Мария Владимировна КИБАЛОВА[1]
Светлана Александровна СЕЛЮКОВА[2]
Александр Германович СЕЛЮКОВ[3]

УДК 502.74/574.23

СОХРАНЕНИЕ ЦЕННЫХ, РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ. 2. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ

[1] магистрант, кафедра зоологии
и эволюционной экологии животных,
Тюменский государственный университет
makib-ichty@mail.ru

[2] старший преподаватель кафедры
математики и информатики,
Государственный аграрный университет
Северного Зауралья (г. Тюмень)
lucretias@yandex.ru

[3] доктор биологических наук,
профессор кафедры зоологии
и эволюционной экологии животных,
Тюменский государственный университет
ags-bios@yandex.ru

Аннотация

В статье приводятся методы, применяющиеся отечественными и зарубежными исследователями по криосохранению отдельных таксонов позвоночных; детализируются способы криоконсервации репродуктивных клеток и эмбрионов рыб как наиболее доступных, удобных для исследования и хозяйственно-значимых объектов. Описываются состав, сроки экспозиции криопротекторов и криосмесей для сохранения фертильности спермы осетровых, лососевых, сиговых, карповых и окуневых рыб в

Цитирование: Кибалова М. В. Сохранение ценных, редких и исчезающих видов животных. 2. Криоконсервация позвоночных / М. В. Кибалова, С. А. Селюкова, А. Г. Селюков // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2017. Том 3. № 3. С. 141-157.
DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-3-141-157

© ФГАОУ Тюменский государственный университет

процессе криоконсервации, хранения и дефростации. С другой стороны, криоконсервация яйцеклеток рыб, а также позвоночных других таксонов затруднена вследствие низкой проницаемости для криопротекторов оболочки, большого содержание воды, жировых включений и желтка. Для успешной криоконсервации спермиев бесхвостых амфибий используются проникающие (диметилсульфоксид) и непроникающие (сахароза) криопротекторы.

В отличие от рыб и амфибий методы криоконсервации гамет рептилий, среди которых много краснокнижных видов, разработаны слабо. Половые клетки самцов разных видов птиц, преимущественно курообразных, после криоконсервации многие годы сохраняли высокую фертильность. Хорошо разработаны методы криосохранения спермы, яйцеклеток и ранних зародышей млекопитающих. По сравнению с остальными классами позвоночных, у млекопитающих выживаемость зародышей после дефростации значительно выше.

Ключевые слова

Криоконсервация, позвоночные животные, половые клетки, зародыши.

DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-3-141-157

Введение

Согласно «Стратегии сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов в Российской Федерации на период до 2030 г.», на территории России зарегистрировано более 2 тыс. видов позвоночных животных. Среди них 320 видов млекопитающих, 732 вида птиц, 80 видов пресмыкающихся и 29 видов земноводных; в пресноводных и морских водоемах обитает более 1 000 видов рыб и 9 видов круглоротых. Отмечается, что в Красную книгу Российской Федерации занесено 258 видов позвоночных животных, включая 41 вид бесчелюстных и рыб, 8 видов земноводных, 21 вид рептилий, 123 вида птиц и 65 видов млекопитающих [19]. Такое значительное количество краснокнижных видов позвоночных не может восстановить свою численность, если ограничиваться только санационными или запретительными методами. Одним из пунктов «Стратегии …» является «разработка технологий сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов в искусственных условиях и природной среде обитания», что указывает на необходимость проведения прикладных научных разработок репродукционного характера с применением новейших биотехнологий, в том числе криобиотехнологий как в естественной среде, так и в условиях искусственного содержания [19].

Рассмотренный ранее материал, касающийся общих проблем криобиологии в области сохранения ценных, редких и исчезающих видов животных, в настоящей статье конкретизируется описанием методов и подходов, используемых в работах по криосохранению представителей отдельных групп позвоночных. При этом приводится более детальное описание криоконсервации

репродуктивных клеток и зародышей рыб как наиболее доступных, удобных для исследования и хозяйственно-значимых объектов.

Ранее отмечалось, что скорость охлаждения, компоненты криозащитной среды (солевой состав базового раствора, присутствие криопротектора, минорные компоненты), процедуры насыщения криопротектором и его удаление из клеток, продолжительность экспозиции в криозащитной среде, температура хранения являются важными параметрами, влияющими на сохранность биологических объектов. И в пределах каждой таксономической группы такие процедуры достаточно специфичны.

Криоконсервация половых клеток

Рыбы и амфибии

В настоящее время методики криоконсервации *спермы рыб* хорошо разработаны. Успешное криоконсервирование спермы украинских пород карпа, а также малочешуйчатого карпа второго селекционного поколения (F_2) с использованием более эффективного для активирования размороженной спермы этих представителей 2,5-2,7%-ного цитратного буфера было проведено Бехом [3].

Результатом исследования Савушкиной с соавторами [17] стало выявление оптимального криопротектора для криоконсервации спермы русского осетра и стерляди — 1,5 М этиленгликоля, а также антиоксиданта бутилокситолуол (БОТ), при помещении которого в состав среды вызывает подвижность 50-60% спермиев сибирского осетра после оттаивания. Для повышения жизнестойкости спермиев следует проводить корректировку концентрации криопротекторов в криозащитном растворе в зависимости от объема внутриклеточной воды.

В экспериментах со спермиями русского осетра [7] было показано, что снижение воды (в качестве разбавителя) и высокоосмотических веществ в разработанной авторами криосмеси повышали ее криопротекторные свойства. Акимочкиной [1] в работах по криоконсервации были исследованы цитоморфологические и функциональные особенности спермиев ряда видов осетровых, карповых, а также белорыбицы и окуня. Ею были выявлены типичные цитологические криоповреждения спермиев рыб, разработана схема их морфофункциональных нарушений, и установлены составы криопротекторов, необходимых для сохранения ряда основных морфологических параметров спермиев после криоконсервации. Показана возможность замораживания и длительного хранения семенной жидкости при температуре −22°С как альтернативы криоконсервации биоматериала в жидком азоте.

Сходные исследования [10] проведены на криоконсервированной сперме белуги, русского осетра, стерляди и белорыбицы после дефростации, используемой для оплодотворения нативных яйцеклеток. Показано, что при снижении количества проникающего криопротектора уменьшается его токсическое действие на спермии, и тем самым увеличивается продолжительность их жизни.

Фабброчини с соавторами [28], используя внутриклеточный криопротектор — диметилсульфоксид (ДМСО) — для криоконсервации спермы дорадо *Sparus aurata*, показали, что после 5-летнего хранения относительная подвижность спермиев была несколько ниже в дефростированной сперме, чем в свежей, но при этом не теряла своих фертильных свойств, и ее можно было использовать для оплодотворения яйцеклеток не только в лабораторных исследованиях, но и в аквакультуре.

При использовании пропиленгликоля и ДМСО в качестве криопротекторов в криотубах объемом 5 мл и коэффициентом разбавления 4:1 было достигнуто успешное криоконсервирование спермы летней камбалы *Paralichthys dentatus* [33]. Авторами показано, что доля подвижных спермиев у этого вида составила 78 ± 4,7% и 76,6±7,9%, процент оплодотворения — 95,7 ± 3,6% и 79,4 ± 5,2%, вылупление достигло высоких значений: 93,1 ± 4% и 77,2 ± 2,9%, соответственно, для каждого криопротектора.

Черешко с соавторами [27] было установлено, что для получения оптимальных условий при криоконсервации спермы радужной форели *Oncorhynchus mykiss* концентрация глюкозы в составе криопротекторной среды должна составлять 0,15 М, а период уравновешивания, когда спермии подвергаются переохлаждению с формированием внутриклеточного льда и клеточной дегидратации — не менее 15 минут.

Исследование Фигероа с соавторами [30] по замораживанию спермы инвертированных самцов радужной форели показало, что сперматозоиды лучше всего сохранялись при использовании в составе криозащитной среды семенной жидкости в концентрации 50%; при этом их жизнеспособность достигала 97,3%, целостность плазматической мембраны возрастала до 98,4%, целостность митохондриальной мембраны была существенно ниже — 36,2%, а фрагментация ДНК опускалась до 11,1%.

Гарсия с соавторами [31] выявили репродуктивные характеристики криоконсервированной спермы колумбийского прохилода *Prochilodus magdalenae* после ее дефростации: коэффициент фертильности составил 70%, коэффициент вылупления — 48,6%, личиночная выживаемость — 19,5%. В состав разработанной криозащитной среды входили: 10% ДМСО, 5,5% глюкозы и 12% яичного желтка.

Как можно видеть, активность исследований сохранности фертильных характеристик спермы рыб, несмотря на продолжительную историю данной проблемы, не снижается, что вызвано значительным научным и практическим интересом.

Криоконсервация *яйцеклеток рыб*, а также позвоночных других таксонов затруднена по причине ряда структурных барьеров: низкая проницаемость оболочки, препятствующая проникновению криопротекторов; большое содержание воды, жировых включений и желтка; повышенная чувствительность женских половых клеток к охлаждению [2, 36, 37]. При криоконсервации яйцеклеток рыб очень важно подобрать подходящий криопротектор. Тихомировым для замора-

живания икры осетровых рыб был выявлен «обволакивающий» криопротектор, включающий масло подсолнечника и рыбий жир [20]. Он успешно применяется в экспериментах [22].

Криоконсервация репродуктивных клеток *амфибий* является относительно молодым методом в области криобиологии, поэтому в настоящее время исследования в этом отношении малочисленны [40].

Для рыб и амфибий как анамниотических позвоночных характерно наружное оплодотворение и полный цикл эмбрионального развития в водной среде. Поэтому криотехнологию для криоконсервации спермы земноводных во многом принято проводить по аналогии с рыбами [38]. Однако успешную криоконсервацию яйцеклеток и ранних эмбрионов земноводных провести удается не всегда [21]. Показано, что для криоконсервирования спермы некоторых видов амфибий возможно применение сразу как непроникающих, так и проникающих криопротекторов. Так, в исследованиях по криоконсервации половых клеток самцов представителей *Bufo*, *Xenopus*, *Rana* были эффективно использованы ДМСО или глицерол как проникающие криопротекторы, сахароза — как непроникающий [38].

В результате исследований по криоконсервации спермиев прудовой лягушки *Pelophylax lessonae*, проведенных Утешевым с соавторами [40], было отмечено снижение подвижности, а также частичное повреждение клеточных мембран половых клеток, хотя удалось провести успешное оплодотворение яйцеклеток.

Амниоты яйцекладущие

Известно, что значительное количество представителей *рептилий* находится под угрозой исчезновения [25]. Однако, как отмечают авторы, должного внимания развитию технологий воспроизводства для сохранения их видового разнообразия не уделяется. Возможно, отчасти это связано с ограниченным использованием рептилий в качестве модельных объектов при фундаментальных исследованиях процессов оплодотворения и раннего онтогенеза.

Некоторого успеха в криоконсервации сперматозоидов маисового полоза *Elaphe guttata* достигли Маттсон с соавторами [34] и Фари с соавторами [29]. Ими показана невысокая жизнестойкость криоконсервированных спермиев: 3 суток у первой группы исследователей и 2 суток у второй. В опыте по криоконсервированию спермы американского аллигатора *Alligator mississippiensis* Ларсеном с соавторами [32] было показано губительное воздействие криопротекторов глицерина и ДМСО на жизнеспособность половых клеток самцов, обычно используемых для криоконсервации сперматозоидов рыб и бесхвостых амфибий.

Процесс криоконсервации оказывает влияние как на физические особенности спермы, так и на химические компоненты, необходимые для поддержания подвижности. Однако для спермы различных видов птиц ее реакция на замораживание проявляется по-разному. Так, оплодотворяющая способность сперма-

тозоидов обыкновенной индейки *Meleagris gallopavo* резко снижалась, как только температура опускалась ниже 15°С; в то время как при температуре 5°С способность спермы петухов к оплодотворению не изменялась [12]. Низкотемпературное замораживание половых клеток самцов имеет большое практическое значение для селекционно-племенной работы на птицеводческих хозяйствах. Так, например, были получены успешные результаты хранившейся в течение 9 лет криоконсервированной спермы нескольких пород петухов: род-айланд, итальянские куропатчатые, австралорп, юрловские голосистые, белый леггорн. Оплодотворяемость и выводимость яиц по породам варьировала в пределах 32,8-80,2% и 25,3-70,3%, соответственно. Таким образом, применение криоконсервированной спермы этих пород в целях дальнейшего разведения является вполне допустимым [12].

Млекопитающие

Несмотря на успешное криоконсервирование зародышей и половых клеток нескольких десятков видов млекопитающих, до сих пор не разработана универсальная технология замораживания и оттаивания [5], и, скорее всего, она не существует.

В исследовании [18] по криоконсервации методом быстрого замораживания спермы благородного оленя (*Cervus elaphus*), пятнистого оленя (*C. nippon hortulorum*) и лося (*Alces alces*) применялись криопротекторные смеси (лактозо-желточно-цитратная смесь с добавлением 5% глицерина), используемые при криоконсервировании спермы крупного рогатого скота.

Невесом с соавторами [35] было показано, что для сохранения замороженной спермы псовых *Caninae* естественный липопротеин низкой плотности (ЛНП), извлеченный с 50% АСС, был настолько же эффективен, как и целый яичный желток. Лиофилизированный ЛНП, главным образом в концентрациях 2% и 3%, был непригоден для поддержания эффективности криопротекторного действия на сперме псовых.

Сохранение генофонда млекопитающих методом криоконсервации позволяет получать новые высокопродуктивные селекционные формы сельскохозяйственных животных путем отдаленной гибридизации. По данным Насибова с соавторами [13], размороженная сперма снежного барана *Ovis nivicola* отличается высокой биологической полноценностью. Подвижность спермиев после криоконсервации в первой и второй фракциях составляла 45% и 38% соответственно. Сохранность акросом в обеих фракциях размороженной спермы находилась на одном уровне — 68-69%. И после внутритрубного осеменения трех овец дефростированной спермой одной из них было рождено двое ягнят.

Криоконсервация ооцитов также является важным объектом для сохранения генофонда животных. Результатом исследования жизнеспособности деконсервированных свежевыделенных ооцит-кумулюсных комплексов коров с использованием этиленгликоля в качестве криопротектора явились 100%-ная жизнеспособность клеток и получение 9,7% эмбрионов на начальных стадиях дробления [6].

Криоконсервация зародышевой и личиночной стадий развития разных таксонов

Эмбрионы, в отличие от половых клеток, содержат генетическую информацию обоих родителей, поэтому они являются привлекательным объектом для формирования генетических криобанков; при этом криоконсервация зародышей представляет значительные трудности [16].

Исследования в области криоконсервации эмбрионов таких классов позвоночных, как земноводные, рептилии, птицы и, особенно, рыбы, менее продвинуты. В сравнении с млекопитающими эмбрионы всех этих классов, как правило, по размерам значительно больше, что приводит к уменьшению отношения площади поверхности к объему, и вследствие этого движение воды и криопротекторов через клеточные мембраны в процессе охлаждения, замораживания и оттаивания становится более затруднительным [37]. Еще одной особенностью этих зародышей является наибольшее количество желтка, особенно у рыб, и, как отмечалось ранее, повышенная чувствительность к охлаждению [36].

Цай и Лин [39] считают, что криоконсервация целых эмбрионов рыб нецелесообразна, главным образом по причине тех же ограничений, что и ооцитов рыб, т. е. их высокой чувствительности к охлаждению и низкой проницаемости мембран. Однако криоконсервация изолированных эмбриональных клеток является вариантом сохранения как материнского, так и родительского генома. Отметим, что на более поздних стадиях эмбриогенеза рыб их проницаемость к водным и криопротекторным растворам возрастает, что делает процесс криоконсервации на этих стадиях успешнее. Так, китайскими учеными Чена и Тиан [26] удалось успешно криоконсервировать способом витрификации зародышей морской камбалы на стадии хвостовой почки; в результате эксперимента жизнеспособными оказались 20 эмбрионов. Исследователями было показано, что зародыши на поздних стадиях эмбрионального развития более устойчивы к воздействию пониженных температур.

В работах с зародышами данио-рерио на последующих стадиях отмечено проникновение криопротекторов в эмбрионы, а после их оттаивания удавалось возвращать зародыши к дальнейшему развитию [2]. В результате таких экспериментов с использованием режимов сверхбыстрого замораживания были получены 63 жизнеспособные предличинки (около 0,003%).

Наибольшее число признанных успешными работ по криоконсервировании эмбрионов диких животных было выполнено с применением ДМСО. Так, преимущество данного криопротектора установлено для зародышей орикса *Oryx gazella*, а также игрунки *Cebuella sp.*, у самок-реципиентов которых отмечалась беременность только после криоконсервации зародышей с ДМСО [16]. Также наиболее эффективное действие ДМСО, по сравнению с глицерином, наблюдали на замороженных эмбрионах хорька *Mustela eversmanni* [8].

Кривохарченко с соавторами [11] была показана эффективность применения сверхбыстрого замораживания зародышей мышей инбредных линий C57B1 и DBA, а также аутбредной линии NMRI с использованием смеси криопротекто-

ров, состоящей из глицерина (30%) и 1 М раствора сахарозы (70%). Снижения жизнеспособности после криоконсервации по данной технологии практически не наблюдалось.

Также с использованием глицерина и сахарозы для криоконсервации 2- и 4-клеточных эмбрионов коров в первом случае дробление продолжалось у 9,5% зародышей, во втором — у 8,3%. Применяя в качестве криопротектора 1,5 М этиленгликоль, сохранность бластоцист на поздних стадиях составила 50% после оттаивания и 25% после их культивирования [6].

Прикладные аспекты криообновления (рыбы)

Применение криобиотехнологий с целью длительного сохранения репродуктивного материала обеспечило возможность проводить скрещивание производителей географически удаленных друг от друга стад и рыб с разными сроками нереста и добиваться высоких репродуктивных и соматических показателей у потомства, полученного данным способом [10]. Так, в эксперименте по осеменению яйцеклеток криоконсервированной спермой показана возможность воспроизведения пород карпа с высокими продуктивными качествами, жизнеспособностью, устойчивостью к неблагоприятным условиям выращивания [23].

В исследованиях Шишановой с соавторами [24] выявлена селективная выживаемость криоконсервированных сперматозоидов и потомства от оплодотворенных размороженной спермой яйцеклеток. При этом у данных эмбрионов наблюдалось генетическое изменение в виде возросшей доли гетерозигот как более криорезистентных; показано, что для гетерозиготных особей характерны мелкие размеры, низкая плодовитость, более короткий жизненный цикл. Подобная селективность более свойственна рыбоводному процессу, т. к. в естественных условиях приведет к нарушению структуры популяции, снижению численности.

По данным Богатыревой с соавторами [4], оплодотворение яйцеклеток криоконсервированными сперматозоидами севрюги в среднем составило 75%, при этом в норме при заводском разведении — 79%. Это свидетельствует о том, что замороженная сперма по своим рыбоводным показателям почти не отличается от нативной и потому может быть использована рыбоводными предприятиями для искусственного воспроизводства.

В опытах Пономаревой с соавторами [14] при оплодотворении криоконсервированной икры осетровых рыб с использованием криопротектора «обволакивающего» действия было получено жизнеспособное потомство, которое по реактивности ЦНС почти не отличалось от нативного материала. Полученные результаты позволяют применять данную технологию на осетровых рыбозаводах для сохранения генетического разнообразия ценных видов рыб.

Экономический эффект применения хранящегося при низких температурах генетического материала осетровых рыб, в сравнении с содержанием в условиях рыбоводных хозяйств особей мужского пола, достаточно отчетливо выражен в различных рыбоводных хозяйствах [9].

Таким образом, использование криотехнологий в аквакультуре и в рыбном хозяйстве способствует сохранению генетического разнообразия разводимых рыб, повышению жизнестойкости, стабилизации численности и росту их воспроизводства.

Заключение

Резюмируя вышеизложенное, отметим успешное развитие методов криоконсервации спермы у ряда наиболее востребованных позвоночных животных — рыб, птиц и млекопитающих. Тогда как замораживание ооцитов, эмбрионов и личинок (рыбы, амфибии) имеет ряд трудностей, обусловленных их структурными и возрастными особенностями. Тем не менее криоконсервация генофонда позвоночных является одним из эффективных способов сохранения ценных, редких и исчезающих видов животных, который позволяет сохранять не только половые клетки, но и генетический материал обоих родителей в случае замораживания эмбрионов.

Продолжение разработок в области криосохранения генофондов ценных и редких видов животных позволит дополнить, углубить и успешно реализовать «Стратегию сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных …», принятую в РФ 17 февраля 2014 г. N 212-р [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимочкина Т. И. Цитологические особенности спермиев ценных видов рыб Волго-Каспийского бассейна и их изменение в зависимости от условий криоконсервации: автореф. дис. канд. биол. наук / Т. И. Акимочкина. Астрахань, 2010. 26 с.
2. Ананьев В. И. Состояние разработок криотехнологий для яйцеклеток, эмбрионов и предличинок рыб / В. И. Ананьев, М. С. Манохина // Аквакультура сегодня. Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства Россельхозакадемии. 2015. С. 19-41.
3. Бех В. В. Криоконсервация спермы карпов украинских пород / В. В. Бех // Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 2004. Том 46. № 9. С. 770.
4. Богатырева М. М. Результаты хранения образцов спермы севрюги / М. М. Богатырева, Н. В. Болонина, Е. Н. Пономарева, А. М. Тихомиров // Вестник АГТУ. 2008. № 3. С. 22-25.
5. Брусенцев Е. Ю. Основные подходы к созданию криобанка эмбрионов и гамет хомячков рода Phodopus (P. sungorus и P. campbelli) и воздействие факторов роста в их преимплантационном развитии: дис. канд. биол. наук / Е. Ю. Брусенцев. Новосибирск, 2016. 111 с.
6. Ганджа А. И. Сохранность и метаболизм деконсервированных ооцитов и ранних зародышей коров / А. И. Ганджа, Л. Л. Леткевич, В. П. Симоненко, Е. С. Лобанок, В. П. Никольская // Зоотехническая наука Беларуси. 2010. Том 45. № 1. С. 28-35.

7. Земков Г. В. Цитоморфологические и функциональные изменения спермиев русского осетра Acipenser guldenshtadti после криоконсервации / Г. В. Земков, Т. И. Акимочкина // Цитология. 2009. Том 51. № 11. С. 945-951.
8. Кизилова Е. А. Влияние криоконсервации на морфологию бластоцист светлого хорька Mustela eversmanni / Е. А. Кизилова, С. И. Байбородин, Л. Ф. Максимовский, Ю. Г. Терновская, С. Я. Амстиславский // Онтогенез. 1998. Том 29. № 6. С. 429-436.
9. Красильникова А. А. Объем замораживаемого образца как один из факторов выживаемости сперматозоидов осетровых видов рыб при криоконсервации / А. А. Красильникова, А. М. Тихомиров // Естественные науки. 2014. № 2. С. 62-69.
10. Красильникова А. А. Совершенствование процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб: дис. канд. биол. наук / А. А. Красильникова. Астрахань, 2015. 149 с.
11. Кривохарченко А. С. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов мышей аутбредных и инбредных линий / А. С. Кривохарченко, Г. А. Серобян, А. К. Шахбазян, В. Б. Садовников // Онтогенез. 1996. Том 27. № 4. С. 300-304.
12. Линник Т. П. Влияние длительного низкотемпературного хранения спермы петухов на ее оплодотворяющую способность / Т. П. Линник, В. И. Грищенко // Проблемы криобиологии. 2000. С. 64-71.
13. Насибов Ш. Н. Сохранение и рациональное использование генофонда снежного барана / Ш. Н. Насибов, В. А. Багиров, П. М. Кленовицкий, Б. С. Иолчиев, Н. А. Зиновьева, В. А. Воеводин // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 12. С. 63-64.
14. Пономарева Е. Н. Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток осетровых видов рыб / Е. Н. Пономарева, А. А. Красильникова, А. М. Тихомиров, А. В. Фирсова // Юг России: экология, развитие. 2016. Том 11. № 1. С. 59-68.
15. Прытков Ю. А. Биологические проблемы криоконсервации семени птицы / Ю. А. Прытков, О. В. Костюнина, Н. А. Волкова, Н. А. Зиновьева // Материалы 11-й всероссийской конференции-школы молодых ученых с международным участием «Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных БиоТехЖ — 2016». 2016. С. 182-190.
16. Ротт Н. Н. Создание генетических криобанков и использование методов биологии развития как способ сохранения редких видов животных. II. Получение и криоконсервация зародышей диких млекопитающих / Н. Н. Ротт // Онтогенез. 1996. Том 27. № 4. С. 245-255.
17. Савушкина С. И. Совершенствование методов глубокого замораживания половых продуктов рыб / С. И. Савушкина, А. С. Ерохин, Л. М. Малиновский // Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 2004. Том 46. № 9. С. 850-851.
18. Сипко Т. П. Сохранение генетических ресурсов оленьих (Cervidae) путем криоконсервации их половых клеток / Т. П. Сипко, Н. Н. Ротт, А. И. Абилов, В. Е. Присяжнюк, Н. В. Шишова, Н. А. Комбарова // Известия АН. Серия биологическая. 1997. № 5. С. 546-555.
19. Стратегия сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов в Российской Федерации на период до 2030 г. URL: http://base.garant.ru/70596992/#friends

20. 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. N 25. 4 с.
21. Утешев В. К. Сравнительная характеристика уринальной спермы трех видов палеарктических бурых лягушек / В. К. Утешев, А. А. Кидов, С. А. Каурова, Н. В. Шишова, А. В. Ковалев // Вестник Тамбовского университета. Естественные и технические науки. 2013. Том 18. № 6. С. 3087-3090.
22. Фирсова А. В. Действие обволакивающих криопротекторов и их плотности на икру рыб при ее криоконсервации / А. В. Фирсова // Естественные науки. 2015. № 4 (53). С. 116-119.
23. Черепнин В. А. Оценка выживаемости личинок карпа, полученных от спермы, криоконсервированной в присутствии криопротекторов разного происхождения / Черепнин В. А. // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького. 2015. Том 17. № 1-3 (61). С. 255-258.
24. Шишанова Е. И. Влияние криоконсервации спермы на выживаемость и генетический полиморфизм личинок русского осетра / Е. И. Шишанова, И. В. Тренклер, А. С. Мамонова // Вестник АГТУ. Серия «Рыбное хозяйство». 012. № 2. С. 105-111.
25. Browne R. K. Reptile and Amphibian Conservation through Gene Banking and Other Reproduction Technologies / R. K. Browne, H. Li, H. Robertson, V. K. Uteshev, N. R. Shishova, D. McGinnity, S. Nofs, C. R. Figiel, N. Mansour, R. E. Lloyd, D. Agnew, C. L. Carleton, M. Wu, E. N. Gakhova // Russian Journal of Herpetology. 2011. Vol. 18. No 3. Pp. 165-174.
26. Chena S. L. Cryopreservation of Flounder (Paralichthys olivaceus) Embryos by Vitrification / S. L. Chena, Y. S. Tian // Theriogenology. 2005. No 63. Pp. 1207-1219. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.06.007
27. Ciereszko A. Cryopreservation of Rainbow Trout Semen Using a Glucose-Methanol Extender / A. Ciereszko, G. J. Dietrich, J. Nynca, S. Dobosz, T. Zalewski // Aquaculture. 2014. Vol. 420-421. Pp. 275-281. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.11.014
28. Fabbrocini A. Sperm Motility Evaluation Following Long-Term Storage (5 Years) of Cryopreserved Sea Bream (Sparus aurata L., 1758) Semen / A. Fabbrocini, R. D'Adamo, S. Pelosi, L. F. J. Oliveira, F. Del Prete, F. Silvestri, V. Vitiello, G. Sansone // Journal of Applied Ichthyology. 2015. Vol. 31. Pp. 104-107. DOI: 10.1111/jai.12726
29. Fahrig B. M. Characterization and Cooled Storage of Semen from Corn Snakes (Elaphe guttata) / B. M. Fahrig, M. A. Mitchell, B. E. Eilts, D. L. Paccamonti // Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2007. Vol. 38. No 1. Pp. 7-12. DOI: 10.1638/05-098.1
30. Figueroa E. Spermatozoa Vitrification of Sex-Reversed Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss): Effect of Seminal Plasma on Physiological Parameters / E. Figueroa, J. Risopatrón, R. Sánchez, E. Isachenko, O. Merino, V. Isachenko, I. Valdebenito // Aquaculture. 2013. Vol. 372-375. Pp. 119-126. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.10.019
31. García V. J. A. Insemination of Bocachico Fish (Prochilodus magdalenae) with Fresh or Cryopreserved Semen: Effect of Spermatozoa/Oocyte Ratio / V. J. A. García, J. A Espinosa, J. G Martínez, S. C. P. Carrasco // Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2015. Vol. 28. No 4. Pp. 347-355.

32. Larsen R. E. Semen Extenders for Artificial Insemination in the American Alligator / R. E. Larsen, P. T. Cardeilhac, T. Lane // Aquaculture. 1984. Vol. 42. No 2. Pp. 141-149. DOI: 10.1016/0044-8486(84)90361-2
33. Liu Q. H. Summer Flounder (Paralichthys dentatus) Sperm Cryopreservation and Application in Interspecific Hybridization with Olive Flounder (P. olivaceus) / Q. H. Liu, D. Y. Ma, S. H. Xu, Z. Z. Xiao, Y. S. Xiao, Z. C. Song, J. Li // Theriogenology. 2015. Vol. 83. Pp. 703-710. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.004
34. Mattson K. J. Successful Artificial Insemination in the Corn Snake, Elaphe gutatta, Using Fresh and Cooled Semen / K. J. Mattson, A. De Vries, S. M. McGuire, J. Krebs, E. E. Louis, N. M. Loskutoff // Zoo Biology. 2007. Vol. 26. No 5. Pp. 363-369. DOI: 10.1002/zoo.20144
35. Neves M. M. Cryoprotection Effectiveness of Low Concentrations of Natural and Lyophilized LDL (Low Density Lipoproteins) on Canine Spermatozoa / M. M. Neves, L. G. D. Heneine, M. Henry // Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2014. Vol. 66. Pp. 769-777. DOI: 10.1590/1678-41626184
36. Robles V. Germplasm Cryobanking in Zebrafish and Other Aquarium Model Species / V. Robles, E. Cabrita, M. P. Herraez // Zebrafish. 2009. Vol. 6. Pp. 281-293. DOI: 10.1089/zeb.2009.0592
37. Saragusty J. Current Progress in Oocyte and Embryo Cryopreservation by Slow Freezing and Vitrification / J. Saragusty, A. Arav // Reproduction. 2011. Vol. 141. No 1. Pp. 1-19. DOI: 10.1530/REP-10-0236
38. Shishova N. R. Cryopreservation of Hormonally Induced Sperm for the Conservation of Threatened Amphibians with Rana temporaria as a Model Research Species / N. R. Shishova, V. K. Uteshev, S. A. Kaurova, R. K. Browne, E. N. Gakhova // Theriogenology. 2010. Vol. 75. No 2. Pp. 220-232. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.08.008
39. Tsai S. Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science / S. Tsai, C. Lin // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2012. Vol. 55. Pp. 425-434. DOI: 10.1590/S1516-89132012000300014
40. Uteshev V. K. Collection and Cryopreservation of Hormonally Induced Sperm of Pool Frog (Pelophylax lessonae) / V. K. Uteshev, N. Shishova, S. Kaurova, A. Manokhin, E. Gakhova // Russian Journal of Herpetology. 2013. Vol. 2. No 20. Pp. 105-109.

Mariya V. KIBALOVA[1]
Svetlana A. SELYUKOVA[2]
Alexander G. SELYUKOV[3]

PRESERVATION OF VALUABLE, RARE AND ENDANGERED SPECIES OF ANIMALS. 2. CRYOCONSERVATION OF THE VERTEBRATES

[1] Master Student, Department of Zoology and Evolutionary Ecology of Animals, University of Tyumen
makib-ichty@mail.ru

[2] Senior Lecturer, Department of Mathematics and Computer Science, State Agrarian University of Northern Transural (Tyumen)
lucretias@yandex.ru

[3] Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Zoology and Evolutionary Ecology of Animals, University of Tyumen
ags-bios@yandex.ru

Annotation

This article presents methods used by Russian and foreign researchers in cryopreservation of individual vertebrate taxa; the authors describe in detail the means of cryopreservation of reproductive cells and embryos of fish, which they believe to be the most available, convenient for research and usage in economically significant objects. The composition, the timing of exposure of cryoprotectants and cryosomes to preserve the fertility of sperm of sturgeon, salmon, whitefish, carp and percid fishes in the process of cryopreservation, storage and defrostation are described. On the other hand, cryopreservation of fish eggs, as well as vertebrates of other taxa, is difficult due to low permeability of membranes for cryoprotectors, large water content, fatty inclusions and yolk. For successful cryopreserva-

Citation: Kibalova M. V., Selyukova S. A., Selyukov A. G. 2017. "Preservation of Valuable, Rare and Endangered Species of Animals. 2. Cryoconservation of the Vertebrates". Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 3, no 3, pp. 141-157.
DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-3-141-157

© University of Tyumen

tion of sperm of tailless amphibians, penetrating (dimethyl sulfoxide) and non-penetrating (sucrose) cryoprotectants are used.

Unlike fish and amphibians, the methods of cryopreservation of gamete reptiles, among which there are many Red Data Book species, are poorly developed. Reproductive cells of males of birds of different species, mostly Galliformes, after cryopreservation for many years kept high fertility. Methods for cryopreserving sperm, ova and early embryos of mammals are well developed. In comparison with the other classes of vertebrates, in mammals the survival of embryos after defrostation is much higher.

Keywords

Cryopreservation, vertebrate animals, germ cells, embryos.

DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-3-141-157

REFERENCES

1. Akimochkina T. I. 2010. “Tsitologicheskie osobennosti spermiev tsennykh vidov ryb Volgo-Kaspiyskogo basseyna i ikh izmenenie v zavisimosti ot usloviy kriokonservatsii” [Cytological features of spermatozoa of valuable fish species in the Volga-Caspian basin and their changes depending on the conditions of cryopreservation]. Cand. Sci. (Biol.) diss. abstract. Astrakhan.
2. Ananyev V. I., Manokhina M. S. 2015. “Sostoyanie razrabotok kriotekhnologiy dlya yaytsekletok, embrionov i predlichinok ryb” [The Development of Cryotechnologies for Eggs, Embryos and Prenticing Fish]. In: Akvakul’tura segodnya. Vserossiyskiy nauchno-issledovatel’skiy institut irrigatsionnogo rybovodstva Rossel’khozakademii, pp. 19-41.
3. Bekh V. V. 2004. “Kriokonservatsiya spermy karpov ukrainskikh porod” [Cryopreservation of Sperm of the Ukrainian Carp Breeds]. Proceedings of the International Conference “Sokhranenie geneticheskikh resursov” [Preservation of Genetic Resources]. Tsitologiya, vol. 46, no 9, pp. 770.
4. Bogatyreva M. M., Bolonina N. V., Ponomareva E. N., Tikhomirov A. M. 2008. Rezul’taty khraneniya obraztsov spermy sevryugi [The Results of Storing the Stellate Sturgeon’s Semen Samples of]. Vestnik AGTU, no 3, pp. 22-25.
5. Brusentsev E. Yu. 2016. “Osnovnye podkhody k sozdaniyu kriobanka embrionov i gamet khomyachkov roda *Phodopus* (*P. sungorus* i *P. campbelli*) i vozdeystvie faktorov rosta v ikh preimplantatsionnom razvitii” [Main Approaches to the Creation of the Cryobank Embryo and Gamete Hamsters of the Genus *Phodopus* (*P. sungorus and P. campbelli*) and the Impact of Growth Factors in Their Preimplantation Development]. Cand. Sci. (Biol.) diss. Novosibirsk.
6. Gandzha A. I., Letkevich L. L., Simonenko V. P., Lobanok E. S., Nikol’skaya V. P. 2010. “Sokhrannost’ i metabolizm dekonservirovannykh ootsitov i rannikh zarodyshey korov” [Safety and Metabolism Deconservation of Oocytes and Early Embryos of Cows]. Zootekhnicheskaya nauka Belarusi, vol. 45, no 1, pp. 28-35.
7. Zemkov G. V., Akimochkina T. I. 2009. “Tsitomorfologicheskie i funktsional’nye izmeneniya spermiev russkogo osetra Acipenser guldenshtadti posle kriokonservatsii”

[Cytomorphological and Functional Changes in the Sperm of Russian Sturgeon Acipenser guldenshtadti after Cryoconservation]. Tsitologiya, vol. 51, no 11, pp. 945-951.

8. Kizilova E. A., Bayborodin S. I., Maksimovskiy L. F., Ternovskaya Yu. G., Amstislavskiy S. Ya. 1998. "Vliyanie kriokonservatsii na morfologiyu blastotsist svetlogo khor'ka *Mustela eversmanni*" [Influence of Cryopreservation on the Morphology of the Blastocyst Bright Ferret *Mustela eversmanni*]. Ontogenez, vol. 29, no 6, pp. 429-436.
9. Krasilnikova A. A., Tikhomirov A. M. 2014. "Ob»em zamorazhivaemogo obraztsa kak odin iz faktorov vyzhivaemosti spermatozoidov osetrovykh vidov ryb pri kriokonservatsii" [The Volume of the Frozen Sample as One of the Factors of Survival of Spermatozoa of Sturgeon Fish Species in the Cryopreservation]. Estestvennye nauki, no 2, pp. 62-69.
10. Krasilnikova A. A. 2015. "Sovershenstvovanie protsessa kriokonservatsii reproduktivnykh kletok samtsov ryb" [Improving the Process of Cryopreservation of the Reproductive Cells of Male Fish]. Cand. Sci. (Biol.) diss. Astrakhan.
11. Krivokharchenko A. S., Serobyan G. A., Shakhbazyan A. K., Sadovnikov V. B. 1996. "Sverkhbystroe zamorazhivanie embrionov myshey autbrednykh i inbrednykh liniy" [Ultra-Rapid Freezing of Mouse Embryos and an Outbred Inbred Lines]. Ontogenez, vol. 27, no 4, pp. 300-304.
12. Linnik T. P., Grishchenko V. I. 2000. "Vliyanie dlitel'nogo nizkotemperaturnogo khraneniya spermy petukhov na ee oplodotvoryayushchuyu sposobnost'" [Influence of Long-Term Cryogenic Storage of Peacocks' Semen on Their Fertilizing Capacity]. Problemy kriobiologii, pp. 64-71.
13. Nasibov Sh. N., Bagirov V. A., Klenovitskiy P. M., Iolchiev B. S., Zinovyeva N. A., Voevodin V. A. 2010. "Sokhranenie i ratsional'noe ispol'zovanie genofonda snezhnogo barana" [The Conservation and Sustainable Use of Gene Pool of Bighorn Sheep]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK, no 12, pp. 63-64.
14. Ponomareva E. N., Krasilnikova A. A., Tikhomirov A. M., Firsova A. V. 2016. "Novye biotekhnologicheskie metody kriokonservatsii reproduktivnykh kletok osetrovykh vidov ryb" [New Biotechnological Methods of Cryopreservation of Reproductive Cells Sturgeon]/ Yug Rossii: ekologiya, razvitie, vol. 11, no 1, pp. 59-68.
15. Prytkov Yu. A., Kostyunina O. V., Volkova N. A., Zinovyeva N. A. 2016. "Biologicheskie problemy kriokonservatsii semeni ptitsy" [Biological Problems of Cryopreservation of Birds' Semen]. Proceedings of the 11th All-Russian School-Conference of Young Researchers withn International Participants "Sovremennye dostizheniya i problemy biotekhnologii sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh BioTekhZh — 2016" [Contemporary Achievements and Challenges of Agricultural Animal Biotechnology BioTech — 2016], pp. 182-190.
16. Rott N. N. 1996. "Sozdanie geneticheskikh kriobankov i ispol'zovanie metodov biologii razvitiya kak sposob sokhraneniya redkikh vidov zhivotnykh. II. Poluchenie i kriokonservatsiya zarodyshey dikikh mlekopitayushchikh" [The Creation of Genetic Cryobanks and the Use of Techniques of Developmental Biology as a Way of Preserving Rare Species of Animals. II. Obtaining and Cryopreservation of Embryos of Wild Mammals]. Ontogenez, vol. 27, no 4, pp. 245-255.
17. Savushkina S. I., Erokhin A. S., Malinovskiy L. M. 2004. "Sovershenstvovanie metodov glubokogo zamorazhivaniya polovykh produktov ryb" [Improvement

of Methods for the Deep Freezing of Fish's Reproductive Products]. Proceedings of the International Conference "Sokhranenie geneticheskikh resursov" [Preservation of Genetic Resources]. Tsitologiya, vol. 46, no 9, pp. 850-851.

18. Sipko T. P., Rott N. N., Abilov A. I., Prisyazhnyuk V. E., Shishova N. V., Kombarova N. A. 1997. "Sokhranenie geneticheskikh resursov olen'ikh (Cervidae) putem kriokonservatsii ikh polovykh kletok" [Conservation of Genetic Resources of Reindeer (Cervidae) by Cryopreservation of Their Gametes]. Izvestiya AN. Seriya biologicheskaya, no 5, pp. 546-555.
19. Strategiya sokhraneniya redkikh i nakhodyashchikhsya pod ugrozoy ischeznoveniya vidov zhivotnykh, rasteniy i gribov v Rossiyskoy Federatsii na period do 2030 g [Strategy of conserving Rare and Endangered Species of Animals, Plants and Fungi in the Russian Federation for the Period up to 2030]. http://base.garant.ru/70596992/#friends
20. Tikhomirov A. M. 2012. "Sposob kriokonservatsii yaytsekletok osetrovykh ryb" [Method of Cryoconservation of Sturgeon Oocytes]. RF Patent 2460284, no 2010142589/13, filed 18 October 2010; issued 10 September 2012, bulletin no 25.
21. Uteshev V. K., Kidov A. A., Kaurova S. A., Shishova N. V., Kovalev A. V. 2013. "Sravnitel'naya kharakteristika urinal'noy spermy trekh vidov palearkticheskikh burykh lyagushek" [Comparative Characteristics Urinal Sperm of Three Species of Palearctic Brown Frogs]. Vestnik Tambovskogo universiteta. Estestvennye i tekhnicheskie nauki, vol. 18, no 6, pp. 3087-3090.
22. Firsova A. V. 2015. "Deystvie obvolakivayushchikh krioprotektorov i ikh plotnosti na ikru ryb pri ee kriokonservatsii" [Enveloping Effect of Cryoprotectants and Their Density on Caviar While Its Cryopreservation]. Estestvennye nauki, no 4 (53), pp. 116-119.
23. Tcherepnin V. A. 2015. "Otsenka vyzhivaemosti lichinok karpa, poluchennykh ot spermy, kriokonservirovannoy v prisutstvii krioprotektorov raznogo proiskhozhdeniya" [Evaluation of the Survival Rate of Carp 's Larvae, Obtained from the Sperm Cryopreserved with Cryoprotectants of Different Origin]. Naukoviy visnik L'vivs'kogo natsional'nogo universitetu veterinarnoï meditsini ta biotekhnologiy imeni. S. Z. Ґzhits'kogo, vol. 17, no 1-3 (61), pp. 255-258.
24. Shishanova E. I., Trenkler I. V., Mamonova A. S. 2012. "Vliyanie kriokonservatsii spermy na vyzhivaemost' i geneticheskiy polimorfizm lichinok russkogo osetra" [The Influence of Semen Cryopreservation on the Survival and Genetic Polymorphism in Larvae of the Russian Sturgeon]. Vestnik AGTU. Ser. Rybnoe khozyaystvo, no 2, pp. 105-111.
25. Browne R. K., Li H., Robertson H., Uteshev V. K., Shishova N. R., McGinnity D., Nofs S., Figiel C. R., Mansour N., Lloyd R. E., Agnew D., Carleton C. L., Wu M., Gakhova E. N. 2011. "Reptile and Amphibian Conservation through Gene Banking and Other Reproduction Technologies". Russian Journal of Herpetology, vol. 18, no 3, pp. 165-174.
26. Chena S. L., Tian Y. S. 2005. "Cryopreservation of Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Embryos by Vitrification". Theriogenology, no 63, pp. 1207-1219. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.06.007
27. Ciereszko A., Dietrich G. J., Nynca J., Dobosz S., Zalewski T. 2014. "Cryopreservation of Rainbow Trout Semen Using a Glucose-Methanol Extender". Aquaculture, vol. 420-421, pp. 275-281. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.11.014

28. Fabbrocini A., D'Adamo R., Pelosi S., Oliveira L. F. J., Prete F. Del, Silvestri F., Vitiello V., Sansone G. 2015. "Sperm Motility Evaluation Following Long-Term Storage (5 Years) of Cryopreserved Sea Bream (*Sparus aurata* L., 1758) Semen". Journal of Applied Ichthyology, vol. 31, pp. 104-107. DOI: 10.1111/jai.12726
29. Fahrig B. M., Mitchell M. A., Eilts B. E., Paccamonti D. L. 2007. "Characterization and Cooled Storage of Semen from Corn Snakes (*Elaphe guttata*)". Journal of Zoo and Wildlife Medicine, vol. 38, no 1, pp. 7-12. DOI: 10.1638/05-098.1
30. Figueroa E., Risopatrón J., Sánchez R., Isachenko E., Merino O., Isachenko V., Valdebenito I. 2013. "Spermatozoa Vitrification of Sex-Reversed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of Seminal Plasma on Physiological Parameters". Aquaculture, vol. 372-375, pp. 119-126. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.10.019
31. García V. J. A., Espinosa J. A, Martínez J. G, Carrasco S. C. P. 2015. "Insemination of Bocachico Fish (*Prochilodus magdalenae*) with Fresh or Cryopreserved Semen: Effect of Spermatozoa/Oocyte Ratio". Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, vol. 28, no 4, pp. 347-355.
32. Larsen R. E., Cardeilhac P. T., Lane T. 1984. "Semen Extenders for Artificial Insemination in the American Alligator". Aquaculture, vol. 42, no 2, pp. 141-149. DOI: 10.1016/0044-8486(84)90361-2
33. Liu Q. H., Ma D. Y., Xu S. H., Xiao Z. Z., Xiao Y. S., Song Z. C., Li J. 2015. "Summer Flounder (*Paralichthys dentatus*) Sperm Cryopreservation and Application in Interspecific Hybridization with Olive Flounder (*P. olivaceus*)". Theriogenology, vol. 83, pp. 703-710. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.004
34. Mattson K. J., Vries A. De, McGuire S. M., Krebs J., Louis E. E., Loskutoff N. M. 2007. "Successful Artificial Insemination in the Corn Snake, *Elaphe gutatta*, Using Fresh and Cooled Semen". Zoo Biology, vol. 26, no 5, pp. 363-369. DOI: 10.1002/zoo.20144
35. Neves M. M., Heneine L. G. D., Henry M. 2014. "Cryoprotection Effectiveness of Low Concentrations of Natural and Lyophilized LDL (Low Density Lipoproteins) on Canine Spermatozoa". Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, vol. 66, pp. 769-777. DOI: 10.1590/1678-41626184
36. Robles V., Cabrita E., Herraez M. P. 2009. "Germplasm Cryobanking in Zebrafish and Other Aquarium Model Species". Zebrafish, vol. 6, pp. 281-293. DOI: 10.1089/zeb.2009.0592
37. Saragusty J., Arav A. 2011. "Current Progress in Oocyte and Embryo Cryopreservation by Slow Freezing and Vitrification". Reproduction, vol. 141, no 1, pp. 1-19. DOI: 10.1530/REP-10-0236
38. Shishova N. R., Uteshev V. K., Kaurova S. A., Browne R. K., Gakhova E. N. 2010. "Cryopreservation of Hormonally Induced Sperm for the Conservation of Threatened Amphibians with *Rana temporaria* as a Model Research Species". Theriogenology, vol. 75, no 2, pp. 220-232. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.08.008
39. Tsai S., Lin C. 2012. "Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science". Brazilian Archives of Biology and Technology, vol. 55, pp. 425-434. DOI: 10.1590/S1516-89132012000300014
40. Uteshev V. K., Shishova N., Kaurova S., Manokhin A., Gakhova E. 2013. "Collection and Cryopreservation of Hormonally Induced Sperm of Pool Frog (*Pelophylax lessonae*)". Russian Journal of Herpetology, vol. 2, no 20, pp. 105-109.