ОГЛАВЛЕНИЕ

[ВВЕДЕНИЕ 3](#_Toc165979537)

[1. Обзор литературы 5](#_Toc165979538)

[1.1. Общее положение с животным и растительным миром Земли 5](#_Toc165979539)

[1.2. Способы сохранения генофонда диких и домашних животных. 15](#_Toc165979540)

[1.3. Консервация геномов 18](#_Toc165979541)

[1.4. Способы консервации генома 20](#_Toc165979542)

[1.4.1. Физиологическая консервация 20](#_Toc165979543)

[1.4.2. Глубокое замораживание биологических объектов 21](#_Toc165979544)

[1.4.3. Замораживание сперматозоидов 23](#_Toc165979545)

[1.4.4. Замораживание яйцеклеток 25](#_Toc165979546)

[1.4.5. Замораживание зародышей 25](#_Toc165979547)

[1.4.6. Замораживание соматических клеток 27](#_Toc165979548)

[1.4.7. Длительность хранения замороженных клеток 28](#_Toc165979549)

[1.4.8. Способы получения живых животных из замороженных спермиев 30](#_Toc165979550)

[2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА 33](#_Toc165979551)

[3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 37](#_Toc165979552)

[3.1. Оценка качества нативной спермы 37](#_Toc165979553)

[3.2. Подбор оптимальных концентраций составляющих протекторов 39](#_Toc165979554)

[Заключение 48](#_Toc165979555)

[Список использованной литературы 49](#_Toc165979556)

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время экологическая обстановка на планете Земля продолжает оставаться напряженной. Среди ряда предложенных способов повышения биоразнообразия генотипический подход является наиболее разработанным и сравнительно дешевым. Методика сохранения генофонда в условиях глубокой заморозки разработанная и предложенная Б.Н. Вепринцевым и Н.Н. Ротт в ряде стран нашла свое применение. Успешно реализуются исследования в данном направлении и в России. За последние годы организованы и функционируют 4 криобанка в Санкт-Петербурге, в Пущинона Оке при ИБК РАН, в Дмитрове при ВНИИПРХ, на Камчатке, где содержатся коллекции генофонда более чем 250 видов гидробионтов.

Одной из нерешенных задач криобиологии является подбор составов криопротекторов для спермы разных видов рыб. Установлено более тридцати веществ, относящихся к трем группам химических соединений, которые обладают протекторными свойствами, однако далеко не все они пригодны для половых клеток водных животных. Вместе с тем, до сих пор не установлен факт видоспецифичности отдельных компонентов криопротекторов, режимы замораживания-оттаивания биологического материала.

Целью данной работы являлось получить результаты криоконсервации спермы русского осетра и севрюги.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Оценить качество спермы от разных самцов русского осетра и севрюги. Для замораживания отобрать сперму только высокого качества, отвечающую рыбоводным показателям.
2. Установить адекватность принятых оценок – время жизни и процент подвижных спермиев в биологической пробе на разных этапах замораживания-оттаивания (нативная сперма, сперма после дефростации, сперма после оттаивания).
3. Оценить роль каждого вещества в составе многокомпонентного криопротектора.
4. Выявить оптимальные составы криопротекторов для спермы русского осетра и севрюги.

# 1. Обзор литературы

## Общее положение с животным и растительным миром Земли

Одна из наиболее угрожающих примет нашего времени – ускоряющееся оскудение природы. Процесс хозяйственного освоения охватывает все новые и новые территории, вытесняя с лица Земли дикие виды. Науке известно не менее 200 вымерших видов птиц и млекопитающих. Из них более 130 видов исчезли за последние 400 лет, около 100 - за последнее столетие. Ежегодно безвозвратно исчезает более З00 видов животных, из них 2-3 вида птиц и млекопитающих. (Витвицкая, Тихомиров, 1999).

В истории Земли известны две крупные экологические катастрофы - Пермская и Меловая, произошедшие, соответственно в Пермском и Меловом геохронологических периодах. Обе эти катастрофы происходили на фоне сильного снижения концентрации кислорода и повышения концентрации углекислого газа в атмосфере Земли и сопровождались вымиранием большого количества видов животных, доминировавших в биосфере предыдущих геохронологических периодов. Именно в конце Мелового периода на Земле вымерли динозавры. Причины этих экологических катастроф окончательно не установлены» но связывают их с действием на Землю внешних космических факторов (Карнаухов, 1994).

Поступающие за последние десятилетия сведения свидетельствуют о том, что скорость вымирания видов живых существ в настоящее время сравнима или превышает скорость вымирания видов во время Пермской и Меловой катастроф (Розанов, 1994). Это в свою очередь означает, что новая экологическая катастрофа, сравнимая по своим масштабам с Пермской и Меловой, уже началась. И если она уже началась, то должна иметь название «антропогенной катастрофы» не только потому, что она происходит в антропогенный геохронологический период, но и потому, что причинами ее может быть только дестабилизирующая деятельность человека. Никаких внешних крупных космических воздействий на Землю в XX веке не наблюдали. Последствиями этой катастрофы в лучшем случае может явиться устранение доминирующего сейчас биологического вида - человека, а в худшем - уничтожение вообще условий для существования любой жизни на Земле и установление климатических условий, близких таковым на Венере (Карнаухов, 1994).

 Причиной исчезновения видов является не только их активное истребление человеком, но и уничтожение природных комплексов – биоценозов, в которых они обитают. Каждый исчезнувший вид растений уносит с собой не менее 5 видов беспозвоночных животных, существование которых неразрывно связано с этим растением. Влажные тропические леса, в которых обитает половина всей флоры и фауны Земли уничтожены уже на 4О%, и их вырубка происходит со скоростью 20 га в минуту. При таких темпах истребления тропические леса полностью исчезнут к началу будущего века. Вместе с ними исчезнет от 500 тыс. до 1 млн. видов животных из их общего числа в 5 млн. живущих на Земле. Тропические леса - один из главных продуцентов кислорода в атмосфере Земли. Уже сейчас в ряде стран собственной зеленой растительности недостаточно, чтобы покрыть расходы кислорода. Так, в Швейцарии растения «производят» всего лишь 25% кислорода, потребляемого населением и промышленностью этой страны, в США - 60%; Московская область обеспечивает себя кислородом всего лишь на 40%. Уже из этих примеров видно, насколько взаимосвязаны процессы, происходящие на Земле. Только объединенные усилия всех стран и народов способны остановить все нарастающий процесс подрыва основ существования жизни на нашей планете, основу ее жизнеобеспечения (Вепринцев, Ротт, 1984).

Рыбы - наиболее крупная группа позвоночных животных. Она насчитывает свыше 20 тысяч видов, т.е. около половины всех известных позвоночных. Около 1% мировой фауны рыб включено в список видов, охраняемых Красной Книгой Международного Сообщества по Охране Природы (МСОП). В нашей стране число представителей пресноводной ихтиофауны, впервые включенных в 1984 году в Красную Книгу СССР, составило около 3%*,* а число нуждающихся в таком включении сегодня около 20%. Кпоследней группе следует отнести и осетровых рыб России,большая часть видов которых находятся либо на грани исчезновения, либо считаются вымершими видами (Павлов, 1993, Красная Книга РСФСР, 1983).

Антропогенное воздействие, в отличие от естественных эволюционных причин, резко ускорило темп преобразования фауны рыб, особенно на протяжении последнего столетия, и изменило его направленность. Кроме случаев, связанных с интродукцией, обычно происходит сокращение числа видов и упрощение структуры рыбного населения водоемов. Антропогенное воздействие становится все более многофакторным; возникает все большее Число синергических эффектов, которые еще слабо изучены (Павлов, 1993).

Условно антропогенные воздействия по направлению действия стрессоров разбивают на три группы: физические, химические и биологические (там же).

Физические формы воздействия связаны как с прямым уничтожением рыб и их местообитаний, так и скосвенным их угнетением. К ним относятся: зарегулирование стоков, водопотребление, турбины ГЭС, тепловое загрязнение, судоходство, добыча строительных материалов и полезных ископаемых, лесосплав, вырубка лесов по берегам рек, уничтожение., малых рек*,* сейсморазведка, электромагнитные поля, строительство мостов и плотин.

Химические формы воздействия разнообразны и очень опасны для всего живого. Они обладают токсичной, тератогенной, канцерогенной и мутагенной активностью. Главными группами воздействия являются: токсиканты, радио-нуклеотиды, биогенные элементы, кислотные дожди.

Биологическое воздействие связано со сбором в водоемы органических веществ способных к брожению, чрезмерной добычей, акклиматизацией, созданием условий для саморасселения, пастбищным рыбоводством и искусственным воспроизводством (Павлов, 1993).

Среди разнообразных факторов антропогенного воздействия на рыб по данным МСОП, первое место занимают по опасности разрушение мест обитания (68%) ивлияние вселенных видов (22%). Чрезмерная добыча составляла на начало 90-х годов прошлого столетия только 10% (Павлов, 1993), однако, в настоящее время перелов и браконьерство более чем в два раза превышают воспроизводительные возможности экосистем.

Самые различные формы негативного антропогенного влияния имеют часто одни и те же механизмы воздействия на рыб:

- нарушение миграционных и жизненных циклов;

- нарушение гаметогенеза, гибель икры и молоди рыб;

- гибель производителей;

- нарушение генофонда популяций и популяционной структуры;

- ухудшение кормовой базы;

- неблагоприятные изменения в составе рыбного населения - резкое сокращение доли ценных рыб, выпадение в речных экосистемах реофильных видов, увеличение численности малоценных и мелких тугорослых рыб, спонтанное расселение и натурализация нежелательных «сорных» видов.

Но каким бы ни были механизмы влияния факторов, их чрезмерное воздействие всегда ведет к одному, общему результату - нарушению самовос-производства, сокращению численности, исчезновению отдельных популяций и к исчезновению вида в целом (Мельников, Прямухина, 2000).

Передовые люди разных стран давно поняли опасность, угрожающую Земле. В 1948 г., когда мир еще не оправился от последствий самой разрушительной в истории войны, а первоочередной задачей было накормить и обеспечить жильем уцелевшее население, люди смогли заглянуть в не столь отдаленное будущее и понять, перед какой угрозой стоит человечество. В этом же 1948г. был создан Международный союз охраны природы, ныне объединяющий 450 государств, государственных и общественных организаций в 100 странах. Помимо других сторон своей многогранной деятельности, этот союз, начиная с 1966г. издает Красную книгу – перечень редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений и животных, В этом списке 768 видов и 371 подвид позвоночных, из них 227 видов и 93 подвида млекопитающих, 264 вида и 167 подвидов птиц, 250 видов растений из 25000 находящихся под угрозой исчезновения. (Вепринцев, Ротт, 1991).

Многие полагают, что сохранение девственной природы и существующего разнообразия животных и растений совсем не обязательно. Однако такой взгляд неправилен. Во-первых, человек - только часть биосферы Земли. Природа планеты, ее леса, степи, моря с обитающими в них живыми существами образуют гигантский суперорганизм, с которым человек неразрывно связан множеством нитей. Человек возник и существует как часть этого природного суперорганизма и делит Землю с другими формами жизни в сложном переплетении биологических циклов планеты, с физическими элементами земной и космической среды. Утрата или порча отдельных элементов биосферы может необратимо нарушить ее функционирование. Мы не знаем, до какой степени системы биоценозов и атмосферы Земли могут быть отклонены от состояния существующего равновесия, не теряя своей устойчивости и способности возвращаться в исходное состояние. Уменьшение разнообразия жизненных форм разлаживает систему, вызывает колебательные процессы. Велика вероятность, что с упрощением системы в какой-то момент времени может произойти необратимый выход биосферы из состояния сегодняшнего равновесия и переход ее на другой стабильный уровень, более примитивный, менее пригодный для жизни человека (Яблоков, Остроумов, 1983).

Для Северной Европы и многих индустриальных районов мира характерно зачисление почвы, выпадение кислых дождей. Соединяясь с влагой атмосферы, оксиды образуют кислоты. Ветры несут эту влагу, насыщенную кислотами, из промышленных районов Западной Европы на Скандинавию. В Норвегии за год выпадает с дождями и снегом до 800 тыс. тонн сернистого газа. В первую очередь страдают озера. Наиболее уязвимыми оказались лососевые рыбы. Из 150 обследованных в середине 70-х годов на юге Норвегии озер 148 оказались лишенными рыбы. Кислые дожди влекут за собой усыхание хвойных деревьев, закисление почвы, падение ее плодородия, обеднение животного и растительного мира. Воздействие современной цивилизации по биологические системы Земли носит масштабы, небывалые во всей истории планеты. Вместе с тем, с увеличением объема наших знаний о живой природе растет и список видов, оказывающихся полезными или необходимыми для человека. Совершенно очевидно, что человек не имеет морального права вытеснять животных и растения с лица Земли, прервать или изменить естественный ход их эволюции. Это также недопустимо, как геноцид. Животный и растительный мир Земли имеет такое же право на существование, как человек (Будыко, 1977).

Виды - продукт долгой, медленной эволюции. Многие виды существуют на Земле не один миллион лет. Они пережили многочисленные смены ландшафтов и климата и, тем не менее, дожили до нашего времени почти в неизменном виде. Так, постоянный спутник человека, рыжий таракан, дошел до нас из глубин триаса (Розанов, Каримов, 1990).

Процесс оскудения природы затронул и нашу страну. Под угрозой исчезновения находятся 92 вида и подвида млекопитающих, 80 птиц, 35 рептилий, 9 амфибий, 9 рыб, 209 насекомых, 2 ракообразных, 11 червей, 6O3 высших растения, 20 грибов, 29 лишайников, всего 1116 видов (Карнаухов, 2001).

Помимо исчезновения отдельных видов идет интенсивный процесс уменьшения абсолютной численности большинства видов животных и растений. Так, невероятно упала численность хищных птиц, уменьшились их ареалы. Нет больше на территории нашей страны красноногого ибиса, гепарда, истреблен туранский тигр. Исчезновение из лесных и степных сообществ хищных зверей и птиц влечет за собой изменение структуры биоценозов. Чрезвычайно возросла численность сорок и ворон. Одичавшие собаки во многих местах замещают волков и представляют большую опасность для людей, и домашнего скота, так как они меньше боятся человека. Подсчитано: чтобы обеспечить сохранность вида, его численность должна составлять не менее 500 особей для позвоночных и 50000 - для беспозвоночных. Когда популяция становится столь малочисленной, способность к размножению изменяется и может даже происходить гибель животных в результате стресса, вызванного отсутствием контакта с другими особями своего вида (Абдуллаев и др., 1990).

Уменьшение численности видов таит в себе и другие опасности. Прежде всего - это уменьшение генетического разнообразия. Каждый вид обладает уникальным набором генов - генофондом, который во всей полноте представлен лишь в некоторой совокупности особей. Так, сохранение 500 особей одного из видов позвоночных, хотя и достаточно для существования вида как такового, обеспечивает сохранение лишь половины объема генетической информации о данном виде. Поэтому один из пунктов «Всемирной стратегии, охраны природы», принятой на ХIV Генеральной Ассамблее МСОП в октябре 1978г. посвящен сохранению полного объема внутривидовой изменчивости каждого вида, что связано с сохранением достаточного числа жизнеспособных популяций (Андреев, Петропавлов,1994).

Сохранение полного набора генов данного вида - задача, имеющая практическое значение: успехи генной инженерии могут сделать необходимым любой из существующих в настоящее время генов, потеря же его невосполнима (Розанов,1994).

 Наконец, еще одна опасность, угрожающая жизни - потеря генетического стандарта, вызванная действием так называемого дрейфа генов. Дрейф генов - процесс внутреннего изменения в частотах генов, случайного, ненаправленного и происходящего в каждом поколении. Эти процессы идут тем быстрее, чем меньше численность популяции, что и наблюдается при общем уменьшении численности животных данного вида, при разведении животных в неволе, в антропогенных, то есть созданных человеком, биоценозах. Одним из факторов, усиливающих дрейф генов, является стресс, вызванный факторами цивилизации (Розанов, 1994).

Одновременно с непрерывным процессом создания новых пород животных и сортов растений ряд пород и сортов находится под угрозой исчезновения, так как сельское хозяйство в настоящее время базируется на немногих высокопродуктивных породах и сортах. Особенно в угрожающем положении находятся так называемые аборигенные, то есть местные породы и сорта, как правило, низкопродуктивные, но зато идеально приспособленные к местным, зачастую суровым условиям. Таким образом, аборигенные породы - незаменимый материал для селекционной работы. Кроме того, они представляют собой элемент культурного наследия человечества и уже хотя бы по этой причине заслуживают сохранения (Ротт, 1996).

Между тем численность аборигенных пород непрерывно сокращается. Из 145 таких пород, разводимых в Европе, 115 находятся на грани исчезновения. Численность серого венгерского скота, наиболее близкого к прародителю домашнего скота - туру, в 1965г. составляла 0,05% от его численности в 184О г. Параллельно происходит уменьшение численности чистопородных животных в пользу гибридов. Так, процент чистокровных уток разных пород уменьшился за последние 7 лет с 71,8 до 55,1 (там же).

Потеря генетического материала происходит и в пушном звероводстве. В то время, когда вновь появилась мода на длинношерстный мех (песца, лисицы), выяснилось, что некоторые разновидности уже утрачены, что значительно затрудняет выведение новых цветовых разновидностей (Сулей,1989).

Проанализировав все имеющиеся материалы по данному вопросу, Д.С. Павлов (1993) предлагает ряд критериев для оценки состояния отдельных видов рыб, которые нуждаются вобсуждении, дополнении и ранжировании..

По его мнению, охрана живой природы должна рассматриваться как одна из сторон управления биологическими ресурсами. Принципиально важным для процесса управления было рассмотрение проблем охраны по уровням организации живого, однако до настоящего времени структурно-функциональная организация такого управления разработана в недостаточной степени. Наблюдается лишь стихийное применение отдельных принципов и методов управления, а сам термин «управление» используется крайне редко.

В последние десятилетия в результате антропогенных нагрузок резко сократилась численность осетровых в водоемах России, в, том числе в Каспийском и Азово-Черноморском бассейнах, где были сосредоточены их основные мировые запасы. В связи с этим в настоящее время необходима разработка концепции сохранения осетровых и постепенное осуществление ее основных позиции. Среди них важнейшее значение имеет охрана осетровых на всех этапах их жизненного цикла, в том числе при естественном размножении, если оно возможно хотя бы в ограниченных масштабах. Однако в большинстве случаев даже при частично сохранившихся нерестилищах на реках нерест не происходит из-за малочисленности мигрирующих производителей, в связи с чем основным или единственным источником формирования и поддержания запасов осетровых является заводское воспроизводство. Это определяет необходимость учета важности поддержания генетической гетерогенности, формируемых популяций и их экологической структуры. Положительные результаты в этом направлении получены в рыбоводных заводах дельты Волги. Важным направлением работ является реабилитация среды, в которой обитают осетровые, предотвращение загрязнения природных водоемом, без чего невозможно получение физиологически полноценного потомства и производителей. В условиях дефицита производителей осетровых необходимым направление является формирование маточных стад на рыбоводных хозяйствах с применением прижизненного получения половых продуктов. Большое значение для выполнения этих работ имеют достижения товарного осетроводства. Для сохранения биоразнообразия осетровых необходимо проведение специальных работ. Среди них следует подчеркнуть необходимое разведения менее массовых видов, в частности персидского осетра различных популяций, шипа, а также создание живых коллекции редких, находящихся под угрозой исчезновения видов, популяции, биологических групп в различных регионах России. В комплекс работ по сохранению биоразнообразия входит также создание банков криоконсервированной спермы (Бараникова и др., 2000).

Основными причинами депрессии каспийских осетровых и 1990 -1998 гг.явились широкомасштабный нелегальный их промысел в море и реках, снижение биомассы солоноватоводного комплекса кормовой базы, неблагоприятная токсикологическая обстановка, которая несколько улучшилась и стабилизировалась по ряду показателей (тяжелые металлы, пестициды) на уровне, близком к ПДК. Однако развернувшаяся в последние годы эскалация добычи нефти в море представляет собой потенциальную опасность гибели не только для осетровых, но и для других биоресурсов Каспия. В этих условиях браконьерство, в несколько раз превышающее объемы легального промысла, оказалось главным фактором падения запасов и снижении официальных вылова осетровых. В условиях экономического кризиса прикаспийских государств, отсутствия единой системы охраны и воспроизводства рыбных ресурсов на бассейне, браконьерство приобрело характер международной проблемы. В целях сохранения уникального Касспийского стада осетровых необходимо принять срочные меры (Малютин, 2000; Мельников, Прямухина, 2000).

## Способы сохранения генофонда диких и домашних животных

Нет сомнения, что наилучшим способом является сохранение популяций видов в естественных для них условиях природы. Для этого необходимо часть Земли, достаточную для поддержания всех основных биоценозов и способную обеспечить существование популяций отдельных видов животных и растений, оставить неприкосновенной, изъяв из всякой хозяйственной деятельности. По экспертным оценкам, для сохранения основных экосистем необходимо сохранить в состоянии, близком к естественному, не менее 30% Земли (в настоящее время заповедано всего около 2%). Эти территории должны стать системой жизнеобеспечения Земли естественным хранилищем генофонда растительного и животного мира, биологическими фильтрами для воды и атмосферы. Одним из основных вопросов при создании заповедника является определение размера его площади, необходимой для обеспечения стабильности находящихся в нем экосистем. Если заповедник слишком мал, он не обеспечит такой стабильности из-за постоянного давления со стороны окружающей среды, измененной вмешательством человека. С другой стороны, маленький заповедник не может предоставить достаточную площадь для содержания необходимого минимума крупных животных, обеспечивающего их генетическое разнообразие. Подсчитано, что число особей не менее 1000 позволяет сохранить 9% генетического разнообразия вида в течение 20 поколений. Территории заповедников необходимо ограничить геоморфологическими рубежами: речные бассейны должны быть заповеданы целиком, от истоков до устья, в горах - разные склоны, очень важно заповедать так называемые критические местообитания, то есть места, защита которых жизненно важна для сохранения того или иного вида (Сулей, Уилкокс, 1983).

Помимо диких, на территории заповедника могут содержаться также домашние животные аборигенных пород - исконные обитатели этих мест. Аборигенные породы, идеально приспособленные к местным условиям, представляют незаменимый материал для создания новых, высокоустойчивых пород (Букварева, 1985).

Своеобразными заповедниками, соединяющими в себе черты заповедника и зоопарка, являются знаменитая Аскания-Нова и вновь созданное Алтайское экспериментальное хозяйство Сибирского отделения РАН. Здесь сохраняются естественные биоценозы. Одновременно эти заповедники являются «банками генов»для многих видов диких животных и домашних, не являющихся исконными ее обитателями, местом проведения обширных работ по созданию новых пород, соединяющих высокую продуктивность с приспособленностью к местным условиям, а также по акклиматизации и одомашниванию диких животных. В Алтайском хозяйстве начаты работы по одомашниванию диких баранов - аргали и снежного, которых в дальнейшем предполагается использовать как исходный материал для выведения новых пород домашних овец мясного и мясо-шубного направления, приспособленных к горным пастбищам. (Ротт, 1995).

Введение диких животных в систему сельского хозяйства, их одомашнивание - еще один способ сохранения генофонда. Однако применение этого способа сопряжено с определенной опасностью для сохранения вида. Дело в том, что, одомашнивая животных, человек сознательно или бессознательно отбирает их по признакам, удобным для него, например по приручаемости. Такой отбор академик Д.К.Беляев определяет как дестабилизирующий, так как он порождает большой размах изменчивости, ее высокие темпы, что, как предполагается, связано с нарушением баланса гормонов (Дьяконов,1998).

В качестве способа сохранения генофонда введение животных в городские биоценозы имеет тот же недостаток, что и доместикация и в этом случае идет отбор по поведению, что может быть связано с потерей устойчивости генов (Вепринцев, Ротт, 1980).

Большую работу по сохранению и размножению редких и исчезающих видов проводят зоопарки и ботанические сады. В настоящее время в зоопарках мира содержится 72 вида птиц, перечисленных в Красной книге МСОП, из них 47 видов размножаются; для млекопитающих эти цифры составляют соответственно 161 и 132. В 33 зоопарках России содержится 127 видов и подвидов животных, занесенных в Красную книгу МСОП и Красную книгу РФ, из них размножались 39 видов и подвидов. Некоторые виды животных сохранились только в зоопарках, например лошадь Пржевальского, олень Давида. Иногда удается размножить в зоопарке редкие виды до такой численности, что оказывается возможным выпустить их в исходные места обитания. Бизоны и зубры, живущие сейчас в природных условиях, являются потомками особей, сохранившихся в зоопарках (Карнаухов, Карнаухов, 1994).

Следующая проблема - какое минимальное число животных должно содержаться в зоопарке, чтобы они могли размножаться в течении многих поколений, не утрачивая генетическое разнообразие и не снижая жизнеспособность и плодовитость из-за близкородственного скрещивания? Подсчитано, что при правильном подборе пар, учитывающем генетические особенности партнеров, популяция из 50-100 особей может обеспечить сохранение всего лишь половины генетического разнообразия данного вида в течение 100 поколений. Большинство зоопарков не могут отказаться от принципа «каждой твари - по паре». В таком случае, единственный способ поддержать генетическое разнообразие и избежать последствий близкородственного разведения - объединить зоопарки в единую систему, осуществляющую обмен производителей. Отдельные опыты такого рода проводятся, но они наталкиваются, во-первых, на сложности политического и экономического порядка, и, во-вторых, на трудности связанные с перевозками производителей. Стресс, вызываемый самим процессом перевозки и пребывания в новом, незнакомом месте может подавить половое поведение, В этом смысле перспективой является транспортировка замороженной спермы с последующим искусственным осеменением самок. Однако и этот метод требует большой исследовательской работы - необходимо разработать методы получения спермы, не травмирующие самца, ее замораживания и, наконец, определение времени овуляции у самок, Например, сперму слона научились получать и замораживать, но дальнейшее ее использование пока невозможно, так как неизвестно время и механизм овуляции у слоних (Никитин, 1994).

## Консервация геномов

Одним из наиболее реализуемых в настоящее время способов сохранения биоразнообразия на Земле является метод криоконсервации геномов, предложенный Б.Н. Вепринцевым (Карнаухов, 1994).

Содержание размножающихся групп животных в неволе - в зоопарках питомниках, на фермах - все это способы создания так называемых патетических банков, то есть обеспечение сохранения генетической информации о виде в ее наиболее полном объеме. Однако существует еще один способ - консервация геномов половых или соматических (то есть телесных) клееток (Ананьев, и др., 1997).

Консервация геномов призвана дополнить другие способы сохранения генетической информации. Она необходима для видов, численность которых упала ниже критической, необходимой для их выживания. Она позволяет сохранить разнообразие. Другая важная задача, решаемая таким способом - сохранение генетического стандарта вида, что особенно важно для видов переживающих усиленный дрейф генов. Консервация геномов позволит уменьшить количество животных, содержащихся в неволе, не опасаясь инбридинга: искусственное осеменение хранившейся в замороженном виде спермой или обеспечение развития замороженных зародышей позволит приливать свежую кровь в такую популяцию, не увеличивая количества животных.

Вместе с тем, консервация геномов может стать основным средством сохранения лабораторных животных с наследственными аномалиями, являющихся неоценимым материалом для изучения наследственных болезней человека. Содержание и разведение таких животных экономически невыгодно, так как жизнеспособность их понижена, и это продолжаетсяв каждом поколении из-за неизбежного близкородственного разведения.

В.Н. Карнацхов (1994) считает, что в условиях сельского хозяйства консервация геномов позволит сохранять материал в течение десятилетий в неизменном виде, использовать и транспортировать его на далекие расстояния

Основные задачи, стоящие при консервации геномов - выбор способов сохранения. Очевидно, материал, избранный для консервации должен содержать генетическую информацию особи в наиболее полном виде. Этой задаче в наибольшей степени отвечают половые клетки – яйцеклетки и сперматозоиды, самой природой предназначенные для передачи генетической информации от поколения к поколению, а также зародыши (Брегма, Найденко, 1992). Однако можно себе представить такую ситуацию, когда мы имеем дело с последними представителями исчезающего вида животных, которые в силу каких-либо причин не могут быть источниками получения половых клеток: например, эти животные слишком стары или получение половых клеток сопряжено с опасностью для их здоровья. В этом случае необходимо сохранить любые доступные клетки тела - так называемые соматические клетки - например, клетки кожи или крови. К сожалению, не у всех животных соматические клетки являются генетически полноценными. Так, у некоторых насекомых, червей часть генетического материала выбрасывается из таких клеток в ходе раннего развития - происходит так называемая диминуация хроматина. Это было показано опытами американских ученых Роберта Бриггса и Томаса Кинга, впервые опубликованными в. 1952 г и выполненными на лягушке. Позднее такие опыты проводили на многих животных в ряде стран, в том числе и в СССР. Здесь ядро яйцеклетки удаляет и заменяет ядром соматической клетки. В ряде случаев развитие такой яйцеклетки привело к образованию взрослого полноценного животного, даже когда ядра были взяты из кожи взрослых животных. Следовательно, соматические клетки также могут быть использованы как материал для консервации генома (Лозино-Лозинский, 1972).

## 1.4. Способы консервации генома

### 1.4.1. Физиологическая консервация

В природе известны случаи, когда клетки остаются живыми и неизменными в течение многих месяцев или даже лет. Примером такой «физиологической консервации» является так называемая диапауза – временная остановка развития зародыша. Так, в половых путях самок многих видов млекопитающих зародыши находятся почти в неизменном состоянии в течение многих месяцев. У некоторых карпозубых рыб живущих в Пересыхающих водоемах Африки, зародыши останавливаются на ранних стадиях развития и в таком виде переживают неблагоприятное для них сухое время года. У многих бабочек, в том числе тутового шелкопряда, развитие зародыша в яйце останавливается на всю зиму. У других бабочек зимуют куколки. Широко распространенное явление зимней спячки млекопитающих также можно рассматривать как пример физиологической консервации, так как жизненные процессы при этом сведены до минимума. Двоякодышащая рыба протоптерус живет в пересыхающих водоемах Африки. В период засухи протоптерус окружает себя коконом из слизи. В таком состоянии он может просуществовать до 4 лет. Физиологическая консервация достигается и искусственным путем. Однако до сих пор не удалось искусственно воспроизвести условия, обеспечивающие без глубокого замораживания столь длительное сохранение спермиев вне организма. Спермии сохраняют жизнеспособность при температуре 13°С не более 35 недель (Карамарова и др., 1994).

Представляется очень привлекательным выяснить физико-химические и биохимические механизмы физиологической консервации и создать на этой основе искусственные среды для хранения клеток в течение относительно короткого времени: дней, месяцев, нескольких лет. Во многих случаях для практических задач и фундаментальных исследований эти сроки хранения клеток достаточны (Осташко, 1978).

### 1.4.2. Глубокое замораживание биологических объектов

Наиболее перспективным способом консервации геномов является глубокое замораживание. В настоящее время глубокое замораживание клеток, тканей и органов получило широкое распространение в медицине и сельском хозяйстве. Этому предшествовали исследования устойчивости живых организмов к действию низких температур и изменений, происходящих в клетке при консервации (Гахова, 1994).

Охлаждение живых клеток ниже 0°С сопровождается вымораживанием воды в клетке, в результате чего в несколько раз увеличивается концентрация растворенных солей, меняется рН, образуются кристаллы льда, возникают механические напряжения, повреждающие клетку. Эти процессы нарушают работу клеточных структур встроенных в мембраны, которые обеспечивают клетку энергией, поддерживают нормальные для клетки концентрации ионов и транспорт веществ между клеткой и средой. Различные виды растений и животных по разному переносят снижение температуры. Самыми холодоустойчивыми оказались организмы, выдерживающие значительное обезвоживание: простейшие в виде цист, коловратки, тихоходки, черви (нематоды). Опыты французского ученого Беккереля, проведенные еще в начале нашего века, показали, что эти организмы остаются живыми при глубоком замораживании, когда температура их тела приближается к абсолютному нулю (-273°С). Другие виды также переносят значительное охлаждение, несмотря на большое содержание воды в их тканях. Например, не погибают моллюски и ракообразные, живущие в прибрежной полосе северных морей и регулярно вмерзающие зимой в лед. Выдерживают замораживание жуки-плавунцы, личинки комара-звонца, рыба далия, живущая на Чукотке, куколки некоторых бабочек и многие другие виды холоднокровных животных (Курбатов и др., 1988).

Исследования показали, что все эти организмы, во-первых, способны выдерживать переохлаждение, при котором не происходит образования льда, хотя температура их тела опускается иногда на десятки градусов ниже точки замерзания жидкостей организма. Во-вторых, их клетки содержат вещества, понижающие точку замерзания: глицерин, особые белки, сахара, Например, жук-древоточец зимой содержит в своем теле до 25% глицерина. В-третьих, у животных, которые регулярно подвергаются опасности замерзания, развита способность к восстановлению клеточных структур, повреждающихся при образовании льда (там же).

Исследователи, занимающиеся поисками путей сохранения клеток при низких температурах, идут по второму пути. Они вводят в среды, где происходит замораживание, вещества, называемые криопротекторами, которые снижают точку замерзания, связывают внутриклеточную воду и защищают структуры клетки от разрушения. К ним относятся: глицерин, диметилсульфоксид, полиэтиленгликоль. Еще лучшими криозащитными свойствами обладают смеси криопротекторов с веществами, стабилизирующими клеточные мембраны. В качестве таких веществ используют яичный желток, антиоксиданты, некоторые сахара (Андреев, Петропавлов, 1994).

При существующей сегодня технологии можно успешно замораживать спермии, гонады и многие соматические клетки, в частности лимфоциты. Электронно-микроскопические исследования указывают на хорошую сохранность клеточных структур глубокозамороженных клеток. Это дает основания уже сегодня ставить вопрос о создании банков глубокозамороженных клеток (Вепринцев, Ротт, 1984).

### 1.4.3. Замораживание сперматозоидов

Глубокое замораживание сперматозоидов - одна из наиболее разработанных отраслей криобиологии (Цветкова и др., 2000). Это связано как с биологическими особенностями спермиев, делающими их наиболее подходящим объектом для замораживания, так и с большим практическим значением этих работ. Успешная разработка глубокого замораживание сперматозоидов дает возможность:

1) сохранять и использовать сперму производителей, дающих высоко-качественное потомство в течение длительного времени, превышающего продолжительность жизни самих производителей;

2) транспортировать сперму таких производителей в отдаленные районы, совершенствуя таким образом животноводство в этих районах;

3) создать банк генов малоиспользуемых пород, особенно местных, представляющих ценный материал для создания новых пород;

4) создать банк генов редких и исчезающих видов (Карнаухов, 1994).

Спермии являются наиболее подходящим для глубокого замораживания видом клеток, так как генетический материал в них плотно упакован, содержание воды, с замерзанием которой связано основное повреждение клетки, мало, и уровень жизнедеятельности в неподвижном состоянии низок (Грищенко, и др., 1994).

Первые попытки замораживания спермы сельскохозяйственных животных принадлежат выдающемуся русскому биологу И.И.Иванову, который в 1907г. показал, что спермии жеребца после охлаждения до -15°С восстанавливали оплодотворяющую способность. В 1947 г. Н.И. Соколовская, В.К. Милованов и И.В.Смирнов получили потомство от осеменения самок оттаянной спермой кролика, хранившейся при температуре твердой углекислоты (-78°С). Принципиальное значение имела работа Смит и Полджа, которые в 1949г. стали использовать для замораживания среду с глицерином при температуре жидкого азота (-196°С), которая в основном и используется в настоящее время. Применение глицерина положило начало использованию криопротекторов. К настоящему времени опыты по замораживанию спермиев проведены на млекопитающих, птицах, пресмыкающихся, земноводных, моллюсках - всего более сотни видов. У большинства из них спермии после оттаивания восстанавливают подвижность. На 16 видах млекопитающих, 5 видах птиц, 1 виде земноводных, 15 видах рыб, 6 видах иглокожих, 2 видах моллюсков показано сохранение оплодотворяющей способности спермиев после замораживания и оттаивания (Савушкина, 1999).

Пока не удалось создать универсального метода замораживания сперматозоидов для различных видов. Наибольшее практическое значение метод замораживания сперматозоидов получил в разведении крупного рогатого скота. В развитых странах более 90% коров осеменяют спермой, хранившейся в замороженном виде. Замораживание спермы - один из самых результативных на сегодняшний день путей создания банка генов исчезающих пород скота. Такие банки созданы уже в ряде стран. В скандинавских странах они существуют с 70-х годов, в Польше созданы в 1981г. В России генофондное хранилище замороженного семени быков местных пород существует при Всесоюзном научно-исследовательском институте разведения и генетики животных под Ленинградом. Широкому внедрению метода в другие отрасли животноводства препятствует его недостаточная разработанность применительно к другим видам (Белоус и др., 1987).

В отношении исчезающих видов животных следует иметь в виду еще один путь сохранения мужских половых клеток - замораживание Семенников погибших в зоопарках или питомниках животных с последующей имплантацией их кастрированным самцам. Такие опыты были проведены на птицах советскими исследователями Б.Г.Новиковым и Л.И.Любарской, которые показали, что спустя несколько недель в пересаженных после оттаивания семенниках происходило образование зрелых сперматозоидов. Конечно, для целей сохранения исчезающих видов имеет смысл производить пересадки семенников исчезающего вида самцам обычных видов, то есть межвидовые пересадки (Вуд и др., 1990).

### 1.4.4. Замораживание яйцеклеток

Этот метод значительно более труден и поэтому менее разработан, чем метод замораживания сперматозоидов. Яйцеклетки легко повреждаются при замораживании, в первую очередь, по-видимому, из-за их значительно больших размеров по сравнению со спермиями, рыхлой структурой ядерного аппарата и значительно большим содержанием воды. Пока удалось осуществить оплодотворение замороженных и оттаянных яйцеклеток у мышей, крыс и хомяков, а развитие до рождения оплодотворенной после оттаивания яйцеклетки наблюдали только у мышей. Более перспективным может оказаться замораживание яичников, в которых имеются» наряду с крупными, также и мелкие половые клетки, более успешно выдерживающие замораживание. После оттаивания такие яичники имплантируют кастрированной самке, и половые клетки завершают свое развитие, Такие опыты были успешно проведены на мышах и крысах. Однако в этих случаях замороженные и оттаянные яичники имплантировали самке того же вида. Между тем возможна такая ситуация, при которой последняя самка исчезающего вида погибнет, и от нее сохранятся только замороженные яичники, В этой связи большой интерес представляют опыты по межвидовой пересадке яичников проведенные на дрозофиле, хвостатых амфибиях и птицах. Во всех случаях яичники, пересаженные от одного вида животного к другому, были способны образовать яйца, из которых развивались зародыши того вида, от которого был взят яичник (Вепринцев, Ротт, 1984).

### 1.4.5. Замораживание зародышей

Замораживание зародышей было впервые проведено в 1971 г. на мышах. После оттаивания зародышей имплантировали в матку «приемной матери», где они продолжали свое развитие. К настоящему времени удалось разработать методику замораживания зародышей крупного рогатого скота, овец, коз, кроликов, крыс. Увсех этих видов замороженные зародыши после оттаивания и трансплантации приемной матери продолжают успешно развиваться до рождения. Замораживание производится в присутствии криопротекторов – глицерина полиэтиленгликоля или диметилсульфоксида. У хомяков и свиней зародыши после замораживания и оттаивания зародыши остались живыми но до рождения их развитие не доходило. Удалось кратковременно сохранять замороженных зародышей трески, лососевых рыб морских ежей и кальмаров (Grunina, Neifakh, 1997).

В нашей стране освоена методика замораживания зародышей лабораторных мышей, овец, кроликов и крупного рогатого скота. Метод замораживания зародышей имеет большое значение в практике сельского хозяйства, медицины и экспериментальных исследований. Во-первых, он позволяет сохранить генотип не только самцов, но и самок, выдающихся по своим хозяйственно-ценным признакам, и размножить их путем трансплантации зародышей приемным матерям. Во-вторых, он позволяет накопить большое количество однородного по возрасту и происхождению эмбриологического материала, что особенно важно при проведении биохимических исследований. В-третьих, он позволяет значительно упростить транспортировку сельскохозяйственных животных ценных пород и лабораторных животных. Ввоз замороженных зародышей - единственный способ импорта ценных пород и линий для тех стран, куда ввоз животных запрещен таможенными правилами, например в Австралию. Наконец, хранение замороженных зародышей позволяет получать детенышей в наиболее удобное время года (например, потомство от сельскохозяйственных животных – весной) (Межевикина, Каранова, 1995).

### 1.4.6. Замораживание соматических клеток

Длительное сохранение клеток в глубокозамороженном состоянии стало обычным методом для лабораторий, работающих с клеточными культурами. Обычно используют медленное замораживание со скоростью около 1°С в минуту и размораживание со скоростью 5-10°С в минуту, помещая ампулы с культурой в водяную баню при +37°С.В качестве криопротекторов используют глицерин. Практически удается заморозить клетки самых различных тканей (Ананьев, 1997).

Клеточные культуры - необходимый инструмент исследований, проводимых в биологии и медицине, атакже биотехнологии. Они необходимы для получения вакцин и сывороток, поиска и проверки новых лекарственных препаратов, диагностики заболеваний производства физиологически активных соединений, в том числе интерферона - крайне активного антивирусного препарата (Fahy, 1986).

Использование гибридных клеток дало возможность получать моноклинальные антитела, специфичные по отношению к определенному антигену. Это позволяет создавать иммунные антитела (сыворотки), не обладающие побочным действием (там же).

Всеми этими достижениями фундаментальная наука и биотехнология обязаны в значительной степени сохранению различных клеточных линий. Первая коллекция клеточных культур для нужд медицины и биологии была основана в США в 1925 г. В России научно-исследовательские институты различных ведомств имеют свои коллекции клеточных культур, в том числе сохраняемые в замороженном виде. В настоящее время в системе РАН создается Всесоюзная коллекция клеточных культур (Шпаро, 1983).

Сохранение в коллекциях глубокозамороженных соматических клеток различных животных может оказаться полезным не только для генной инженерии, но и для сохранения генетической информации об исчезающих видах животных, изучения их генетики (Карнаухов, 1994).

### 1.4.7. Длительность хранения замороженных клеток

По прогнозам ученых, человечество достигнет «экологического равновесия» к началу XХII в. Предполагается, что приблизительно через 120 лет можно будет выпустить в природу животных, как сохраненных в зоопарках, питомниках и фермах, так и восстановленных из замороженных клеток. Поэтому при использовании метода глубокого замораживания клеток, как способа сохранения генетической информации большое значение имеет вопрос о длительности сохранения замороженными клетками жизнеспособности и генетической неизменности (Вепринцев, Ротт, 1985).

Криоконсервация как метод сохранения половых клеток сельскохозяйственных животных для искусственного осеменения возникла в конце 40-х годов нашего столетия. Первоначально клетки пытались сохранять при температуре сухого льда, то есть -78°С, однако очень скоро выяснилось, что при этой температуре качество семени быстро ухудшается. При температурах ниже -130°С, то есть температуре, при которой уже не идет перекристаллизация льда, заметного ухудшения не возникает (Вепринцев, Ротт, 1985).

Поскольку сам метод глубокого замораживания существует сравнительно недавно, всего несколько десятков лет, нет достаточных экспериментальных данных для ответа на вопрос, как долго замороженные клетки сохраняют жизнеспособность и генетическую неизменность. Однако есть все основания надеяться, что значительная часть клеток при -196°С сохранит жизнеспособность в течение десятков и даже сотен лет. Существующая практика животноводства показывает, что потомство быков, семя которых хранилось в течение 25 лет в замороженном состоянии оказалось совершенно нормальным (там же).

При температуре -196°С практически не идут биохимические реакции. Однако клетки, в частности их геном, могут повреждаться за счет радиоактивного фона Земли и космического излучения. Радиоактивный фон Земли создается излучением радиоактивных веществ, существующих в природе и образующихся в результате атомных испытаний, атомной энергетики, излучения рентгеновской и изотопной аппаратуры, применяемой в медицине и промышленности. Суммарная мощность космического излучения и радиоактивного фона Земли мала: она не превышает 0,2 рад/г. Доза, при которой погибает 63% животных, составляет от 6ОО рад до нескольких тысяч, в зависимости от вида животного (Наук и др., 1991).

Расчеты времени, в течение которого можно быть уверенным в получении полноценного потомства из замороженных клеток, были проведены тремя независимыми способами:

1) анализ экспериментальных кривых летального действия ионизирующих излучений на клетки млекопитающих показал, что доза излучения, при которой выживает 37% половых клеток, при существующем уровне радиации при температуре -196°С может быть только за 200 лет. Эта оценка была сделана американским криобиологом Мазуром;

2) расчет числа повреждений, возникающих при хранении на фоне существующей радиоактивности, при ~196°С показал, что число невосстанавливаемых повреждений ДНК не превышает 10 при изменении в течение 300 лет на один геном половой клетки млекопитающих. Это существенно меньше числа повреждений, при которых гибнет 63% половых клеток;

3) мышиных зародышей, хранившихся в жидком азоте, в течение 13 лет облучали при мощности дозы, в 100 раз превышающее уровень фона. После этого зародыши были разморожены и пересажены в матки самок – «приемных матерей». Родившиеся мышата были нормальными по жизнеспособности и плодовитости и число мутаций, проявившихся у их потомков, не отличались от контроля. Таким образом, существующие на сегодня данные, как экспериментальные, так и полученные путем теоретических расчетов, показывают, что допустимое время хранения половых клеток в глубокозамороженном состоянии без существенного повреждения их организма при существующем на сегодня на Земле радиоактивном фоне составляет не менее 20О лет. Возможно, что в действительности оно много больше (Somme, 1982).

Тепловые мутации, то есть мутации, при температуре жидкого азота практически не возникают. Иначе бы не было радиоактивного фона, то клетки в азоте можно было бы хранить практически вечно (O Neil, Mac Neill, 1993).

До сих пор экспериментально не выяснена в достаточной степени возможность возникновения мутаций в ходе самого процесса замораживания и оттаивания клеток. Нет также данных о преимущественном отборе каких-либо генотипов при замораживании популяции однотипных клеток (Бергман, Найденко, 1992).

Возможно, перспективным окажется при длительных сроках хранения генов использование специальных веществ, замедляющих в случае невозможности глубокого замораживания такие образцы могут быть фиксированы спиртом или феноксиэтанолом, не разрушает химическую структуру ДНК (Вепринцев, Ротт, 1984)

### 1.4.8. Способы получения живых животных из замороженных спермиев

Как известно, развитие всех живых организмов, размножающихся половым путем, начинается слиянием мужской и женской половых клеток. Однако существуют, по крайней мере, два пути воссоздания вида, от которого сохранились только замороженные спермин.

Первый путь - оплодотворение такими спермиями яйцеклетки самки другого вида, то есть межвидовая гибридизация (Алтухов, 1989).

Очевидно, что невозможность скрещивания с другими видами - необходимое условие существования вида как такового. Однако эта невозможность может обеспечиваться различными путями. Во-первых, виды могут не скрещиваться просто в силу их пространственной изоляции. В таком случае, оказавшись в одном месте, виды могут образовать гибриды. Скрещиванием белуги со стерлядью была получена новая форма - бестер, имеющая значение при товарном выращивании (Алтухов, 1989).

Большую сложность представляют случаи, когда наблюдается так называемая физиологическая изоляция вида, то есть неспособность его к скрещиванию с другими видами. Такая изоляция может быть вызвана раз-личными причинами. Одна из наиболее преодолимых - это различия в поведенческих реакциях. В таком случае достаточно применить искусственное осеменение самок. Сложнее случай, когда спермин оказываются нежизнеспособными в половых путях самки другого вида. Способ преодоления этого препятствия - разработка методов оплодотворения яйцеклетки в пробирке. Этот этап представляет значительные трудности, так как перед проникновением в цитоплазму яйца спермий претерпевает ряд физиологических и морфологических изменений, связанных с взаимодействием спермия с наружными оболочками яйцеклетки, или со средой половых путей самки. Для имитации этих взаимодействий оплодотворение приходится производить в специально подобранных средах. Для 14 видов млекопитающих удалось подобрать такие среды, в которых осуществляется проникновение спермия в цитоплазму яйцеклетки. У 4 видов после введения таких оплодотворенных яйцеклеток в матку самки они развивались до рождения детенышей. Большое внимание привлекли работы с оплодотворением в пробирке яйцеклеток человека (Вепринцев, Ротт, 1984).

Таким образом, анализ литературы по криоконсервации показывает, что в данном направлении достигнуты довольно значительные результаты, однако ряд вопросов, связанных с замораживанием и оттаиванием спермиев рыб и других животных остается не выясненным. Так актуальным остается вопрос об видоспецифичности криопротекторов для разных видов осетровых. В месте с тем, до конца не установлено качество спермы, пригодной для криоконсервации.

Исходя из выше сказанного и анализа литературных источников целью данной работы явилось разрешение следующих задач:

1. Оценить качество спермы от разных самцов русского осетра и севрюги. Для замораживания отобрать сперму только высокого качества, отвечающую рыбоводным показателям.
2. Установить адекватность принятых оценок – время жизни и процент подвижных спермиев в биологической пробе на разных этапах замораживания-оттаивания (нативная сперма, сперма после дефростации, сперма после оттаивания).
3. Оценить роль каждого вещества в составе многокомпонентного криопротектора.
4. Выявить оптимальные составы криопротекторов для спермы русского осетра и севрюги.

# МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проведена в период май-июль месяцы 2006 года на Александровской осетровом рыбоводном заводе Севкаспрыбвода.

Количество проведенных опытов по подготовке и реализации исследо-ваний представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Объем экспериментального материала.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| №п/п | Наименование работ | ВсегоОпытов |
| 1.  | Оценка качества нативной спермы русского осетра | 35 |
| 2. | Оценка качества нативной спермы севрюги | 35 |
| 3. | Подбор концентраций компонентов криопротектора | 20 |
| 4. | Сравнение протекторов на сперме русского осетра (время жизни) | 120 |
| 5. | Сравнение протекторов на сперме русского осетра (% подвижных спермиев) | 120 |
| 6. | Сравнение протекторов на сперме севрюги (время жизни) | 120 |
| 7. | Сравнение протекторов на сперме севрюги (% подвижных спермиев) | 120 |
| Всего опытов | 570 |

Сперму от самцов русского осетра и севрюги отбирали методом сцеживания. Ее до замораживания хранили в холодильнике при t = +4°С. Время хранения от 1.5 часов до 2 суток.

Перед замораживанием сперму первоначально смешивали с одним из образцов криопротектора, затем смесь оставляли на эквилибрацию (до 40 минут) при комнатной температуре. После этого образцы раскапывали в пробирки Эпендорфа и начинали замораживание в парах жидкого азота. Для этого замаркированные пробирки помещали на площадку, которая находилась в емкости с жидким азотом и «плавала» на его поверхности (рис. 1). Температура на поверхности пластины – -70 - -100°С. Время выдерживания образца в парах жидкого азота устанавливали экспериментально, после чего последний погружали в жидкий азот (t = -196°С). Вместе с тем апробировали способ сверхбыстрой заморозки спермы на тефлоновом планшете (рис. 3), которую помещали на поверхность жидкого азота в кювету. Сперму автоматическими пипетками раскапывали по гнездам пластины. Замороженные шарики ссыпали в емкость, объемом до 20 мл., которую помещали в жидкий азот.

Для проведения исследований влияния скоростей замораживания на качество и жизнестойкость образцов было необходимо осуществить калибровку температур в опытной камере. Рофиль распределения температур в зависимости от расстояния до поверхности жидкого азота приведен на рис. 2.

1

2

4

 3

2

Рис. 1 Установка для замораживания образцов.

1 – емкость. 2 – жидкий азот. 3 – пенопластовая пластина на поверхности жидкого азота. 4 – замораживаемый образец.



Рис. 2. Профиль температуры в экспериментальной установке.

Размораживание образца осуществляли следующим образом. Быстрый вариант. Образец помещали под водяную баню, где температуру среды поддерживали 36-38°С. После оттаивания (время от 2 до 4 минут) замороженный образец помещали в базовый раствор для отмывки от криопротектора. Время отмывки для каждого вида осетровых рыб устанавливали отдельно.

Рис. 3. Планшет для быстрой заморозки образцов.

Рис. 4. Установка для замораживания спермы осетровых рыб.

За выходные показатели в экспериментах принимали время жизни сперматозоидов после оттаивания и отмывки протектора до полной их остановки, а также % подвижных спермиев в зоне видимости микроскопа. Третьим показателем являлся процент оплодотворения икры дефростированной спермой.

Статистическую обработку результатов осуществляли с применением приемов Теории планирования экспериментов. Использован план однофакторного блочного эксперимента с дисперсионным анализом. За факторы принимали образца криопротекторов, за блоки – сперму от разных самцов. Значимость различий между факторами и блоками устанавливали с применением F-критерия Фишера.

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед началом эксперимента было необходимо проверить ряд параметров факторов. К таковым в первую очередь относятся: возможность криоконсервации спермы осетровых рыб любого качества и установление концентраций компонентов криопротекторов.

## Оценка качества нативной спермы

Русский осетр. Нативную сперму русского осетра получили от 9 самцов путем сцеживания. Результаты оценки качества представлены в табл. 1

Таблица 1.

Оценка качества нативной спермы русского осетра.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № самца | % подвижности  | Время жизни |
| 1 | 100 | 3.47 |
| 2 | 100 | 4.30 |
| 3 | 100 | 5,30 |
| 4 | 100 | 6,53 |
| 5 | 100 | 4.40 |
| 6. | 100 | 6.39 |
| 7 | 100 | 3.37 |
| 8 | 100 | 3.14 |
| 9 | 100 | 7.27 |
| Уср. | 100 | 4.9 |

Примечание: N = 9. М = 4.9, . m = ±0.42.

После статистической обработки вариационного ряда оказалось, что по своим показателям сперма от разных самцов русского осетра достоверно не отличается друг от друга, Ошибка измерения составила m = ±0.42, что свидетельствует о незначительном разбросе показателей. Последнее свидетельствует, что можно замораживать сперму всех самцов. В среднем количество подвижных спермиев составило 100% во всех пробах, среднее время их жизни – 4.9 минуты, что соответствует рыбоводным нормативам (3 минуты). Для глубокой заморозки отобраны пробы самцов №№ 1- 6.

Севрюга. Получена сперма от 6-ти самцов. Седьмая проба состояла из смеси спермы от разных производителей. Результаты оценки качества приведены в таблице 2.

После статистической обработки вариационных рядов оказалось, что сперма севрюги от разных самцов достоверно отличается друг от друга. Поэтому криоконсервации отобраны образца спермы от самцов №№ 1, 3, 4, 6.

Таблица 2.

Оценка качества нативной спермы севрюги.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № самца | % подвижности. | Время жизни |
| 1 | 100 | 13.5 |
| 2 | 0 | 0 |
| 3 | 100 | 7.55 |
| 4 | 80 | 7.03 |
| 5 | 0 | 0 |
| 6 | 30 | 5.31 |
| 7 | 10 | 2.45 |
| Уср. | 45.7 | 5.11 |

Примечание: N = 7. % подвижности: М = 45.7, m = ±2.59,

время жизни: М = 5.11, m = ±0.86.

Впоследствии была получена сперма от самцов севрюги №№ с 9 по 19. Их оценка качества представлена в таблице 3.

Таблица 3.

Оценка качества нативной спермы севрюги.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № самца | % подвижности. | Время жизни |
| 8 | 100 | 2.52 |
| 9 | 60 | 1.43 |
| 10 | 100 | 3.35 |
| 11 | 80 | 1.29 |
| 12 | 60 | 1.20 |
| 13-18 | 0 | 0 |
| 19 | 50 | 1.36 |
| Уср. | 64.3 | 1.6 |

Примечание: N = 7. % подвижности М = 64.3, m = ±1.9

время жизни М = 1.6, m = ±0.4.

После статистической обработки данных и их анализа установлено, что этот материал не пригоден для глубокой заморозки в жидком азоте, так как в основной массе по всем показателям данный материал не отвечает рыбоводным показателям. Если же принять во внимание ожидаемое ухудшение качества спермы по принятым показателям (% подвижных сперматозоидов и время жизни спермиев), то после температурного шока (криоконсервации) такая сперма вряд ли может демонстрировать положительные свойства при оплодотворении. Поэтому принято решение данный биологический материал исключить из эксперимента.

## 3.2. Подбор оптимальных концентраций составляющих протекторов

Русский осетр. В качестве основных составляющих криопротекторы веществ являлись: глицерин, ДМСО, гепарин, сахароза, яичный желток и манит. За основной показатель для оценки концентрации апробируемых веществ принимали временя жизни сперматозоидов. Результаты тестирования приведены в табл. 4.

Таблица 4.

Результаты установления концентраций.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| С | Глицерин | ДМСО | Гепарин |
| 0.1мг/0.5мл³ | 0 | 0.46 | 2.09 |
| 0.05мл3. | 2.01 | 0 | 3.10 |
| 0.025мл3. | - | 2.02 | - |
| 0.025Х 3 | Смесь 2.26 |

Для русского осетра были отобраны ряд вариантов криопротекторов, отличающихся друг от друга составом криопротектора №№ 1. 2. 3 и 4 и режимом заморозки-разморозки. Их различия были зашифрованы под следующими обозначениями: ОТ, БОТ, АБ и АС.

Для реализации эксперимента был использован однофакторный блочный тип планирования эксперимента (Адлер, 1969), где за блоки принимали сперму от разных самцов, а за факторы – варианты криопротекторов и режимы криоконсервации. За выходные показатели выбрали как время жизни сперматозоидов, так и % живых спермиев в опыте и контроле. Результаты эксперимента приведены в таблицах 5 – 8.

##### Таблица 5.

Однофакторный блочный эксперимент (% живых сперимев)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Блоки | ОТ | БОТ. | А.Б. | АС | 1 | 2 | 3 | 4 | К | Tj |
| 1 | 23 | 0 | 0 | 2 | 6 | 10 | 7.5 | 15 | 100 | 163.5 |
| 2 | 2 | 0 | 2 | 5 | 7.5 | 12.5 | 5 | 7.5 | 100 | 141.5 |
| 3 | 2 | 0 | 0 | 5 | 17.5 | 32.5 | 10 | 5 | 100 | 158 |
| 4 | 5 | 5 | 3 | 5 | 5 | 15 | 10 | 17.5 | 100 | 165.5 |
| 5 | 60 | 20 | 5 | 5 | 15 | 10 | 12.5 | 5 | 100 | 232.5 |
| 6 | 10 | 5 | 0 | 3 | 10 | 10 | 10 | 5 | 100 | 153 |
| Ti | 102 | 30 | 10 | 25 | 61 | 90 | 55 | 55 | 600 | 1028 |

Статистическая обработка результатов

Корректирующий член Т״²/N = 1028/54 = 19570, где N= 54.

SSобщ. = ∑∑yi² - Tײ²/N = 69250 – 19570 = 49680.

SSфак. = ∑Ti²/n - К.Ч. = 43322 – 19570 = 23742, где n = 9.

SSбл. = ∑Ti²/k - К.Ч. = 9859.

Ssош. = 49680 – (23742 + 9859) = 16079

Таблица 6.

Дисперсионный анализ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Различия | Степени свободы | Сумма квадратов | Средний квадрат |
| Между факт. | 8 | 23742 | 2967 |
| Между бл. | 5 | 9859 | 1971 |
| Ошибка | 64 | 16079 | 251 |

F кр. Факторы = 2967 / 7750 = 11.8.

Fкр.бл. = 1971 / 7750 = 7.8

Таблица 7.

Однофакторный блочный эксперимент (время жизни спермы)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Блоки | К | 1 | 2 | 3 | 4 | .ОТ | БОТ | АБ | АС | Tj |
| 1 | 3.4 | 4.6 | 3.5 | 2.8 | 4.4 | 1 | 0 | 0 | 2.1 | 21.8 |
| 2 | 4.3 | 5.3 | 3.4 | 4.1 | 4.6 | 0.3 | 0 | 2.5 | 9.2 | 33.7 |
| 3 | 5.3 | 7.9 | 5.4 | 7.2 | 2.5 | 0.3 | 0 | 0 | 6.4 | 35 |
| 4 | 6.5 | 1.3 | 3.4 | 6.1 | 1.9 | 1.1 | 2.2 | 4.1 | 5.3 | 31.9 |
| 5 | 4.4 | 8.4 | 5.5 | 8.9 | 3.1 | 6.5 | 2 | 3.1 | 6.4 | 48.3 |
| 6 | 6.4 | 5.2 | 4.2 | 5.5 | 3.6 | 3.5 | 2.6 | 0 | 3.5 | 34.5 |
| Ti | 33 | 32.7 | 25.4 | 34.6 | 20.1 | 12.7 | 6.8 | 9.7 | 32.9 | *207.9* |

N = 54. n = 9. k = 6

Статистическая обработка результатов

К.Ч. T״²/N = 800.4

SSобщ. = 2989.5 – 800.4 = 2189.1

SSфакт = 5630.3 : 9 – 800.4 = 625.6 – 800.4 = - 174.8

SSбл. = 1229.4 – 800.4 = 429.

SSош. = 2189.1 – (-174.8 + 429) = 1934.9

Таблица 8.

Дисперсионный анализ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Различия | Степени свободы | Сумма квадратов | Средний квадрат |
| Между факторами | 8 | 174.8 | 21.9 |
| Между блоками | 5 | 429 | 85.8 |
| Ошибка | 64 | 1934.9 | 30.2 |

F кр. факторы. = 0.7; Fкр. блоки = 2.8.

Из результатов дисперсионного анализа по времени жизни спермиев после дефростации видно, что между протекторами нет значимых различий при значимости последних между блоками, т.е. все протекторы «работают» одинаково.

По полученным коэффициентам регрессии Ti по обоим видам оценки качества биологических проб были составлены ранжированные ряды (рис. 5, 6).



Рис. 5. Ранжированный ряд криопротекторов и режимов замораживания-оттаивания образцов (% живых спермиев).

Анализ ранжированных рядов свидетельствует о том, что состав криопротекторов имеет более существенное значение для сохранения жизнеспособности клеток при глубоком замораживании чем режимы заморозки-оттаивания.

Процент подвижных спермиев как показатель качества оказался менее объективным, чем время жизни клеток этого типа, так как в сравнительно короткие сроки достоверно установить величину этого показателя довольно сложно. Для получения надежных данных необходим достаточный опыт работы. Поэтому в дальнейших исследованиях принимается решение использовать его лишь как косвенные данные, пригодные для дальнейших расчетов количества дефростированной спермы при оплодотворении получаемых объемов икры.



Рис. 6. Ранжированный ряд криопротекторов и режимов замораживания-оттаивания образцов (время жизни спермиев).

Состав криопротектора № 3 по времени жизни сперматозоидов русского осетра оказался выше остальных, исследуемых в данном эксперименте.

Севрюга. В качестве контроля использовали нативную сперму (табл. 2; средне время жизни 5.11 мин., % подвижных сперимев – 45,7%). В качестве факторов использовали составы протекторов №№ 1-4. Протектор № 5 представлял собой раствор глицерина в концентрации, принятой для холоднокровных животных. Эксперимент по установлению оптимальных составов криопротекторов спланирован по типу однофакторного блочного. За факторы принимали различные составы криопротекторов, за блоки - сперму от отдельных самцов. Эксперимент реализовали в двух повторностях, что позволило существенно снизить общую ошибку. За выходные показатели взяты время жизни спермиев и процент подвижности сперматозоидов в пробе. Результаты обработаны как отдельные выборки. Последние представлены в таблицах 9 – 12.

Таблица 9.

Влияние состава криопротекторов на время жизни спермы севрюги.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Блокирыбы | Ф А К Т О Р Ы | Ti |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 05.30 | 3.297.17 | 5.376.24 | 6.262.18 | 7.500 | 43.31 |
| 2 | 8.254.20 | 8.506.14 | 2.270 | 7.354.31 | 2.450 | 43.47 |
| 3 | 4.403.27 | 5.03.23 | 7.077.47 | 3.514.03 | 00 | 37.98 |
| 4 | 7.244.01 | 8.403.24 | 5.504.03 | 6.556.16 | 00 | 45.13 |
| Tj | 36.67 | 44.97 | 37.95 | 40.35 | 9.95 | 169.9 |
| Уср. | 4.58 | 5.62 | 4.74 | 5.04 | 1.24 |  |

Статистическая обработка результатов

1. Корректирующий член (КЧ) T״²/N = 721.7, где N = 40.

2. SSобщ. = 292.9. 3. SSфак. -= 585.2. 4. SSбл. = 1089.4, 5. SSош. = -1381.7

Таблица 10.

Дисперсионный анализ

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Различия | Степени свободы | Сумма квадратов | Средний квадрат | F-критерий |
| Между факторами | 4 | 585.2 | 146.3 | 4.9 |
| Междублоками | 3 | 1089.4 | 363.1 | 12.1 |
| ошибка | 46 | 1381.7 | 30.0 |  |

Таблица 11.

Влияние состава криопротекторов на процент подвижности сперматозоидов севрюги.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Блокирыбы | Ф А К Т О Р Ы | Ti |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 010 | 55 | 1510 | 1020 | 50 | 80 |
| 2 | 105 | 105 | 1200 | 155 | 100 | 70 |
| 3 | 55 | 55 | 1010 | 55 | 00 | 50 |
| 4 | 105 | 55 | 155 | 105 | 00 | 60 |
| Tj | 50 | 45 | 75 | 75 | 15 | 260 |
| Уср. | 6.25 | 5.6 | 9.4 | 9.4 | 1.9 |  |

Статистическая обработка.

1 Корректирующий член (КЧ) = 1690, 2. SSобщ. = 925. 3. SSфак. = 1510, 4. SSбл. = 2660, 5. SSош. = 3245.

Из результатов дисперсионного анализа видно, что между факторами и между блоками в обоих случаях существуют статистически значимые различия. Последнее означает, что сперма от отдельных самцов севрюги существенно отличается друг от друга. Так сперма самцов 1 и 2 являются наилучшими по времени жизни (коэффициенты регрессии 80 и 70 соответст-венно). Худшей оказалась сперма самца № 3 (коэфф. регр. 50). Между криопротекторами различия статистически значимы (Fкр. = 4.9 и 5.4, Fтабл. = 2.26). Исходя из этого возможно построить ранжированные ряды «работы» криопротекторов, где «качество» их действия по обоим показате-лям располагали в порядке убывания Уср. (табл. 9 и 11). Ранжированные ряды представлены на рис. 7 и 8.

Таблица 12.

Дисперсионный анализ.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Различия | Степени свободы | Сумма квадратов | Средний квадрат | F-критерий |
| Между факторами | 4 | 1510 | 377.5 | 5.4 |
| МеждуБлоками | 3 | 2660 | 886.7 | 12.6 |
| ошибка | 46 | 3245 | 70.5 |  |



Рис. 7. Ранжированный ряд действия криопротекторов на

время жизни сперматозоидов севрюги.



Рис. 8. Ранжированный ряд действия криопротекторов на

процент подвижных сперматозоидов севрюги.

Из рис. 8 видно, что процент подвижности дефростированной спермы существенно уступает нативной. Вместе с тем, данный показатель, как и в эксперименте с русском осетром является субъективной оценкой, так как в поле зрения микроскопа попадает в этом состоянии далеко не все подвижные спермии. В то же время было установлено, что при замораживании и дефростации у некоторых спермиев обламываются хвосты, однако сама клетка остается целой и способной к оплодотворению. Если в естественных условиях данная аномалия играет отрицательную роль при оплодотворении, то при искусственном перемешивании дефростированной спермы с икрой в ограниченном пространстве (таз) этот показатель не может играть определяяющей роли при оценки качества спермы.

Таким образом единственной экспресс оценкой размороженной спермы может служить время жизни спермиев после оттаивания. Последнее также является критерием при отборе проб в производство. Из рис. 7 видно, что использование криопротектора № 2 увеличивает время жизни спермиев по сравнению с контролем. Последнее, по-видимому, обусловлено тем, что при двойном термическом ударе (заморозка-оттаивание) наиболее слабые спермии погибают и остаются более сильные клетки, способные к оплодотворению. Составы криопротекторов №№ 4, 3 и 1 оказались хуже контроля, следовательно их использование для рыбоводного процесса с севрюгой целесообразно исключить, а глицерин (крипротектор № 5) вообще не пригоден для использования при криоконсервации спермы осетровых рыб.

Различия в составах криопротекторов для русского осетра и севрюги свидетельствует об видовой специфичности спермы данных видов рыб. Исходя из этого является необходимым для каждого вида осетровых рыб подбирать определенные составы криопротекторов, где основными компонентами остаются базовый раствор, сахароза, яичный желток, манит и ДМСО. Гепарин рекомендуется использовать при дефростации замороженных образцов с целью предотвращения слипания клеток.

# Заключение

На основании проведенных экспериментов возможно сделать следующие выводы:

1. Самцы русского осетра и севрюги по качеству половых продуктов достоверно различаются друг от друга. Поэтому при криоконсервации необходимо отбирать сперму только высокого качества, отвечающую стандартным рыбоводным показателям.
2. Из двух показателей качества спермы на промежуточных этапах криоконсервации наиболее адекватным является время жизни спермиев (до остановки последнего сперматозоида в поле видимости микроскопка). Процент подвижных спермиев может служить лишь косвенной оценкой так как здесь присутствует фактор субъективности исследователя. Слишком высока ошибка за счет исследователя.
3. Основными компонентами криопротекторов для осетровых рыб являются: ДМСО и манит. Базовый раствор необходим для поддержания РН среды при введении разных составляющих. Сахарозы и яичный желток необходимы как энергетический запас для клеток после двойного термического шока (заморозка – разморозка).
4. Рецептуры разный криопротекторов отличаются соотношением основных компонентов.
5. Составы криопротекторов для русского осетра и севрюги оказались разными. Это свидетельствует о том, что последние являются видоспецифичными для спермы разных видов осетровых рыб. Исходя из этого, при криоконсервации спермы новых видов осетровых необходимо подбирать новый состав криопротектора.

Список использованной литературы

1. Абдуллаев М.А., Бакаев С.Б., Пославский А.Н. Экологические проблемы охраны живой природы. //М., 1990, т 1, с.75.
2. Андреев А.А., Петропавлов Н.Н. Генетические криобанки в проблеме сохранения биоразнообразия. //В. сб научных трудов «Консервация генетических ресурсов» Пущино. 1994, -С 35-81с.
3. Ананьев В.И., Гахова Э.Н., Катосонов В.Я., Ротт Н.Н., Цветкова Л.И. Концепция сохранения и устойчивого использования биоразнобразия с применением методов криоконсервации геномов гидробионтов. // М, 1997, с 1-36.
4. Ананьев В.И. Новые технологии криоконсервации биологических объектов для управления биоразнообразием в аквакультуре и природных популяциях. //Рыбное хоз-во. Сер. Аквакультура: Информационный пакет. ВНИЭРХ, 1997, вып. 1, с. 36-47.
5. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. //М. «Наука» 1989, -125 с.
6. Баранникова И.А., Никоноров С., Белоусов Л.Н. Проблема сохранения осетровых России современный период. /Международная конферен-ция «Осетровые рубеже 21 века». Астрахань. 11 -15 сент. 2000, Тезисы докладов. //Астрахань. 2000. - С. 7-8.
7. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. //М. «Высшая школа» 1987, 80с.
8. Брегман Ю.Э., Найденко Т.Х. Криоконсервация геномов гидробионтов. //Бюлл. Дальневосточного отдел. РАН. 1992, № 1-2. -С76-78.
9. Будыко М.И. Глобальная экология. // М., «Мысль» 1977, 126 с.
10. Букварева Е. Н. Сохранение генофонда животного мира и проблема минимальной численности популяции. //Консервация генетических ресурсов. Пущино, ОНТИ ПИЦ РАН. 1985г, 27с.
11. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Экспериментальные и теоретические предпосылки получения живых животных из клеток, несущих генетическую информацию. В серии: Консервация генетических ресурсов. //Пущино, ОНТИ ПНЦ РАН. 1980, 71с.
12. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Консервация генетических ресурсов. Информационный материал. //Пущино, 1981, – 24с.
13. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н Проблема сохранения генофонда. /М. «Знание». 1985, -С 1-59.
14. Вепринцев Б.Н,. Ротт Н.Н. Стратегия сохранения животного и растительного мира Земли. Консервация генетических ресурсов. //Пущино, ОНТИ ПНЦ РАН. 1991г. -с 5-35.
15. Вуд М., Уиттингхем Д., Ролл. Низкотемпературная консервация яиц и эмбрионов мыши. Биология развития млекопитающих. Методы. М., Мир. 323-356с. 1990г.
16. Гахова Э.Н. Митохондрии спермиев лягушки при замораживании. /В сб. «Биофизика живой клетки. //Пущино, 1994, т. 6, -С 47 - 55.
17. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А. Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы. // Проблемы криобиологии, № 2. 29-36с. 1994г.
18. Дьяконов Л.П. Основные достижения и перспективы развития клеточной биотехнологии. //Труды ВИЭВ. т.71. 1998.
19. Карамарова Л.И., Гахова Э.Н., Карнаухов В.Н. Гипометаболические факторы зимоспящих как возможные регуляторы резистентности клеток к низким температурам. / В сб. «Биофизика живой клетки. //Пущино, 1994, т. 6, -С 47- 55.
20. Карнаухов А.В. О роли биоразнообразия в сохранении климата Земли. // В сб. «Биофизика живой клетки. //Пущино, 1981, -С 34-54.
21. Карнаухов В.Н., Карнаухов А.В. Возможность экологической катиастрофы и снижения биоразнообразия в пресных водах Северной Америки. /В сб. «Биофизика живой клетки. //Пущино, 1994, т. 6, -С 17 – 20.
22. Карнаухов В.Н. Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды. //М «Наука» 2001, -186 с.
23. Курбатов А.Д., Платов Е.М., Корбан Н.В., Мороз Л.Г., Наук В.А. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. //Л.: Агропром-издат. Ленинградское отделение. 1998, 186 с.
24. Лозино–Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии. Адаптации и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам. //Л: Наука. 1972, 288с.
25. Малютин B.C. Проект федеральной программы по сохранению и устойчивому использованию осетровых рыб, включая комплекс мер по развитию искусственного воспроизводства и товарного осетроводства. Международная конференция "Осетровые на рубеже 21 века", Астрахань, 11—15 сент., 2000: Тезисы докладов. //Астрахань, 2000. — С. 12—14.
26. Межевикина Л.М., Каранова М.В. Использование антифризных гликопротеинов при замораживании в жидком азоте ранних зародышей мыши. //Известия. Акад. наук. Сер. биол. 1995. –С 113 - 145.
27. Мельников В.Н., Прямухина Н.В. О мерах по сохранению и восстановлению запасов осетровых в Каспийском бассейне. Международная конференция "Осетровые на рубеже 21 века", Астрахань, 11—15 сент., 2000. Тезисы докладов. //Астрахань. 2000. — С. 77—78.
28. Наук В.А., Борончук Г.В., Ротт Н.Н. Длительное сохранение спермы сельскохозяйственных и диких животных. //В. сб научных трудов «Консервация генетических ресурсов» Пущино. 1991, -С35-81.
29. Никитин В.А. Технология генетически идентичных близнецов. Возможности и перспективы. /В сб. «Биофизика живой клетки. //Пущино, 1994, т. 6, -С 56 - 61.
30. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.//Киев: Урожай.. 1978, 255с.
31. Павлов Д.С. Подходы к охране редких и исчезающих рыб. Информационный материал. //Научный центр РАН, Пущино, 1993, 126 с.
32. Розанов Р.М., Каримов Б.К. Экологические проблемы охраны живой природы, //М. «Высшая школа», 1990, т.1, с. 70.
33. Розанов С.И. Место генетических криобанков в решении проблемы сохранения биоразнообразия. /В сб. «Биофизика живой клетки. //Пущино, 1994,т.6, -С 8-13.
34. Ротт Н.Н. Создание генетических криобанков и использование методов биологии развития как способ сохранения редких видов. //М, Журнал ВНД, 1996, Т. 27. № 4, -С 45-48.
35. Ротт Н.Н. Создание генетических криобанков и использование методов биологии развития как способ сохранения редких видов животных. Криоконсервация спермы диких млекопитающих. // Онтогенез. 1995 т 26. №4. 270-281с.
36. Савушкина С.И. Влияние криоконсервации на подвижность сперматозоидов русского осетра (Acipensеr gueldenstadti br.) //2-й Междуна-родный симпозиум "Ресурсосберегательные технологии в аквакультуре", Адлер, 4—7 окт., 1999. //Матер. докладов. Краснодар, 1999. - С. 90.
37. Сулей М., Уилкокс Б. Биология охраны природы. //М., Мир, 1983, 430с.
38. Сулей М. Жизнеспособность популяций. //М., Мир 1989, 224 с.
39. Тихомиров А. М. Витвицкая Л. В. Курс лекций по дисциплине «осетроводство» часть 3. //Астрахань, АГТУ, 2001, 125 с.
40. Шпаро М.И. Криопротекторы. Криоконсервация клеточных суспензий. //Киев, «Наукова Думка, 1983. 289 с.
41. Яблоков А.В., Остроумов С.А. Охрана живой природы: проблемы и перспективы. //М., Лесн. пром., 1983г. 269с.
42. Fahy G.M. The relevance of cryopotectant “toxicity” to cryobiology. //”Cryobiology”, 1986, 23. –p. 1-13.
43. Grunina F.S., Neifakh F.F. Induced diploid androgenesis. //Phisiol/ end Gen. Biologi rev., 1997 v/ 13, part 1, -p. 73-103.
44. Somme L. Supercooling and winter survival in terresthal arthopods. //Comp. Biochem. Phisiol. 1982, 73A, -р. 519 – 543.