

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ РАЗБАВЛЕНИЯ СПЕРМЫ СИБИРСКОГО ОСЕТРА НА КАЧЕСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ТЕЧЕНИЕ КРАТКОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ****Н. В. БАРУЛИН, К. Л. ШУМСКИЙ**

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,

г. Горки, Республика Беларусь, 213407

(Поступила в редакцию 05.03.2018)

В технологии искусственного воспроизводства осетровых рыб важным моментом является период хранения спермы, поскольку этого требуют различные технологические ситуации (задержка созревания самок, необходимость транспортировки и др.). Известным способом хранения спермы является ее криоконсервация. Однако криоконсервация может значительно снизить качество сперматозоидов. По этой причине перспективным направлением является разработка методов снижения периода краткосрочного хранения спермы осетровых рыб. Цель наших исследований заключалась в установлении наиболее оптимальных параметров разбавления спермы осетровых рыб для повышения периода его краткосрочного хранения. В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов ленского осетра. Проведенные исследования установили, что разбавление способно оказывать влияние на качественные и количественные показатели спермы осетровых рыб, увеличивая общий срок краткосрочного хранения без использования криоконсервации в 4 раза (до 4 суток). При этом наиболее оптимальная концентрация разбавления составила 1:10. Полученные результаты представляют практический интерес для практики искусственного воспроизводства осетровых рыб и рекомендуются к использованию в инкубационных цехах в условиях неравномерного созревания производителей, а также при транспортировке спермы.

**Ключевые слова:** аквакультура, ленский осетр, сперма, сперматозоиды, краткосрочное хранение, подвижность.

*In the technology of artificial reproduction of sturgeon, an important point is the period of semen storage, as this is required by various technological situations (delay in maturation of females, the need for transportation, etc.). A known method of storing sperm is its cryopreservation. However, cryopreservation can significantly reduce the quality of spermatozoa. For this reason, a promising direction is the development of methods for increasing the period of short-term storage of sturgeon sperm. The purpose of our research was to establish the most optimal parameters for dilution of sperm of sturgeon to increase the period of its short-term storage. As the object of research, the sperm of the Lena sturgeon males was selected. The conducted studies have established that dilution is able to influence qualitative and quantitative indicators of sturgeon sperm, increasing the total term of short-term storage without using cryopreservation by 4 times (up to 4 days). The most optimal concentration of dilution was 1:10. The obtained results are of practical interest for the practice of artificial reproduction of sturgeons and are recommended for use in hatchery shops in conditions of uneven maturation of producers, as well as in the transport of sperm.*

**Key words:** aquaculture, the Lena sturgeon, sperm, spermatozoa, short-term storage, mobility.

**Введение.** Государственной программой развития аграрного бизнеса на 2016–2020 гг. предусмотрено значительно увеличение объемов выращивания товарной рыбы, в том числе и за счет увеличения доли ценных видов рыб [1]. Осетровые (*Chondrostei*, *Acipenseriformes*) населяют реки, устья и внутренние моря северного полушария. Однако, почти все 27 видов осетров подвергаются опасности и их естественная численность уменьшается из-за истощения рыбных запасов, включая изменения миграции и воспроизводства [14, 23]. В настоящее время аквакультура осетровых расширяется во всем мире из-за международного спроса на мясо и икру [14, 3]. По этой причине технологии искусственного воспроизводства уделяется большое внимание со стороны исследователей [2, 3, 4, 7, 8].

В настоящее время репродуктивная функция осетровых рыб, особенно в промышленных условиях, снижается. В этой связи технология искусственного воспроизводства осетровых рыб нуждается в постоянном совершенствовании. Успех оплодотворения зависит от подвижности сперматозоидов, поэтому изучение подвижности сперматозоидов будет способствовать совершенствованию методов искусственного оплодотворения. Известно, что у большинства видов рыб, сперматозоиды в семенной жидкости находятся в неподвижном состоянии, а активация сперматозоидов происходит после попадания в водную среду [10, 11, 12, 13, 15, 21, 25].

В технологии искусственного воспроизводства осетровых рыб важным моментом является период хранения спермы, поскольку этого требуют различные технологические ситуации (задержка созревания самок, необходимость транспортировки и др.). Известным способом хранения спермы является ее криоконсервация. Однако криоконсервация может значительно снизить качество сперматозоидов. По этой причине перспективной является разработка методов увеличения периода краткосрочного хранения спермы осетровых рыб [23].

Краткосрочное хранение включает себя разбавление собранной спермы в ее семенной жидкости, или в специальном разбавителе, который не вызывает преждевременной активации сперматозоидов, в сочетании с хранением спермы при прохладных температурах (2–4 °С) в течение многих дней [12, 13, 18, 19].

Цель наших исследований заключалась в установлении наиболее оптимальных параметров разбавления спермы осетровых рыб для повышения периода его краткосрочного хранения.

**Материал и методы исследований.** В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов ленского осетра, выращенных от стадии личинки до половозрелого состояния в условиях установки замкнутого водоснабжения (фермерское хозяйство «Василек», Дзержинский р-н, Минская обл.). Возраст самцов – 7 лет, средняя масса – 7,0 кг, средняя длина – 99,5 см. Самцов отбирали осенью, для возможного использования в воспроизводстве, с гонадами, находящимися в III–IV и IV стадиях зрелости. Осенняя бонитировка самцов проводилась при снижении температуры воды до 12 °С, при которой рыбу обычно прекращали кормить. Для отбора зрелых самцов при осенней бонитировке использовали метод определения стадий зрелости гонад при помощи неинвазивного экспресс-метода УЗИ. Температурный режим во время зимовки самцов составлял 4–5 °С. При этом допускалось кратковременное повышение температуры до 7 °С и ее понижение до 2 °С. Во время весенней бонитировки основным требованием к режиму преднерестового содержания самцов являлось сохранение их репродуктивных качеств. Поскольку самцы обычно готовы к нересту уже при кратковременном выдерживании при нерестовых температурах, наиболее эффективным приемом сохранения их репродуктивных качеств являлось содержание при невысоких температурах. Для стимулирования созревания самцов применяли суперактивный синтетический аналог гонадотропин-релизинг-гормона млекопитающих (GnRHа, сурфагон). Для инъекций использовали медицинские шприцы. Инъекцию производили в спинные мышцы между спинными и боковыми жучками на уровне 3–5 спинной жучки. При введении препарата в мышечные ткани соблюдали осторожность и следили за тем, чтобы рыба при сжатии мышц не вытолкнула препарат. Отбор спермы осуществляли при помощи катетера и пластикового шприца Жане. Средний объем полученного эякулянта – 100 см<sup>3</sup>. Температура воды в период взятия половых продуктов составляла 14,5 °С. Вся отобранная сперма оценивалась в 5 баллов по 5-балльной шкале Персова. Для исследования подвижности спермиев пробу разбавляли водой в соотношении 1:20–1:50. Температура воды соответствовала температуре эякулята. Перед получением спермы производители обтирали полотенцем или марлевой салфеткой, особенно тщательно вытирали место у анального отверстия, а также анальный и хвостовой плавники. При этом следили, чтобы в пробирку не попали вода, полостная жидкость или экскременты рыбы. Пробирки со спермой ставили в холодильник или в холодное затененное место. После проведения сцеживания спермы производили манипуляции по ее разбавлению. Разбавление осуществляли в сыворотке спермы, которую получали индивидуально для каждого самца. Получение сыворотки осуществляли методом центрифугирования при скорости вращения ротора 800 об/мин в течение 2 мин, а затем на оборотах 3500 об/мин в течение 10 минут. Для проведения исследования были сформированы следующие группы с разбавлением 0 (контрольная группа), 1:1 (опытная группа 50), 1:3 (опытная группа 30), 1:10 (опытная группа 10) и 1:100 (опытная группа 1). Исследуемая сперма помещалась в пробирки типа Eppendorf объемом 2 мл и хранилась в холодильнике при температуре 5 °С.

Подвижность сперматозоидов исследовали на тринокулярном (тип Зидентофа) биологическом микроскопе проходящего света серии MMC-KZ-900 с независимой планохроматической оптической системой на бесконечность F=200мм. Для анализа подвижности использовали счетные камеры с фиксированной глубиной марки Leja. Запись подвижности сперматозоидов осуществляли при помощи видеокамеры MMC-31C12-M построенной на основе сенсора компании Aptina. Частота кадров в секунду – 12 к/с при разрешении 2048x1536, 60 к/с при 800x600, 95 к/с при 640x480, 135 к/с при 512x384. Для исследований качества спермы использовали автоматизированное программное обеспечение MMC Сперм, которое представляло собой основу для компьютерного спермоанализатора (CASA). Оценка концентрации сперматозоидов и анализ их подвижности производился на видеоклипах в формате AVI (захваченных в память компьютера или записанных на жесткий диск), на основе алгоритма анализа с учетом требований руководства Всемирной организации здравоохранения.

Для статистической обработки результатов использовали программную среду R, включая пакеты R Commander, MASS, ggplot2, mgcv, drc, corrplot [9, 22, 30, 29, 27, 16, 28, 17, 5] 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 [5, 6].

**Результаты исследований и их обсуждение.** В результате проведенных исследований нами было установлено, что разбавление спермы сибирского осетра способно оказывать влияние на качественные и количественные показатели сперматозоидов в период краткосрочного хранения.

Общая средняя криволинейной скорость сперматозоидов (VCL). Через сутки после сцеживания в контрольной группе, сперма которой не подвергалась разбавлению, общая средняя криволинейной скорость сперматозоидов (VCL) составила 41,5±1,33 м/с. Достоверно выше ( $p < 0,05$ ) общая средняя

криволинейной скорости сперматозоидов была в опытной группе 30, в опытной группе 10 с достижением максимального значения  $57,30 \pm 1,39 \mu/c$  в опытной группе 1 (рис. 1 а). В дальнейшем значения VCL в исследуемых группах плавно снижаются в течении срока хранения. Однако подвижность сперматозоидов в контрольной группе и в опытной группе 50 через 2 дня после сцеживания резко сократилась и достигла нулевых значений.

Через 2 дня после сцеживания, максимальные значения VCL наблюдались в опытной группе 1 и достигали  $54,61 \pm 0,98 \mu/c$  достоверно отличаясь ( $p < 0,05$ ) от опытной группы 30 и опытной группы 10 (рис. 1 б). Через 3 дня после сцеживания, нами был обнаружен интересный факт, когда в опытной группе 1 подвижные сперматозоиды отсутствовали. При этом такая закономерность наблюдалась во всех повторностях. Данный обнаруженный факт требует отдельного изучения. В этот временной период максимальные значения VCL наблюдались у опытной группы 30 и составили  $47,36 \pm 2,57 \mu/c$ , однако достоверных отличий между оставшимися исследуемыми группами не наблюдалось (рис. 1 в).

Через 4 дня после сцеживания, достоверные ( $p < 0,05$ ) максимальные значения VCL наблюдались у опытной группы 30 и составили  $31,00 \pm 5,62 \mu/c$  (рис. 1 г).

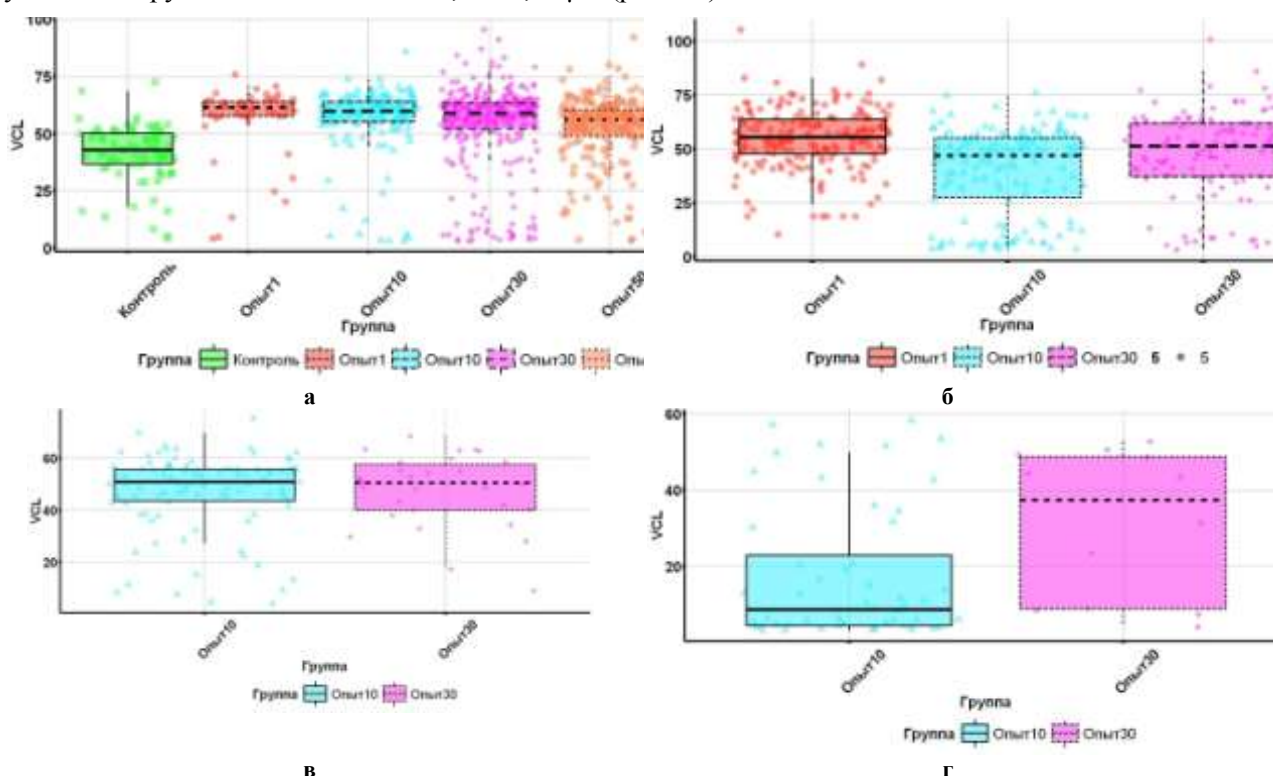


Рис. 1. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости сперматозоидов ленского осетра (VCL,  $\mu/c$ ) через 1 (а), 2 (б), 3 (в), 4 (г) дня после сцеживания в зависимости от величины разбавления спермы. Прямоугольник диаграммы размахов обозначает медиану, а также 0,25 и 0,75 квантили

Средняя криволинейная скорость сперматозоидов категории А (VCL (А)). Выше рассматривался показатель, который фиксируется у сперматозоидов всех категорий,двигающихся поступательно, зигзагообразно и колебательно. Однако непосредственно в оплодотворении принимают участие сперматозоиды относящиеся к категории А, имеющие высокую скорость поступательных движений,двигающихся стремительно, преимущественно по линейной траектории. По этой причине высокий интерес имеет оценка спермы по средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А.

Через сутки после сцеживания в контрольной группе, сперма которой не подвергалась разбавлению, средняя криволинейной скорости сперматозоидов категории А составила  $44,54 \pm 1,05 \mu/c$ . Достоверно выше ( $p < 0,05$ ) общая средняя криволинейной скорости сперматозоидов была в опытной группе 30, в опытной группе 1 с достижением максимального значения  $60,93 \pm 1,01 \mu/c$  в опытной группе 10 (рис. 2а). В дальнейшем значения VCL (А) в исследуемых группах плавно снижаются в течение срока хранения. Однако, как было указано выше, подвижность всех сперматозоидов в контрольной группе и в опытной группе 50 через 2 дня после сцеживания резко сократилась и достигла нулевых значений. Через 2 дня после сцеживания максимальные значения VCL (А) наблюдались в опытной группе 1 и достигали  $56,58 \pm 0,83 \mu/c$  недостоверно отличаясь ( $p > 0,05$ ) от опытной группы 30 и опытной группы 10 (рис. 2б). Через 3 дня после сцеживания, максимальные значения VCL (А) наблюдались у опытной группы 10 и составили  $52,00 \pm 0,84 \mu/c$ ,

однако достоверных отличий между оставшимися исследуемыми группами не наблюдалось (рис. 2в). Через 4 дня после сцеживания, недостоверные ( $p > 0,05$ ) максимальные значения VCL (A) наблюдались у опытной группы 10 и составили  $52,29 \pm 5,03$   $\mu/s$  (рис. 2г), что было выше по отношению к предыдущему дню хранения. Это факт объясняется тем, что слабые сперматозоиды, которые на третий день после сцеживания входили в статистику показателя VCL (A), к 4 дню погибли, оставив только сперматозоиды с повышенной подвижностью. Поэтому мы наблюдали данное повышение.

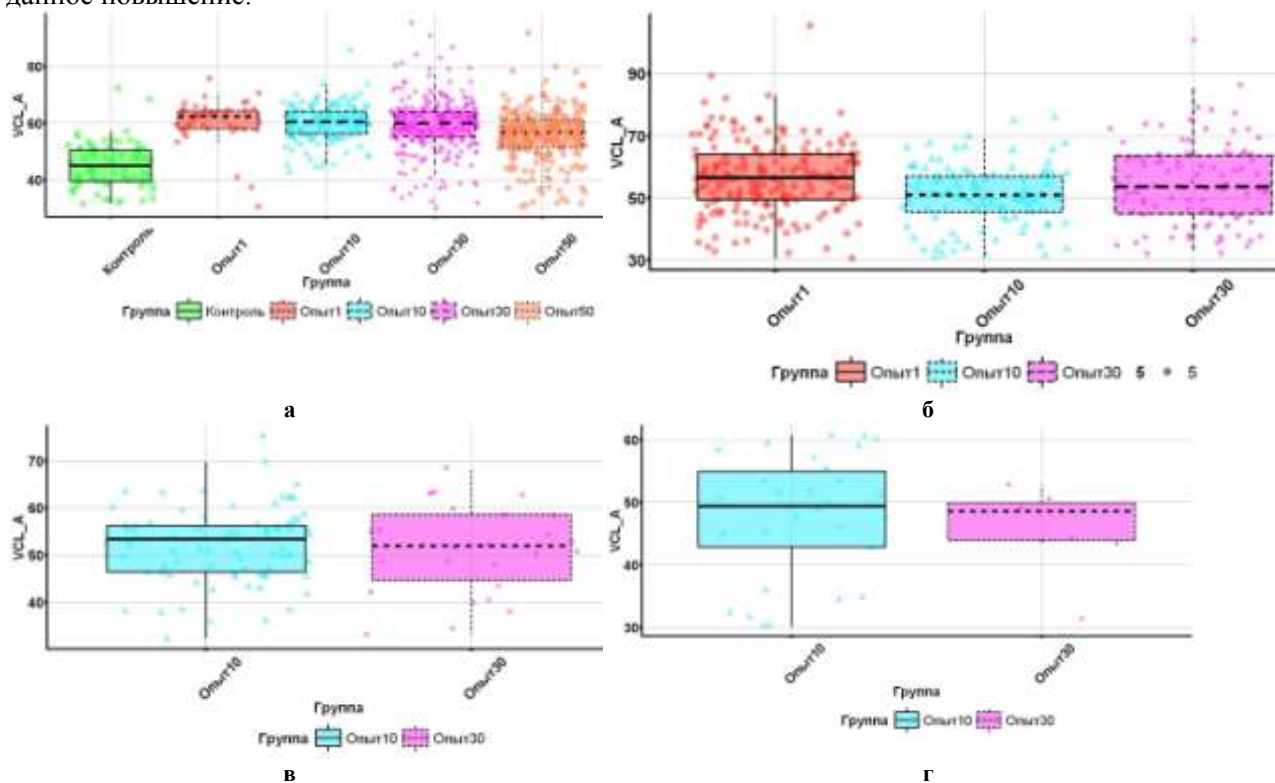


Рис. 2. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А ленского осетра (VCL (A),  $\mu/s$ ) через 1 (а), 2 (б), 3 (в), 4 (г) дня после сцеживания в зависимости от величины разбавления спермы. Прямоугольник диаграммы размахов обозначает медиану, а также 0,25 и 0,75 квантили

Процент общей подвижности сперматозоидов. Наряду со скоростью подвижности сперматозоидов, особенно в условиях высокой продуктивности самок и разбавления водой, процент подвижности (количество подвижных) сперматозоидов является важным показателем.

Через сутки после сцеживания в контрольной группе, сперма которой не подвергалась разбавлению, средний процент общей подвижности сперматозоидов составил  $15,60 \pm 3,59$  %. Достоверно выше ( $p < 0,05$ ) средний процент общей подвижности сперматозоидов был в опытной группе 30 с достижением максимального значения  $84,8 \pm 4,02$  % в опытной группе 10 (рис. 3а). В дальнейшем значения процента общей подвижности в исследуемых группах плавно снижаются в течение срока хранения. Однако, как было указано выше, подвижность всех сперматозоидов в контрольной группе и в опытной группе 50 через 2 дня после сцеживания резко сократилась и достигла нулевых значений. Через 2 дня после сцеживания, максимальные значения среднего процента общей подвижности сперматозоидов наблюдались в опытной группе 10 и достигали  $92,62 \pm 3,43$  % достоверно отличаясь ( $p < 0,05$ ) от опытной группы 30 и опытной группы 10 (рис. 3б). Такое повышение процента общей подвижности, относительно первого дня после сцеживания также объясняется вышеназванными причинами. Через 3 дня после сцеживания значения среднего процента общей подвижности сперматозоидов наблюдались у опытной группы 10 и составили  $57,58 \pm 4,67$  %, достоверно отличаясь ( $p < 0,05$ ) от оставшихся исследуемых групп (рис. 3в).

Через 4 дня после сцеживания, недостоверные ( $p > 0,05$ ) максимальные значения среднего процента общей подвижности сперматозоидов наблюдались у опытной группы 10 и составили  $26,02 \pm 11,09$  % (рис. 3 г).

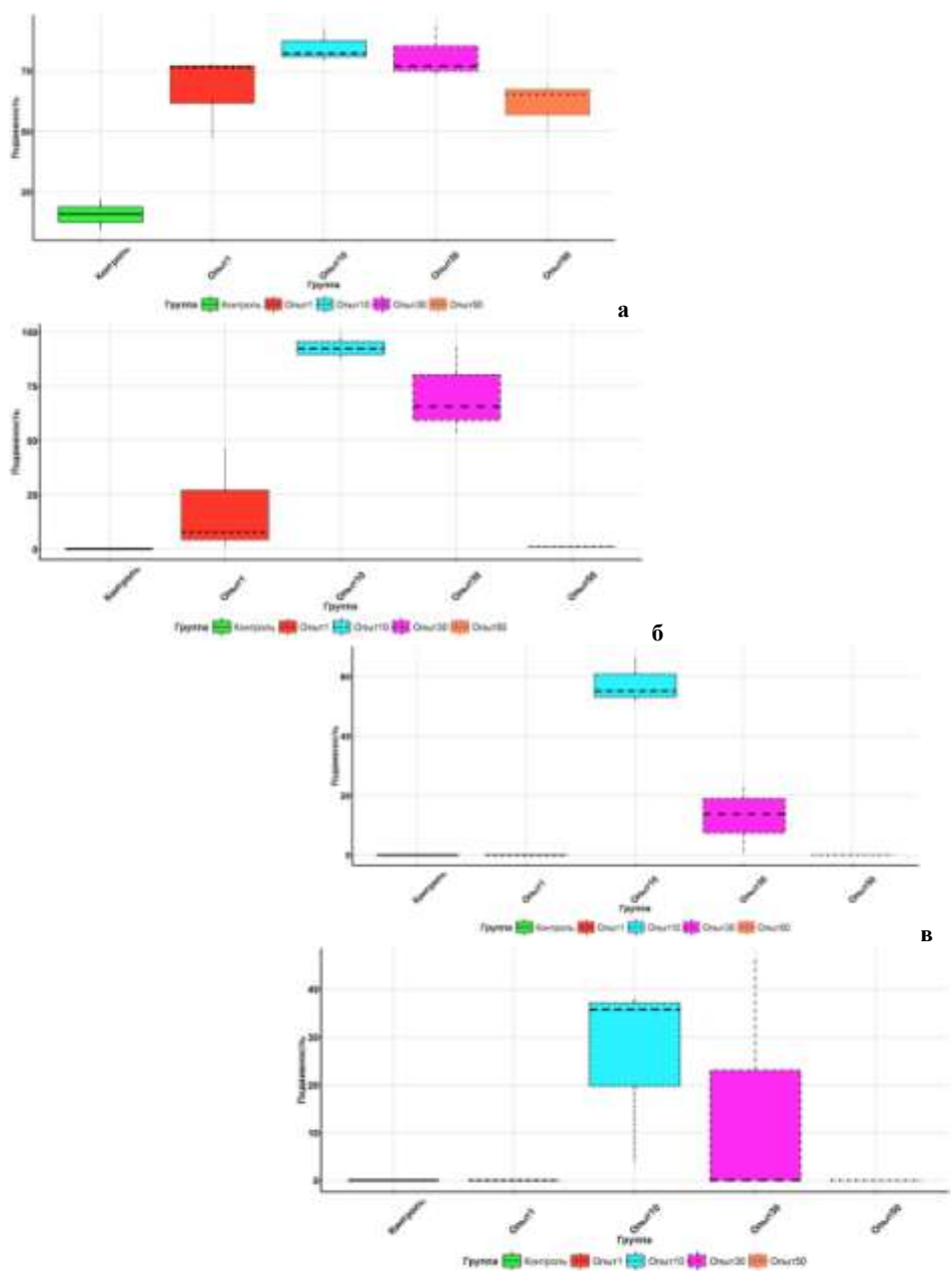


Рис. 3. Диаграмма размахов изменения средней общей подвижности сперматозоидов ленского осетра (%) через 1 (а), 2 (б), 3 (в), 4 (г) дня после сцеживания в зависимости от величины разбавления спермы. Прямоугольник диаграммы размахов обозначает медиану, а также 0,25 и 0,75 квантиль

Процент подвижности сперматозоидов категории А. Как и в случае со скоростью подвижности, выше рассматривался показатель, который фиксируется у сперматозоидов всех категорий,двигающихся поступательно, зигзагообразно и колебательно. Однако непосредственный интерес для изучения сперматозоидов участвующих в оплодотворении является изучения процента подвижных сперматозоидов относящихся к категории А.

Через сутки после сцеживания в контрольной группе, сперма которой не подвергалась разбавлению, средний процент подвижности сперматозоидов категории А составил  $86,02 \pm 4,66\%$  от всего количества подвижных сперматозоидов. Недостаточно выше ( $p > 0,05$ ) средний процент общей подвижности сперматозоидов категории А был в опытной группе 30 с достижением максимального значения  $90,80 \pm 5,93\%$  в опытной группе 10 (рис. 4а). В дальнейшем, значения процента подвижности сперматозоидов категории А в исследуемых группах плавно снижаются в течение срока хранения. Однако, как было указано выше, подвижность всех сперматозоидов в контрольной группе и в опытной группе 50 через 2 дня после сцеживания резко сократилась и достигла нулевых значений. Через 2 дня после сцеживания максимальные значения среднего процента подвижности сперматозоидов категории А наблюдались в опытной группе 30 и достигали  $83,83 \pm 6,32\%$  недостаточно отличаясь ( $p > 0,05$ ) от опытной группы 10 и достоверно отличаясь ( $p < 0,05$ ) от опытной группы 1 (рис. 4б). Через 3 дня после сцеживания максимальные значения среднего процента подвижности сперматозоидов категории А наблюдались у опытной

группы 10 и составили  $73,88 \pm 14,47$  %, недостоверно отличаясь ( $p > 0,05$ ) от оставшихся исследуемых групп (рис. 4в).

Через 4 дня после сцеживания недостоверные ( $p > 0,05$ ) максимальные значения среднего процента подвижности сперматозоидов категории А наблюдались у опытной группы 10 и составили  $26,31 \pm 14,55$  % (рис. 4г).

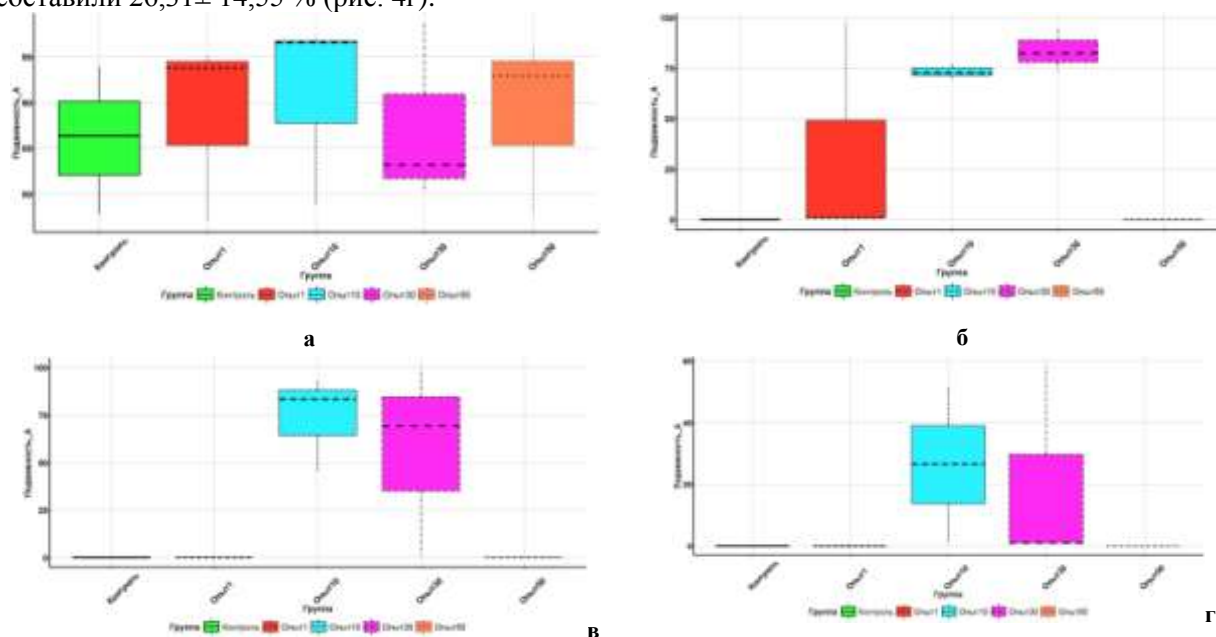


Рис. 4. Диаграмма размахов изменения средней подвижности сперматозоидов категории А ленского осетра (%) через 1 (а), 2 (б), 3 (в), 4 (г) дня после сцеживания в зависимости от величины разбавления спермы. Прямоугольник диаграммы размахов обозначает медиану, а также 0,25 и 0,75 квантиль

Как показали приведенные выше результаты, величина разбавления спермы оказывает влияние качественные и количественные показатели сперматозоидов в течение краткосрочного хранения. При этом наиболее высокие значения были зафиксированы для сперматозоидов, которые разбавляли в концентрации 1:10. Обращает на себя внимание важность определения не только общих показателей качества сперматозоидов, но и показателей, характеризующих сперматозоиды относящихся к категории А, у которых наиболее высокая вероятность участвовать в оплодотворении. Так, при изучении VCL и общего процента подвижности сперматозоидов лучшие показатели были продемонстрированы опытной группой 30. Тогда как при более углубленном изучении показателей VCL (А) средней подвижности сперматозоидов категории А лучшие показатели были продемонстрированы опытной группой 10.

В целом следует отметить, что разбавление спермы способно значительно увеличить срок краткосрочного хранения с 1 (в контрольной группе) до 4 дней (в опытных группах 10 и 30). Использование разбавления обеспечивает поддержание нормальной концентрации иона и осмотическое давление на изотоническом уровне, который предотвращает активацию спермы, обеспечивает защиту спермы от осмотического повреждения и загрязнителей, и поддерживает необходимый уровень АТФ, требуемый для биения жгутиков. При прохладных температурах сперматозоиды имеют низкий метаболизм и могут содержаться в течение нескольких дней в соответствующих разбавителях спермы. Однако длительные холодные условия хранения помещения могут значительно затронуть качество спермы, т. к. мощные микробные загрязнения могут уменьшить подвижность спермы и ее жизнеспособность, что выразилось в наших исследованиях, когда срок краткосрочного хранения достигал только 4 дней [12, 19, 20, 26].

**Заключение.** Таким образом, проведенные исследования на примере сибирского осетра установили, что разбавление способно оказывать влияние на качественные и количественные показатели спермы осетровых рыб, увеличивая общий срок краткосрочного хранения без использования криоконсервации в 4 раза (до 4 суток). При этом наиболее оптимальная концентрация разбавления составила 1:10.

Полученные результаты представляют практический интерес для практики искусственного воспроизводства осетровых рыб и рекомендуются к использованию в инкубационных цехах в условиях неравномерного созревания производителей, а также при транспортировке спермы.

Авторы выражают благодарность сотрудникам фермерского хозяйства «Василек» В. Ф. Вергейчику, Ал. И. Лашкевичу, Ан. И. Лашкевичу за помощь в организации проведения исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Барулин, Н. В. Системный подход к технологии регулирования воспроизводства объектов аквакультуры в рыбоводных промышленных комплексах / Н. В. Барулин // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. (Серыя аграрных навук). – Мінск, 2015. – 3. – С.107-111.
2. Барулин, Н. В. Жаброногий рачок *Artemia salina* L. как объект для исследования биологической активности оптического излучения низкой интенсивности / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский, В. А. Орлович // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. – 2012. – № 28. – С. 42–49.
3. Барулин, Н. В. Лазерное излучение как важный элемент технологии аквакультуры / Н. В. Барулин, М. В. Шалак, В.Ю. Плавский // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2008. – № 3. – С. 82–85.
4. Оценка подвижности сперматозоидов осетровых рыб в условиях аквакультуры / Н.В. Барулин [и др.] // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2013. – № 4. – С. 10–15.
5. Мастицкий, С. Э. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R / С. Э. Мастицкий, В. К. Шитиков. – Хайдельберг – Лондон – Тольятти. – 2014. – Электронная книга. – <http://t-analytics.blogspot.com>.
6. Мастицкий, С. Э. Визуализация данных с помощью ggplot2 / С. Э. Мастицкий. – М.: ДМК Пресс, 2017. – 222 с.
7. Плавский, В. Ю. Влияние лазерного излучения инфракрасной области спектра на устойчивость молоди осетровых рыб к дефициту кислорода / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2008. – № 8–9. – С. 65–74.
8. Плавский, В. Ю. Влияние модуляции низкоинтенсивного лазерного излучения на его биологическую активность / Н. В. Барулин, В. Ю. Плавский // Лазерная медицина. 2009. – Т. 13. №. 1. – С. 4–10.
9. Шитиков, В.К. Экотоксикология и статистическое моделирование эффекта с использованием R / В. К. Шитиков. – Тольятти: ИЭВБ РАН, 2016. – 149 с.
10. A proposal and case study towards a conceptual approach of validating sperm competition in common carp (*Cyprinus carpio* L.) with practical implications for hatchery procedures / V. Kaspar [et al.] // J Appl Ichthyol. – 2008. Vol. 24. – P. 406 – 409.
11. Barulin, N. V. Serum enzyme response of captive sturgeon brookstock *Acipenser baerii* Brandt 1869 females and two hybrids (bester= female *Huso huso* Linnaeus, 1758× male *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758, and RsSs= *A. gueldenstaedtii* Brandt 1833× *A. baerii* Brandt 1869) to hormonal stimulation for spawning induction / N. V. Barulin // *Journal of Applied Ichthyology*. – 2015. – Vol. 2 (31). – P. 2 – 6.
12. Billard, R. Changes in structure and fertilising ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities / R. Billard // *Aquaculture*. – 1978. – Vol. 14. – P. 187 – 198.
13. Biology of sperm and artificial reproduction in carp / R. Billard [et al.] // *Aquaculture*. – 1995. – Vol. 129. – P. 95 – 112.
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. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) / O. Linhart [et al.] // *J Appl Ichthyol*. – 2008. – Vol. 24. – P. 386 – 392.
16. Dose-Response Analysis Using R / C. Ritz [et al.] // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10(12).
17. Fox, J. 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R / J. Fox // *J. of Statistical Software*. – V. 14(9). –P. 1 –42.
18. *In vitro* maturation of the potential for movement of carp spermatozoa / C. Redondo [et al.] // *Mol Reprod Dev*. – 1991. – Vol. 29. – P. 259 – 270.
19. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.) / M. Rodina [et al.] // *Aqua Int*. – 2004. – Vol. 12. – P. 119–131.
20. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish / E. Rurangwa [et al.] // *Aquaculture*. – 2004. – Vol. 234. – P. 1 – 28.
21. Morisawa, M. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes / M. Morisawa, K. Suzuki, S. J. Morisawa // *Exp Biol*. – 1983. – Vol. 107. – P. 105 – 113.
22. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – 2017. – URL <https://www.R-project.org/>.
23. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (I) testicular development, sperm maturation and seminal plasma characteristics / S.M.H Alavi [et al.] // *Rev Fish Biol Fish*. – 2012. doi:10.1007/s11160-012-9268-4.
24. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) Sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation / S. Mohammad [et al.] // *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. – 2012. – Vol. 22. – P. 861 – 886.
25. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species / R. Billard // *Reprod Nut Dev*. – 1986. – Vol. 2. P. 877 – 920.
26. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.) / O. Linhart [et al.] // *J Appl Ichthyol*. – 2003. – Vol. 19. – P. 177 – 181.
27. Venables, W. N. Modern Applied Statistics with S / W.N. Venables. B.D. Ripley // Fourth Edition. Springer, New York. – 2002.
28. Wei, T. Corrplot: Visualization of a Correlation Matrix / T. Wei, V. Simko // R package version 0.77. – 2016. – <https://CRAN.R-project.org/package=corrplot>.
29. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis / H. Wickham. – Springer-Verlag New York, 2009.
30. Wood, S.N. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models / S.N. Wood // *Journal of the Royal Statistical Society (B)*. – 2011. – Vol. 73(1). – P. 3– 36.