



СОХРАНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МЕТОДАМИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ: ОПЫТ ЮЖНОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РАН

© 2022 г. Е. Н. Пономарева^{1,2}, А. А. Красильникова¹, М. М. Белая¹, М. В. Коваленко¹

¹Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук,
Ростов-на-Дону, Российская Федерация

²Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Российская Федерация
E-mail: kafavb@mail.ru

Поступила в редакцию 28.07.2022; после доработки 18.08.2022;
принята к публикации 19.08.2022; опубликована онлайн 13.09.2022.

Одним из перспективных направлений увеличения генетического разнообразия животных является формирование криобанков и долгосрочное хранение репродуктивных клеток в жидком азоте. Известны методы криоконсервации спермы более чем 200 видов рыб. Устойчивость к криоповреждениям спермы у разных видов рыб различается кардинально. Единой методики криоконсервации для рыб нет, так как среда обитания имеет значительные различия для разных видов. В аквакультуре России криоконсервированная сперма в настоящее время используется недостаточно, однако практика диктует необходимость широкого применения криоспермы для решения проблем производства качественного рыбопосадочного материала и для селекционно-племенной работы. В связи с широким развитием аквакультуры создание криобанка является весьма актуальным. Обеспечение товарных и фермерских хозяйств элитным генетическим материалом, способным к воспроизводству в любое время года, позволит не только наладить биотехнологический процесс, но и исключить инбридинг.

Ключевые слова: криобанк, криоконсервация, оценка качества, подвижность

В настоящее время рыбные морские ресурсы истощаются под влиянием антропогенных факторов, многие из которых оказывают необратимое воздействие на внутренние водоёмы (Балыкин и Ходоревская, 2021). При этом численность хозяйственно ценных видов рыб снизилась настолько, что возник вопрос о создании маточных стад, способных восстанавливать нормальное функционирование естественных популяций этих рыб, поддерживать их генетическое разнообразие и интенсифицировать товарное направление аквакультуры, чтобы уменьшить пресс на дикие популяции, существенно подорванные промыслом. Это возможно лишь тогда, когда формирование искусственных популяций и товарное направление в рыбоводстве основываются на генетических принципах, позволяющих снизить вероятность существенного обеднения генофонда восстанавливаемых популяций и выращивать рыб с высокими значениями хозяйственно полезных признаков. Однако формирование маточных стад на рыбоводных предприятиях и управление ими должны базироваться на тех же принципах, что и благополучие природных популяций, основой чего является поддержание оптимального уровня их генетического разнообразия. Криоконсервация — один из методов репродуктивной биологии, имеющий прямое отношение к сохранению биоресурсов с возможностью последующего

восстановления их воспроизводительных функций. В литературных источниках под термином «криоконсервация» обычно понимают хранение биологических объектов при температуре жидкого азота ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), считающееся результативным, только если клетки или ткани полностью жизнеспособны после отогрева (Амстиславский и др., 2014).

История криоконсервации. Идею замораживать репродуктивные клетки первым выдвинул итальянский врач Мантегацца. В 1866 г. он издал монографию о сохранении способности к оплодотворению эякулята быков и коней после его охлаждения до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ и оттаивания. Основы науки криобиологии были заложены в конце XIX в. русским учёным П. И. Бахметьевым, который изучал особенности переохлаждения у насекомых и анабиоз у летучих мышей. Французский физиолог П. Беккерель (1904–1936) и австрийский учёный П. Г. Рам (1919–1924) выявили способность различных организмов (микроорганизмов, беспозвоночных), а также семян и спор переносить глубокое охлаждение (до -269 и $-271\text{ }^{\circ}\text{C}$, то есть до температур, близких к абсолютному нулю) в высушенном состоянии. В дальнейшем было доказано, что некоторые животные и растения выживают при замерзании воды, содержащейся в них. Первые пробы замораживания сперматозоидов сельскохозяйственных животных в нашей стране провёл видный русский биолог И. И. Иванов. В 1907 г. он показал, что сперма жеребца после охлаждения до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ и оттаивания восстанавливала свою оплодотворяющую способность. В 1947 г. И. И. Соколовская, В. К. Милованов и И. В. Смирнов получили потомство от осеменения самок отогретыми сперматозоидами кролика, хранившимися до этого при температуре $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Большое значение имели исследования О. У. Смит и К. Полджа: именно эти специалисты в 1949 г. предложили применять для криоконсервации глицерин. Сохранение фертильной способности сперматозоидов после замораживания — отогрева продемонстрировано на 16 видах млекопитающих, 2 видах моллюсков, 5 видах птиц, 6 видах иглокожих и 1 виде земноводных (Пономарева и др., 2017а).

Первые успешные воспроизводимые результаты криоконсервации сперматозоидов рыб получены для сельди (Blaxter, 1953). Результаты криоконсервации спермы нескольких видов осетровых — белуги *Huso huso* Linnaeus, 1758, стерляди *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758, калуги *Huso dauricus* (Georgi, 1775) и бестера *H. huso* × *A. ruthenus* — впервые получены И. А. Бурцевым и Е. В. Серебряковой (1969). Первая возможность консервации спермы лососёвых была продемонстрирована на примере чавычи *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum, 1792); её сперма, хранившаяся в жидком азоте семь суток, показала 77,7 % оплодотворения (Ott & Horton, 1971). Хорошие результаты использования криоконсервированной спермы для оплодотворения икры большеголового и серебряного карпов первым получил А. W. Sin (1974). В 1976 г. при использовании криоспермы обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 доля оплодотворённой икры составила 11 % (Pavlovici & Vlad, 1976). Положительный опыт применения криоконсервированной спермы для восстановления и поддержания популяционной структуры лососей имеется в Исландии, Норвегии и Канаде. Коммерческие криобанки функционируют в США, Норвегии, Японии и Франции.

Перспективы создания криобанка. Известны методики криоконсервации спермы более чем 200 видов рыб. Устойчивость к криоповреждениям спермы у разных видов рыб кардинально различается. Единой методики криоконсервации для рыб нет, поскольку среда обитания разных видов (морских, пресноводных, проходных и оседлых, туводных) имеет сильные различия. Если для морских рыб, устойчивых к высокому осмотическому давлению воды, легко удаётся получить хорошие показатели выживания сперматозоидов после криоконсервации, то для пресноводных и проходных видов необходим поиск криозащитных сред (Asturiano et al., 2017 ; Maisse, 1996 ; Martínez-Páramo et al., 2017). Эксперименты по криоконсервации сперматозоидов и соматических клеток к настоящему времени проведены более чем на 30 видах

морских рыб (Cabrita et al., 2010 ; Mauger et al., 2006 ; Suquet et al., 2000). Доля сперматозоидов, выживших и активных после криоконсервации, намного выше у морских видов рыб (80–90 %), чем у пресноводных (40–50 %) (Scott & Baynes, 1980).

В России для аквакультуры в настоящее время криоконсервированная сперма используется недостаточно, однако практические возможности позволяют широко применять криотехнологии для воспроизводства качественного рыбопосадочного материала, а также для селекционно-племенной работы. В связи с повсеместным развитием аквакультуры создание криобанка весьма перспективно и актуально. Товарные и фермерские хозяйства будут обеспечены элитным генетическим материалом, способным к воспроизводству вне зависимости от наличия самцов, и смогут не только наладить биотехнологический процесс, но и исключить инбридинг (Савушкина, 1999 ; Cabrita et al., 2015 ; Zhang, 2018).

Создание криобанка позволяет:

1. Сохранять генетическую информацию редких, исчезающих, хозяйственно ценных видов животных в жидком азоте в течение десятков лет. Хранение замороженных клеток при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ возможно до 50 и более лет без возникновения существенного количества аномальных участков ДНК.
2. Перевозить генетический материал в места сокращения или исчезновения популяций для восстановления вида.
3. Обеспечить возможности для селекционно-генетических работ.
4. Создать и сохранить генетическую коллекцию различных видов гидробионтов.

При проектировании и строительстве фермерских рыбоводных хозяйств следует предусмотреть наличие регионального криобанка: это существенно облегчит их работу в дальнейшем. Ежегодное обновление маточных стад будет способствовать «вливанию свежей крови» и омоложению стада, а также позволит минимизировать количество самцов на предприятиях. Затраты на сбор и хранение генетического материала в пять раз меньше затрат на корма для рыб. Деятельность криобанка сможет способствовать развитию аквакультуры в регионах.

Отличия криобанка-репродуктора от существующих аналогов:

1. Криобанк-репродуктор позволяет не только хранить генетический материал, но и обеспечивать рыбоводные предприятия нужным количеством спермы в удобное время.
2. Через обмен криоконсервированной спермой между рыбоводными хозяйствами будет происходить расширение генетического разнообразия и, как следствие, повышение качества молоди. Обмен нативной спермой не всегда возможен и удобен, так как сроки проведения нерестовых мероприятий на предприятиях различаются, а при существенной их удалённости друг от друга возникает проблема потери качества при транспортировке.
3. Криобанк-репродуктор предоставит возможность рыбоводным хозяйствам сохранить сперму, оставшуюся после оплодотворения, в замороженном виде и впоследствии её использовать.
4. Образцы спермы в криобанке позволяют предприятиям уменьшить количество самцов в маточном стаде. Это повлечёт за собой снижение затрат на содержание рыбы или замену части самцов самками для получения большего количества молоди либо пищевой икры.
5. Применение методов криоконсервации спермы рыб с высокой выживаемостью после замораживания — оттаивания позволяет получать физиологически полноценное потомство.

Для обеспечения деятельности криобанка необходимо правовое регулирование, позволяющее покупку материала у рыбоводных предприятий, а также использование на них криоспермы.

При формировании криобанков репродуктивных клеток самцов важно заложить на хранение материал высокого качества. Знание специфических морфофизиологических особенностей репродуктивных клеток рыб позволит создавать более эффективные методики криоконсервации, учитывающие необходимость сочетания проникающих и непроникающих криопротекторов,

осмотически активных соединений и антифризов, а также включение в среды стабилизаторов клеточных мембран и антиоксидантов. Это даёт возможность надёжно защищать спермии рыб от криповреждений при замораживании — оттаивании и оптимизировать на этой основе все этапы криоконсервации. Масштаб описанной проблемы определяется охватом исследований большой группы хозяйственно ценных, аборигенных, уникальных и исчезающих видов рыб, которые могут быть использованы, в частности, для выращивания и спасения исчезающих видов. Криоконсервированная сперма может стать источником генофонда того или иного вида в селекционном процессе.

Криобанк Южного научного центра РАН. Специалисты ЮНЦ РАН начали работы по криоконсервации репродуктивных клеток редких и исчезающих видов рыб южных морей России в 2004 г. Важнейшей задачей наших исследований является оптимизация процесса криоконсервации спермы рыб методом подбора оптимальных криопротекторов и снижения их негативного воздействия на клетки. В процессе криоконсервации происходят кристаллизация внутриклеточной и внеклеточной воды, а также разрушение мембран половых клеток, что ведёт к их гибели. Для защиты клеток от разрушений используют криопротекторы и стабилизаторы мембран. Лучшему проникновению протекторов внутрь клеток способствуют различные методы стимуляции (химическая, механическая, магнитная и т. д.). Одним из перспективных направлений в работах по криоконсервации является электростимуляция.

Первые эксперименты были проведены со спермой русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833, которую получили с Бертюльского осетрового завода Астраханской области. В исследованиях по криоконсервации использовали сперму активностью 4 и 5 баллов по шкале Г. М. Персова (1953). В качестве криопротекторов применяли среду Штайна (NaCl, KCl, NaHCO₃, глюкоза, 12,5 % яичного желтка, 12,5 % ДМСО) и разработанную нами криосреду (NaCl, KCl, NaHCO₃, CaCl₂, маннит, сахароза, 10 % яичного желтка, 10 % ДМСО). Замораживание проводили по методике Л. И. Цветковой и С. И. Савушкиной (1997). Выявлена высокая (до 85 %) выживаемость; это значение выше, чем у дефростированной спермы, которая была заморожена с разработанной криосредой. Экспериментально установлены оптимальные параметры электрического сигнала, при которых увеличиваются выживаемость и время активности сперматозоидов, — частота 20 Гц и амплитуда 150 мВ. Получена дефростированная сперма лучшего качества по обоим показателям при воздействии электрическим сигналом в течение 1 мин; выживаемость сперматозоидов русского осетра составила 50 %, время жизни — 290 с; значения для севрюги — 56 % и 693 с соответственно.

С 2007 г. специалисты проводят работы с белорыбницей *Stenodus leucichthys* (Güldenstädt, 1772). Её икра была оплодотворена спермой, хранившейся два года в жидком азоте. Воздействие электрическим током в период эквilibрации и выведение протектора во время дефростации половых клеток повышают выживаемость половых клеток осетровых рыб в 1,4–1,6 раза. При использовании электростимуляции на этапе эквilibрации возрастает проницаемость мембран, и криопротекторы, проникая внутрь клеток, предохраняют их от повреждений в процессе замораживания. Выживаемость сперматозоидов с применением электростимуляции после дефростации увеличивается по сравнению с выживаемостью спермы, замороженной по традиционной методике (90 % и 60 % соответственно). Сперму такого высокого качества можно рекомендовать для искусственного осеменения икры. При проведении экспериментов по осеменению икры дефростированной спермой успешность оплодотворения составила 80–96 % у русского осетра и 64–84 % — у севрюги. Успешность оплодотворения тех же партий икры на осетровом рыболовном заводе достигла 75–80 %. Полученные результаты свидетельствовали о высоком качестве криоконсервированной спермы (Богатырева, 2010 ; Красильникова, 2015 ; Красильникова и Тихомиров, 2018 ; Пономарева и др., 2017b).

Таким образом, установлено, что глубокая заморозка спермы русского осетра и хранение её в жидком азоте при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение двух лет не оказывают негативного влияния на качество дефростированной спермы, а также на эмбриональное развитие и морфометрические показатели личинок и молоди русского осетра. Именно поэтому использование дефростированных половых клеток для искусственного осеменения икры целесообразно в условиях недостатка производителей на осетровых рыбоводных предприятиях.

Совместно с сотрудниками Института биофизики клетки РАН нами разработан способ снижения низкотемпературного скачка при кристаллизации растворов криопротекторов, позволяющего повысить целостность дефростированных клеток после криоконсервации. Суть в следующем: в способе, включающем замораживание криораствора с биологическим материалом в жидком азоте, до операции замораживания раствора криопротекторов с клетками живых организмов осуществляют дистанционное воздействие на этот раствор ультразвуковым излучением частотой 0,50–10 МГц (Патент 2540598 РФ, 2015). Установлена зависимость между объёмом замораживаемого материала и выживаемостью после оттаивания (Красильникова и Тихомиров, 2014а), описана возможность замораживания семенной жидкости на сетках в виде тонкой плёнки (Krasilnikova & Tikhomirov, 2014b). Также установлена эффективность снижения объёмов 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 (Красильникова и Тихомиров, 2015). 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.

Банк спермы осетровых и других видов рыб пополняется в криобанке ЮНЦ с 2006 г. Все репродуктивные клетки замораживают по технологическим методам, разработанным учёными центра. Сбор материала производят на рыбоводных предприятиях Астраханской, Волгоградской и Ростовской областей, что обеспечивает возможность обмена генетическим материалом в пределах Южного федерального округа России (табл. 1).

Таблица 1. Коллекция репродуктивных клеток рыб в криобанке Южного научного центра РАН

Table 1. Collection of fish reproductive cells in the cryobank of the Southern Scientific Center of the RAS

Вид	Количество образцов
Русский осётр <i>Acipenser gueldenstaedtii</i> Brandt & Ratzeburg, 1833	398
Сибирский осётр ленокской популяции <i>Acipenser baerii</i> Brandt, 1869	224
Севрюга <i>Acipenser stellatus</i> Pallas, 1771	38
Шип <i>Acipenser nudiiventris</i> Lovetsky, 1828	196
Бестер <i>Huso huso</i> Linnaeus, 1758 × <i>Acipenser ruthenus</i> Linnaeus, 1758	125
Белуга <i>Huso huso</i> Linnaeus, 1758	105
Стерлядь <i>Acipenser ruthenus</i> Linnaeus, 1758	337
Веслонос <i>Polyodon spathula</i> (Walbaum, 1792)	20
Амурский осётр <i>Acipenser schrenckii</i> Brandt, 1869	50
Белорыбица <i>Stenodus leucichthys leucichthys</i> (Güldenstädt, 1772)	140

Сохранённый генетический материал можно использовать для восполнения дефицита производителей и коррекции существующих технологий искусственного воспроизводства редких и исчезающих видов рыб. Таким образом, криоконсервация репродуктивных клеток самцов рыб является актуальным направлением в стратегии сохранения генетического биоразнообразия, а также развития рыбного хозяйства и аквакультуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-16-00118 с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Амстиславский С. Я., Абрамова Т. О., Брусенцев Е. Ю., Кизилова Е. А. Криоконсервация и сохранение биоразнообразия // *Природа*. 2014. № 9. С. 24–33. [Amstislavsky S. Ya., Abramova T. O., Brusentsev E. Yu., Kizilova E. A. Cryopreservation and conservation of biodiversity. *Priroda*, 2014, no. 9, pp. 24–33. (in Russ.)]
2. Балыкин П. А., Ходоревская Р. П. Состояние рыболовства в южном районе Волго-Каспийского рыбохозяйственного бассейна // *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство*. 2021. № 3. С. 7–16. [Balykin P. A., Khodorevskaya R. P. State of fisheries in south region of Volgo-Caspian fisheries basin. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry*, 2021, no. 3, pp. 7–16. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2021-3-7-16>
3. Богатырева М. М. *Оптимизация методов криоконсервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.06. Астрахань, 2010. 20 с. [Bogatyreva M. M. *Optimizatsiya metodov kriokonservatsii spermy dlya sokhraneniya genofonda osetrovyykh ryb* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.02.06. Astrakhan, 2010, 20 p. (in Russ.)]
4. Бурцев И. А., Серебрякова Е. В. *Долгосрочное хранение спермы при низкой температуре* : методическое пособие. Москва, 1969. 5 с. [Burtsev I. A., Serebryakova E. V. *Dolgosrochnoe khraneniye spermy pri nizkoi temperature* : metodicheskoye posobie. Moscow, 1969, 5 p. (in Russ.)]
5. Красильникова А. А. *Совершенствование процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 06.04.01. Астрахань, 2015. 24 с. [Krasilnikova A. A. *Sovershenstvovaniye protsessiya kriokonservatsii reproduktivnykh kletok samtsov ryb* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 06.04.01. Astrakhan, 2015, 24 p. (in Russ.)]
6. Красильникова А. А., Тихомиров А. М. Корреляция объёмов эндоцеллюлярного протектора в криозащитных средах и внутриклеточной жидкости сперматозоидов осетровых рыб // *Естественные науки*. 2015. № 3 (52). С. 96–102. [Krasilnikova A. A., Tikhomirov A. M. Correlation of volumes of intracellular fluid of spermatozoa and endocellular protector in cryoprotective media for sturgeon fishes. *Estestvennye nauki*, 2015, no. 3 (52), pp. 96–102. (in Russ.)]
7. Красильникова А. А., Тихомиров А. М. Объём замораживаемого образца как один из факторов выживаемости сперматозоидов осетровых видов рыб при криоконсервации // *Естественные науки*. 2014а. № 2 (47). С. 62–69. [Krasilnikova A. A., Tikhomirov A. M. The volume of the frozen sample as one of factors of survival of spermatozoa of sturgeon species at the cryopreservation. *Estestvennye nauki*, 2014a, no. 2 (47), pp. 62–69. (in Russ.)]
8. Красильникова А. А., Тихомиров А. М. Получение жизнеспособной молоди русского осетра с применением криоконсервированной спермы и оценка поведенческих реакций криопотомства // *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53, № 4. С. 762–768. [Krasilnikova A. A., Tikhomirov A. M. Reproduction of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) viable juveniles using cryopreserved sperm and behavioral reactions of the cryo-progeny. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, 2018, vol. 53, no. 4, pp. 762–768. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.4.762rus>
9. Патент 2540598 РФ. *Способ снижения низкотемпературного скачка растворов криопротекторов* / Андреев А. А., Садикова Д. Г., Пономарева Е. Н., Красильникова А. А., Белая М. М. ; заявитель и патентообладатель Астраханский государственный технический университет (ФГБОУ ВПО АГТУ), Южный научный центр Российской академии наук (ФГБН ЮНЦ РАН). № 2013125414/13 ; заявл. 31.05.2013 ; опублик. 10.02.2015 ; Бюл. № 4. 5 с. [Patent 2540598 RF. *Sposob snizheniya nizkotemperaturnogo skachka rastvorov krioprotektorov* / Andreev A. A., Sadikova D. G., Ponomareva E. N., Krasilnikova A. A., Belaya M. M. ; zayavitel' i patentoobladatel' Astrakhanskii gosudarstvennyi tekhnicheskii

- universitet (FGBOU VPO AGTU), Yuzhnyi nauchnyi tsentr Rossiiskoi akademii nauk (FGBUN YuNTs RAN). No. 2013125414/13 ; zayavl. 31.05.2013 ; opubl. 10.02.2015 ; Byul. no. 4. 5 p. (in Russ.)]
10. Персов Г. М. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток осетровых // *Доклады АН СССР*. 1953. Т. 90, № 6. С. 1183–1185. [Persov G. M. Dozirovanie spermiev kak sposob upravleniya oplodotvoreniiem yaitsekletok osetrovykh. *Doklady AN SSSR*, 1953, vol. 90, no. 6, pp. 1183–1185. (in Russ.)]
 11. Пономарева Е. Н., Красильникова А. А., Фирсова А. В., Белая М. М. Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы // *Рыбное хозяйство*. 2017а. № 4. С. 85–88. [Ponomareva E. N., Krasilnikova A. A., Firsova A. V., Belaya M. M. Cryopreservation of fish reproductive cells: History and prospects. *Rybnoe khozyaistvo*, 2017а, no. 4, pp. 85–88. (in Russ.)]
 12. Пономарева Е. Н., Неваленный А. Н., Белая М. М., Красильникова А. А. Использование криоконсервированной спермы для формирования маточного стада стерляди // *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство*. 2017б. № 4. С. 118–127. [Ponomareva E. N., Nevalennyu A. N., Belaya M. M., Krasilnikova A. A. Using cryopreserved sperm for creating sterlet brood stock. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry*, 2017b, no. 4, pp. 118–127. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2017-4-118-127>
 13. Савушкина С. И. Воспроизводство осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы // *Рыбное хозяйство. Серия «Аквакультура»: информационный пакет ВНИЭРХ. «Проблемы сохранения геномов рыб»*. Москва : ВНИЭРХ, 1999. Вып. 1. С. 39–42. [Savushkina S. I. Vosproizvodstvo osetrovykh ryb s ispol'zovaniem kriokonservirovannoi spermy. In: *Rybnoe khozyaistvo. Seriya "Akvakul'tura" : informatsionnyi paket VNIERKh. "Problemy sokhraneniya genotov ryb"*. Moscow : VNIERKh, 1999, iss. 1, pp. 39–42. (in Russ.)]
 14. Цветкова Л. И., Савушкина С. И. *Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососёвых и осетровых видов рыб*. Москва : ВНИИПРХ, 1997. 11 с. [Tsvetkova L. I., Savushkina S. I. *Metodicheskoe posobie po kriokonservatsii spermy karpa, lososevykh i osetrovykh vidov ryb*. Moscow : VNIIPRKh, 1997, 11 p. (in Russ.)]
 15. Asturiano J. F., Cabrita E., Horváth Á. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, vol. 245, pp. 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.019>
 16. Blaxter J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 1953, vol. 172, pp. 1189–1190. <https://doi.org/10.1038/1721189b0>
 17. Cabrita E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cerezales S., Herráez M. P. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, vol. 26, iss. 5, pp. 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>
 18. Cabrita E., Labbé C., Horváth Á., Herráez P., Robles V., Asturiano J. F., Tiersch T., Martínez-Páramo S. Cryobanking in aquatic species: Applications and perspectives in fish germ cells. *Cryobiology*, 2015, vol. 71, iss. 3, pp. 556. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.10.082>
 19. Krasilnikova A. A., Tikhomirov A. M. Alternative methods of preparation of fish sperm to freeze at ultra-high values of cooling rate. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry*, 2014b, no. 2, pp. 72–78.
 20. Maisse G. Cryopreservation of fish semen: A review. In: *Refrigeration and Aquaculture : proceedings of the conference of IIR Commission C2 : Bordeaux colloquium, Bordeaux, France, 20–22 March, 1996*. Paris : L'Institut International du Froid, 1996, pp. 443–457.
 21. Martínez-Páramo S., Horváth Á., Labbé C., Zhang T., Robles V., Herráez P., Suquet M., Adams S., Viveiros A., Tiersch T. R., Cabrita E. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 2017, vol. 472, pp. 156–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>
 22. Mauger P.-E., Le Bail P.-Y., Labbé C. Cryobanking of fish somatic cells: Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. *Comparative Biochemistry*

- and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, vol. 144, iss. 1, pp. 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.01.004>
23. Ott A. G., Horton H. F. Fertilization of chinook and coho salmon eggs with cryopreserved sperm. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 1971, vol. 28, no. 5, pp. 745–748. <https://doi.org/10.1139/f71-102>
24. Pavlovici L., Vlad C. Some data on the preservation of carp (*Cyprinus carpio* L.) seminal material by freezing. *Review Cresterea Animals*, 1976, no. 4, pp. 45–48. (Can. Fish. Mar. Serv. Transl. Ser. ; 3965).
25. Scott A. P., Baynes S. M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, 1980, vol. 17, iss. 6, pp. 707–739. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02804.x>
26. Sin A. W. Preliminary results on cryogenic preservation of sperm of silver carp and bighead. *Hong Kong Fisheries Bulletin*, 1974, vol. 4, pp. 33–36.
27. Suquet M., Dreanno C., Fauvel C., Cosson J., Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 2000, vol. 31, iss. 3, pp. 231–243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x>
28. Zhang T. Importance of cryobanking in aquatic species conservation and aquaculture. *Cryobiology*, 2018, vol. 80, pp. 169. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.10.059>

PRESERVATION OF BIOLOGICAL DIVERSITY BY CRYOPRESERVATION METHODS: EXPERIENCE OF THE SOUTHERN SCIENTIFIC CENTER OF THE RAS

E. N. Ponomareva^{1,2}, A. A. Krasilnikova¹, M. M. Belaya¹, and M. V. Kovalenko¹

¹Federal Research Center Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation

²Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation
E-mail: kafavb@mail.ru

One of the promising directions for increasing animal genetic diversity is the formation of cryobanks and long-term storage of reproductive cells in liquid nitrogen. Methods of sperm cryopreservation are known for more than 200 fish species. The resistance to sperm cryodamage in different fish species varies dramatically. There is no unified cryopreservation technique for fish since the habitats vary greatly for different species. In Russia, cryopreserved sperm is currently used extremely insufficiently in aquaculture, but the practice dictates the need for widespread use of cryosperm to solve the problems of producing high-quality fish seed material and for breeding work. The formation of cryobanks is very relevant due to extensive development of aquaculture. Providing commercial and farm enterprises with elite genetic material capable of reproduction at any time of the year will allow not only to set up a biotechnological process, but also to eliminate inbreeding.

Keywords: cryobank, cryopreservation, quality assessment, mobility