

А.С. Асылбекова^{1*}, Г.К. Барина¹,
А.Б. Маханбетова², Б.С. Сейсен², А.Д. Мусина¹

¹НАО Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина, Казахстан, Г. Нур-Султан

²АО «Республиканский центр по племенному делу
в животноводстве «Асыл түлік», Казахстан, с. Косшы

*e-mail: gamily-05@mail.ru

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК САМЦОВ КАРПА

В настоящее время криоконсервация репродуктивных клеток рыб является актуальным направлением в стратегии сохранения генетического биоразнообразия, а также развития рыбного хозяйства и аквакультуры. Научные исследования проводились в Научно-исследовательском центре «Рыбное хозяйство» НАО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина» и в АО «Республиканский центр по племенному делу в животноводстве «Асыл түлік» в 2021 году. В ходе исследований был изучен метод криоконсервации репродуктивных клеток самцов карпа с использованием двух видов криопротектора на основе 10% этиленгликоля и 10% диметилсульфидоксида. При проведении экспериментальных работ были использованы общепринятые методики по проведению бонитировки рыб и заморозки спермы карпа. Оценку качества спермы карпа проводили по 5-балльной шкале Персова. Также при оценке качества учитывались объем, концентрация спермы, время активности и подвижности спермиев карпа. В результате проведения научных исследований установлено, что использование криозащитной среды в составе 10% этиленгликоля оказывает положительный эффект в сравнении с ДМСО, так как он снижает осмотический и окислительный стресс, испытываемый клетками во время заморозки. Полученные результаты позволяют рекомендовать корректировку концентрации проникающих протекторов в криозащитном растворе в зависимости от количества внутриклеточной воды для повышения выживаемости репродуктивных клеток самцов рыб после двойного температурного шока. Результаты исследований дают возможность создать криобанк генофонда племенного материала карпа на рыбных заводах для сохранения генетического разнообразия этих промысловых объектов.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротектор, репродуктивные клетки, карп, сперма.

A.S. Assylbekova^{1*}, G.K. Barinova¹,
A.B. Makhanbetova², B.S. Seisenov², A.D. Mussina¹
¹S. Seifullin Kazakh Agro Technical University, Kazakhstan, Nur-Sultan
²Joint-Stock Company "Republican Center for Breeding
in Animal Husbandry" Asyl Tulik, Kazakhstan, Kosshy v.
*e-mail: gamily-05@mail.ru

Cryopreservation of male carp reproductive cells

Currently, cryopreservation of fish reproductive cells is an urgent direction in the strategy of preserving genetic biodiversity, as well as the development of fisheries and aquaculture, scientific research was carried out in the research center "Fisheries" of the «S.Seifullin Kazakh Agro Technical University» and in the JSC "Republican Center for Breeding in Animal Husbandry "Assyl Tulik" in 2021. During the research, the method of cryopreservation of male carp reproductive cells using two types of cryoprotector based on 10% ethylene glycol and 10% dimethyl sulfide oxide was studied. During the experimental work, the generally accepted methods for conducting fish bonitization and freezing carp sperm were used. The assessment of the quality of carp sperm was carried out on a 5-point Persov scale. Also, when assessing the quality, the volume, concentration of sperm, the time of activity and mobility of carp sperm were taken into account. As a result of scientific research, it was found that the use of a cryoprotective medium consisting of 10% ethylene glycol has a positive effect in comparison with DMSO, since it reduces the osmotic and oxidative stress experienced by cells during freezing. The obtained results allow us to recommend adjusting the concentration of penetrating protectors in the cryoprotective solution depending on the amount of intracellular water to increase the survival rate of male fish reproductive cells after a double temperature shock. The results of the research make it possible to create a cryobank

of the gene pool of carp breeding material at fish hatcheries to preserve the genetic diversity of these commercial objects.

Key words: cryopreservation, cryoprotector, reproductive cells, carp, sperm.

А.С. Асылбекова^{1*}, Г.К. Баринаева¹,
А.Б. Маханбетова², Б.С. Сейсенов², А.Д. Мусина¹

¹«С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» КеАҚ, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

²«Республикалық мал шаруашылығын асылдандыру

«Асыл түлік» АҚ, Қазақстан, Қосшы а.

*e-mail: gamily-05@mail.ru

Тұқы аталықтарының репродуктивті жасушаларының криоконсервациясы

Қазіргі уақытта балықтардың репродуктивтік жасушаларын криоконсервациялау генетикалық биоалуантүрлілікті сақтау, сондай-ақ балық шаруашылығы мен аквакультураны дамыту стратегиясында өзекті бағыт болып табылады. Ғылыми зерттеулер 2021 ж. «С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің» КеАҚ «Балық шаруашылығы» ғылыми-зерттеу орталығында және «Республикалық мал шаруашылығын асылдандыру «Асыл түлік» АҚ-да жүргізілді. Зерттеу барысында 10% этиленгликоль және 10% диметилсульфидоксид негізінде криопротектордың екі түрін қолдана отырып, аталық тұқы репродуктивті жасушаларын криоконсервациялау әдісі зерттелді. Эксперименттік жұмыстарды жүргізу кезінде балықтарды сұрыптау және тұқы шәуетін мұздату бойынша жалпы қабылданған әдістер қолданылды. Жыныс өнімдерінің сапасын бағалау Персовтың 5 балдық шкаласы бойынша жүргізілді. Сондай-ақ, сапаны бағалау кезінде ұрықтың көлемі, концентрациясы, тұқы сперматозоидтарының белсенділігі мен қозғалғыштығы ескерілді. Ғылыми зерттеулер жүргізу нәтижесінде этиленгликольдің 10% құрамында криопротекторлық ортаны пайдалану ДМСО-мен салыстырғанда оң әсер ететіні анықталды, өйткені ол мұздату кезінде жасушалар бастан кешіретін осмотикалық және тотықтырғыш стресті төмендетеді. Алынған нәтижелер қос температуралық соққыдан кейін аталық балықтардың репродуктивті жасушаларының өмір сүруін арттыру үшін жасушаішілік судың мөлшеріне байланысты криопротекторлық ерітіндідегі енетін протекторлардың концентрациясын түзетуді ұсынуға мүмкіндік береді. Зерттеу нәтижелері осы кәсіптік нысандардың генетикалық алуантүрлілігін сақтау үшін балық зауыттарында тұқы асыл тұқымды материалдарының криобанк гендік қорын құруға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: криоконсервация, криопротектор, репродуктивті жасушалар, тұқы, шәует.

Сокращения и обозначения

ДМСО – диметилсульфидоксид; NaHCO_3 – гидрокарбоната натрия; NaCl – хлорид натрия; KCl – хлорид калия; мл – миллилитр; с – секунд.

Введение

Один из побочных эффектов развития цивилизации – обеднение генофонда и в конечном счете гибель и исчезновение многих видов растений и животных. Пространства многих природных экосистем стремительно сокращаются, изменяются и разрушаются места обитания, уменьшается их численность и разнообразие. Эти процессы приняты особенно угрожающие масштабы с конца XX в. [1].

В настоящее время важнейшей задачей является сохранение генофонда редких и исчезающих популяций и видов рыб, особенно тех, которые представляют практический интерес для увеличения уловов рыб в естественных во-

доемах или для введения их в аквакультуру как перспективных объектов разведения [2].

Для сохранения и восполнения численности отдельных популяций рыб разработаны биотехнологии искусственного воспроизводства на различных рыбоводных предприятиях. В их основу положены принципы содержания и использования производителей из маточных стад, содержащихся на предприятии, что, в свою очередь, ограничивает число особей, скрещивающихся между собой, и приводит впоследствии к инбридингу [3].

Использование криоконсервации половых продуктов на заводах по искусственному воспроизводству, а также предприятиях аквакультуры, позволит получать генетически разнородное потомство, сократит площади и затраты на содержание самцов, тем самым позволив увеличить продуктивное стадо самок [4]. Применение криоконсервированных половых продуктов возможно в любое время, без риска несвоевременного созревания производителей или полу-

чения от них половых продуктов ненадлежащего качества.

В настоящее время в мировой практике исследований работы по сохранению и использованию замороженной спермы рыб ведутся достаточно широко [5-7]. За последние десятилетия научные знания о специфике процедур криоконсервации спермы рыб существенно пополнились [8-11]. Разработаны методы криоконсервации спермы более 250 видов различных рыб [12-18]. Это, в основном, зарубежные разработки, которые успешно применяют в аквакультуре этих стран для сохранения гетерогенности генофонда таких рыб как форель, карповые, сиговые (Норвегия, Франция, Турция, Америка, Япония) [19-24].

Однако в Казахстане применение методов криоконсервации репродуктивных клеток рыб в искусственном воспроизводстве не развито.

Таким образом, криоконсервация репродуктивных клеток рыб является актуальным направлением в стратегии сохранения генетического биоразнообразия, а также развития рыбного хозяйства и аквакультуры. Исходя из этого, исследования в данной области являются актуальными и требуют досконального изучения.

Цель исследования: применение методов криоконсервации половых продуктов карпа, и оценка качества половых продуктов до и после заморозки.

Материалы и методы исследования

Научно-исследовательская работа проводилась в 2021г. на базе научно-исследовательского центра «Рыбное хозяйство» кафедры охотоведения и рыбного хозяйства, Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина

Материалы для исследований были взяты в Карагандинском рыбопитомнике. Определение линейно-весовых показателей проводилось по стандартным методикам [25] статистическую обработку – по руководству Г.Ф. Лакина [26] и все расчеты проводились на ПК с применением программы «Excel» [27]. Материалом послужили половозрелые самцы карпа. Так же биоматериал после заморозки был изучен на качество в лаборатории АО «Республиканский центр по племенному делу в животноводстве «Асыл түлік»».

Качества спермы исследуемых объектов проводили по 5-бальной шкале Персова. При оценке качества спермы учитывали объем, консистенцию и цвет. Качество спермы, пригодной

для криоконсервации, определяли по времени жизни спермиев после ее активации. На предметное стекло наносили каплю спермы, затем разбавляли ее водой в соотношении 1:300, тем самым активируя сперматозоиды. Двигательную активность спермиев (время жизни) регистрировали на мониторе персонального компьютера с использованием видеоприставки под микроскопом при увеличении от 180 до 400 раз.

Низкотемпературное консервирование репродуктивных клеток самцов карпа проводили согласно разработанной методики астраханских ученых [3]. Однако в криозащитном растворе, содержание криопротекторов и введение базового раствора скорректировано ввиду того, что в качестве объекта исследования был выбран карп (*Cyprinus carpio*). Размораживали криопробирки в дистиллированной воде при температуре 38°C в течение 1 минуты. Для разморозки применяли водяную баню.

Для проведения экспериментальной работы применялись следующие материалы: сосуд Дьюара для хранения биологического материала в азоте, тринокулярный микроскоп с камерой и программным обеспечением CEROS компьютерной технологии системы CASA (IMV-technologies, Франция) для оценки качества дефростированной спермы рыб, микроскоп при увеличении x40 для оценки качества нативной спермы, криопробирки, водяная баня, секундомер, микропипетка. При заморозке использовались криопробирки Эппиндорфа с объемом 0,2мл и 1,9мл и полипропиленовые соломинки объемом 0,25мл. Использовали криопротекторы на основе: ДМСО (диметилсульфидоксид) и этиленгликоль (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительный состав криопротекторов на водном растворе, %

№ п/п	Наименование	Основа криопротектора	
		Этиленгликоль	ДМСО
1	NaCl	0,73	0,036
2	KCl	0,04	0,1
3	Сахароза	0,115	-
4	NaHCO ₃	0,23	0,002
5	Этиленгликоль	10	-
6	ДМСО	-	10

Криопротекторы отличались соотношением составляющих компонентов и в криопротекторе на основе этиленгликоля содержалась сахароза в составе 0,115%.

Результаты исследования и их обсуждения

Перед началом проведения научных исследований была проведена бонитировка производителей карпа Карагандинского рыбобитомника. Для проведения экспериментальной работы нами были отобраны производители из общего стада. Отбор проводили по следующим параметрам: масса тела, упитанность, размер, внешний вид (таблица 2). В общей сложности было отобрано 15 самцов. Длина тела в среднем составила: 65,9 см, длина тела без хвостового плавника 56,6 см, масса тела 4188 г, упитанность по Фультону 2,4. Длина головы в среднем составляет 24,38%.

Зрелые половые продукты самцов карпа получали после гормональной стимуляции путем сцеживания. Визуальная оценка качества спермы по цвету и консистенции проводилась во время отцеживания половых продуктов. Оценка

качества спермиев карпа по подвижности проводили под микроскопом по процентному отношению сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением к общему количеству сперматозоидов в поле зрения (рисунок 1,2).

Таблица 2 – Биологические показатели карпа Карагандинского рыбобитомника, n=15

Признаки	min-max	M±m
L, см	57-76	65,93±5,53
l, см	49-66	56,60±5,22
Q, г	3130-5185	4188,2±608,50
Fulton	1,83-2,89	2,36±0,30
В %		
lc, см	21,53-28,30	24,38±1,37

Примечание: * L – общая длина рыбы; l-длина тела без хвостового плавника; Q – полная масса, Fulton – коэффициент упитанности по Фультону, lc – длина головы.

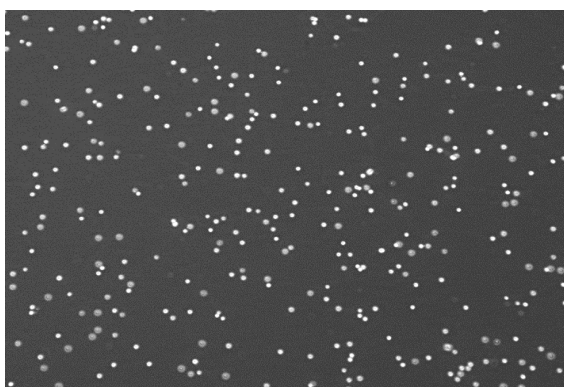


Рисунок 1 – Нативная сперма карпа

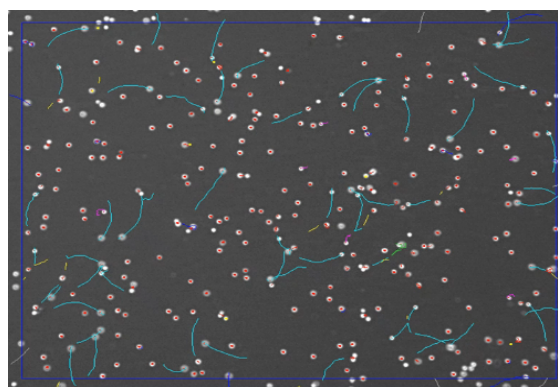


Рисунок 2 – Подвижность спермы карпа

Таблица 3 – Оценка качества свежеполученной спермы карпа в зависимости от скорости выживания и подвижности спермиев карповых рыб

Группы рыб	Объем, мл	Концентрация, в млн/мм ³	Подвижность спермиев, %	Скорость выживаемости спермиев, с	Качество спермы в баллах
1 (смесь спермы 3 самцов)	108±0,1	21,10±0,45	90±0,3	70±0,12	5
2 (смесь спермы 2 самцов)	58±0,2	20,50±0,28	87±0,5	65±0,11	5
3 (смесь спермы 2 самцов)	55±0,4	20,75±0,39	93±0,2	75±0,05	5
4 (смесь спермы 2 самцов)	63±0,2	20,68±0,51	83±0,2	60±0,13	5
5 (смесь спермы 3 самцов)	80±0,3	22,01±0,25	86±0,3	62±0,11	5
6 (смесь спермы 3 самцов)	95±0,1	20,11±0,31	92±0,1	75±0,12	5

Для эксперимента по криоконсервации были отобраны образцы спермы со 100%-ной подвижностью.

Для проведения исследований были выбраны 15 самцов карпа, отобрано путем сцеживания от 20мл до 50мл спермы от каждого самца карпа. В последующем от спермы 15 самцов после оценки нативной спермы по подвижности сформированы 6 групп (в 1 группу входила сперма по 2 -3 самца). Оценка качества свежеполученной спермы карпа представлена в таблице 3.

В таблице 3 представлены основные качественные показатели свежеполученной спермы карпа, полученные путем сцеживания, из образцов сперм сгруппированы для дальнейшей заморозки, при котором учитывались качественные показатели спермы каждого самца.

Процесс замораживания спермы карпа производился по следующей схеме: разбавление спермы с криозащитной средой, эквilibрация, замораживание, дефростирование. Разбавление спермы карпа с криопротектором производилось в соотношении 1:1. Криозащитная среда добавлялась медленно при непрерывном помешивании. Во время проведения заморозки спермы карпа было использовано 2 вида криопротектора. Первый криопротектор состоял из водного раствора, содержащий 0,73% хлорида натрия, 0,04% хлорида калия, 0,0115% сахарозы, 0,23% гидрокорбаната натрия и 10% этиленгликоля. Второй криопротектор состоял из водного раствора, содержащий 0,036% хлорида натрия, 0,1% хлорида калия, 0,002% гидрокорбаната натрия и 10% ДМСО. Полученную смесь спермы разлили

по криопробиркам и замораживали, применяя ступенчатое замораживание в парах жидкого азота. Замораживание осуществляли в три этапа: 6 °С/мин в течение 6 минут, 10 °С/мин, в течение 4 минут, а затем плавно погружали в жидкий азот, находящийся в сосуде Дьюара. Размораживание спермы осуществляли, извлекая пробирки с замороженной спермой из жидкого азота и помещая их в водяную баню с температурой 38-40°С, одновременно встряхивали в течение 20-40с до появления в них жидкой фазы. В замороженных образцах определяли количество подвижных сперматозоидов.

Во время проведения научных исследований нами был создан банк половых продуктов самцов карпа, отобранных в Карагандинском рыбопитомнике. Половые продукты (молоки) были помещены в сосуды Дьюара заполненные жидким азотом. Температура хранения половых продуктов в жидком азоте составляла -196°С.

Оценку качества спермы карпа проводили перед замораживанием на нативной сперме и после на дефростированной сперме, затем через час и через месяц после заморозки. При изучении качества спермы применялся метод определения по 5 бальной шкале Персова.

За активностью спермиев следили через тринокулярный микроскоп с камерой и программным обеспечением CEROS компьютерной технологии системы CASA (IMV-technologies, Франция). Продолжительность активности сперматозоидов измеряли секундомером.

Показатели качества спермы карпа до заморозки и после с применением криопротектора этиленгликоль 10% отображены в таблице 4.

Таблица 4 – Оценка качества спермы на основе криопротектора с 10% этиленгликолем

Оценка качества	Нативная сперма	После замораживания	Через час после заморозки	Через месяц после заморозки
По шкале Персова	5	4	4	4
Время активности, с	71	66	54	51

Как видно на таблице 4 до заморозки активность спермиев составляла 5 баллов по шкале Персова, это означает что сперма отличного качества (заметна подвижность всех спермиев), а после этот показатель снизился до 4. По времени активности спермиев, так же показывают отличный результат. Возможно это связано с добавлением сахарозы. Ведь базовый раствор благоприятно

влияет на среду обитания спермиев как до заморозки проникая внутрь клетки, предотвращая разрушение при глубокой заморозке, а также после размораживания являясь питательной средой для клеток после температурного шока.

Показатели качества спермы карпа до заморозки и после с применением криопротектора ДМСО отображены в таблице 5.

Таблица 5 – Оценка качества спермы на основе криопротектора с ДМСО 10%

Оценка качества	Нативная сперма	После замораживания	Через час после заморозки	Через месяц после заморозки
По шкале Персова	5	4	4	4
Время активности, с	69	61	48	46

Как видно из таблицы 5, дефростированная сперма карпа с содержанием криопротектора ДМСО 10% имеют оценку 4 балла. По времени активности спермы мы так же наблюдаем из-

менения в пробах после размораживания, время жизни спермиев сократилось на 23 секунды.

Время активности спермиев наглядно отображено на рисунке 3.

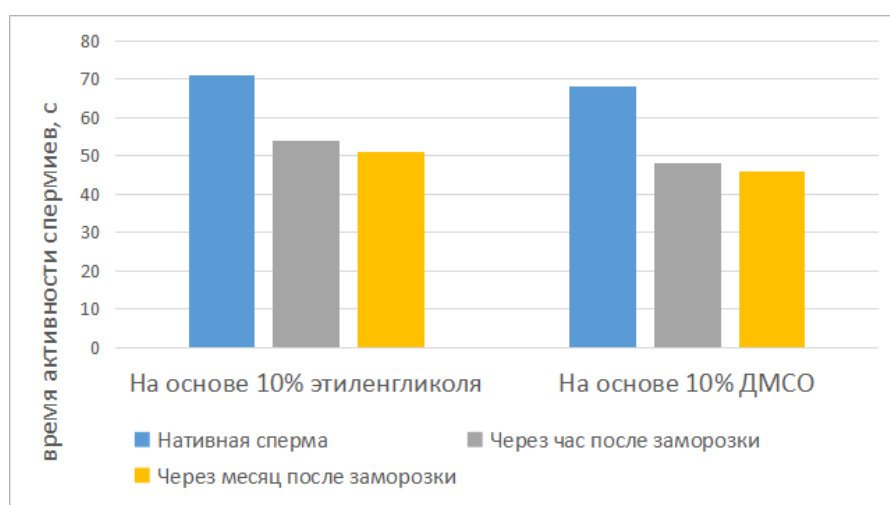


Рисунок 3 – Время активности спермиев до заморозки и после размораживания

Сравнивая эти показатели можно сделать вывод, что использование криопротектора на основе 10% этиленгликоля является наиболее оптимальным, по сравнению с 10% содержанием ДМСО. Исходя из данных диаграммы можно

утверждать, что способность к выживанию спермиев с добавлением базового раствора для криоконсервации в составе сахарозы, увеличивается.

Оценка качества дефростированной спермы приведена на рисунках 4 и 5.

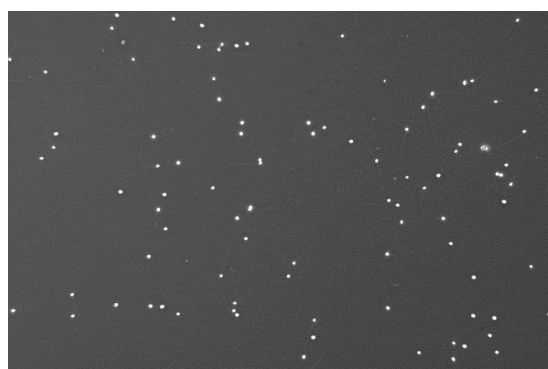


Рисунок 4 – Дефростированная сперма карпа на основе этиленгликоля

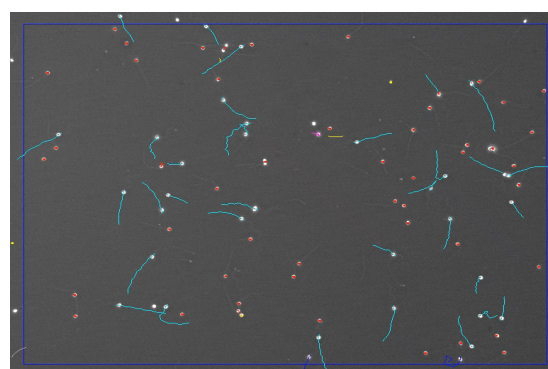


Рисунок 5 – Подвижность дефростированной спермы карпа на основе этиленгликоля

Как видно из рисунков 4 и 5 подвижность и жизнеспособность сперматозоидов были в пределах 4 баллов, со временем активности 51-54с, замороженных криопротектором на основе 10% этиленгликоля.

Таким образом использование 10% этиленгликоля в сравнении с 10% ДМСО является более эффективным для замораживания спермы карпа, так как он снижает осмотический и окислительный стресс, испытываемый клетками во время криоконсервации.

Заключение

Криоконсервация остается одним из наиболее привлекательных и быстроразвивающихся направлений сохранения редких и исчезающих видов. Наличие в криобанке генофонда племенного материала рыб на рыбоводных заводах позволяет с максимальным эффектом сохранить генетическое разнообразие этих промысловых объектов.

По результатам оценки качества половых клеток до и после замораживания спермы карпа, было установлено, что способность к выживанию спермиев с использованием криораствора 10% этиленгликоля с добавлением сахарозы выше, чем показатели качества спермы карпа до заморозки и после с применением криопротектора ДМСО 10%.

Таким образом использование этиленгликоля с сахарозой в сравнении с ДМСО является более эффективным для замораживания спермы карпа, а также увеличивает вероятность благополучного оплодотворения и выхода жизнеспособных особей карпа.

В результате проведения научных исследований установлена эффективность снижения

объемов отравляющих веществ в составе криозащитной среды для сперматозоидов карпа, что в свою очередь уменьшило токсическое действие последней на объект. Полученные результаты позволяют рекомендовать корректировку концентрации проникающих протекторов в криозащитном растворе в зависимости от количества внутриклеточной воды для повышения выживаемости репродуктивных клеток самцов рыб после двойного температурного шока.

Криоконсервация спермы карповых рыб при использовании криопротектора на основе с 10% этиленгликоля и получение вполне жизнеспособного потомства из области одиночных лабораторных экспериментов переходит в разряд высокотехнологичной аквакультуры.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Благодарности

Авторы статьи выражают свою благодарность руководству Карагандинского рыбопитомника за оказание помощи при получении спермы карпа в период нереста.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования молодых ученых по научно-техническим проектам на 2021-2023 годы по теме «Создание криобанка репродуктивных клеток ценных видов рыб Казахстана».

Литература

- 1 Бапсанова, А.М. Криоконсервация генетического материала для сохранения редких и исчезающих видов животных / А.М. Бапсанова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 1. – С. 79.
- 2 Ананьев, В.И. К вопросу о создании национальной системы генофондных коллекций рыб и других гидробионтов России для аквакультуры и сохранения редких и исчезающих видов: правовые и нормативно-методологические аспекты / В.И. Ананьев, М.С. Манохина // Ветеринарная патология. – 2007. – № 1. – С. 19-24.
- 3 Белая М.М., Красильникова А.А., Пономарева Е.Н. Разработки южного научного центра РАН в области криоконсервации репродуктивных клеток рыб // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т. 20, № 5(2), 2018 – С. 280-286.
- 4 Чипинов, В.Г. Экономическая эффективность использования криоконсервированной спермы при выращивании осетровых видов рыб / В.Г. Чипинов, М.М. Богатырева // Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения: материалы Международной научной конференции (27-30 сентября 2011 г., Ростов-на-Дону). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 133-135.

- 5 Бех В.В. Крיוконсервация спермы карпов украинских пород // Докл. Межд. конф. «Сохранение генетических ресурсов», Санкт-Петербург, 19-22 октября 2004. Цитология. – 2004. Т. 46, № 9. – С. 769-770.
- 6 Горбунов Л.В., Филипов В.Ю., Бучацкий Л.П. Воспроизводимость результатов оплодотворения ооцитов деконсервированными спермиями карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Биотехнология. – 2010. Т. 3, № 6. – С. 80-84.
- 7 Матишов Г.Г., Пономарева Е.Н., Белая М.М. Сохранение генетического разнообразия рыб методами низкотемпературного консервирования // Рыбное хозяйство. – 2012. № 3. – С. 59-62
- 8 Bernath G., Zarski D, Kása E., Staszny Á., Várkonyi L., Kollár T., Hegyi Á., Bokor Z., Urbányi B., Horváth Á. Improvement of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cryopreservation using a programmable freezer // *General and Comparative Endocrinology*. – 2016. V. 237. – P. 78-88.
- 9 Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M., Li P., Hulak M., Gela D, Linhart O. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Cryobiology*. – 2009. V 59. – P. 291-296.
- 10 Boryshpolets S., Sochorova D., Rodina M., Linhart O., Dzyuba B. Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm: impact of seeding and freezing rates on post-thaw outputs // *Biopreserv and Biobanking*. – 2017. V. 15, 3. – P. 234-240.
- 11 Bozkurt Y., Yavas I. Effect of different straw volumes and thawing rates on post-thaw quality and fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) sperm // *LIMNOFISH – Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*. – 2017. V 3 N 1. – P 25-31.
- 12 Bozkurt Y., Yavas I., Yildiz C. Effect of extender supplemented with different sugar types on post-thaw motility, viability and fertilizing ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) // *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh, IJA*. – 2016. V. 68. – P. 1334.
- 13 Dietrich M.A., Irnazarow I., Ciereszko A. Proteomic identification of seminal plasma proteins related to the freezability of carp semen // *Journal of Proteomics*. – 2017. V. 162. – P. 52-61.
- 14 Dzyuba B., Cosson J., Yamaner G., Bondarenko O., Rodina M., Gela D., Bondarenko V., Shaliutina A., Linhart O. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa // *Cryobiology*. – 2013. V. 66. – P. 192-194.
- 15 Horokhovatskiy Y., Sampels S., Cosson J., Linhart O., Rodina M., Fedorov P., Blecha M., Dzyuba B. Lipid composition in common carp (*Cyprinus carpio*) sperm possessing different cryor // *Cryobiology*. – 2016. V 73. P282-285.
- 16 Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm // *Cryobiology*. – 2007. V. 54. P. 251-257.
- 17 Irawan H., Vuthiphandchai V., Nimrat S. The effect of ext, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm // *Anim. Reprod. Sci.* 2010. V 122 P 236-243.
- 18 Kutluyer F., Öğretmen F., İnanan B.E. Cryopreservation of goldfish (*Carassius auratus*) spermatozoa: Effects of extender supplemented with taurine on sperm motility and DNA damage // *CryoLetters*. 2016. V.37., N 1. – P. 41-46.
- 19 Li P., Hulak M., Koubek P., Sulc M., Dzyuba B., Boryshpolets S., Rodina M., Gela D., Manaskova-Postlerova P., Peknicova J., Linhart O. Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. // *Theriogenology*. – 2010. V. 74. – P. 413-423.
- 20 Li P., Li Z., Dzyuba B., Hulak M., Rodina M., Linhart O. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on Common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm caused by cryopreservation techniques // *Biol. Reprod.* – 2010. V. 83. – P. 852-858
- 21 Magyary I., Urbányi B., Horváth Á., Dinnyes A. Cryopreservation of gametes and embryos of Cyprinid fishes. Cryopreservation in Aquatic Species, 2 ndEd. Ed. Tiersch T.R., Green Ch.C. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. 2011. – P. 525-538.
- 22 Öğretmen F., İnanan B.E. Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*cyprinus carpio*) // *CryoLetters*. – 2014. V. 35, № 5. – P. 427-437.
- 23 Öğretmen F., İnanan B.E., Kutluyer F., Kayim M. Effect of semen extender supplementation with cysteine on post-thaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*) // *Theriogenology*. – 2015. V.83, N9. – P. 1548-1552.
- 24 Yavas I., Bozkurt Y., Yildiz C. Cryopreservation of scaly carp (*Cyprinus carpio*) sperm: effect of different cryoprotectant concent post-thaw motility, fertilization and hatching success of embryos // *Aquacult. Int.* – 2014. V. 22. – P. 141-148.
- 25 Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. – М.: Пищевая промышленность, 1966. – 376 с.
- 26 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш.школа, 1990. – 352 с.
- 27 Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных. – Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2007. – 76 с.

References

- 1 Anan'ev, V.I. K voprosu o sozdanii nacional'noj sistemy genofondnyh kolekcij ryb i drugih gidrobiontov Rossii dlja akvakul'tury i sohraneniya redkih i ischezajushhih vidov: pravovye i normativnometodologicheskie aspekty / V.I. Anan'ev, M.S. Manohina // *Veterinarnaja patologija*. – 2007. – № 1. – S. 19-24.
- 2 Bapsanova, A.M. Kriokonservacija geneticheskogo materiala dlja sohraneniya redkih i ischezajushhih vidov zhivotnyh / A.M. Bapsanova // *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij*. – 2012. – № 1. – S. 79.
- 3 Beh V.V. Kriokonservacija spermy karpov ukrainskih porod // *Dokl. Mezhhd. konf. «Sohranenie geneticheskikh resursov»*, Sankt-Peterburg, 19-22 oktjabrja 2004. *Citologija*. 2004. T. 46, № 9. S.769-770.

- 4 Belaja M.M., Krasil'nikova A.A., Ponomareva E.N. Razrabotki juzhnogo nauchnogo centra RAN v oblasti kriokonservacii reproduktivnyh kletok ryb / *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*, t. 20, № 5(2), 2018 – S 280-286.
- 5 Bernath G., Zarski D, Kása E., Staszny Á., Várkonyi L., Kollár T., Hegyi Á., Bokor Z., Urbányi B., Horváth Á. Improvement of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cryopreservation using a programmable freezer // *General and Comparative Endocrinology*. 2016. V.237. P 78-88.
- 6 Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M., Li P., Hulak M., Gela D, Linhart O. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Cryobiology*. 2009. V 59. P291-296.
- 7 Boryshpolets S., Sochorova D., Rodina M., Linhart O., Dzyuba B. Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm: impact of seeding and freezing rates on post-thaw outputs // *Biopreserv and Biobanking*. 2017. V. 15, 3. P. 234-240.
- 8 Bozkurt Y., Yavas I. Effect of different straw volumes and thawing rates on post-thaw quality and fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) sperm // *LIMNOFISH – Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*. 2017. V 3 N 1. P 25-31.
- 9 Bozkurt Y., Yavas I., Yildiz C. Effect of extender supplemented with different sugar types on post-thaw motility, viability and fertilizing ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) // *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh, IJA*. 2016. V. 68. P. 1334.
- 10 CHipinov, V.G. JEkonomicheskaja jeffektivnost' ispol'zovanija kriokonservirovannoj spermy pri vyrashhivanii osetrovyh vidov ryb / V.G. CHipinov, M.M. Bogatyreva // *Aktual'nye problemy obespechenija prodovol'stvennoj bezopasnosti juga Rossii: innovacionnye tehnologii dlja sohraneniya biosursov, plodorodija pochv, melioracii i vodoobespechenija: materialy Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii (27-30 sentjabrja 2011 g., Rostov-na-Donu)*. – Rostov-na-Donu: Izd-vo JUNC RAN, 2011. – S. 133-135.
- 11 Dietrich M.A., Irnazarow I., Ciereszko A. Proteomic identification of seminal plasma proteins related to the freezability of carp semen // *Journal of Proteomics*. 2017. V. 162. P. 52-61.
- 12 Dzyuba B., Cosson J., Yamaner G., Bondarenko O., Rodina M., Gela D., Bondarenko V., Shaliutina A., Linhart O. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa // *Cryobiology*. 2013. V. 66. P192-194.
- 13 Gorbunov L.V., Filipov V.JU., Buchackij L.P. Vosproizvodimost' rezul'tatov oplodotvorenija oocitov dekonservirovannymi spermijami karpa (*Syprinus carpio* L.) // *Biotehnologija*. 2010. T. 3, № 6. S. 80-84.
- 14 Horokhovatskiy Y., Sampels S., Cosson J., Linhart O., Rodina M., Fedorov P., Blecha M., Dzyuba B. Lipid composition in common carp (*Cyprinus carpio*) sperm possessing different cryor // *Cryobiology*. 2016. V 73. P282-285.
- 15 Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm // *Cryobiology*. 2007. V.54. P251-257.
- 16 Irawan H., Vuthiphandchai V., Nimrat S. The effect of ext, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm // *Anim. Reprod. Sci*. 2010. V 122 P 236-243.
- 17 Korosov A. V., Gorbach V. V. Komp'juternaja obrabotka biologicheskikh dannyh. –Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU,– 2007, –76 s.
- 18 Kutluyer F., Öğretmen F., İnanan B.E. Cryopreservation of goldfish (*Carassius auratus*) spermatozoa: Effects of extender supplemented with taurine on sperm motility and DNA damage // *CryoLetters*. 2016. V.37., N 1. P41-46.
- 19 Lakin G.F. *Biometrija – M.: Vyssh.shkola*, 1990.-352 s.
- 20 Li P., Hulak M., Koubek P., Sulc M., Dzyuba B., Boryshpolets S., Rodina M., Gela D., Manaskova-Postlerova P., Peknicova J., Linhart O. Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. // *Theriogenology*. 2010. V. 74. P. 413-423.
- 21 Li P., Li Z., Dzyuba B., Hulak M., Rodina M., Linhart O. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on Common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm caused by cryopreservation techniques // *Biol. Reprod*. 2010. V. 83. P. 852-858
- 22 Magyary I., Urbányi B., Horváth Á., Dinnyes A. Cryopreservation of gametes and embryos of Cyprinid fishes. *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2 ndEd. Ed. Tiersch T.R., Green Ch.C. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. 2011. P. 525-538.
- 23 Matishov G.G., Ponomareva E.N., Belaja M.M. Sohranenie geneticheskogo raznoobrazija ryb metodami nizkotemperaturnogo konservirovaniya // *Rybnoe hozjajstvo*. 2012. № 3. S. 59-62.
- 24 Öğretmen F., İnanan B.E. Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*cyprinus carpio*) // *CryoLetters*. 2014. V. 35, № 5. P. 427-437.
- 25 Öğretmen F., İnanan B.E., Kutluyer F., Kayim M. Effect of semen extender supplementation with cysteine on post-thaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*) // *Theriogenology*. 2015. V.83, N9. P. 1548-1552.
- 26 Pravdin I.F. *Rukovodstvo po izucheniju ryb. – M.: Pishhevaja promyshlennost'*, 1966. – 376 s.
- 27 Yavas I., Bozkurt Y., Yildiz C. Cryopreservation of scaly carp (*Cyprinus carpio*) sperm: effect of different cryoprotectant concentr post-thaw motility, fertilization and hatching success of embryos // *Aquacult. Int*. 2014. V. 22. P. 141-148.