УДК 597.6 Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2016. Вып. 3

В. К. Утешев, Э. Н. Гахова, С. А. Каурова, Л. И. Крамарова, Н. В. Шишова

СОВРЕМЕННЫЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ АМФИБИЙ

Разведение амфибий в неволе — одна из современных стратегий сохранения биоразнообразия батрахофауны. В работе рассмотрены репродуктивные технологии, применяемые для получения потомства от производителей различных видов амфибий, содержащихся в неволе: в зоопарках, питомниках, в коллекциях любителей. Выделены два основных методических приема современных репродуктивных технологий — использование гонадотропных гормонов и искусственное оплодотворение. Рассмотрена возможность применения гонадотропных гормонов как для стимулирования нереста у амфибий и получения оплодотворенной развивающейся икры, так и для сбора половых продуктов амфибий (неоплодотворенной икры и спермы), необходимых для проведения искусственного оплодотворения. Обсуждаются варианты проведения искусственного оплодотворения икры амфибий не только сразу после получения икры и спермы, но и через различные интервалы времени — несколько дней (отсроченное искусственное оплодотворение) или несколько месяцев (отложенное оплодотворение с применением процедуры криоконсервации). Библиогр. 30 назв.

Ключевые слова: амфибии, размножение в неволе, репродуктивные технологии, искусственное оплодотворение, гонадотропные гормоны, гормональная стимуляция размножения.

V. K. Uteshev[1], *E. N. Gakhova*[1], *S. A. Kaurova*[1], *L. I. Kramarova*[2], *N. V. Shishova*[1]

MODERN REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES FOR AMPHIBIAN BIODIVERSITY PRESERVATION

[1] Institute of Cell Biophysics RAS, 3, ul. Institutskaya, Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation; uteshev-cryobank@mail.ru, gakhova@gmail.com, sakaurova@mail.ru, cryopreservation@ist.ru

[2] Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, 3, ul. Institutskaya, Pushchino, Moscow region, 142290, Russian Federation; luda_kramarova@rambler.ru

Breeding of amphibians in captive is one of the modern strategies for biodiversity preservation of batrochofauna. In our article we present the reproductive technologies to obtain the offspring from different amphibian threatened species, which live in zoos, nurseries and in collections of nonprofessionals. In this article we discuss two basic approaches in current reproductive technologies — the employment of gonadotropic hormones and artificial fertilization. Gonadotropic hormons could be used for stimulation of amphibian spawning to obtain already fertilized eggs, as well as for sampling of nonfertilized eggs and sperm that can be further used in artificial fertilization. We discuss the approaches to artificial fertilization both immediately after obtaining eggs and sperm, and in several days (delayed artificial fertilization) or months (adjourned artificial fertilization after cryopreservation). Refs 30.

Keywords: amphibian, breeding in captive, reproductive technologies, artificial fertilization, gonadotropins, hormone stimulation of breeding.

Исчезновение биологических видов мировой герпетофауны в наши дни происходит угрожающими темпами, поэтому любые усилия, направленные на сохранение исчезающих видов, актуальны. Одной из генеральных стратегий сохранения видов, находящихся под угрозой исчезновения, является создание популяцион-

В. К. Утешев (uteshev-cryobank@mail.ru), Э. Н. Гахова (gakhova@gmail.com), С. А. Каурова (sakaurova@mail.ru), Н. В. Шишова (cryopreservation@ist.ru): Институт биофизики клетки РАН, Российская Федерация, 142290, Пущино, МО, ул. Институтская, 3; Л. И. Крамарова (luda_kramarova@rambler.ru): Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Российская Федерация, 142290, Пущино, МО, ул. Институтская, 3.

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.326

ных групп, размножающихся в неволе. Для успешного получения потомства у животных редких видов, содержащихся в неволе, большое значение имеет развитие и применение современных репродуктивных технологий.

Из всей совокупности экспериментальных методов два, на наш взгляд, являются основополагающими: искусственное оплодотворение и применение гонадотропных гормонов. В экспериментальной эмбриологии гонадотропные гормоны стали изучать и использовать достаточно давно. К настоящему времени вся последовательность гормонального регулирования естественного репродуктивного процесса у амфибий изучена достаточно подробно. Прослежена вся цепь последовательных событий, начиная от образования в гипоталамусе лютеинизирующего релизинг гормона (LHRH), регулирующего активность гипофиза, и до накопления в гонадах эстрогенов и андрогенов, стимулирующих созревание ооцитов и сперматозоидов. Результаты этих исследований обобщены в ряде обзоров [1–3].

Можно выделить два направления применения гонадотропных гормонов для получения потомства у амфибий. К первому относятся работы, в которых гонадотропные гормоны используют для стимулирования естественного репродуктивного поведения и успешного спаривания, причем нередко вне сезона естественного размножения данного вида. В этих случаях применение гормона приводит к амплексусу и откладке оплодотворенной икры. Имеется значительное число публикаций, в которых описано подобное применение гонадотропных гормонов для получения потомства от бесхвостых и хвостатых видов амфибий, а число этих видов насчитывает десятки [4, 5]. Для стимуляции естественного нереста обычно используют хорионический гонадотропин человека (hCG,) или синтетические аналоги лютеинизирующего релизинг гормона (LHRHa). В России из аналогов LHRH наиболее часто применяют препарат Российского производства с коммерческим названием сурфагон.

Другим направлением является применение гормонов для получения у амфибий гамет, зрелых половых продуктов, используемых для проведения искусственного оплодотворения. Половые продукты (неоплодотворенную икру или сперматозоиды) у амфибий можно получать постмортально, умерщвляя животных, или прижизненно от живых самцов и самок. В ранних исследованиях сперматозоиды у бесхвостых амфибий получали путем измельчения вырезанных семенников (тестикул) из декапитированных самцов, а тестикулярную сперму для искусственного оплодотворения получали путем приготовления взвеси тестикулярных сперматозоидов на основе активирующих растворов. Тестикулярную сперму можно получать от репродуктивно активных самцов в период нереста, или активируя сперматогенез гонадотропными гормонами (hCG или LHRHa). Неоплодотворенную икру для искусственного оплодотворения у бесхвостных амфибий в ранних исследованиях также получали из обездвиженных декапитированных самок. Метод извлечения неоплодотворенной икры из яйцеводов умерщвленной самки травяной лягушки описан [6]. Овуляцию ооцитов обычно стимулировали, используя суспензию гипофиза. Позднее для этих целей стали применять синтетические аналоги люлиберина (LHRHa) или хорионический гонадотропин (hCG).

Постмортальную неоплодотворенную икру и тестикулярную сперму обычно получают сразу после декапитации животных. Однако проведенное нами исследование показало, что в тушках травяной лягушки *R. temporaria*, хранящихся в хо-

лодильнике при температуре +4 °С, сперматозоиды могут сохранять подвижность и оплодотворяющую способность в течение нескольких дней. Тестикулярная сперма, приготовленная из семенников, извлеченных из тушек самцов через пять дней их хранения в холодильнике, была способна оплодотворить до 25 % икры [7]. Кроме того, нами были получены данные, что овулировавшие ооциты, сохраненные в холодильнике в тушках декапитированных самок травяной лягушки, в течение нескольких дней не утрачивают способность к оплодотворению. Неоплодотворенная икра, извлеченная из яйцеводов декапитированных самок после пяти дней холодового хранения, в результате искусственного осеменения в 70,6 % оказалась оплодотворенной и нормально развивалась (неопубликованные данные). Таким образом, неоплодотворенную икру и тестикулярную сперму от постмортальных амфибий можно получать как сразу после декапитации самцов и самок, так и через несколько дней хранения тушек при температуре +4 °С.

Развитие идей гуманного обращения с животными (биоэтика) стимулировало создание методов прижизненного получения сперматозоидов бесхвостых амфибий. Для получения сперматозоидов самцов, активированных гонадотропными гормонами (hCG или LHRHa), держат в руках над чашкой Петри и осуществляют им мягких массаж брюшной зоны в области мочевого пузыря по направлению от головы к клоаке. Истекающую из клоаки урину, содержащую спермоплазму и взвесь зрелых сперматозоидов, собирают в чашку Петри. Описание получения такой уринальной спермы представлено в недавно опубликованных обзорах [2, 3]. Методы прижизненного получения неоплодотворенной икры у гормонально стимулированных самок бесхвостых амфибий к настоящему времени также разработаны и успешно применяются [2, 3, 8].

Полученные гаметы амфибий могут быть использованы для искусственного оплодотворения. В экспериментальной эмбриологии эту методику начали применять достаточно давно [9]. Искусственное оплодотворение икры бесхвостых амфибий на примере травяной лягушки подробно описано Н. В. Дабагян и Л. А. Слепцовой [6]. В последние годы эта процедура рассмотрена в ряде обзоров [2, 3].

Описанная процедура оплодотворения икры *in vitro* может быть использована для любых видов бесхвостых амфибий. Для хвостатых амфибий предложено два варианта искусственного оплодотворения: *in vitro* и *in vivo*. В норме большинство хвостатых амфибий имеют внутреннее оплодотворение, однако искусственное осеменение *in vitro* для некоторых видов практикуют уже достаточно давно. В середине прошлого века Брунст [10] предложил метод искусственного оплодотворения икры в чашке Петри с использованием гамет, постмортально полученных у аксолотля *Ambystoma mexicanum*. Позднее этот метод описали Н. П. Бордзиловская и Т. А. Детлаф [11]. Неинвазивный метод прижизненного получения гамет аксолотля и искусственное оплодотворение икры в чашке Петри приведен в исследовании Н. Мансура [12]. К настоящему времени существуют и другие публикации с описанием метода оплодотворения икры хвостатых амфибий *in vitro* [13]. Наряду с оплодотворением икры *in vitro* у хвостатых амфибий возможно применение метода внутреннего искусственного оплодотворения (*in vivo*). Мы применили метод оплодотворения *in vivo* икры тритона Карелина *Triturus karelinii* взвесью уринальных сперматозоидов [14].

Обычно искусственное оплодотворение икры амфибий проводят в течение одного часа после получения гамет. Однако в некоторых случаях бывает необходимо

перенести процедуру оплодотворения на несколько часов или дней (отсроченное оплодотворение). Существуют исследования, в которых изучалась длительность сохранения функциональной активности сперматозоидов и неоплодотворенной икры, хранящихся при низких положительных температурах. Было показано, что неактивированная тестикулярная сперма амфибий при температурах, близких к 0 °C, хранится достаточно длительное время. Максимально длительное (до 25–30 суток) сохранение подвижности и оплодотворяющей способности наблюдали в концентрированной суспензии сперматозоидов с SAR (1:1) в анаэробных условиях при температуре хранения 0 °C [15]. Кроме того, было показано, что и активированные уринальные сперматозоиды, хранящиеся в рефрижераторе при 4 °C, могут длительное время сохранять подвижность и оплодотворяющую способность. В работе [2] описано, что сперматозоиды уринальной спермы жабы через восемь суток хранения в холодильнике были способны оплодотворить икру столь же успешно, как и после одного дня холодового хранения.

Неоплодотворенная икра, извлеченная из организма самки и сохраняемая в охлажденном состоянии, также способна в течение некоторого времени не утрачивать способность к оплодотворению. На длительность жизни неоплодотворенной икры амфибий оказывают влияние разные факторы. Одним из важнейших является осмотичность среды инкубации. Так, Эдвардс с соавторами, работая с икрой *Limnodynastes tasmaniensis*, показали, что хранение в течение двух часов в низко гипотоничном растворе осмотичностью 5 мосм $кг^{-1}$ не оказывало значительного влияния на ее оплодотворяемость. Время успешного оплодотворения икры увеличивалось до четырех часов при ее сохранении в растворах средней и высокой осмотичности (124–271 мосм $кг^{-1}$). В работе Брауна с соавторами [15] ооциты *Bufo marinus* в физиологическом растворе для амфибий (SAR) при оптимальной для данного вида температуре 15 °C сохраняли способность к оплодотворению после восьми часов хранения. Максимально длительное хранение ооцитов в SAR (220 мосм $кг^{-1}$) в течение 12 часов отмечено в работе Брауна [16]. По нашим неопубликованным данным 70 % неоплодотворенной икры травяной лягушки *R. temporaria*, хранившейся в эпиндорфах без каких-либо растворов в холодильнике при температуре 4 °C в течение пяти суток, сохраняет способность к оплодотворению. Таким образом, в настоящее время разработаны методы, позволяющие сохранять в жизнеспособном состоянии сперматозоиды и неоплодотворенную икру амфибий при низких положительных температурах в течение нескольких дней. Это, в свою очередь, позволяет проводить искусственное оплодотворение через несколько дней после получения гамет амфибий (отсроченное оплодотворение).

Наряду с отсроченным оплодотворением, в последние годы большой интерес проявляется к изучению «отложенного оплодотворения». Отложенным оплодотворением мы назвали оплодотворение, которое можно проводить через месяцы или годы после получения гамет амфибий. Для сохранения в жизнеспособном состоянии репродуктивных клеток амфибий на месяцы или годы необходима их криоконсервация. Криоконсервация является единственным способом сохранения живых клеток в неизменном состоянии в течение такого длительного времени. Суть криоконсервации — это глубокое замораживание живых объектов и их хранение при температуре жидкого азота (–196 °C) в течение необходимого времени в криохранилищах или криобанках.

В настоящее время существуют методы криоконсервации сперматозоидов бесхвостых амфибий. Методы успешного замораживания икры амфибий пока не созданы. Первые публикации по криоконсервации тестикулярной спермы травяной лягушки и тростниковой жабы появились в конце прошлого столетия [17–19]. Позднее были опубликованы сходные исследования по криоконсервации тестикулярной спермы других видов [20–25]. Создание методов прижизненного получения уринальной спермы [2, 3, 16, 26–28] дало новый импульс к изучению подходов к криоконсервации спермы амфибий. Результаты первых исследований по криоконсервации уринальной спермы травяной и прудовой лягушек опубликованы [29, 30]. Таким образом, экспериментально показана принципиальная возможность криоконсервации и длительного хранения не только тестикулярной, но и уринальной спермы бесхвостых амфибий. Поэтому создание криохранилищ и криобанков спермы амфибий является актуальной задачей.

Криобанки криоконсервированного материала амфибий могут выполнять две функции. Во-первых, генетические криобанки должны в будущем стать неотъемлемой частью любых питомников по разведению амфибий. В генетических криобанках может быть собран и на длительное время сохранен генетический материал, прижизненно полученный от большого числа полноценных производителей. Этот материал может в дальнейшем активно использоваться для получения потомства и длительного поддержания батрахокультуры. Использование криоконсервированного генетического материала от большого числа производителей позволит содержать в специализированных питомниках разумное число живых производителей, не опасаясь проявления последствий близкородственного скрещивания и снижения внутривидового генетического разнообразия. Другой функцией криобанка является создание страховой, длительно хранящейся криоколлекции генетического материала видов, находящихся под угрозой исчезновения. В ситуации, когда по различным причинам природные популяции каких-либо видов амфибий исчезают, остается последняя надежда на их восстановление путем использования репродуктивных клеток, сохраненных в криобанках.

В данном обзоре перечислен ряд современных репродуктивных технологий, которые уже сейчас или в недалеком будущем, могут быть использованы в программах по сохранению видов амфибий, находящихся под угрозой исчезновения, путем их разведения в питомниках, создания батрахокультур и подготовки выращенного материала для реинтродукции в природу для поддержания угнетенных или восстановления поврежденных естественных биоценозов.

Литература

1. *Kouba A. J., Vance C. K., Willis E. L.* Artificial fertilization for amphibian conservation: current knowledge and future considerations // Theriogenology. 2009. Vol. 71. P. 214–227.

2. *Kouba A., Vance C., Calatayud N., Rowlison T., Langhorne C., Willard S.* Assisted reproduction technologies (ART) for amphibians // Amphibian Husbandry Resource Guide. Amphibian Taxon Advisory Group. American Association of Zoos and Aquariums, Silver Springs, Maryland, USA, 2012. P. 60–118.

3. *Kouba A. J., Vance C. K.* Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation // Reprod. Fertil. Devel. 2013. Vol. 21, N 6. P. 719–737.

4. *Goncharov B. F., Shubravy O. I., Serbinova I. A., Uteshev V. K.* The USSR programme for breeding amphibians, including rare and endangered species // Int. Zoo Yearb. 1989. Vol. 28. P. 10–21.

5. *Kidov A. A., Matushkina K. A., Uteshev V. K., Timoshina A. L., Kovrina E. G.* The first captive breeding of the eichwalds toad (*Bufo eichwaldi*) // Russian Journal of Herpetology. 2014. Vol. 21, N 1. P. 40–46.

6. *Дабагян Н. В., Слепцова Л. А.* Травяная лягушка *Rana temporaria* // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. 579 с.

7. *Shishova N. R., Uteshev V. K., Sirota N. P., Kuznetsova E. A., Kaurova S. A., Browne R. K., Gakhova E. N.* The quality and fertility of sperm collected from european common frog (*Rana temporaria*) carcasses refrigerated for up to 7 days // Zoo Biology. 2013. Vol. 32, N 4. P. 400–406.

8. *Uteshev V. K., Kaurova S. A., Shishova N. V., Kramarova L. I., Browne R. K., Gakhova E. N.* Current reproductive and cryopreservation technologies in herpetology // Russian Journal of Herpetology. 2015. Vol. 22, N 2. P. 143–144.

9. *Rugh R.* Experimental Embryology, Techniques and Procedures. Minneapolis 15, Minnesota: Burgess Publishing Company, 1962.

10. *Brunst U. V.* The axolotl as material for scientific research // Laboratory Investigation. 1955. Vol. 4. P. 45–64.

11. *Бордзиловская Н. П., Детлаф Т. А.* Аксолотль *Ambystoma mexicanum* // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. 579 с.

12. *Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R. A.* Collection of gametes from live axolotl, *Ambystoma mexicanum*, and standardization of *in vitro* fertilization // Theriogenology. 2011. Vol. 75, N 2. P. 354–361.

13. *Uteshev V. K., Kaurova S. A., Shishova N. V., Stolyarov S. D., Browne R.* K., *Gakhova E. N. In vitro* fertilization with hormonally induced sperm and eggs from sharp-ribbed newts *Pleurodeles waltl* // Russian Journal of Herpetology. 2015. Vol. 22, N 1. P. 35–40.

14. *Утешев В. К., Кидов А. А., Каурова С. А., Шишова Н. В., Мельникова Е. В.* Первый опыт размножения тритона Карелина *Triturus karelinii* с использованием уринальной спермы для оплодотворения икры // Вестник ТГУ. 2013. Т. 18, вып. 6. С. 3090–3092.

15. *Browne R. K., Clulow J., Mahony M.* Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes // Reproduction. 2001. Vol. 121, N 1. P. 167–173.

16. *Browne R. K., Seratt J., Vance C., Kouba A.* Hormonal induction with priming and *in vitro* fertilisation increases egg numbers and quality in the Wyoming toad (*Bufo baxteri*) // Reproduction Biology and Endocrinology. 2006. Vol. 4. P. 34–39.

17. *Каурова С. А., Чекурова Н. Р., Мельникова Е. А., Утешев В. К., Гахова Э. Н.* Сохранение оплодотворяющей способности спермы травяной лягушки *Rana temporaria* после криоконсервации // Консервация генетических ресурсов. Материалы рабочего совещания (Пущино, 28–30 мая 1996 г.) Пущино, 1996. 166 с.

18. *Kaurova S. A., Uteshev V. K., Chekurova N. R., Gakhova E. N.* Cryopreservation of testis of frog *Rana temporaria*. // Infusionsther. Transfusionsmed. 1997. Vol. 24, N 5. P. 78–79.

19. *Browne R. K., Clulow J., Mahony M., Clark A.* Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm // Cryobiology. 1998. Vol. 37. P. 339–345.

20. *Browne R. K., Clulow J., Mahony M.* The short-term storage and cryopreservation of spermatozoa from hylid and myobatrachid frogs // Cryoletters. 2002. Vol. 23. P. 129–136.

21. *Browne R. K., Davis J., Pomering M., Clulow J.* Storage of cane toad (*Bufo marinus*) sperm for 6 days at 0 with subsequent cryopreservation // Reproduction, Fertility and Development. 2002. Vol. 14, N 5. P. 267–273.

22. *Каурова С. А., Утешев В. К., Гахова Э. Н.* Криоконсервация тестикулярных сперматозоидов серой жабы *Bufo bufo* // Биофизика живой клетки. Т. 9: Консервация генетических ресурсов. Пущино, 2008. 146 с.

23. *Mansour N., Lahnsteiner F., Robert A., Patzner R. A.* Successful cryopreservation protocol for the sperm of African clawed frog, *Xenopus laevis* // Theriogenology. 2009. Vol. 73, N 9. P. 1221–1228.

24. *Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R. A.* Motility and cryopreservation of spermatozoa of European Common Frog, *Rana temporaria* // Theriogenology. 2010. Vol. 74, N 5. P. 724–732.

25. *Browne R. K., Figiel C.* Cryopreservation in Amphibians // Cryopreservation of Aquatic Species / Eds T. Tiersch, P. Mazic. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 2010. Vol. 8. 450 p.

26. *Obringer A. R., O'Brien J. K., Saunders R. L., Yamamoto K., Kikuyama S., Roth T. L.* Characterization of the spermiation response, luteinizing hormone release and sperm quality in the American toad (*Bufo americanus*) and the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*) // Reproduction, Fertility and Development. 2000. Vol. 12. P. 51–58.

27. *Limori E., D'Occhio M. J., Lisle A. T., Johnston S. D.* Testosterone secretion and pharmacological spermatozoa recovery in the cane toad // Animal Reproduction Science. 2005. Vol. 90. P. 163–173.

28. *Uteshev V. K., Shishova N. V., Kaurova S. A., Browne R. K., Gakhova E. N.* Hormonal induction of spermatozoa from amphibians with *Rana temporaria* and *Bufo bufo* as anuran models // Reproduction, Fertility and Development. 2012. Vol. 24, N 4. P. 599–607.

29. *Shishova N. R., Uteshev V. K., Kaurova S. A., Browneb R. K., Gakhova E. N.* Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species // Theriogenology. 2011. Vol. 75, N 2. P. 220–232.

30. *Uteshev V. K., Shishova N. V., Kaurova S. A., Manokhin A. A., Gakhova E. N.* Collection and cryopreservation of hormonally induced sperm of pool frog (*Pelophylax lessonae*) // Russian Journal of Herpetology. 2013. Vol. 20, N 2. P. 105–109.

Для цитирования: Утешев В. К., Гахова Э. Н., Каурова С. А., Крамарова Л. И., Шишова Н. В. Современные репродуктивные технологии для сохранения биоразнообразия амфибий // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. 2016. Вып. 3. С. 157–164. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.326

References

1. Kouba A. J., Vance C. K., Willis E. L. Artificial fertilization for amphibian conservation: current knowledge and future considerations. *Theriogenology*, 2009, vol. 71, pp. 214–227.

2. Kouba A., Vance C., Calatayud N., Rowlison T., Langhorne C., Willard S. Assisted reproduction technologies (ART) for amphibians. *Amphibian Husbandry Resource Guide. Amphibian Taxon Advisory Group. American Association of Zoos and Aquariums*, Silver Springs, Maryland, USA, 2012, pp. 60–118.

3. Kouba A. J., Vance C. K. Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation. *Reprod. Fertil. Devel.*, 2013, vol. 21, no. 6, pp. 719–737.

4. Goncharov B. F., Shubravy O. I., Serbinova I. A., Uteshev V. K. The USSR programme for breeding amphibians, including rare and endangered species. *Int. Zoo Yearb.*, 1989, vol. 28, pp. 10–21.

5. Kidov A. A., Matushkina K. A., Uteshev V. K., Timoshina A. L., Kovrina E. G. The first captive breeding of the eichwalds toad (*Bufo eichwaldi*). *Russian Journal of Herpetology*, 2014, vol. 21, no. 1, pp. 40–46.

6. Dabagian N. V., Sleptsova L. A. Travianaia liagushka *Rana temporaria* [Grass frog *Rana temporaria*]. *Ob"ekty biologii razvitiia* [*Objects of developmental biology*]. Moscow, Nauka Publ., 1975. 579 p. (In Russian)

7. Shishova N. R., Uteshev V. K., Sirota N. P., Kuznetsova E. A., Kaurova S. A., Browne R. K., Gakhova E. N. The quality and fertility of sperm collected from european common frog (*Rana temporaria*) carcasses refrigerated for up to 7 days. *Zoo Biology*, 2013, vol. 32, no. 4, pp. 400–406.

8. Uteshev V. K., Kaurova S. A., Shishova N. V., Kramarova L. I., Browne R. K., Gakhova E. N. Current reproductive and cryopreservation technologies in herpetology. *Russian Journal of Herpetology*, 2015, vol. 22, no. 2, pp. 143–144.

9. Rugh R. *Experimental Embryology, Techniques and Procedures*. Minneapolis 15, Minnesota: Burgess Publishing Company, 1962.

10. Brunst U. V. The axolotl as material for scientific research. *Laboratory Investigation*, 1955, vol. 4, pp. 45–64.

11. Bordzilovskaia N. P., Detlaf T. A. Aksolotl' *Ambystoma mexicanum* [Axolotl *Ambystoma mexicanum*]. *Ob"ekty biologii razvitiia* [*Objects of developmental biology*]. Moscow, Nauka Publ., 1975. 579 p. (In Russian)

12. Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R. A. Collection of gametes from live axolotl, *Ambystoma mexicanum*, and standardization of *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 2011, vol. 75, no. 2, pp. 354–361.

13. Uteshev V. K., Kaurova S. A., Shishova N. V., Stolyarov S. D., Browne R. K., Gakhova E. N. *In vitro* fertilization with hormonally induced sperm and eggs from sharp-ribbed newts *Pleurodeles waltl*. *Russian Journal of Herpetology*, 2015, vol. 22, no. 1, pp. 35–40.

14. Uteshev V. K., Kidov A. A., Kaurova S. A., Shishova N. V., Mel'nikova E. V. Pervyi opyt razmnozheniia tritona Karelina *Triturus karelinii* s ispol'zovaniem urinal'noi spermy dlia oplodotvoreniia ikry [The first experience of breeding of Karelin's newt *Triturus karelinii* using urinal sperm for egg fertilization]. *Vestnik TGU*, 2013, vol. 18, issue 6, pp. 3090–3092. (In Russian)

15. Browne R. K., Clulow J., Mahony M. Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes. *Reproduction*, 2001, vol. 121, no. 1, pp. 167–173.

16. Browne R. K., Seratt J., Vance C., Kouba A. Hormonal induction with priming and *in vitro* fertilisation increases egg numbers and quality in the Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproduction Biology and Endocrinology*, 2006, vol. 4, pp. 34–39.

17. Kaurova S. A., Chekurova N. R., Mel'nikova E. A., Uteshev V. K., Gakhova E. N. Sokhranenie oplodotvoriaiushchei sposobnosti spermy travianoi liagushki *Rana temporaria* posle kriokonservatsii [The preservation of fertilization ability of grass frog (*Rana temporaria*) sperm after cryopreservation]. *Konservatsiia geneticheskikh resursov. Materialy rabochego soveshchaniia (Pushchino, 28–30 maia 1996 g.)* [*Preservation of genetic resources. The proceedings of workshop (Pushchino, 28–30 of May 1996)*]. Pushchino, 1996. 166 p. (In Russian)

18. Kaurova S. A., Uteshev V. K., Chekurova N. R., Gakhova E. N. Cryopreservation of testis of frog *Rana temporaria*. *Infusionsther. Transfusionsmed*, 1997, vol. 24, no. 5, pp. 78–79.

19. Browne R. K., Clulow J., Mahony M., Clark A. Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm. *Cryobiology*, 1998, vol. 37, pp. 339–345.

20. Browne R. K., Clulow J., Mahony M. The short-term storage and cryopreservation of spermatozoa from hylid and myobatrachid frogs. *Cryoletters*, 2002, vol. 23, pp. 129–136.

21. Browne R. K., Davis J., Pomering M., Clulow J. Storage of cane toad (*Bufo marinus*) sperm for 6 days at 0 with subsequent cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development*, 2002, vol. 14, no. 5, pp. 267–273.

22. Kaurova C. A., Uteshev V. K., Gakhova E. N. Kriokonservatsiia testikuliarnykh spermatozoidov seroi zhaby *Bufo bufo* [Cryopreservation of testicular sperm of grey toad *Bufo bufo*]. *Biofizika zhivoi kletki. T. 9: Konservatsiia geneticheskikh resursov* [*Biophysics of living cells. Vol. 9. Preservation of genetic recourses*]. Pushchino, 2008. 146 p. (In Russian)

23. Mansour N., Lahnsteiner F., Robert A., Patzner R. A. Successful cryopreservation protocol for the sperm of African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Theriogenology*, 2009, vol. 73, no. 9, pp. 1221–1228.

24. Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R. A. Motility and cryopreservation of spermatozoa of European Common Frog, *Rana temporaria*. *Theriogenology*, 2010, vol. 74, no. 5, pp. 724–732.

25. Browne R. K., Figiel C. Cryopreservation in Amphibians. *Cryopreservation of Aquatic Species*. Eds T. Tiersch, P. Mazic, World Aquaculture Society, Baton Rouge, 2010, vol. 8. 450 p.

26. Obringer A. R., O'Brien J. K., Saunders R. L., Yamamoto K., Kikuyama S., Roth T. L. Characterization of the spermiation response, luteinizing hormone release and sperm quality in the American toad (*Bufo americanus*) and the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproduction, Fertility and Development*, 2000, vol. 12, pp. 51–58.

27. Limori E., D'Occhio M. J., Lisle A. T., Johnston S. D. Testosterone secretion and pharmacological spermatozoa recovery in the cane toad. *Animal Reproduction Science*, 2005, vol. 90, pp. 163–173.

28. Uteshev V. K., Shishova N. V., Kaurova S. A., Browne R. K., Gakhova E. N. Hormonal induction of spermatozoa from amphibians with *Rana temporaria* and *Bufo bufo* as anuran models. *Reproduction, Fertility and Development*, 2012, vol. 24, no. 4, pp. 599–607.

29. Shishova N. R., Uteshev V. K., Kaurova S. A., Browneb R. K., Gakhova E. N. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology*, 2011, vol. 75, no. 2, pp. 220–232.

30. Uteshev V. K., Shishova N. V., Kaurova S. A., Manokhin A. A., Gakhova E. N. Collection and cryopreservation of hormonally induced sperm of pool frog (*Pelophylax lessonae*). *Russian Journal of Herpetology*, 2013, vol. 20, no. 2, pp. 105–109.

For citation: Uteshev V. K., Gakhova E. N., Kaurova S. A., Kramarova L. I., Shishova N. V. Modern reproductive technologies for amphibian biodiversity preservation. *Vestnik of Saint Petersburg University. Series 3. Biology*, 2016, issue 3, pp. 157–164. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.326

Статья поступила в редакцию 27 января 2016 г., принята 1 июня 2016 г.

Сведения об авторах:

Утешев Виктор Константинович — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудние
Гахова Эдита Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Каурова Светлана Анатольевна — научный сотрудник
Крамарова Людмила Ивановна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Шишова Наталья Владимировна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Uteshev Victor K. — PhD, Leading Researcher
Gakhova Edith N. — PhD, Leading Researcher
Kaurova Svetlana A. — Researcher
Kramarova Ludmila I. — PhD, Senior Researcher
Shishova Natalia V. — PhD, Leading Researcher