

Аквакультура

УДК 639.3.034.2

doi: 10.15389/agrobiology.2018.4.762rus

ПОЛУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОЙ МОЛОДИ РУССКОГО ОСЕТРА (*Acipenser gueldenstaedtii*) ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ И ОЦЕНКА ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У КРИОПОТОМСТВА*А.А. КРАСИЛЬНИКОВА¹, А.М. ТИХОМИРОВ²

Криоконсервирование репродуктивных клеток самцов рыб — актуальное направление в стратегии сохранения генетического биоразнообразия и в аквакультуре. Жизнеспособность криоконсервированной спермы обычно подтверждают оплодотворением яйцеклеток рыб в лабораторных условиях, но дальнейших наблюдений за полученной молодью не проводят. В настоящем исследовании впервые проанализированы поведенческие реакции предличинок, личинок и молоди русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* von Brandt & Ratzeburg 1833) при использовании размороженной спермы для оплодотворения икры и доказана физиологическая полноценность развивающихся особей. Икру получали в производственных условиях от самки русского осетра массой 20 кг и длиной 142 см, рабочая плодовитость — 229500 икринок. Одну часть икры оплодотворили размороженной спермой русского осетра, хранившейся в криобанке 2 года, другую — нативной спермой по стандартной заводской технологии (контроль). Вылупившихся предличинок учитывали сплошным поштучным методом. Поведенческие реакции особей, полученных по традиционной технологии, и криомолоди оценивали с применением теста «открытое поле», который проводили индивидуально, помещая объект (предличинку, личинку, молодь) в специальную установку с координатной сеткой. Определяли ориентировочную активность объекта, фоновую активность и двигательную активность в первые 30 с после воздействия различных раздражителей (свет 20 лк, низкочастотный прямоугольный сигнал частотой 20 Гц, яркий свет 100 лк, высокочастотный прямоугольный сигнал 300 Гц, воздействие виброакустическим раздражителем). При оплодотворении икры спермой, отогретой после замораживания, доля оплодотворения в опытной партии составила 50 %, в контрольной — 80 %. Смертность за период подращивания в опыте и контроле составила соответственно 7 и 5 %. Полученная криомолодь оказалась жизнеспособной. По морфометрическим показателям экземпляры предличинок (1 сут), личинок (8 сут) и молоди (15 сут) в опыте превосходили контроль. По реактивности центральной нервной системы и рецепторного комплекса криопотомство также иногда превосходило контрольную партию. В тесте «открытое поле» предличинки из контрольной группы проявляли низкую ориентировочную активность, демонстрируя реакцию затаивания, которая переходила в медленные передвижения по опытной установке. Предличинки из опытной группы вели себя более активно. Реакции на разного рода раздражители статистически не различались. Личинки, полученные с использованием замороженной и отогретой спермы, после перехода на смешанное питание (8-е сут) по характеру реакции центральной нервной системы достоверно не отличались от контроля, за исключением реакции на яркий свет ($p \leq 0,05$). На 15-е сут развития особи в обоих вариантах опыта адекватно реагировали на воздействие раздражители классической реакцией затаивания. При анализе ответных реакций на раздражители были установлены значимые различия ($p \leq 0,05$) как в контроле, так и в опыте. Это указывало на начало формирования межнейронных связей в продолговатом мозге. Значимых различий между группами выявлено не было. Таким образом, применение спермы из криобанка позволяет получать жизнестойкую молодь рыб и может быть рекомендовано для использования на государственных заводах при искусственном воспроизводстве и на частных предприятиях аквакультуры.

Ключевые слова: осетровые рыбы, *Acipenser gueldenstaedtii*, русский осетр, сперма, криоконсервация, криопотомство, предличинка, личинка, молодь, поведение.

В настоящее время актуально сохранение генофонда редких и исчезающих популяций и видов рыб, особенно тех, которые представляют практический интерес для увеличения уловов в естественных водоемах или для введения их в аквакультуру как перспективных объектов рыборазведе-

* Работы выполнены с использованием УНУ «МУК» ЮНЦ РАН и Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602 в рамках реализации ГЗ ЮНЦ РАН на 2018 год «Оценка современного состояния, анализ процессов формирования водных биоресурсов южных морей России в условиях антропогенного стресса и разработка научных основ технологии реставрации ихтиофауны, сохранения и восстановления хозяйственно ценных видов рыб». № госрегистрации 01201354245 и Гранта Президента РФ МК-115.2017.11, № АААА-А17-117051110132-5.

ния (1-3). Одним из основных источников формирования и поддержания запасов редких, исчезающих и хозяйственно ценных видов рыб становится их искусственное воспроизводство (4, 5). Однако на рыбоводных заводах подход к формированию маточных стад упрощен из-за дефицита производителей. Использование близкородственных пар при скрещивании чревато инбридингом и потерей природного генетического полиморфизма, что ведет к значительному снижению адаптивного потенциала популяции (6-8).

Криотехнологии считаются стратегически важными, в том числе антикризисными, для сохранения биологического разнообразия рыб (9, 10). Прогресс в технологиях криоконсервирования расширит сферу их применения в рыбном хозяйстве и аквакультуре, позволит поддерживать генетическое разнообразие промысловых стад рыб, стабилизировать их воспроизводство и тем самым будет способствовать устойчивому рыболовству, а также создаст предпосылки для роста производства рыбы и других гидробионтов в хозяйствах аква- и марикультуры (11-13). Использование криоконсервированной спермы позволит получать генетически разнородную молодь, сократить затраты и площади на содержание самцов. Как следствие, будет увеличено количество самок в маточном стаде (14-16). Применение спермы из криобанка возможно в любое время года, что исключает риск несвоевременного созревания самцов или получения от них эякулята ненадлежащего качества (17, 18).

Накопленные данные по криоконсервированию биологических объектов свидетельствуют о том, что длительное хранение генетического биоматериала в криобанке не оказывает существенного влияния на сохранность клеток (19-21). При этом жизнеспособность криоконсервированной спермы обычно подтверждают оплодотворением яйцеклеток рыб в лабораторных условиях (22-24), но дальнейших наблюдений за молодь не проводят.

В настоящей работе впервые проанализированы поведенческие реакции предличинок, личинок и молоди русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* von Brandt & Ratzeburg 1833) полученные при использовании криоконсервированной спермы и доказана физиологическая полноценность развивающихся особей.

Целью работы было применение размороженной спермы при искусственном воспроизводстве русского осетра и оценка поведенческих реакций у криопотомства.

Методика. Работу выполняли в период нерестовой кампании на Александровском осетровом рыбноводном заводе (Астраханская обл.). Икру получали от самки русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) массой 20 кг и длиной 142 см, рабочая плодовитость — 229500 икринок. Одну часть икры оплодотворили дефростированной спермой русского осетра, хранившейся в криобанке 2 года, другую — нативной спермой по стандартной заводской технологии (контроль). Обесклеивание оплодотворенной икры осуществляли танином из расчета 1 г на 5 л воды (25). Икру инкубировали в аппарате Осетр (Россия) в течение 6 сут. Во время инкубации ее обрабатывали органическим красителем (фиолетовый К) чтобы избежать заражения сапролегниозом (25). Вылупившихся предличинок учитывали сплошным поштучным методом. Предличинок выдерживали в прямоугольных бассейнах объемом 250 л. При помощи компрессора воду обогащали кислородом. Молодь, перешедшую на активное питание, кормили дафнией.

У предличинок (1-е сут после вылупления), личинок (8-е сут), перешедших на активное питание, и молоди (15-е сут) учитывали морфометрические показатели (массу и длину).

Поведенческие реакции особей, полученных по традиционной тех-

нологии, и криомолоды оценивали с применением теста «открытое поле» (26, 27). Тест проводили индивидуально, помещая исследуемый объект (предличинку, личинку, молодь) в специальную установку с нанесенной координатной сеткой. При размещении объекта в устройство для проведения теста «открытое поле» сначала определяли его ориентировочную активность в течение 3 мин (ОА, ед/мин), регистрируя число пересечений объектом координатных линий установки. Двигательную активность с 4-й по 7-ю мин принимали за фоновую (ФА, ед/мин). Первым раздражителем был свет (освещенность 20 лк), который включали на 7-й мин тестирования. Освещенность измеряли с помощью люксметра. Величину двигательной активности в первые 30 с после воздействия раздражителя (число пересечений линий координатной сетки) определяли как P1, ед/мин. Через 9 мин после начала опыта применяли второй раздражитель (P2, ед/мин) — низкочастотный прямоугольный сигнал (частота 20 Гц). На 11-й мин включали яркий свет (100 лк) — P3, ед/мин. Через 13 мин от начала тестирования применяли воздействие высокочастотным прямоугольным сигналом (300 Гц) — P4, ед/мин. Виброакустический раздражитель (P5, ед/мин) использовали на 15-й мин исследования. Тестировали по 10 особей из опытной и контрольной групп на трех этапах развития: предличинка (1-е сут после вылупления), личинка, которая перешла на активное питание (8-е сут после вылупления) и молодь (15-е сут после вылупления).

В программе Microsoft Excel для показателей рассчитывали средние арифметические (M) и средние квадратичные отклонения (σ). Статистическую значимость различий устанавливали по t -критерию Стьюдента (28).

Результаты. Доля подвижных клеток в нативной сперме составила 90 %, в криоконсервированной — 60 %; время подвижности спермиев после размораживания спермы — 14,2 мин, в нативной сперме — 26,3 мин; доля оплодотворения в опытной партии — 50 %, в контрольной — 80 %. За период подращивания смертность в опытных и контрольных группах существенно не различалась и составила соответственно 7 и 5 %.

Динамика морфометрических показателей у потомства русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* von Brandt & Ratzeburg 1833) при оплодотворении икры криоконсервированной (опыт) и нативной (контроль) спермой ($M \pm \sigma$)

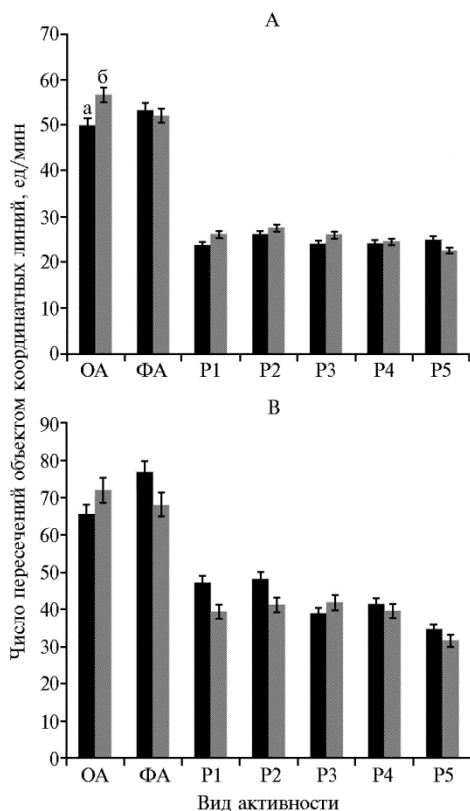
Этап развития	Масса, мг		Длина, мм	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Предличинка (возраст 1 сут)	18,9±0,28	20,5±0,22*	12,3±0,21	14,2±0,2*
Личинка, перешедшая на активное питание (8 сут)	28,2±0,55	35,0±0,30*	20,7±0,21	21,4±0,34
Молодь (15 сут)	43,8±0,33	47,5±0,33*	24,0±0,15	25,2±0,13*

Примечание. Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,001$.

Согласно результатам измерений предличинок (1-е сут), экземпляры из опытной группы по морфометрическим показателям превосходили контроль (табл.). Были установлены статистически значимые различия ($p \leq 0,001$) как по массе, так и по длине исследуемых особей. При сравнении личинок, которые перешли на активное питание (8 сут), выявили значимые различия ($p \leq 0,001$) между массой в опыте и контроле, но длина личинок в этих вариантах не различалась. У молоди (15 сут) в опытной партии сохранялась тенденция превосходства над контрольными особями по массе и длине.

Любой организм, попадая в незнакомую обстановку и ориентируясь в пространстве, начинает проявлять повышенную двигательную активность. Согласно данным литературы, после вылупления у предличинок сформирован рецепторный комплекс, но без адекватной информации из внешней среды продолговатый мозг не может нормально развиваться (29).

Именно в продолговатом мозге сосредоточены основные анализаторы систем, ответственных за взаимосвязь особи со средой (системы боковой линии, статоакустические органы, вкусовые рецепторы), а также центры нейромоторных реакций, питания и дыхания (30). В этой связи мы оценили качество особей, полученных с использованием криоконсервированной и нативной спермы, на основании сравнения их поведенческих реакций.



Активность в тесте «открытое поле» у предличинки (1-е сут после вылупления, А), личинки (8-е сут после вылупления, Б) и молоди (15-е сут после вылупления, В) русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* von Brandt & Ratzeburg 1833), полученной из икры, которая была оплодотворена нативной (а) и криоконсервированной (б) спермой: ОА — ориентировочная активность, ФА — фоновая активность, P1-P5 — двигательная активность в первые 30 с после воздействия различных раздражителей. Описание раздражителей см. в разделе «Методика».

В тесте «открытое поле» предличинки из контрольной группы проявляли низкую ориентировочную активность, демонстрируя реакцию затаивания, которая переходила в медленные передвижения по опытной установке (рис.). Предличинки из опытной группы вели себя более активно, показывая классическую реакцию при изучении незнакомой обстановки, которая характерна для особей различных эволюционных групп. Не было выявлено значимых различий между ориентировочной и фоновой активностью ни в контрольной группе, ни в опытной. Реакции на различные раздражители между особями в опыте и контроле также статистически значимо не различались.

Личинки, которые были полученные с использованием криоконсервированной спермы, после перехода на смешанное питание (8-е сут) по реакции центральной нервной системы достоверно не отличались от контроля, за исключением реакции на третий раздражитель — яркий свет (100 лк) ($p \leq 0,05$). Особи в опытной группе проявляли реакцию затаивания, что было свидетельством более стремительного формирования ассоциативных связей в двухолмии среднего мозга по сравнению с личинками из контрольной партии, которые на этот раздражитель не отреагировали и сохранили активность на уровне фоновой. На 15-е сут развития особи в обоих вариантах опыта адекватно реагировали на воздействии раздражителей классической реакцией затаивания. При анализе от-

ветных реакций на раздражители были установлены значимые различия ($p \leq 0,05$) как в контроле, так и в опыте. Это указывает на начало формирования межнейронных связей в продолговатом мозге. В целом значимых различий между группами мы не выявили.

Аналогичные исследования по оценке поведенческих реакций молодежи осетровых рыб, полученной из спермы, хранившейся в криобанке, ранее проводились на стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) (31). По итогам теста «открытое поле» криомолодь не отличалась от молодежи контрольной группы, однако при анализе динамики двигательной активности опытная партия демонстрировала более яркую реакцию на предложенные раздражители. Авторы отмечают, что этот факт имеет важное значение для адаптации при выпуске молодежи в естественную среду обитания.

Таким образом, молодь русского осетра, полученная с применением замороженной и отогретой спермы, по морфометрическим показателям имела преимущество по сравнению с рыбой, полученной по традиционной технологии. Криомолодь оказалась жизнеспособной, а по реактивности центральной нервной системы и рецепторного комплекса в некоторых случаях превосходила контрольную партию. Незначительная разница в развитии предличинок, личинок и молодежи рыб в опытной и контрольной партиях может быть следствием различий в криоустойчивости субпопуляций замораживаемых клеток. Однако при оценке совокупности реакций особей, полученных по традиционной технологии и с использованием размороженной спермы, различий между опытной и контрольной партиями не выявлено. Сперма из криобанка может быть рекомендована для использования на государственных заводах при искусственном воспроизводстве осетровых рыб и на частных предприятиях аквакультуры.

¹ФГБУН ФИЦ Южный научный центр
Российской академии наук,
344006 Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41,
e-mail: alexandra.kras@yandex.ru ✉;

Поступила в редакцию
9 июня 2016 года

²ФГБОУ ВО Астраханский государственный
технический университет,
414056 Россия, г. Астрахань, ул. Татищева, 16,
e-mail: tikhomirov41@mail.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 4, pp. 762-768

REPRODUCTION OF RUSSIAN STURGEON (*Acipenser gueldenstaedtii*) VIABLE JUVENILES USING CRYOPRESERVED SPERM AND BEHAVIORAL REACTIONS OF THE CRYO-PROGENY

A.A. Krasilnikova¹, A.M. Tikhomirov²

¹Federal Research Centre Southern Scientific Center RAS, Federal Agency of Scientific Organizations, 41, ul. Chekhova, Rostov-on-Don, 344006 Russia, e-mail alexandra.kras@yandex.ru (✉ corresponding author);

²Astrakhan State Technical University, 16, ul. Tatischeva, Astrakhan, 414056 Russia, e-mail tikhomirov41@mail.ru
ORCID:

Krasilnikova A.A. orcid.org/0000-0002-7186-8849

Tikhomirov A.M. orcid.org/0000-0002-4087-818X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

This work was carried out using devices of Unique Scientific Installation Module Complex (USI-MC, SSC RAS) and Bio-resource Collection of Rare and Endangered Fish Species (SSC RAS) № 73602.

Supported financially by Federal Program of Russian State Academies for 2013-2020, State Registration No 01201354245 (0256-2018-0007), and by the grant of the President of the Russian Federation (MK-115.2017.11)

Received June 9, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2018.4.762eng

Abstract

Cryopreservation of male reproductive cells is an important issue of genetic biodiversity conservation strategy and the development of fisheries and aquaculture. The use of cryopreserved semen in artificial reproduction and aquaculture will provide genetically diverse progeny, reduce area

and the cost of maintaining male fishes, and, thereby, will allow rise in female herd abundance. Cryopreserved sperm can be used at any time, without risk of untimely maturing or improper quality. The data on the low-temperature preservation indicates that the long-term storage in liquid nitrogen does not significantly affect the safety of cells after freezing and thawing. The viability of cryopreserved sperm is usually confirmed by laboratory fertilization of caviar, without further observations of the obtained juveniles. This paper reports for the first time the behavioral response of pre-larvae, larvae, and juveniles of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* von Brandt & Ratzeburg 1833), obtained with the use of frozen-thawed sperm, and shows physiological fullness of the resulting progeny. The aim of this work was to compare quality of Russian sturgeon offspring as influenced by cryopreserved and native semen. In using frozen-thawed sperm stored 2 years in liquid nitrogen, the conception was 50 % compared to 80 % in the control insemination with native semen. The mortality rate for the whole period was 7 and 5 % in the test and the control groups, respectively. The obtained cryo-progeny was viable. One-day old pre-larvae, 8-day old larvae and 15-day old juveniles of the test group were superior in size and weight as compared to the control group. Behavioral responses of the offspring were evaluated in «open field» test which was carried out individually by placing an individual (pre-larvae, larvae, juveniles) in a special installation with coordinate grid. The pre-larvae activity was somewhat, but not significantly, higher in cryo-progeny. No differences were found between 8-day old larvae in the response to irritants, except bright light ($p \leq 0.05$). In 15-day old juveniles, the response was adequate in both groups. Basal activity and reactivity differed significantly ($p \leq 0.05$) in both groups. So, cryopreserved sperm led to some morphometric advantage in the progeny compared to the individuals produced by conventional methods, and some advantages were found in the response to irritants, however, on the whole, the differences were not significant. A small alteration may be due to the difference in frozen cell subpopulations. Thus, frozen semen contributes to young fish vitality and may be recommended for artificial reproduction and aquaculture.

Keywords: sturgeons, Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, sperm, cryopreservation, cryo-progeny, pre-larvae, larvae, juveniles, behavior.

REFERENCES

1. Worm B., Barbier E.B., Beaumont N., Duffy J.E., Folke C., Halpern B.S., Jackson J.B.C., Lotze H.K., Micheli F., Palumbi S.R., Sala E., Selkoe K.A., Stachowicz J.J., Watson R. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 2006, 314: 787-790 (doi: 10.1126/science.1132294)
2. Béné Ch., Arthur R., Norbury H., Allison E.H., Beveridge M., Bush S., Campling L., Leschen W., Little D., Squires D., Thilsted S.H., Troell M., Williams M. Contribution of fisheries and aquaculture to food security and poverty reduction: assessing the current evidence. *World Dev.*, 2016, 79: 177-196 (doi: 10.1016/j.worlddev.2015.11.007).
3. Ottinger M., Clauss K., Kuenzer C. Aquaculture: relevance, distribution, impacts and spatial assessments — a review. *Ocean Coast. Manage.*, 2016, 119: 244-266 (doi: 10.1016/j.ocecoaman.2015.10.015).
4. Bronzi P., Rosenthal H., Gessner J. Global sturgeon aquaculture production: an overview. *J. Appl. Ichthyol.*, 2011, 27: 169-175 (doi: 10.1111/j.1439-0426.2011.01757.x).
5. Safina C., Duckworth A. Fish conservation. In: *Encyclopedia of biodiversity (second edition)*. S.A. Levin (ed.). Princeton University, New Jersey, USA Academic Press, 2013: 443-455 (doi: 10.1016/B978-0-12-384719-5.00315-4).
6. Olesen I., Rosendal G.K., Tvedt M.W., Bryde M., Bentsen H.B. Access to and protection of aquaculture genetic resources — structures and strategies in Norwegian aquaculture. *Aquaculture*, 2007, 1: S47-S61 (doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.08.012).
7. Gjedrem T., Robinson N., Rye M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*, 2012, 350-353: 117-129 (doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.008).
8. Duncan N.J., Sonesson A.K., Chavanne H. Principles of finfish broodstock management in aquaculture: control of reproduction and genetic improvement. In: *Advances in aquaculture hatchery technology. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. G. Allan, G. Burnell (eds.). Woodhead Publishing, Cambridge, 2013: 23-75 (doi: 10.1533/9780857097460.1.23).
9. Cabrera E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cerezales S., Herráez M.P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives (review). *J. Appl. Ichthyol.*, 2010, 26(5): 623-635 (doi: 10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x).
10. Herráez P., Cabrera E., Robles V. Fish gamete and embryo cryopreservation: state of the art. In: *Aquaculture biotechnology*. G.L. Fletcher, M.L. Rise (eds.). Wiley-Blackwell, 2011: 303-317 (doi: 10.1002/9780470963159.ch20).
11. Tsvetkova L.I., Pronina N.D., Dokina O.B., Rekrubratskii A.V., Parnyshkov V.A. *Voprosy rybolovstva*, 2012, 13(3-51): 538-545 (in Russ.).
12. Labbé C., Robles V., Herráez M.P. Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative

- cell sources for genome preservation. In: *Advances in aquaculture hatchery technology. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. G. Allan, G. Burnell (eds.). Woodhead Publishing, Cambridge, 2013: 76-116 (doi: 10.1533/9780857097460.1.76).
13. Kopeika J., Thornhill A., Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: Principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum. Reprod.*, 2015, 21(2): 209-227 (doi: 10.1093/humupd/dmu063).
 14. Robles V., Cabrita E., Kohli V., Herráez M.P. Prospects and development in fish sperm and embryo cryopreservation. In: *Aquaculture research progress*. T.K. Nakamura (ed.). Nova Science Publishers, Inc., NY, 2009: 199-210.
 15. Krasil'nikova A.A. *Sovershenstvovanie protsessa kriokonservatsii reproduktivnykh kletok samtsov ryb. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Improvement of cryopreservation of male reproductive cells of fish. PhD Thesis]. Astrakhan', 2015 (in Russ.).
 16. Sampath Kumar J.S., Betsy C.J. Cryopreservation of fish gametes and its role in enhancing aquaculture production. In: *Advances in marine and brackishwater aquaculture*. S. Perumal, A.R. Thirunavukkarasu, P. Pachiappan (eds.). Springer, New Delhi, 2015: 241-246 (doi: 10.1007/978-81-322-2271-2_22).
 17. Tsai S., Lin C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 2012, 55(3): 425-434 (doi: 10.1590/S1516-89132012000300014).
 18. Ponomareva E.N., Krasil'nikova A.A., Tikhomirov A.M., Firsova A.V. *Yug Rossii: ekologiya, razvitiye*, 2016, 11(1): 59-68 (doi: 10.18470/1992-1098-2016-1-59-68) (in Russ.).
 19. Krasil'nikova A.A., Tikhomirov A.M. *Estestvennye nauki*, 2014, 2: 62-69 (in Russ.).
 20. Krasilnikova A.A., Tikhomirov A.M. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya Rybnoe khozyaistvo*, 2014, 2: 72-78 (in Russ.).
 21. Krasil'nikova A.A., Tikhomirov A.M. *Estestvennye nauki*, 2015, 3(52): 105-111 (in Russ.).
 22. Aramli M.S., Nazari R.M. Motility and fertility of cryopreserved semen in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, stored for 30-60 min after thawing. *Cryobiology*, 2014, 69(3): 500-502 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.10.006).
 23. Dzyuba B., Boryshpolets S., Cosson J., Dzyuba V., Fedorov P., Saito T., Psenicka M., Linhart O., Rodina M. Motility and fertilization ability of sterlet *Acipenser ruthenus* testicular sperm after cryopreservation. *Cryobiology*, 2014, 69(2): 339-341 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.008).
 24. Nynca J., Dietrich G.J., Dobosz S., Grudniewska J., Ciereszko A. Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout semen. *Aquaculture*, 2014, 433: 62-65 (doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.037).
 25. Chebanov M.S., Galich E.V., Chmyr' Yu.N. *Rukovodstvo po razvedeniyu i vyrashchivaniyu osetrovyykh ryb* [Guide to breeding and growing sturgeon]. Moscow, 2004: 148 (in Russ.).
 26. Vitvitskaya L.V., Nikonorov S.I., Tikhomirov A.M., Kozlov A.V. V sbornike: *Fundamental'nye nauki — narodnomu khozyaistvu* [In: Fundamental sciences for the national economy]. Moscow, 1990: 123-149 (in Russ.).
 27. Nikonorov S.I., Vitvitskaya L.V. *Ekologo-geneticheskie problemy iskusstvennogo vosproizvodstva osetrovyykh i lososevyykh ryb* [Ecogenetic aspects of artificial reproduction of sturgeons and salmonids]. Moscow, 1993 (in Russ.).
 28. Ivanter E.V., Korosov A.V. *Vvedenie v kolichestvennuyu biologiyu* [Introduction to quantitative biology]. Petrozavodsk, 2011 (in Russ.).
 29. Shmal'gauzen I.I. *Osnovy sravnitel'noi anatomii* [Basic principles of comparative anatomy]. Moscow, 1947 (in Russ.).
 30. Abdurakhmanov G.M., Zaitsev V.F., Lozhnichenko O.V., Fedorova N.N., Tikhonova E.YU., Lepilina I.N. *Razvitiye zhiznennno vazhnykh organov osetrovyykh v rannem ontogeneze* [The development of vital organs in early ontogeny of sturgeon]. Moscow, 2006 (in Russ.).
 31. Ponomareva E.N., Nevalennyi A.N., Belaya M.M., Krasil'nikova A.A. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya Rybnoe khozyaistvo*, 2017, 4: 118-127 (doi: 10.24143/2073-5529-2017-4-118-127) (in Russ.).