ЭКОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

Экология животных / Ecology of Animals
Оригинальная статья / Original article
УДК 597.423:57.086.13
DOI: 10.18470/1992-1098-2016-1-59-68

НОВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК ОСЕТРОВЫХ ВИДОВ РЫБ

[1]Елена Н. Пономарева*, [1]Александра А. Красильникова,
[2]Андрей М. Тихомиров, [1]Ангелина В. Фирсова
[1]лаборатория водных биоресурсов и аквакультуры, Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, Россия, kafavb@mail.ru
[2]научно-исследовательская лаборатория криотехнологии в аквакультуре, Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия

Резюме. Цель. Повышение выживаемости репродуктивных клеток осетровых видов рыб при криоконсервации и получение надежной технологии, пригодной для использования в промышленных масштабах. **Методы**. В работе применяли стандартные методы замораживания, оттаивания репродуктивных клеток, оплодотворения и инкубации икры и подращивания личинок осетровых видов рыб. Принципиально новым был криопротективный состав: для сперматозоидов скорректирован состав криозащитной среды (для белуги 3% диметилсульфоксида, для русского осетра 4% диметилсульфоксида); для замораживания яйцеклеток применялась криопротекторная смесь из растительного нерафинированного и животного масел. **Результаты**. Увеличилась выживаемость дефростированных сперматозоидов осетровых видов рыб: у белуги на 20%, у русского осетра – на 47%. При осуществлении оплодотворения криоконсервированной икры русского осетра нативной спермой процент оплодотворения составил 41%. **Выводы**. Показана эффективность снижения токсического действия веществ в составе криозащитной среды, что привело к повышению выживаемости репродуктивных клеток осетровых видов рыб. При проведении оплодотворения икры, хранившейся в жидком азоте, полученное потомство было жизнеспособным и по реактивности центральной нервной системы и рецепторного комплекса не отличалось от молоди, полученной по традиционной технологии.
Ключевые слова: криоконсервация, сперма рыб, яйцеклетки, криопротектор, осетровые рыбы, выживаемость, сохранение генофонда, искусственное воспроизводство.

Формат цитирования: Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Тихомиров А.М., Фирсова А.В. Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток осетровых видов рыб // Юг России: экология, развитие. 2016. Т.11, N1. C.59-68. DOI: 10.18470/1992-1098-2016-1-59-68

NEW BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR CRYOPRESERVATION OF REPRODUCTIVE CELLS OF STURGEON

[1]Elena N. Ponomareva*, [1]Alexandra A. Krasilnikova,
[2]Andrei M. Tikhomirov, [1]Angelina V. Firsova
[1]Laboratory of aquatic bioresources and aquaculture, Southern scientific center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-don, Russia, kafavb@mail.ru
[2]Research laboratory of cryotechnology in aquaculture, Astrakhan State Technical University, Astrakhan, Russia

Abstract. The **aim** of the research is to increase the survivability of reproductive cells of sturgeon at cryopreservation and developing reliable technology suitable for use on an industrial scale. **Methods.** We have used standard methods of freezing, thawing reproductive cells, fertilization and incubation of eggs and larval rearing of sturgeon. Fundamentally new is cryoprotective composition: for sperm we have adjusted the composition of cryoprotective medium (for beluga 3% of dimethyl sulfoxide, for Russian sturgeon 4% of dimethyl sulfoxide); for freezing the eggs we have

used cryoprotective mixture of unrefined vegetable and animal oils. **Results.** Survivability of defrosted sperm sturgeon has been increased: for Beluga it is up to 20%, for Russian sturgeon - 47%. At insemination of cryopreserved eggs of Russian sturgeon with native sperm the fertilization rate has made 41%. **Main conclusions.** The research proves the effectiveness of reducing the toxic effect of cryoprotective substances, thus leading to increased survivability of reproductive cells of sturgeon. During the insemination of eggs, stored in liquid nitrogen, the resulting offspring were viable and by the reactivity of the central nervous system and receptor complex it does not differ from the young obtained by conventional technology.
Keywords: cryopreservation, fish sperm, egg, cryoprotectant, sturgeon, survivability, preservation of the gene pool, artificial reproduction.

For citation: Ponomareva E.N., Krasilnikova A.A., Tikhomirov A.M., Firsova A.V. New biotechnological methods for cryopreservation of reproductive cells of sturgeon. *South of Russia: ecology, development.* 2016, vol. 11, no. 1, pp. 59-68. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2016-1-59-68

ВВЕДЕНИЕ

В современных экологических условиях, когда антропогенные воздействия на ихтиофауну бассейнов южных морей достигли максимума, важным становится сохранение их генофонда. Особенно это заметно на таких видах, как осетровые, белорыбица (эндемик Каспийского моря), судак и др. Если ранее русский осётр, севрюга и белуга, а также шип в Каспийском и Азовском бассейнах имели промысловое значение, то в настоящее время их вылов запрещен. Белуга и севрюга в этих водоёмах стали настолько редкими, что перешли в разряд исчезающих видов, а популяции русского осётра резко сократились. В настоящее время к редким видам можно отнести шипа и аборигенный вид Каспийского моря - белорыбицу, численность которой снизилась до критически низкого уровня [1-3].

Возникла необходимость разработки разнообразных подходов использования и сохранения популяционного генофонда производителей естественной генерации для целей искусственного воспроизводства.

Методы криобиотехнологии для гидробионтов стали активно применяться последние 10 – 15 лет и эффективность их внедрения при сокращении численности природных популяций и дефиците производителей может быть достаточно высокой.

В процессе криоконсервирования клетки подвергаются воздействию целого комплекса стрессовых факторов, которые вызывают структурные и функциональные изменения различных субклеточных систем. Данные процессы могут развиваться на этапе, предшествующем замораживанию, в зоне положительных температур в присутствии криопротекторов, а также под влиянием охлаждения и/или отогрева.

Основными причинами, инициирующими повреждения клеток при воздействии низких температур являются образование вне- и внутри-клеточных кристаллов льда, которые разрушают клеточные структуры и солевой (осмотический) шок, вызывающий повышение концентрации солей в клетке. Согласно двухфакторной теории, сохранность клеточных суспензий при низкотемпературном консервировании куполообразно зависит от скорости охлаждения на этапе кристаллизации. В настоящее время возможно создание искусственных условий глубокого холода, в которых достигается обратимая остановка жизнедеятельности клеток, пребывающих в состоянии суспензий, и некоторых плотных тканей. Пределы восстановления жизнедеятельности в значительной степени определяются эффективностью примененных криопротекторов. В связи с этим интерес к криозащитным веществам и исследованиям механизмов их действия не ослабевает [4].

Сотрудниками Института биофизики клетки Российской академии наук (РАН) совместно со специалистами Южного научного центра РАН и Астраханского государственного технического университета разработан способ снижения низкотемпературного скачка при кристаллизации растворов криопротекторов, позволяющего повысить целостность дефростированных клеток после криоконсервации. Он заключается в том, что в способе, включающем замораживание криораствора с биологическим материалом в жидком азоте, до операции замораживания раствора криопротекторов с клетками живых организмов, осуществляют дистанционное воздействие на замораживаемый раствор ультразвуковым излучением частотой 0,50 – 10 МГц [5].

Описанию различных криопротекторов посвящена обширная отечественная и зарубежная литература, в которой уделено внимание главным образом морфологической и функциональной сохранности биологических объектов, особенностям развивающихся явных и латентных повреждений отдельных клеточных структур после замораживания-отогрева, а также технологическим аспектам процесса криоконсервирования. Вместе с тем, анализ накопленных данных убеждает в том, что все известные криопротекторы, в том числе обеспечивающие высокую сохранность клеток и тканей после замораживания, не лишены определенных недостатков и оказывают очень слабое действие при криоконсервировании большинства плотных тканей, органов и многоклеточных особей.

Криозащитные вещества, используемые для консервирования, недостаточно систематизированы, а предложенные классификации основаны на описании лишь отдельных свойств химических соединений. Так, по классификации Лавлока [6], в основу которой положен один из показателей механизма криозащиты - способность проникать внутрь клетки все известные криопротекторы разделяются на экзо- и эндоцеллюлярные. Однако ее нельзя считать общей, так как клеточная проницаемость веществ для различных клеток неоднозначна, а защитный эффект может быть достигнут при применении соединений как проникающих, так и непроникающих в клетки [4].

В настоящее время возможно создание искусственных условий глубокого холода, в которых достигается обратимая остановка жизнедеятельности клеток, пребывающих в состоянии суспензий, и некоторых плотных тканей. Пределы восстановления жизнедеятельности в значительной степени определяются эффективностью примененных криопротекторов. В связи с этим интерес к криозащитным веществам и исследованиям механизмов их действия не ослабевает. Описанию различных криопротекторов посвящена обширная отечественная и зарубежная литература, в которой уделено внимание главным образом морфологической и функциональной сохранности биологических объектов, особенностям развивающихся явных и латентных повреждений отдельных клеточных структур после замораживания-отогрева, а также технологическим аспектам процесса криоконсервирования. Вместе с тем, анализ накопленных данных убеждает в том, что все известные криопротекторы, в том числе обеспечивающие высокую сохранность клеток и тканей после замораживания, не лишены определенных недостатков и оказывают очень слабое действие при криоконсервировании большинства плотных тканей, органов и многоклеточных особей.

Указанные обстоятельства обосновывают дальнейший поиск криопротекторов и совершенствование, таким образом, возможности низкотемпературной консервации. Однако научно обоснованные принципы создания криопротекторов до сих пор не разработаны.

Основная задача криозащитных сред состоит в связывании внутриклеточной воды в клетках. Однако, криопротекторы, помимо защитного, оказывают также и токсическое действие на клетки, что является стрессовым фактором. Известно, что многие, наиболее часто используемые криопротекторы, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), глицерин (ГЛ), являются пертурбантами плазматических мембран и обладают способностью заменять гидратную воду, стабилизирующую конформацию белков, липидов и других биомолекул. Токсичность данных веществ рассматривается с точки зрения гипотезы денатурации белков, согласно которой криопротекторы связывают воду, препятствуя тем самым нормальной гидратации белков и других макромолекул. В результате стресса, вызванного действием любого химического вещества на живую клетку, нарушается липидный бислой мембран, изменяется активность ферментных комплексов, что, в конечном счете, влияет на структурно-функциональное состояние мембран клеток и органелл, обладающих окислительно-восстановительной функцией [4].

Однако, учитывая, что любые вещества, используемые в качестве протекторов являются в том или ином случае токсикантами для любых клеток, в том числе и репродуктивных, является целесообразным использовать криопротекторы в строго дозированных соотношениях клетка-протектор, т.к. излишнее количество криопротектора, как токсиканта негативно действует на качество сперматозоидов после двойного температурного шока [4]. Таким

образом, дозированное количество эндоцеллюлярного протектора в составе криозащитного раствора, необходимого для связывания внутриклеточной жидкости в половых клетках, должно повысить качество дефростированного материала.

В связи с этим нуждаются в пересмотре ряд установленных ранее положений, конкретизация которых может способствовать повышению выживаемости репродуктивных клеток рыб после двойного температурного шока и получению надежной технологии, пригодной для использования в промышленных масштабах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили репродуктивные клетки самцов русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) и белуги (*Huso huso* Linnaeus, 1758), а также икра русского осетра (*Acipenser guldenstadtii* Brandt et Ratzeburg, 1833), полученные в период нерестовой кампании.

Семенную жидкость собирали в стеклянные емкости, затем помещали их в сумку-холодильник и перевозили в лабораторию при температуре +4°С, где осуществляли все операции.

Определение качества спермы проводили визуально с использованием микроскопа и видеоокуляра с выходом на монитор компьютера.

Сперму оценивали по внешнему виду (цвет, консистенция), концентрацию сперматозоидов оценивают в счетной камере Горяева, время жизни устанавливали с помощью секундомера.

Низкотемпературное консервирование репродуктивных клеток самцов осетровых рыб проводили согласно разработанной ранее методики [7].

Для спермы осетровых рыб использовали криораствор, содержащий многокомпонентный базовый раствор, сахарозу, маннит, яичный желток, диметилсульфоксид (ДМСО), приготовленный в прохладном помещении при температуре 16-18°С, используя охлажденную посуду и дистиллированную воду. Однако в криозащитной среде было скорректировано содержание ДМСО (для сперматозоидов белуги его количество составило 3%, для русского осетра – 4%). Семенную жидкость смешивали с криозащитной средой, воздействовали низкочастотным электрическим прямоугольным раздражителем, амплитудой 150 мВ и частотой 20 Гц в течение 1 минуты [8], затем замораживали. Скорость охлаждения на линейном участке температурной кривой составляла около 150°С/мин.

Размораживали ампулы в дистиллированной воде при температуре 38ºС. Отмывку от криопротектора осуществляли в физиологическом растворе с применением электростимуляции оболочек клеток сперматозиодов частотой 300 Гц [8]. Выходным показателем являлось время жизни сперматозоидов после дефростации.

Яйцеклетки русского осетра замораживали с использованием криопротектора принципиально нового «обволакивающего действия», базовым компонентом которого являлась смесь растительного нерафинированного и животного масел, содержащих линолевые, линоленовые кислоты и фосфатиды [9].

Партию икры (300 г) разделили на две части: нативная – контроль; криоконсервированная – опыт. Время эквилибрации составляло 20 минут. Замораживание проводили в криопробирках Nunc ("Intermed", Denmark), объемом 1.8 мл, по 30-40 шт. Оттаивание партий икры осуществляли в воде температурой 42°С в течение 5 минут.

Контрольную партию икры оплодотворяли в день получения, а опытную – после процедуры замораживания-хранения-оттаивания. Оплодотворение проводили по стандартной технологии с использованием танина в качестве обесклеивающего вещества. После обесклеивания икру помещали в ячейки аппарата «Осетр» на инкубацию в цехе завода. После вылупления предличинок опытной и контрольной партий рассаживали по аквариумам объемом 200 литров, в цехе выращивания молоди.

Физиологические характеристики полученного опытной и контрольной партий на разных стадиях развития (однодневная личинка, личинка при переходе на активное питание и 20-дневная молодь) изучали в тесте «открытое поле» [10]. При тестировании использовали показатель изменения двигательной активности при действии следующих факторов: ориентировочная активность

(ОА), фоновая активность (ФА), действие слабого и сильного света, освещенностью 7 и 300 люкс (РА 1 и РА 3), действие импульсных электрических раздражителей, амплитудой 150 mV и частотами 20 и 300 Гц (РА 2, РА 4) и виброакустических раздражителей (РА 5).

Различия между реакциями на действие факторов между контрольной и опытной партиями устанавливали с использованием t-критерия Стьюдента.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При замораживании семенной жидкости белуги в криосреде стандартного состава, содержащей 10% проникающего криопротектора – диметилсульфоксида (ДМСО), время жизни спермиев составило 26,2 ± 1,4 мин. При криоконсервации с измененным его количеством произошло увеличение выживаемости сперматозоидов (рис. 1).

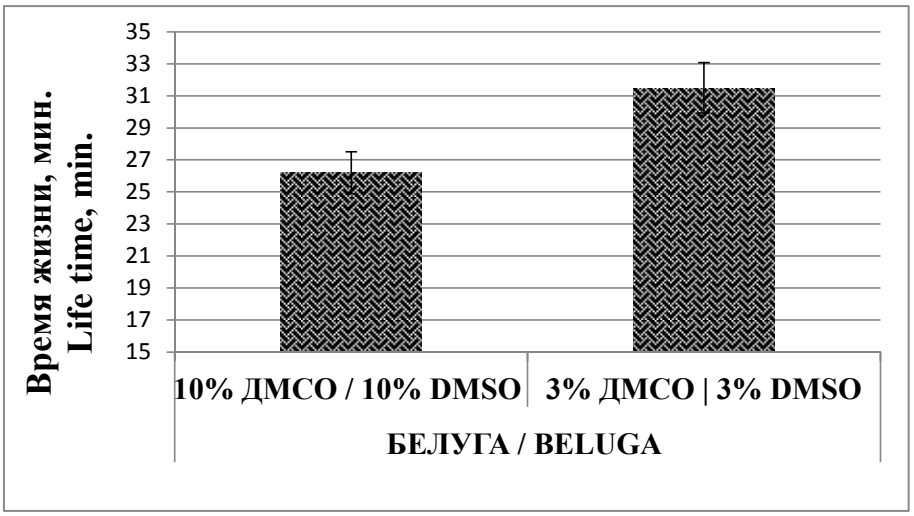

Рис. 1. **Выживаемость сперматозоидов белуги после дефростации различия достоверны при α=0,05**
Fig. 1. **The survival rate of beluga sperm after thawing, differences are significant at α = 0,05**

Время жизни спермиев белуги при замораживании в криозащитном растворе с уменьшенным количеством протектора проникающего действия увеличилось на 20%.

Аналогичные результаты получены при замораживании спермы русского осетра (рис. 2).

Продолжительность жизни спермиев русского осетра, замороженных в криозащитном растворе, содержащем 4% диметилсульфоксида, увеличилась на 47% по сравнению с традиционным составом среды.

Следующий этап экспериментальных работ был направлен на оплодотворение в производственных условиях осетрового рыбоводного завода партии яйцеклеток, замороженных с применением криопротектора принципиально нового «обволакивающего действия», базовым компонентом которого являлась смесь растительного нерафинированного и животного масел, содержащих линолевые, линоленовые кислоты и фосфатиды.

При осуществлении оплодотворения размороженной икры нативной спермой процент оплодотворения составил в опытной партии 41%, в контрольной – 95%. Процесс инкубации в обеих партиях прошел за 5 дней (опытная партия заложена на 2 дня позже контрольной). Процент вылупления предличинок в контроле 85%, в опыте 7,8%. Получено 273 шт. предличинок опытной партии.

За период выращивания до перехода на активное питание смертность в контроле и опыте достоверно не различалась и составила 7 и 5% соответственно. При переходе на внешнее питание смертность в контроле 20%, в опытной партии 35%. На 20-й день развития молодь в обоих партиях была фактически одинаковой массы: в среднем опыт – 0,41 г, контроль – 0,40 г.

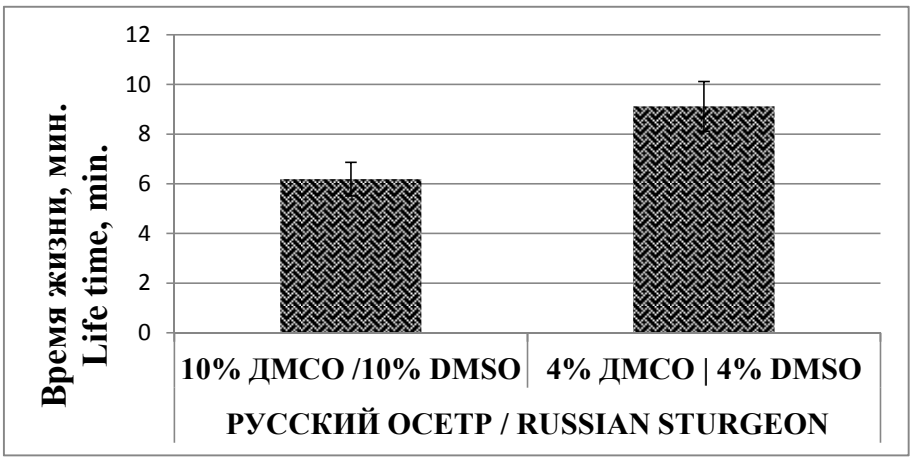

Рис. 2. **Выживаемость сперматозоидов русского осетра после дефростации различия достоверны при α=0,05**
Fig. 2. **The survival rate of Russian sturgeon sperm after thawing, differences are significant at α = 0,05**

По средним значениям тестов построены графики ответных реакций посадочного материала (рис. 3-5). Сравнение физиологических показателей на всех исследованных стадиях развития молоди осетра дает следующие результаты:

Для предличинок реакции опытной партии не различаются достоверно во всех тестах кроме реакции на сильный свет и импульсный электрический раздражитель. Реакции на сильный свет (РА3), импульсный электрический раздражитель (РА4) достоверно выше у контрольной партии (рис. 3). Это свидетельствует о том, что рецепторный комплекс четвертого желудочка головного мозга более приспособлен к восприятию раздражителей внешней среды, чем у опытных особей.

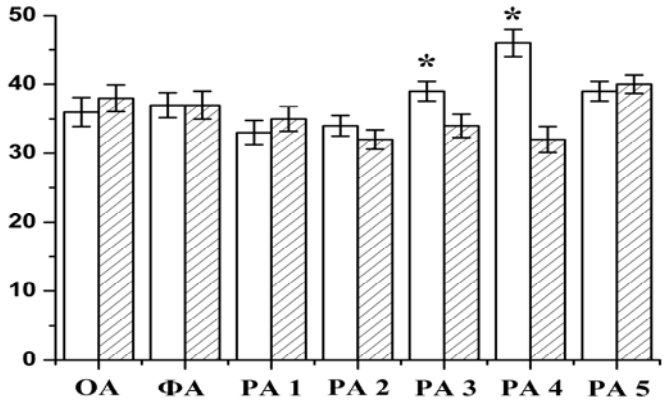

Рис. 3. **Реакции однодневной предличинки русского осетра в тесте «открытое поле» (контроль - белые столбцы, опыт - заштрихованные столбцы)**
Примечание: *Реакции измерялись в условных единицах. Достоверно отличающиеся реакции контрольной и опытной партии отмечены звездочкой*
Fig. 3. **Reaction of the one-day prelarvae of Russian sturgeon under the experiment" open field" (control - white columns, experiment - shaded columns)**
Note: *Reaction is measured in arbitrary units. Significantly different reaction of controlled and experimental parts is marked with an asterisk*

После перехода на внешнее питание ответные реакции молоди опытной и контрольной партий несколько изменяются (рис. 4). Ответные реакции молоди опытной партии на все тесты, кроме виброакустических раздражителей, достоверно выше у опытной партии. Видно, что рыбы из опытной партии превосходят контрольные экземпляры практически по всем показателям.

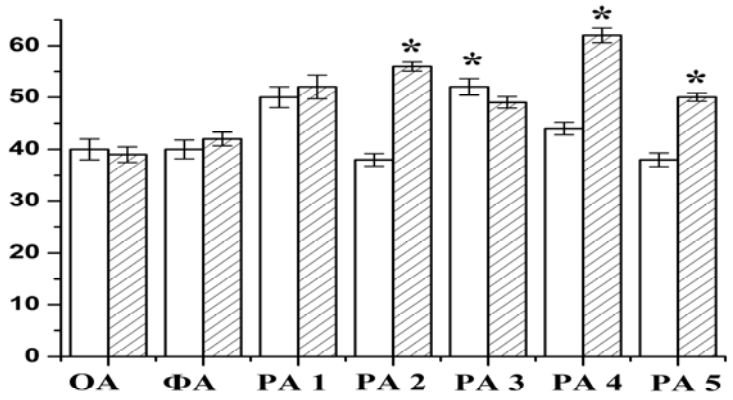

Рис. 4. **Реакции личинки русского осетра после перехода на внешнее питание в тесте «открытое поле» (контроль - белые столбцы, опыт - заштрихованные столбцы)**
Примечание: *Реакции измерялись в условных единицах. Достоверно отличающиеся реакции контрольной и опытной партии отмечены звездочкой*
Fig. 4. **Reaction of the larvae of Russian sturgeon after switching to an external nutrition under the experiment "open field" (control - white columns, experiment – shaded columns)**
Note: *Reaction is measured in arbitrary units. Significantly different reaction of controlled and experimental parts is marked with an asterisk*

В 20-ти дневном возрасте опытная и контрольная партии молоди русского осетра практически сравнялись по реактивности на предлагаемые раздражители (рис. 5), единственный показатель по которому контрольная партия достоверно превосходит опытную, тест на сильный свет (РА 3).

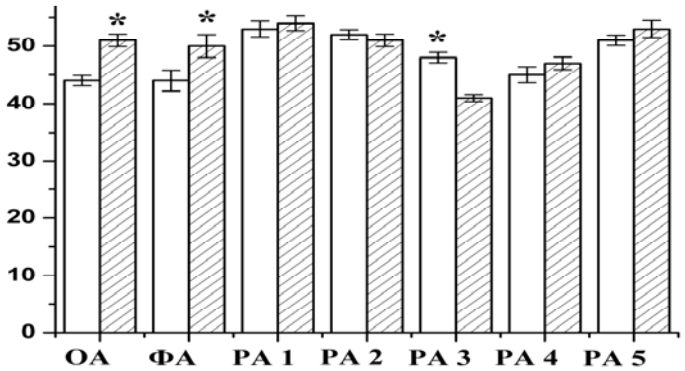

Рис. 5. **Реакции молоди русского осетра в 20-дневном возрасте в тесте «открытое поле» (контроль - белые столбцы, опыт - заштрихованные столбцы)**
Примечание: *Реакции измерялись в условных единицах. Достоверно отличающиеся реакции контрольной и опытной партии отмечены звездочкой*
Fig. 5. **Reaction of the young Russian sturgeon in the 20 days of age under the experiment "open field" (control - white columns, experiment - shaded columns)**
Note: *Reaction is measured in arbitrary units. Significantly different reaction of controlled and experimental parts is marked with an asterisk*

Небольшая разница в развитии личинок и молоди рыб в опытной и контрольной партиях может быть следствием разницы в криоустойчивости субпопуляций замораживаемых икринок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Криоконсервация остается одним из наиболее привлекательных и быстроразвивающихся направлений сохранения редких и исчезающих видов. Наличие в криобанке генетически репрезентативных коллекций геномов рыб и маточных стад на осетровых рыбоводных заводах позволяет с максимальным эффектом сохранить генетическое разнообразие этих ценных промысловых объектов.

В результате проведения научных исследований установлена эффективность снижения объемов отравляющих веществ в составе криозащитной среды для сперматозоидов осетровых видов рыб, что в свою очередь уменьшило токсическое действие последней на объект и привело к повышению времени жизни дефростированных клеток у белуги на 20 %, у русского осетра – на 47 %. Полученные результаты позволяют рекомендовать корректировку концентрации проникающих протекторов в криозащитном растворе в зависимости от количества внутриклеточной воды для повышения выживаемости репродуктивных клеток самцов рыб после двойного температурного шока.

Полученное потомство из криоконсервированной икры оказалось жизнеспособным и по реактивности центральной нервной системы и рецепторного комплекса практически не отличается от нативного материала. Очевидно, криоконсервация таких крупных объектов как яйцеклетки рыб и получение вполне жизнеспособного потомства из области одиночных лабораторных экспериментов переходит в разряд высокотехнологичной аквакультуры.

Благодарность: Работы выполнены в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» по проекту «Разработка методов и технологий мониторинга, управления и сохранения биологического разнообразия водных экосистем южных регионов России» (соглашение № 14.604.21.0129 от 20.10.2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0129), № государственной регистрации 114111940059).

Acknowledgement: The research has been carried out in the framework of the Federal Program "Research and development in priority scientific-technological areas of Russia for 2014-2020" under the project "Development of methods and technologies for monitoring, management and conservation of biodiversity of aquatic ecosystems in southern Russia" (agreement № 14.604.21.0129 from 10.20.2014, the unique identifier of applied scientific research (project) RFMEFI60414X0129), state registration № 114 111 940 059).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лепилина И.Н., Васильева Т.В., Абдусамадов А.С. Состояние запасов каспийских осетровых в многолетнем аспекте (литературный обзор) // Юг России: экология, развитие. 2010. Т. 5, N3. С. 57-65. DOI:10.18470/1992-1098-2010-3-57-65
2. Васильева Л.М., Смирнова Н.В., Юсупова А.З. К вопросу сохранения и восстановления запасов осетровых рыб в Волго-Каспийском бассейне // Юг России: экология, развитие. 2012. Т. 7, N1. С. 73-76. DOI:10.18470/1992-1098-2012-1-73-76
3. Matishov G.G., Balykin P.A., Ponomareva E.N. Russia's fishing industry and aquiculture // Herald of the Russian Academy of Sciences. 2012. T. 82, N1. C. 55-62.
4. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев: Наукова думка, 1994. 432 с.
5. Андреев А.А., Садикова Д.Г., Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Белая М.М. Патент 2540598 Российская Федерация. Способ снижения низкотемпературного скачка растворов криопротекторов / заявитель и патентообладатель Астраханский государственный технический университет (ФГБОУ ВПО АГТУ), Южный научный центр Российской академии наук (ФГБУН ЮНЦ РАН). N 2013125414/13; заявл. 31.05.2013; опубл. 10.02.2015, Бюл. N4. 5 с.
6. Lovelock J.E. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells // Proc. Roy. Soc. Med. 1954. V. 47. P. 60.
7. Белая М.М., Тихомиров А.М. Научно-методические рекомендации по сохранению биологического разнообразия южных морей РФ с применением современ-

ных методов криоконсервации репродуктивных клеток рыб. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. 14 с.
8. Ponomareva E.N., Bogatyreva M.M., Tikhomirov A.M. Increase in the germ cell survival during cryopreservation using electrostimulation // Doklady biological sciences. 2010. V.431, N1. C. 264-265. DOI: 10.1134/s0012496610020237
9. Тихомиров А.М. Патент 2460284 Российская Федерация. Способ криоконсервации яйцеклеток осетровых рыб / заявитель и патентообладатель А.М. Тихомиров. N 2010142589/13; заявл. 18.10.2010; опубл. 10.09.2012, Бюл. N25. 4 с.
10. Витвицкая Л.В., Никоноров С.И., Тихомиров А.М., Козлов А.В. Оценка качества продукции рыбоводных заводов по эколого-физиологическим показателям // Фундаментальные науки – народному хоз-ву. Ан СССР. М.: Наука, 1990. С. 123-149.

REFERENCES

1. Lepilina I.N., Vasilieva T.V., Abdusamadov A.C. The state Caspian sturgeon stocks in long-term aspect (review of literature). *South of Russia: ecology, development*. 2010, vol. 5, no. 3, pp. 57-65. (In Russian) DOI:10.18470/1992-1098-2010-3-57-65
2. Vasilieva L.M., Smirnova N.V., Usupova A.Z. To the issue of preservation and restoration of sturgeon stocks in the Volga-Caspian basin. *South of Russia: ecology, development.* 2012, vol. 7, no. 1, pp. 73-76. (In Russian) DOI:10.18470/1992-1098-2012-1-73-76
3. Matishov G.G., Balykin P.A., Ponomareva E.N. Russia's fishing industry and aquiculture. Herald of the Russian Academy of Sciences. 2012. vol. 82, no. 1, pp. 55-62.
4. Belous A.M., Grishchenko V.I. *Kriobiologija* [Cryobiology]. Kiev, Naukova dumka Publ., 1994. 432 p. (In Russian)
5. Andreev A.A., Sadikova D.G., Ponomareva E.N., Krasilnikova A.A., Belaya M.M. [A method for reducing the low-temperature jump cryoprotectants solutions]. Patent 2540598 Russian Federation. Applicant and patentee Astrakhan State Technical University (ASTU), Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (SSC RAS). no. 2013125414/13; application 31.05.2013; publ. 10.02.2015, bull. no. 4. 5 p. (In Russian)
6. Lovelock J.E. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. Proc. Roy. Soc. Med. 1954. V. 47. P. 60.
7. Belaya M.M., Tikhomirov A.M. *Nauchno-metodicheskie rekomendacii po sohraneniju biologicheskogo raznoobrazija juzhnyh morej RF s primeneniem sovremennyh metodov kriokonservacii reproduktivnyh kletok ryb* [Scientific guidelines for the conservation of biological diversity of the southern seas of the Russian Federation with the use of modern methods of cryopreservation of reproductive cells of fish]. Rostov-on-Don, Southern Scientific Center RAS Publ., 2013. 14 p. (In Russian)
8. Ponomareva E.N., Bogatyreva M.M., Tikhomirov A.M. Increase in the germ cell survival during cryopreservation using electrostimulation. *Doklady biological sciences*. 2010. V. 431, no. 1. pp. 264-265. DOI: 10.1134/s0012496610020237
9. Tikhomirov A.M. [The method of cryopreservation of eggs of sturgeon]. Patent 2460284 Russian Federation. Applicant and patentee A.M. Tikhomirov. no. 2010142589/13; application 18.10.2010; publ. 10.09.2012, bull. no. 25. 4 p. (In Russian)
10. Vitvittskaya L.V., Nikonorov S.I., Tikhomirov A.M., Kozlov A.V. Assessment of the quality of products hatcheries for ecological and physiological parameters. Fundamental'nye nauki – narodnomu hozyaistvu [Basic Science - national households count]. Moscow, Nauka Publ., 1990. pp. 123-149. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Елена Н. Пономарева* – доктор биологических наук, заведующая отделом водных биологических ресурсов бассейнов южных морей Южного научного центра Российской академии наук, тел. +7 (8512) 61-41-06, пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону, 344006 Россия, e-mail: kafavb@mail.ru

Александра А. Красильникова – научный сотрудник лаборатории водных биоресурсов и аквакультуры Южного научного центра Российской академии наук, Ростов-на-Дону, Россия.

Андрей М. Тихомиров – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории криотехнологии в аквакультуре, Астраханского государственного технического университета, Астрахань, Россия.

AUTHOR INFORMATION

Affiliations

Elena N. Ponomareva* – Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of aquatic biological resources of the basins of the southern seas of the southern scientific center of Russian Academy of Sciences, phone: +7 (8512) 61-41-06, Chekhov St., 41, Rostov-on-don, 344006 Russia, e-mail: kafavb@mail.ru

Alexandra A. Krasilnikova – researcher at the laboratory of aquatic bioresources and aquaculture of the southern scientific center of Russian Academy of Sciences, Rostov-on-don, Russia.

Andrei M. Tikhomirov – Candidate of Biological Sciences, leading researcher at research laboratory of cryotechnology in aquaculture, Astrakhan state technical University, Astrakhan, Russia.

Ангелина В. Фирсова – младший научный сотрудник лаборатории водных биоресурсов и аквакультуры Южного научного центра Российской академии наук, Ростов-на-Дону, Россия.

Критерии авторства

Елена Н. Пономарева – обзор литературных источников по исследуемой проблеме, разработка научной концепции статьи. Александра А. Красильникова – сбор экспериментального материала при замораживании сперматозоидов рыб, корректура рукописи до подачи в редакцию, несет ответственность за плагиат. Андрей М. Тихомиров – анализ полученного экспериментального материала по криоконсервации репродуктивных клеток рыб. Ангелина В. Фирсова – сбор экспериментального материала при замораживании яйцеклеток рыб.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.12.2015

Angelina V. Firsova – Junior researcher of the laboratory of aquatic bioresources and aquaculture of the southern scientific center of Russian Academy of Sciences, Rostov-on-don, Russia.

Contribution

Elena N. Ponomareva was responsible for reviewing of the literature sources on the research topic, the scientific concept of development of the article. Alexandra A. Krasilnikova, for collection of the experimental material when freezing fish sperm; proofreading the manuscript prior to submission to the editor and responsible for avoiding plagiarism. Andrei M. Tikhomirov, responsible for analyzing the obtained experimental data on cryopreservation of reproductive cells of fish. Angelina V. Firsova, responsible for collecting the experimental material when freezing fish eggs.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 02.12.2015