

ДЕАКТИВАЦИЯ АНОМАЛЬНЫХ И СЛАБОПОДВИЖНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ КАК ПРИЁМ ПОВЫШЕНИЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПОТОМСТВА ОСЕТРОВЫХ РЫБ

К. Л. ШУМСКИЙ, Н. В. БАРУЛИН

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407

(Поступила в редакцию 21.10.2021)

Согласно существующим рекомендациям, оплодотворение икры осетровых необходимо осуществлять сразу после активации подвижности сперматозоидов. Продолжительность оплодотворения должна составлять 1–2 минуты. Однако в первую минуту запуска подвижности сперматозоидов, сравнительно высокими показателями подвижности обладают сперматозоиды с морфологическими аномалиями. Ввиду искусственного оплодотворения при нахождении большого количества икры в небольшой емкости и большого количества микропиларных каналов в одной икринке вероятность оплодотворения икры такими дефективными сперматозоидами возрастает. Цель работы заключалась в разработке методического приема повышения оплодотворения икры, выживаемости эмбрионов, предличинок и личинок осетровых рыб за счет деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении. В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов бестера. Наши исследования установили, что после прекращения движения основного количества сперматозоидов через 3–4 минуты после активации, обнаруживаются сперматозоиды, которые сохраняют высокую скорость подвижности продолжительное время (до 8–10 минут). При оплодотворении икры именно этими сперматозоидами увеличивается процент оплодотворения и выживаемость на первых ключевых стадиях эмбрионального развития. Поэтому с целью деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении рекомендуется осуществлять оплодотворение икры через 4 минуты после их активации оплодотворяющим раствором в соотношении 1:50.

Ключевые слова: аквакультура, осетровые, бестер, сперматозоиды, подвижность, искусственное оплодотворение.

According to existing recommendations, fertilization of sturgeon eggs should be carried out immediately after activation of sperm motility. The duration of fertilization should be 1–2 minutes. However, in the first minute of the start of sperm motility, spermatozoa with morphological abnormalities have relatively high rates of mobility. Due to artificial fertilization, when there is a large amount of eggs in a small container and a large number of micropilar canals in one egg, the probability of fertilization of eggs by such defective spermatozoa increases. The aim of the work was to develop a methodological method for increasing the fertilization of eggs, the survival of embryos, prelarvae and larvae of sturgeon fish due to the deactivation of abnormal and low-mobility spermatozoa during artificial insemination. The sperm of male bester was selected as the object of research. Our studies have established that after the cessation of the movement of the main amount of spermatozoa 3–4 minutes after activation, spermatozoa are found that retain a high speed of mobility for a long time (up to 8–10 minutes). When eggs are fertilized with these very spermatozoa, the percentage of fertilization and survival at the first key stages of embryonic development increase. Therefore, in order to deactivate abnormal and low-mobility spermatozoa during artificial insemination, it is recommended to fertilize eggs 4 minutes after their activation with a fertilizing solution in a ratio of 1:50.

Key words: aquaculture, sturgeon, bester, sperm, motility, artificial insemination.

Введение

Численность естественных популяций осетровых во всем мире снижается. Единственным решением данной проблемы является искусственное воспроизводство этих рыб в аквакультуре [14, 26].

Однако, в настоящее время репродуктивная функция осетровых рыб, особенно в промышленных условиях, снижается. В этой связи технология искусственного воспроизводства осетровых рыб нуждается в постоянном совершенствовании [31, 32].

Сперматозоиды осетровых представляют собой примитивную «аквасперму» с акросомой. У сперматозоида выделяют головку, среднюю часть и жгутик с микротрубочной структурой «9 + 2» (девять периферических дублетов микротрубочек, расположенных по кругу, и две микротрубочки в центре). Подвижность сперматозоидов обеспечивается жгутиком, который состоит из аксонемы, окруженной плазматической мембраной [3].

Сперматозоиды осетровых, как и костистых рыб, являются неподвижными в семенной плазме или семенных канальцах [26, 1]. Как и у *Salmonidae* [10, 24], K^+ является основным ингибирующим фактором, препятствующим активации сперматозоидов в семенной плазме. Активация сперматозоидов у осетровых рыб происходит после попадания в пресноводную среду или после снижения внеклеточного K^+ (Ke^+) [22].

Сперматозоиды морских рыб подвижны больше, чем у пресноводных видов [20]. У большинства пресноводных видов рыб сперматозоиды подвижны менее 2 минут, при этом энергичные поступательные движения длятся менее чем 30 секунд [25]. Продолжительность моторики сперматозоидов

осетровых, как и морских видов, дольше нескольких минут [22, 1]. Продолжительность подвижности сперматозоидов после активации в пресной воде была зарегистрирована у белуги 5–13 мин [9], 2–6 мин у веслоноса [23], 5–30 мин у озерного осетра [21], > 5 мин у персидского осетра [15], 4–5 мин у стерляди [28], 5 мин у тупорылого осетра [1] и 4–60 мин у севрюги [3]. Механизм активации моторики сперматозоидов гормонозависим и регулируется по оси гипоталамус–гипофиз–ганада, что приводит к увеличению внутриклеточного рН и цАМФ (циклический аденозинмонофосфат) в сперматозоидах [29].

Подвижность сперматозоидов зависит от энергии, выделяемой при гидролизе АТФ динеин АТФазой для получения биения жгутика [19]. Пути получения энергии, особенно окислительное фосфорилирование митохондриями, эффективны во время неподвижного хранения и движения [13], но неэффективны при поддержании АТФ на постоянных уровнях [16]. Более длительная продолжительность моторики объясняется более высокой доступностью АТФ [30].

Характеристики подвижности непосредственно связаны с морфологией и структурой сперматозоидов. Различия, которые могут повлиять на подвижность, наблюдаются среди видов костистых рыб в длине жгутика, жизнеспособности сперматозоидов и числе митохондрий сперматозоидов [17].

При нересте осетровых рыб в естественных условиях оплодотворение икры спермиями происходит в воде при быстром течении на достаточно большой площади нерестилищ. Эти факторы сводят к минимуму вероятность оплодотворения икры слабыми и аномальными сперматозоидами. В таких условиях вероятность оплодотворения выше у сперматозоидов с более длительным периодом моторики. При искусственном оплодотворении вероятность оплодотворения икры у всех сперматозоидов одинакова. А зачастую шансов больше у сперматозоидов с аномалиями, так как сразу после активации скорость таких сперматозоидов значительно выше, но продолжительность моторики ниже [8].

Основная гипотеза данной серии экспериментов заключалась в том, что в первую минуту запуска подвижности сперматозоидов относительно высокой подвижностью обладают сперматозоиды с морфологическими аномалиями, которые после оплодотворения икры могут вызывать нарушения в эмбриональном развитии. Вероятность оплодотворения такими сперматозоидами икры особенно повышается при искусственном оплодотворении, когда большое количество икры находится в одной емкости, особенно на фоне большого количества микропилярных каналов в одной икринке.

Цель работы – повышение оплодотворения икры, выживаемости эмбрионов, предличинок и личинок осетровых рыб за счет деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении.

Основная часть

Исследования проводились в период 2014–2019 гг. Объектом исследований являлась сперма самцов бестера – гибрида белуги и стерляди (*Huso huso* × *A. ruthenus*). Самцы бестера выращивались от стадии личинки до половозрелого состояния в условиях установки замкнутого водоснабжения (фермерское хозяйство «Василек», Дзержинский р-н, Минская обл.).

Формирование осетрового маточного стада начиналось во время первой бонитировки среди годовиков. Были отобраны здоровые внешне без дефектов и аномалий особи. По достижении рыбы товарной массы была проведена вторая бонитировка. После второй бонитировки выращивание самцов и самок осуществлялось раздельно. Для маточного стада были созданы оптимальные условия содержания. Использовались бассейны различной конструкции и материала со средней площадью дна 20–40 м², уровнем воды 1,5 м. Плотность посадки зависела от штучной массы ремонта и производителей, так для особей массой 1,5–3 кг плотность посадки составляла 15 кг/м², от 3 до 4 кг – 18 кг/м², от 4 до 6 кг – 25 кг/м², от 6 до 10 кг – 30 кг/м², более 10 кг – 40 кг/м². Выживаемость за период выращивания ремонтного и маточного стада составляла 98 %.

Для нормального формирования репродуктивной системы осетров важным являлось сезонное изменение температурного режима содержания ремонтных стад. Для осуществления данного условия вводилась «зимовка» – ежегодное содержание ремонта и производителей при низких температурах (4–5 °С).

Процесс получения зрелых половых продуктов осетров начинался с зимовки и последующего вывода рыбы на нерестовую температуру и завершался гормональным стимулированием созревания гонад.

В исследованиях участвовали самцы возрастом 7 лет, средней массой 7,0 кг со средней длиной тела 99,5 см. Во время осенней бонитировки были отобраны особи бестерас гонадами, находящимися в III–IV и IV стадиях зрелости. Перед бонитировкой температура воды понижалась до 12 °С и прекращалось кормление рыбы.

Для определения стадий зрелости гонад использовался метод УЗИ диагностики. Зимовка проводилась при температуре воды 4–5 °С с возможным краткосрочным колебанием в диапазоне 2–7 °С. После вывода самцов на нерестовую температуру проводилось стимулирование созревания гонад однократной инъекции сурфагона (GnRHα) являющегося синтетическим аналогом гонадотропин-релизинг-гормона млекопитающих [7]. Инъекция осуществлялась медицинским шприцом внутримышечно в область расположенную между спинными и боковыми жучками на уровне 3–5 жучки.

Отбор спермапродукции осуществлялся при температуре воды 14,5 °С пластиковым шприцем Жане с катетером. Перед началом сцеживания рыбу тщательно протирали ветошью либо салфеткой для предотвращения попадания воды и слизи в сперму. Объем получаемой пробы составлял в среднем 100 см³. Получаемая сперма имела наивысший балл по 5-балльной шкале Персова. Пробирку с полученной спермой помещали в прохладное затемненное место.

Для исследования подвижности сперматозоидов использовалась система CASA состоящая из тринокулярного электронного микроскопа с камерой и персонального компьютера с автоматизированным программным обеспечением ММС Сперм с последующим анализом данных в программе ImageJ [9].

В качестве микроскопа использовался биологический тринокулярный микроскоп (тип Зидентофа) проходящего света ММС-KZ-900. Для анализа подвижности использовались одноразовые счетные стекла Лежа с четырьмя камерами глубиной 10 микрон (точность ±5%) и объемом около 1 мкл.

Для исследования подвижности сперматозоидов пробу разбавляли активирующей средой в соотношении 1:50. Состав активирующей среды: 10 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 10 мМ трисHCl, pH 8,5. Для исследований допускались образцы, подвижность которых превышала 90 %. Для предотвращения прилипания сперматозоидов, предметные стекла обрабатывались 1%-ным сывороточным альбумином. В каждом видеоклипе оценивались от 20 до 70 сперматозоидов. Сперматозоиды со скоростью менее 3 мкм/с считались неподвижными и исключались из расчета подвижности.

Для записи подвижности сперматозоидов использовалась цифровая камера для микроскопии ММС-31С12-М, созданная на основе КМОП сенсора Aptina. Данная камера позволяла проводить цветную видеосъемку с частотой кадров 12, 60, 95 и 135 к/с при разрешении 2048×1536, 800×600, 640×480 и 512×384 пикселей соответственно.

С помощью автоматизированного программного обеспечения ММС Сперм осуществлялся захват изображений и видеоклипов в формате AVI с камеры микроскопа. Затем для компьютерного анализа полученных видеоклипов использовалась программа ImageJ. Результаты экспортировались в Microsoft Excel для последующей обработки.

На основании полученных из программы ImageJ данных (общее количество сперматозоидов, количество подвижных сперматозоидов, время подвижности и расстояние пройденное сперматозоидом) в программе Microsoft Excel рассчитывались процент подвижных сперматозоидов (общее число сперматозоидов с вычетом количества неподвижных умноженное на 100 % и деленное на общее количество спермиев) и скорость движения сперматозоидов (расстояние пройденного пути деленное на время подвижности) (мкм/с). На основании полученных значений скорости, сперматозоиды были разделены на две группы: группа А – сперматозоиды имеющие скорость 30 и более мкм/с, группа В – сперматозоиды имеющие скорость менее 30 мкм/с [2].

Для статистической обработки результатов использовали программную среду R, включая пакеты RCommander, MASS, ggplot2, mgcv, drc, corrplot и др. Статистическую достоверность различий оценивали по тесту Тьюки при условии соблюдения нормальности распределения данных (оценивалось тестом Шапиро–Уилка) и однородности групповых дисперсий (оценивалось тестом Ливина). При несоблюдении указанных условий использовали непараметрический тест Ньюмена–Кейлса [6, 18].

В проведенных исследованиях было отмечено, что после прекращения движения основного количества сперматозоидов через 3–4 минуты после активации обнаруживаются сперматозоиды, которые сохраняют высокую скорость подвижности продолжительное время (до 8–10 минут). Было выдвинуто предположение, что данные сперматозоиды могут быть носителями более улучшенных жизнеспособных генотипов. Биологический смысл отбора сперматозоидов с таким длительным периодом подвижности заключается в том, что в природе наблюдается подобный механизм отбора, так как при естественном нересте сперматозоиды попадают в условия быстрого течения и вероятность успешного оплодотворения икры повышается у тех сперматозоидов, которые обладают повышенной подвижностью. Слабые сперматозоиды в дикой среде теряют шансы на оплодотворение, в отличие от искусственного оплодотворения, где такой шанс остается высоким.

Изменение средней криволинейной скорости (VCL) и средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А бестера представлено в табл. 1.

Таблица 1. Изменение средней криволинейной скорости сперматозоидов бестера (VCL и VCL (A), мкм/с) после активации

Время с момента активации, мин	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с		
	Mean ± SE	Cv, %	Объем выборки <i>n</i>	Mean ± SE	Cv, %	Объем выборки <i>n</i>
0	34,78 ± 0,27	0,17	491	36,42 ± 0,21	0,12	420
1	33,28 ± 0,40	0,23	374	36,89 ± 0,28	0,13	272
2	29,44 ± 0,50	0,31	349	35,44 ± 0,34	0,14	197
3	27,72 ± 0,49	0,36	396	35,44 ± 0,32	0,12	190
4	22,39 ± 0,55	0,44	320	33,56 ± 0,35	0,10	84
5	20,96 ± 0,61	0,46	250	34,58 ± 0,71	0,13	40
6	15,51 ± 0,59	0,59	234	32,45 ± 0,90	0,10	13
7	13,33 ± 0,57	0,62	213	33,59 ± 1,31	0,09	5

Как видно из данных таблицы, после активации сперматозоидов общая криволинейная скорость (VCL) составляет $34,78 \pm 0,27$ мкм/с. Затем происходит плавное снижение VCL до $13,33 \pm 0,57$ мкм/с к 7-й минуте с последующим прекращением движения. Однако анализ криволинейной скорости сперматозоидов категории А (VCL (A)) показал, что данный показатель подвергается незначительным колебаниям в течение 7 минут, с незначительным снижением. Этот факт подтверждает существование отдельных жизнестойких сперматозоидов с предположительно улучшенным генотипом. Так, VCL (A) сразу после активации сперматозоидов составила $36,42 \pm 0,21$ мкм/с и незначительно снизилась до $33,59 \pm 1,31$ мкм/с к 7-й минуте.

Анализ общей выживаемости показал (табл. 2), что происходит плавное снижение общей подвижности сперматозоидов с момента их активации.

Таблица 2. Изменение средней общей подвижности (%) сперматозоидов и доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности (%) после активации

Время с момента активации, мин	Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
	Mean ± SE	Cv, %	Объем выборки <i>n</i>	Mean ± SE	Cv, %	Объем выборки <i>n</i>
0	84,31 ± 12,99	0,27	3	82,56 ± 4,07	0,09	3
1	86,90 ± 10,12	0,20	3	66,67 ± 11,24	0,29	3
2	88,41 ± 4,71	0,09	3	53,67 ± 8,07	0,26	3
3	89,97 ± 4,92	0,09	3	41,34 ± 9,89	0,41	3
4	79,15 ± 9,71	0,21	3	22,44 ± 6,25	0,48	3
5	62,55 ± 19,04	0,53	3	14,06 ± 3,53	0,43	3
6	57,03 ± 14,02	0,43	3	5,58 ± 0,64	0,20	3
7	48,32 ± 15,25	0,55	3	2,83 ± 1,53	0,94	3

Из данных таблицы видно, что общий процент подвижности после активации составил $84,31 \pm 12,99$ % и снизился к 7-й минуте до $48,32 \pm 15,25$ %.

Анализ доли сперматозоидов категории А показал, что с третьей минуты происходит практически 2-кратное снижение (1,99 раза) их численности с $82,56 \pm 4,07$ после активации до $41,34 \pm 9,89$ % к 3-й минуте. К четвертой минуте происходит резкое повторное снижение сперматозоидов еще в 2 раза (1,84 раза) до $22,44 \pm 6,25$ %, т.е. с момента запуска происходит снижение сперматозоидов практически в 4 раза (3,67 раза). Резкое снижение численности сперматозоидов категории А на 4 минуте говорит о том, что с высокой долей вероятности произошло резкое снижение скорости большинства сперматозоидов, а сперматозоиды с предположительно улучшенным генотипом сохраняют свою подвижность. Вероятность оплодотворения именно этими сперматозоидами значительно повышается.

Была осуществлена практическая апробация данного метода селективного отбора сперматозоидов. Перед оплодотворением икры сперма была активирована активирующим раствором, однако концентрация разбавления была снижена в 4 раза относительно рекомендуемого стандартного разбавления 1:200. Через 4 минуты после активации, когда произошел массовый отсев менее жизнеспособных сперматозоидов, было осуществлено оплодотворение икры.

Результаты оценки оплодотворяющей способности такого метода представлены на рисунке.

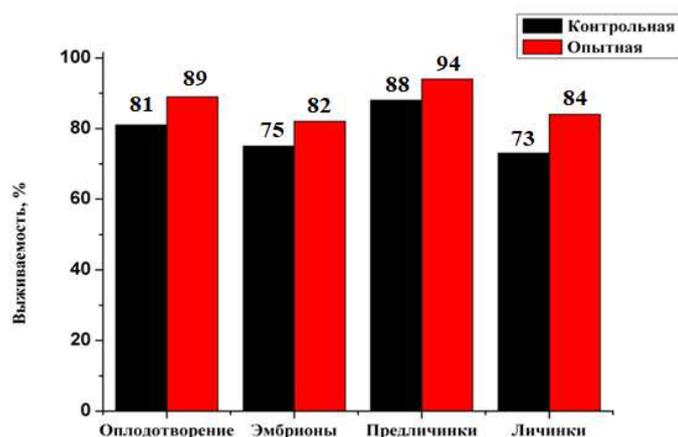


Рис. Влияние метода селективного отбора сперматозоидов на оплодотворение и выживаемость эмбрионов, предличинок и личинок

Как видно из представленных данных, этот метод позволил повысить процент оплодотворения и выживаемость на первых ключевых стадиях эмбрионального развития. Так, процент оплодотворения икры увеличился на 8 %, увеличилась выживаемость эмбрионов на 7 %, предличинок на 6 %, личинок на 11 %.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования на примере бестера установили, что существуют отдельные жизнестойкие сперматозоиды с предположительно улучшенным генотипом. При участии в оплодотворении только этих сперматозоидов позволяет повысить процент оплодотворения и выживаемость на первых ключевых стадиях эмбрионального развития. Так, процент оплодотворения икры увеличивается на 8 %, выживаемость эмбрионов увеличивается на 7 %, предличинок на 6 %, личинок на 11 %.

Для практики искусственного воспроизводства осетровых рыб, с целью деактивации аномальных и слабоподвижных сперматозоидов при искусственном оплодотворении, рекомендуется осуществлять оплодотворение икры через 4 минуты после их активации оплодотворяющим раствором в соотношении 1:50.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барулин, Н. В. Влияние различной концентрации разбавления спермы сибирского осетра на качественные и количественные показатели сперматозоидов в течение краткосрочного хранения / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. – № 1(28). – С. 39–45.
2. Барулин, Н. В. Компьютерный анализ подвижности сперматозоидов ленского осетра в аквакультуре / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. – № 3(30). – С. 11–16.
3. Барулин, Н. В. Регулирование качества спермопродукции осетровых рыб в технологии воспроизводства объектов аквакультуры / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский. – Горки, УО БГСХА, 2019. – 175 с.
4. Шумский, К. Л. Влияние борной кислоты на качественные и количественные показатели сперматозоидов Сибирского осетра в течение краткосрочного хранения / К. Л. Шумский, Н. В. Барулин, М. М. Усов // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2019. – № 1. – С. 3–10.
5. Гинзбург, А. С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии / А. С. Гинзбург. – Москва: Наука, 1968. – 358 с.
6. Мастицкий, С. Э. Визуализация данных с помощью ggplot2 / С. Э. Мастицкий. – М.: ДМК Пресс, 2017. – 222 с.
7. Чебанов, М. С. Руководство по искусственному воспроизводству осетровых рыб / М. С. Чебанов, Е. В. Галич. – Анкара: ФАО, 2013. – 325 с.
8. Шумский, К. Л. Оценка, сохранение качества и повышение оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб при искусственном оплодотворении: автореф. дис. ...канд. с-х. наук: 06.04.01 / К. Л. Шумский; РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству». – Жодино, 2021. – 22 с.
9. Оценка подвижности сперматозоидов осетровых рыб в условиях аквакультуры / Н. В. Барулин [и др.] // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2013. – № 4. – С. 10–15.
10. Baghfalaki, M. The relationships between some spermatological and biochemical parameters of Beluga (*Husohuso L.*) semen in the southeastern of Caspian Sea / M. Baghfalaki, F. Shalouei, M. R. Imanpour // Iranian J. Biol. – 2009. – Vol. 22. – P. 312–320.
11. Plavskii, V. Y. Fish embryos as model for research of biological activity mechanisms of low intensity laser radiation / V. Y. Plavskii, N. V. Barulin // Advances in Laser and Optics Research, 2010. – P. 1–47.
12. Billard, R. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / R. Billard // Journal of Reproduction and Infertility. – 1983. – Vol. 68, iss. 1. – P. 77–84.
13. Billard, R. The energetics of fish sperm motility / R. Billard, M. P. Cosson // Controls of Sperm Motility Biological and Clinical Aspects / ed.: C. Gagnon. – Boca Raton: CRC Press, 1990. – P. 153–173.

14. Bronzi, P. Global sturgeon aquaculture production: an overview / P. Bronzi, H. Rosenthal, J. Gessner // *J Appl Ichthyol.* – 2011. – Vol. 27. – P. 169–175.
15. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus* their physiological relationship with sperm motility / S. M. H. Alavi [et al.] // *Aqua. Res.* – 2004. – Vol. 35, iss. 13. – P. 1238–1243.
16. Christen, R. Trout sperm motility- the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement / R. Christen, J. L. Gatti, R. Billard // *European J. Biochem.* – 1987. – Vol. 166, iss. 3. – P. 667–671.
17. Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species / B. Baccetti // *Gamete Research.* – 1984. – Vol. 10, iss. 4. – P. 373–396.
18. Fox, J. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R / J. Fox // *J. of Statistical Software.* – 2015. – Vol. 14, iss. 9. – P. 1–42.
19. Gibbons, I. R. Cilia and flagella of eukaryotes / I. R. Gibbons // *J. Cell. Biol.* – 1981. – Vol. 91. – P. 107–124.
20. Ginzburg, A. S. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes / A. S. Ginzburg // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1963. – Vol. 11. – P. 13–33.
21. Identification of trypsin-like activity in sturgeon spermatozoa / A. Ciereszko [et al.] // *J. Exp. Zool.* – 1994. – Vol. 268. – P. 486–491.
22. Linhart, O. Motility of spermatozoa from Shovelnose sturgeon and Paddlefish / O. Linhart, S. D. Mims, W. L. Shelton // *J. Fish Biol.* – 1995. – Vol. 47, iss. 5. – P. 902–909.
23. Mims, S. D. Evaluation of activator solutions, motility duration, and short-term storage of paddlefish spermatozoa / S. D. Mims // *J. World Aqua Soc.* – 1991. – Vol. 22, iss. 4. – P. 224–229.
24. Morisawa, M. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes / M. Morisawa, K. Suzuki S. Morisawa // *J. Exp. Biol.* – 1983. – Vol. 107, iss. 1. – P. 105–113.
25. Morisawa, M. Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility in teleosts / M. Morisawa, K. Suzuki // *Science.* – 1980. – Vol. 210, iss. 4474. – P. 1145–1147.
26. Плавский, В. Ю. Роль поляризации и когерентности оптического излучения во взаимодействии со сперматозоидами осетровых рыб / В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин // *Вопросы рыбного хозяйства Беларуси.* – 2009. – № 25. – С. 56–63.
27. Siberian sturgeon spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility / J. L. Gallis [et al.] // *Acipenser: proceedings of the first International Sturgeon Symposium, Bordeaux, 3–6 October 1989* / Cemagref; ed.: P. Williot. – Bordeaux, 1991. – P. 143–151.
28. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) / F. Lahnsteiner [et al.] // *Aqua Res.* – 2004. – Vol. 35, iss. 6. – P. 519–528.
29. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish / T. Miura // *J. Exp. Zool.* – 1992. – Vol. 261, iss. 3. – P. 359–363.
30. Vladoic, T. V. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories / T. V. Vladoic, B. A. Afzelius, G. E. Bronnikov // *Biol. Reprod.* – 2002. – Vol. 66. – P. 98–105.
31. Барулин, Н. В. Комплекс диагностического мониторинга физиологического состояния ремонтно-маточных стад осетровых рыб в установках замкнутого водоснабжения Беларуси / Н. В. Барулин // *Вестник Государственной полярной академии.* – 2014. – № 1(18). – С. 19–20.
32. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, К. Л. Шумский [и др.]. – Горки, Беларусь: УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», 2016. – 204 с.