АА	67,3 ± 2,2	84,0
		С03ФА	69,6 ± 6,7	86,9
		контроль	80,1 ± 5,7	
12.01.2021	Сибирский осетр (сперма 1 самца) 80%	С01	42,2 ± 3,1	85,3
		С01ФА	47,1 ± 6,8	95,2
		С01АА	52,1 ± 4,5	105,3
		С03	45,8 ± 6,8	92,5
		С03ФА	32,7 ± 9,1	66,1
		С03АА	63,5 ± 0,8	128,3
		С05	53,7 ± 3,4	108,5
		С05ФА	45,4 ± 6,3	91,7
		С05АА	47,8 ± 7,8	96,6
		контроль	49,5 ± 2,1	
		Г01	58,5 ± 4,3	118,2
		Г01ФА	50,3 ± 4,0	101,6
		Г01АА	25,3 ± 3,0	51,1
		Г03	68,5 ± 12	138,4
		Г03ФА	51,7 ± 6,0	104,4
		Г03АА	29,5 ± 6,1	59,6
		Г05	49,4 ± 3,9	99,8
Г05ФА	36,2 ± 7,8	73,1		
Г05АА	20,6 ± 1,7	41,6		
контроль	49,5 ± 2,1			
21.01.2021	Белуга (сперма 1 самца) 70%	С01	68,3 ± 3,1	83,7
		С03	64,6 ± 5,6	79,2
		С05	78,2 ± 2,3	95,8
		Г01	61,1 ± 4,0	74,9
		Г03	56,8 ± 5,1	69,6
		Г05	78,1 ± 6,4	95,7
		С01АА	56,2 ± 4,2	68,9
контроль	81,6 ± 2,4			
21.01.2021	Амурский осетр (сперма 1 самца) 90%	С01	42,8 ± 2,5	52,5
		С03	54,8 ± 10,8	67,2
		С05	50,2 ± 6,0	61,5
		Г01	41,3 ± 3,5	50,6
		Г03	39,6 ± 4,9	48,5
		Г05	18,9 ± 0,4	23,2
		С01ФА	61,9 ± 2,1	75,9
		С01АА	62,0 ± 5,1	76,0
контроль	81,6 ± 2,4			

Таблица 1. Продолжение / Table 1. Continuation

Дата	Вид рыбы, подвижность нативной спермы	Обозначение состава среды*	Оплодотворение икры размороженной спермой	
			средний % развития	% от контроля
20.02.2021	Калуга (сперма 1 самца) 80%	С03	76,2 ± 0,4	98,2
		Г03	75,6 ± 5,6	97,4
		контроль	77,6 ± 7,9	
20.02.2021	Русский осетр (сперма 1 самца) 70%	С03	17,3 ± 3,7	21,3
		Г03	19,7 ± 4,5	24,3
		контроль	81,2 ± 1,7	
27.04.2021	Стерлядь (сперма 1 самца) 80%	С01	19,5 ± 2,6	24,6
		Г01	7,4 ± 5,1	9,3
		И01	9,5 ± 3,8	12,0
		С03	32,9 ± 6,8	41,4
		Г03	2,9 ± 1,6	3,7
		И03	9,4 ± 3,5	11,8
		С05	19,6 ± 5,9	24,7
		Г05	11,2 ± 2,1	14,1
25.05.2021	Севрюга (сперма 2 самцов) 90%, 70%	И05	0	0
		контроль	79,4 ± 1,9	
		С03	21,1 ± 5,8	33,8
		С03ФА	16,2 ± 4,3	26,0
		С03АА	7,3 ± 1,1	11,7
		С01АА	13,8 ± 2,5	22,1
		контроль	62,4 ± 4,3	
		С03	16,2 ± 3,5	28,5
		С03ФА	11,0 ± 1,4	19,3
		С03АА	14,2 ± 1,3	25,0
11.01.2022	Русский осетр (сперма 1 самца) 60%	С01АА	14,8 ± 3,2	26,0
		контроль	56,9 ± 1,1	
		С01	74,2 ± 2,9	84,1
		Г01	79,6 ± 3,6	90,2
		И01	84,6 ± 4,0	95,9
		С03	85,3 ± 1,8	96,7
		Г03	75,5 ± 4,0	85,6
		И03	63,9 ± 6,0	72,4
		С05	51,0 ± 8,5	57,8
		Г05	69,2 ± 2,6	78,5
11.01.2022	Белуга (сперма 2 самцов) 60%, 60%	И05	61,8 ± 11,8	70,1
		контроль	88,2 ± 2,0	
		С03	80,8 ± 7,2	88,2
		С03АА	79,7 ± 5,2	87,0
		контроль	91,6 ± 1,2	
		С03	38,3 ± 4,3	43,1
		С03АА	53,1 ± 4,8	59,7
		контроль	88,9 ± 2,9	
		С03	97,9 ± 1,1	104,7
		С03АА	78,4 ± 2,8	83,9
18.01.2022	Сибирский осетр (сперма 1 самца) 70%	контроль	93,5 ± 3,7	
		С01	59,0 ± 2,6	74,4
		С03	61,3 ± 3,0	77,3
		С05	63,9 ± 2,9	80,6
		С03ФА	52,6 ± 3,1	66,3
		С03АА	58,5 ± 3,9	73,8
18.01.2022	Амурский осетр (сперма 1 самца) 70%	контроль	79,3 ± 3,7	
		С03	37,9 ± 3,7	54,3
		С03АА	44,9 ± 8,0	64,3
		контроль	69,8 ± 5,9	

Таблица 1. Продолжение / Table 1. Continuation

Дата	Вид рыбы, подвижность нативной спермы	Обозначение состава среды*	Оплодотворение икры размороженной спермой	
			средний % развития	% от контроля
16.02.2022	Стерлядь (смесь спермы 3 самцов) 70%	С01	17,3 ± 3,9	40,7
		С03	28,6 ± 3,0	67,3
		Г01	23,4 ± 5,3	55,1
		Г03	30,1 ± 6,1	70,8
		контроль	42,5 ± 2,7	
10.03.2022	Бестер (сперма 1 самца) 70%	С01	32,7 ± 6,7	44,7
		С01АА	47,0 ± 5,0	64,2
		С03	36,6 ± 3,7	50,0
		С03АА	47,5 ± 10,1	64,9
		Г01	34,2 ± 2,7	46,7
		Г01АА	51,5 ± 5,9	70,4
		Г03	29,6 ± 4,0	40,4
		Г03АА	21,5 ± 3,3	29,4
		контроль	73,2 ± 3,2	
17.03.2022	Сибирский осетр (2 смеси спермы 2 самцов) 80%, 70%	С01	25,9 ± 5,6	30,2
		С01АА	40,8 ± 7,0	47,6
		С03	38,0 ± 7,0	44,3
		С03АА	40,4 ± 8,2	47,1
		Г01	31,5 ± 6,9	36,8
		Г01АА	28,9 ± 2,5	33,7
		Г03	30,0 ± 5,6	35,0
		Г03АА	27,7 ± 4,8	32,3
		контроль	85,7	
		С01	56,1 ± 6,8	65,5
		С01АА	54,2 ± 4,0	63,2
		С03	68,3 ± 3,8	79,7
		С03АА	47,6 ± 2,7	55,5
		Г01	62,3 ± 5,0	72,7
		Г01АА	52,4 ± 1,6	61,1
Г03	58,9 ± 4,4	68,7		
Г03АА	64,9 ± 7,4	75,7		
контроль	85,7			
30.03.2022	Стерлядь (смесь спермы 6 самцов) 70%	С01	22,2 ± 2,0	51,7
		С01АА	27,6 ± 3,4	64,3
		С03	25,1 ± 2,7	58,5
		С03АА	19,6 ± 2,7	45,7
		Г01	25,4 ± 3,0	59,2
		Г01АА	16,1 ± 4,1	37,5
		Г03	24,4 ± 4,9	56,9
		Г03АА	19,5 ± 3,0	45,5
		контроль	42,9 ± 7,6	

Примечание: * - В обозначениях составов сред: С - сахароза, Г - глюкоза, И - инозит; 01, 03, 05 - соответственно массовая доля 0,1%, 0,3%, 0,5% данных сахаров в основе среды; ФА - 0,7% формамида, АА - 0,7% ацетамида в основе. Основа: водный раствор 0,08% хлорида калия, 8% метанола.

ски во всех испытанных концентрациях. Принципиальной была установленная значимость различий между средами С03 и Г03, содержащими соответственно 0,3% сахарозы или 0,3% глюкозы. На втором этапе, при сравнении сред с разным содержанием сахарозы, подтверждена предпочтительность концентрации 0,3%.

Сравнение действия сахарозы и ее сочетаний с амидами, проведенное на третьем этапе, показало целесообразность добавления амидов в среды с концентрациями сахарозы как 0,1%, так и 0,3%. Доказанная значимость различий между средами в парах С01 и С01ФА, С01 и С01АА, С01ФА и С03 подтвердила обоснованность

Таблица 2. Сравнение криозащитного действия экспериментальных сред в парах по выборкам из результатов опытов за 2019–2022 гг. / **Table 2.** Comparison of cryoprotective effect of experimental media in pairs based on selected parts from experimental results for 2019–2022

Этап сравнения	Средние значения оплодотворения икры размороженной спермой (в % от контроля) по выборкам для пар сред					
1	C01 и Г01 65,7 и 66,6	C01 и И01 80,8 и 77,2	C03 и Г03* 68,5 и 62,3	C03 и И03 77,0 и 69,1	C05 и Г05 64,4 и 55,0	C05 и И05 54,9 и 40,5
2		C01 и C03 66,7 и 70,5			C03 и C05 73,3 и 71,5	
3	C01 и C01ФА* 76,4 и 86,2	C01 и C01АА* 54,6 и 66,5	C03 и C03ФА 65,9 и 63,9	C03 и C03АА 65,6 и 70,6		
	C03ФА и C03АА 63,9 и 76,3	C01 и C03АА* 68,1 и 78,6	C01ФА и C03* 86,2 и 71,9	C01ФА и C03АА 88,0 и 96,4		
4	Г01 и Г01АА 66,7 и 50,8	Г03 и Г03АА 67,9 и 48,5	Г03АА и C03АА 45,7 и 53,3		-	-

Примечание: * - различия достоверны при уровне значимости 0,05

ванность выводов, сделанных ранее, при разработке усовершенствованной криозащитной среды для спермы осетровых рыб [5; 6]. Сравнение действия каждого из двух амидов в среде с концентрацией сахарозы 0,3% (C03ФА и C03АА) обнаружило, что ацетамид более эффективно обеспечивал криозащиту клеток при замораживании, чем формамид. Преимущество среды с ацетамидом C03АА, по сравнению с применяемой нами ранее базовой осетровой средой C01, показала достоверность различий между ними по *t*-критерию.

Проверка сочетаний ацетамида с разными концентрациями глюкозы, предпринятая на четвертом этапе, обнаружила для сред с его присутствием снижение криозащитного действия, а также вновь подтвердила преимущество среды C03АА по сравнению с ее глюкозо-содержащим аналогом Г03АА.

Анализ полученных данных позволил заключить, что наибольшую защиту спермы осетровых рыб разного качества при криоконсервации обеспечивает среда C03АА, содержащая в водном растворе 0,3% сахарозы, 0,08% хлорида калия, 8% метанола и 0,7% ацетамида.

Данная среда использовалась далее для контроля эффективности разработанной нами технологии криоконсервации спермы осетровых рыб [6] по всем остальным параметрам. Результаты девяти проведенных опытов по отдельным технологическим этапам представлены на рисунках 1-4. Эффективность испытанных вариантов протоколов оценивалась по таким показателям криоконсервированной спермы как подвижность, степень оплодотво-

рения и выклев, в сравнении с аналогичными показателями для нативной спермы в контроле. Объектами исследования в нерестовых сезонах 2023 и 2024 гг. были индивидуальные образцы нативной спермы сибирского осетра (опыты 1, 5, 9), белуги (опыт 2), русского осетра (опыты 3, 7), калуги (опыты 6, 8) и смесь спермы двух самцов стерляди (опыт 4). При проверке оплодотворяющей способности размороженных образцов использовалась икра русского (опыты 1-4, 7) и сибирского (опыты 5, 6, 8, 9) осетров.

Результаты, полученные при использовании среды C03АА в опытах 1-9, в целом подтвер-



Закладка в криохранилище контейнера с замороженной спермой /
Placing a container with frozen sperm into cryostorage

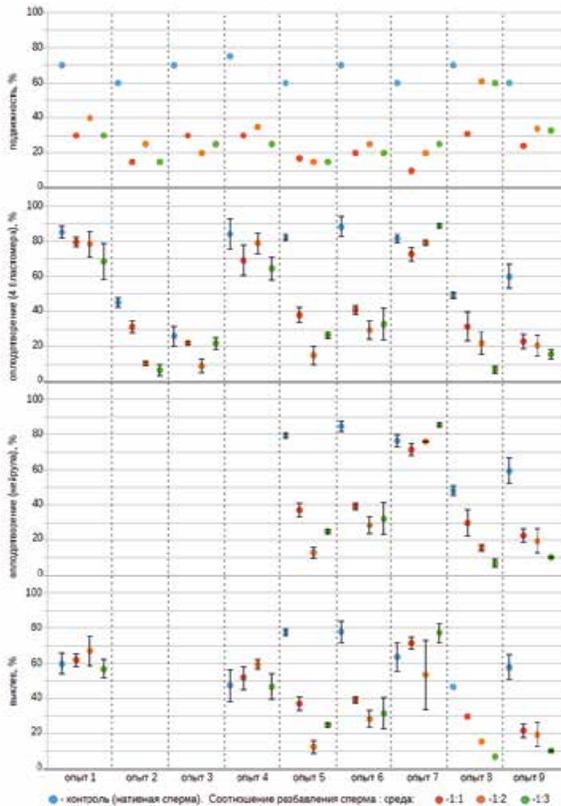


Рисунок 1. Влияние соотношения разбавления спермы средой C03AA на результаты криоконсервации (время эквilibрации суспензии сперма-среда 5-20 мин, замораживание на диске, температура оттаивания замороженной спермы - 40 °С, время оттаивания - 60 сек).

Figure 1. Influence of dilution ratio (sperm: protective medium C03AA) on cryopreservation results (equilibration time of sperm - protective medium suspension - 5-20 min, freezing on the disk, thawing temperature of frozen sperm - 40 °C, thawing time - 60 s).

дили эффективность обычно применяемого протокола криоконсервации (с двухэтапным режимом замораживания на диске) по остальным технологическим параметрам.

Сравнение на первом этапе данного протокола различных соотношений разбавления спермы криозащитной средой показало в семи опытах из девяти предпочтительность обычно соотношения 1:1 (рис. 1).

На следующем этапе было подтверждено, установленное ранее, отсутствие необходимости в длительной (25-85 мин) эквilibрации суспензии сперма-среда. Однако, наблюдаемое в ряде опытов и при продолжительной эквilibрации, сохранение размороженной спермой приблизительно одинаковой оплодотворяющей способности указывает на возможность

успешного выполнения трудоемких операций при крупномасштабной криоконсервации (рис. 2).

Оптимальные параметры этапа оттаивания, судя по частоте встречаемости наиболее высоких результатов оплодотворения икры размороженной спермой во всех опытах, кроме опыта 4, оказались теми же, что и в обычно применяемом протоколе (с двухэтапным режимом замораживания на диске): температура 40 °С и продолжительность 60 сек (рис. 3).

Высокоскоростной режим замораживания на «плотике», испытанный ранее и успешно применяемый нами в практике криоконсервации спермы лососевых и карповых рыб [8; 9], оказался мало пригодным для спермы осетровых рыб: оплодотворяющая способность оттаявших образцов спермы сибирского осетра и стерляди оказалась существенно ниже, чем при обычном замораживании на диске. Использование этого упрощенного протокола подтвердило также нежелательность длительной (45-70 мин) эквilibрации суспензии сперма-среда (рис. 4).

При анализе полученных данных принималось во внимание характерное нивелирование различий в результатах влияния рассмотренных технологических параметров на успех криоконсервации, наблюдаемое при замораживании образцов спермы достаточно высокого качества в опытах 1, 4 и 7, когда происходило сохранение размороженной спермой оплодотворяющей способности на уровне контроля. Проявлявшийся эффект подтверждал, тем не менее, высокое протективное действие оптимизированной криозащитной среды.

В проведенных опытах проявилось также часто наблюдаемое нами [1] и отмечаемое другими исследователями [10-12] отсутствие прямой зависимости между оплодотворяющей способностью размороженной спермы и подвижностью, как размороженной, так и нативной спермы.

Очевидно, что, как отмечалось ранее и другими авторами [13], предпочтительной является оценка эффективности любого применяемого протокола по результатам выклева личинок из икры, оплодотворенной криоконсервированной спермой, в сравнении с выклевом в контроле. В проведенном исследовании высокую эффективность оптимизированного протокола подтверждали достигнутые в опытных вариантах проценты выклева, в большинстве случаев совпадающие или немного отличающиеся от процентов развития икры на стадии нейрулы и даже на стадии 4 бластомеров. При этом в контролях наблюдалось более сильное снижение процентов выклева, по сравнению

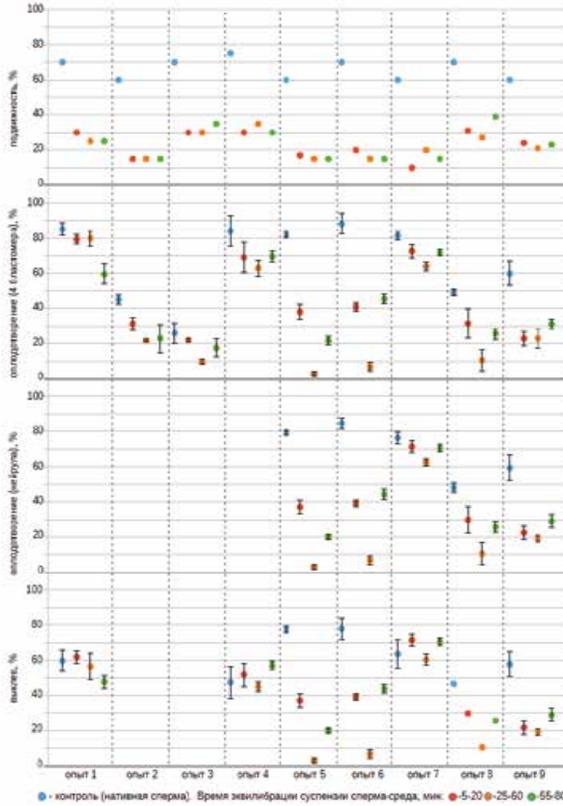


Рисунок 2. Влияние времени эквilibрации суспензии сперма-среда на результаты криоконсервации (среда C03AA, соотношение разбавления сперма: среда 1:1, замораживание на диске, температура оттаивания замороженной спермы – 40 °С, время оттаивания – 60 сек)

Figure 2. Influence of equilibration time of sperm-protective medium suspension on cryopreservation results (medium C03AA, dilution ratio sperm : protective medium 1:1, freezing on the disk, thawing temperature of frozen sperm – 40 °С, thawing time – 60 s)

с процентами оплодотворения, чем в опытных вариантах.

Проведенные исследования позволяют рекомендовать оптимизированный протокол криоконсервации спермы осетровых рыб, обеспечивающий возможность замораживания больших объемов спермы (до 100 мл) с сохранением ее оплодотворяющей способности на уровне нативной спермы в контроле. Данный протокол включает следующие этапы.

1. Транспортировка половых продуктов осуществляется при температуре 1-5 °С в изотермическом контейнере с хладоэлементами. Для криоконсервации отбираются образцы нативной спермы с подвижностью ≥ 60%.
2. Для криоконсервации сперма разбавляется в объемном отношении 1:1 криозащит-

ной средой, содержащей в водном растворе в массовых долях 0,3% сахарозы, 0,08% хлорида калия, 8% метанола и 0,7% ацетамида. Среда добавляется к сперме по каплям, при непрерывном перемешивании, при температуре 10-12 °С.

3. Суспензия сперма-среда разливается в криопробирки объемом 1,5 мл, которые немедленно или, при необходимости, после эквilibрации в течение 20-80 мин. устанавливаются вертикально на диск замораживателя. Замораживание осуществляется в парах LN₂ при постепенном погружении диска в криогенный сосуд с LN₂ по следующей программе: I этап: от +10 до -15 °С со скоростью 2-3 °С/мин; II этап: от -15 до -196 °С с плавно увеличивающейся скоростью до 20-25 °С/мин.

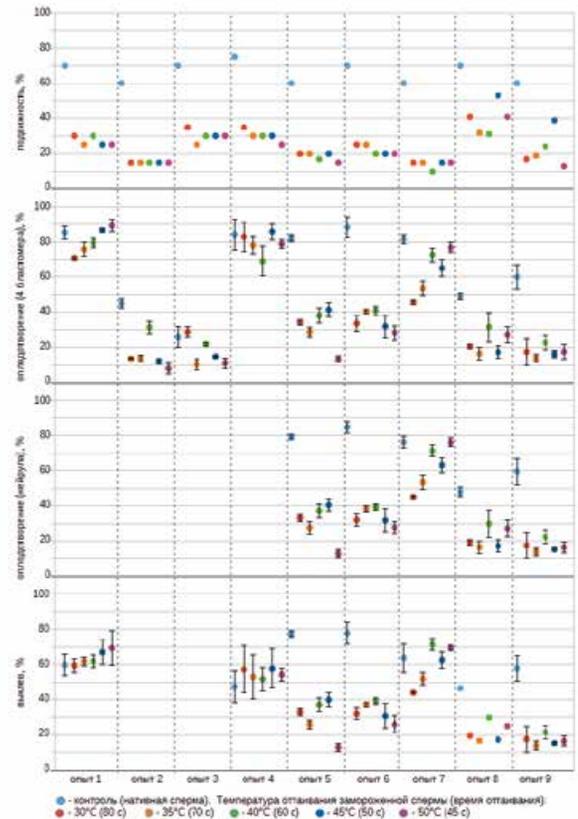


Рисунок 3. Влияние режима оттаивания на результаты криоконсервации (среда C03AA, соотношение разбавления сперма : среда 1:1, время эквilibрации суспензии сперма-среда 5-20 мин, замораживание на диске)

Figure 3. Influence of thawing regime on cryopreservation results (medium C03AA, dilution ratio sperm : protective medium 1:1, equilibration time of sperm-protective medium suspension – 5-20 min, freezing on the disk)

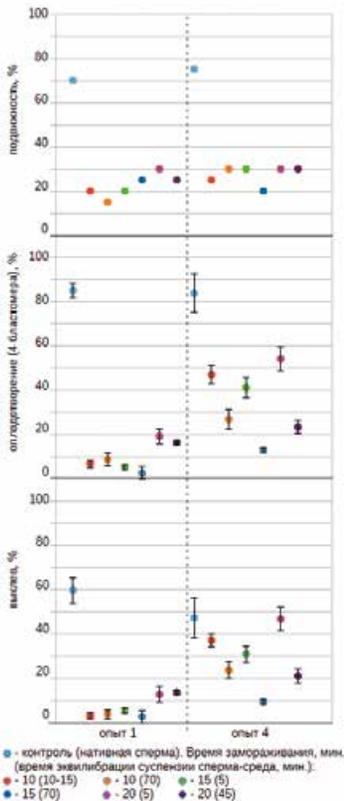


Рисунок 4. Влияние параметров замораживания на «плотике» на результаты криоконсервации (среда C03AA, соотношение разбавления сперма : среда 1:1, температура оттаивания замороженной спермы - 40 °С, время оттаивания - 60 сек)

Figure 4. Influence of parameters of «raft»-freezing on cryopreservation results (medium C03AA, dilution ratio sperm : protective medium 1 : 1, thawing temperature of frozen sperm - 40 °C, thawing time - 60 s)

4. После хранения в LN₂ пробирки с криоконсервированной спермой размораживаются в водном термостате при температуре 40 °С в течение 60 сек. Эффективность криоконсервации оценивается путем определения процентов оплодотворения икры размороженной спермой и выклева личинок.

Потомство опытных групп сибирского осетра и стерляди, полученное с использованием криоконсервированной по данному протоколу спермы, на втором году выращивания не отличалось по морфометрическим показателям и показателям развития половых клеток от рыб из контрольных групп, полученных с использованием нативной спермы [14; 15], что указывает на отсутствие негативного влияния данной технологии криоконсервации на генетический аппарат клеток.

Оптимизированный в ходе проведенных исследований протокол будет способствовать эффективному замораживанию больших объемов спермы для целей сохранения генетического разнообразия осетровых рыб при искусственном воспроизводстве, а также – для пополнения коллекций криобанков качественными образцами.



Криохранилища и резервная емкость с жидким азотом в криобанке ВНИИПРХ / Cryostorages and reserve capacity with liquid nitrogen in the cryobank of VNIIPRKh

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 075-15-2021-1084 по развитию генетических технологий.

The work was supported by a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation 075-15-2021-1084 for the development of genetic technologies.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Вклад в работу авторов: **О.Б. Докина** – идея работы, подготовка и участие в проведении экспериментов, подготовка статьи, **К.В. Ковалев** – участие в проведении экспериментов, окончательная проверка статьи, **Н.Д. Пронина** – участие в проведении экспериментов, **Д.А. Попов** – участие в проведении экспериментов, графическое отображение данных, **О.В. Корабельникова** – участие в проведении экспериментов, **В.Н. Коваленко** – статистическая обработка данных.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Contribution to the work of the authors: **O.B. Dokina** – the idea of the work, preparation and participation in conducting experiments, preparation of the article, **K.V. Kovalev** – participation in conducting experiments, final verification of the article, **N.D. Pronina** – participation in conducting experiments, **D.A. Popov** – participation in conducting experiments, graphical representation of data, **O.V. Korabelnikova** – participation in conducting experiments, **V.N. Kovalenko** – statistical data processing.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Попов Д.А., Корабельникова О.В. Анализ динамики криоустойчивости как показателя качества спермы осетровых рыб в рыбоводных хозяйствах // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры: сборник научных трудов. – Астрахань. 2024. Вып. 95 С. 35-45.
2. Тихомиров А.М. Корректировка методики криоконсервации половых продуктов осетровых рыб Нижней Волги при создании маточного стада // Материалы научных мероприятий, приуроченных к 15-летию Южного научного центра Российской академии наук: Международного научного форума «Достижения академической науки на Юге России»; Международной молодежной научной конференции «Океанология в XXI веке: современные факты, модели, методы и средства» памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова; Всероссийской научной конференции «Аквакультура: мировой опыт и российские разработки». – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН. 2017. С. 433-434.
3. Красильникова А.А. Применение криоконсервированной спермы при искусственном воспроизводстве рыб // Дельты рек России: закономерности формирования, биоресурсный потенциал, рациональное хозяйствование и прогнозы развития: материалы Международной молодежной научной конференции памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова (Ростов-на-Дону, 4-6 сентября 2018). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2018. С. 151-154.
4. Патент № 2317703 Российская Федерация, А 01 К 61/00, А 01 N 1/02. Способ криоконсервирования спермы осетровых рыб: № 2006119203: заявл. 02.06.2006: опубл. 27.02.2008 / Докина О.Б., Цветкова Л.И., Пронина Н.Д., Миленко В.А.
5. Патент № 2683682 Российская Федерация, МПК А 01 N 1/02 (2006.01). Защитная среда для криоконсервации спермы осетровых рыб: № 2018126466: заявл. 18.07.2018: опубл. 01.04.2019 / Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А.
6. Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Эффективные технологии криоконсервации спермы карповых и осетровых рыб // Новейшие генетические технологии для аквакультуры: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29-31 января 2020 г.). – М.: «Перо». 2020. С. 119-134.
7. Чебанов М.С., Галич Е.В., Чмырь Ю.Н. Руководство по разведению и выращиванию осетровых рыб – М.: ФГНУ «Росинформагротех». 2004. 148 с.
8. Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А., Новоселова Ю.А. Усовершенствованная криозащитная среда для низкотемпературной консервации спермы радужной форели // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры: сборник научных трудов. – М.: Издательство «Перо». 2021. Вып. 92. С. 39-48.
9. Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Миленко В.А., Коваленко В.Н. Оптимизированные технологии крупномасштабной криоконсервации спермы карповых рыб // Рыбное хозяйство. 2022. № 6. С. 58-66. <https://doi.org/10.37663/0131-6184-2022-6-58-66>
10. Lahnsteiner, F. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. / F. Lahnsteiner, B. Berger, A. Horvath [et al.] // Aquacult. Res. 2004. V. 35. Pp. 519-528.
11. Horvath, A. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study / A. Horvath, W.R. Wayman, J.C. Dean [et al.] // J. Appl. Ichthyol. 2008. V. 24. Pp. 443-449. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01134.x>
12. Boryshpolets, S. Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants / S. Boryshpolets, B. Dzyuba, M. Rodina [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2011. – V. 27. – P. 1147-1149. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01866.x>
13. Urbanyi, B. Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm / B. Urbanyi, A. Horvath, B. Kowacs // Aquacult. Int. 2004. V. 12. Pp. 47-56.
14. Мельченков Е.А., Воробьев А.П., Арчибасов А.А., Ильясова В.А., Калмыкова В.В., Антипина Ю.А.

Сравнительная рыбоводно-биологическая характеристика потомства сибирского осетра и стерляди, полученного с использованием криоконсервированной (дефростированной) спермы на втором году выращивания // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2024. № 7. С. 473-488. <https://doi.org/10.33920/sel-09-2407-04>

15. Илясова В.А., Мельченков Е.А., Воробьев А.П., Арчибасов А.А., Калмыкова В.В., Антипина Ю.А. Сравнительная характеристика развития половых клеток у сибирского осетра и стерляди на втором году выращивания, полученных с использованием криоконсервированной и нативной спермы в условиях промышленных хозяйств // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2024. № 9. С. 612-625. <https://doi.org/10.33920/sel-09-2409-02>

REFERENCES AND SOURCES

- Dokina O.B., Kovalev K.V., Pronina N.D., Popov D.A., Korabelnikova O.V. (2024). Analysis of dynamics of cryoresistance as an indicator of sturgeon sperm quality in fish farms // Actual issues of freshwater aquaculture: collection of scientific papers. – Astrakhan. Issue 95. Pp. 35-45. (In Russ.)
- Tikhomirov A.M. (2017). Correction of cryopreservation techniques of sexual products of Lower Volga sturgeon fish during the creation of a breeding stock // Materials of scientific events dedicated to the 15th anniversary of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences: International Scientific Forum "Achievements of academic science in the South of Russia"; International Youth Scientific Conference "Oceanology in the XXI century: modern facts, models, methods and tools" in memory of Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences D.G. Matishov; All-Russian Scientific Conference "Aquaculture: world experience and Russian developments". Rostov-on-Don: Publishing House of the YUNTS RAS. Pp. 433-434. (In Russ.)
- Krasilnikova A.A. (2018). The use of cryopreserved sperm in artificial reproduction of fish // Deltas of rivers of Russia: patterns of formation, bioresource potential, rational management and development forecasts: proceedings of the International Youth Scientific Conference in Memory of Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences D.G. Matishov (Rostov-on-Don, September 4-6, 2018). Rostov-on-Don: Publishing House of the UNC RAS. Pp. 151-154. (In Russ.)
- Patent No. 2317703 Russian Federation, A 01 K 61/00, A 01 N 1/02. Method of cryopreservation of sperm of sturgeon fish: No. 2006119203: application. 06/02/2006: published. 02.02.2008 / Dokina O.B., Tsvetkova L.I., Pronina N.D., Milenko V.A. (In Russ.)
- Patent No. 2683682 Russian Federation, IPC A 01 N 1/02 (2006.01). Protective medium for cryopreservation of sperm of sturgeon fish: no. 2018126466: published on 07/18/2018: published on 04/01/2019 / Dokina O.B., Kovalev K.V., Pronina N.D., Milenko V.A. (In Russ.)
- Dokina O.B., Kovalev K.V., Pronina N.D., Milenko V.A. (2020). Effective cryopreservation technologies for sperm of carp and sturgeon fish // Latest genetic technologies for aquaculture: proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation (Moscow, Crocus Expo IEC, January 29-31, 2020). – M.: "Pen". Pp. 119-134. (In Russ.)
- Chebanov M.S., Galich E.V., Chmyr Yu.N. (2004). Guidelines for breeding and rearing sturgeon fish – Moscow: FGNU "Rosinformagrotech". 148 p. (In Russ.)
- Dokina O.B., Kovalev K.V., Pronina N.D., Milenko V.A., Novoselova Yu.A. (2021). Improved cryoprotective medium for low-temperature preservation of rainbow trout sperm // Actual issues of freshwater aquaculture: a collection of scientific papers. - M.: Publishing house "Feather". Issue 92. Pp. 39-48. (In Russ.)
- Dokina O.B., Kovalev K.V., Pronina N.D., Milenko V.A., Kovalenko V.N. (2022). Optimized technologies for large-scale cryopreservation of carp sperm. // Fisheries. No. 6. Pp. 58-66. <https://doi.org/10.37663/0131-6184-2022-6-58-66>. (In Russ., abstract in Eng.)
- Lahnsteiner F. (2004). Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. / F. Lahnsteiner, B. Berger, A. Horvath [et al.] // Aquacult. Res. V. 35. Pp. 519-528.
- Horvath, A. (2008). Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study / A. Horvath, W.R. Wayman, J.C. Dean [et al.] // J. Appl. Ichthyol. V. 24. Pp. 443-449. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01134.x>
- Boryshpolets S. (2011). Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants / S. Boryshpolets, B. Dzyuba, M. Rodina [et al.] // J. Appl. Ichthyol. V. 27. Pp. 1147-1149. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01866.x>
- Urbanyi B. (2004). Successful hybridization of Acipenser species using cryopreserved sperm / B. Urbanyi, A. Horvath, B. Kowacs // Aquacult. Int. V. 12. Pp. 47-56.
- Melchenkov E.A., Vorobyov A.P., Archibasov A.A., Ilyasova V.A., Kalmykova V.V., Antipina Yu.A. (2024). Comparative fish-breeding and biological characteristics of the offspring of Siberian sturgeon and sterlet obtained using cryopreserved (defrosted) sperm in the second year of cultivation // Fish farming and fisheries. No. 7. Pp. 473-488. <https://doi.org/10.33920/sel-09-2407-04>. (In Russ.)
- Ilyasova V.A., Melchenkov E.A., Vorobyov A.P., Archibasov A.A., Kalmykova V.V., Antipina Yu.A. (2024). Comparative characteristics of germ cell development in Siberian sturgeon and sterlet in the second year of cultivation, obtained using cryopreserved and native sperm in industrial farms // Fish farming and fisheries. No. 9. Pp. 612-625. <https://doi.org/10.33920/sel-09-2409-02>. (In Russ.)

Материал поступил в редакцию / Received 18.04.2025
Принят к публикации / Accepted for publication 15.05.2025