СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2017, том 52, № 2, с. 282-290

УДК 636.082:599.735.51:591.463.1 doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.282rus

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПОЛНОЦЕННОСТЬ ЭПИДИДИМАЛЬНОГО СЕМЕНИ ЗУБРА (*Bison bonasus* L.) ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ*

Б.С. ИОЛЧИЕВ[1], А.И. АБИЛОВ[1], А.В. ТАДЖИЕВА[2], В.А. БАГИРОВ[1], Ш.Н. НАСИБОВ[3], И.Н. ШАЙДУЛЛИН[1], П.М. КЛЕНОВИЦКИЙ[1], Н.А. КОМБАРОВА[4], М.А. ЖИЛИНСКИЙ[1]

Сохранение генетических ресурсов имеет важное значение для обеспечения населения продуктами питания в условиях роста его численности, ограниченности ресурсов Земли и исчезновения видов. В зависимости от стратегии сохранения генетических ресурсов используется два основных метода: in situ — сохранение видов в естественной среде обитания, ex situ — сохранение компонентов биологического разнообразия вне естественных мест обитания или посредством криоконсервации биологических материалов. Криоконсервация позволяет использовать генетический ресурс диких видов не только для сохранения и восстановления, но и для интродукции в генотип домашних животных. Зубр (*Bison bonasus*) относится к редким исчезающим видам. В настоящее время численность вольноживущих зубров в России составляет более 1500 гол. Проводится научно-исследовательская работа по сохранению генофонда зубра в России, одна из основных составляющих которой — создание криобанка семени. Настоящая работа посвящена изучению биологической полноценности криоконсервированного эпидидимального семени зубров после длительного (более 20 лет) хранения. Сбор сперматозоидов проводили постмортально из придатка семенника от самцов, получивших несовместимые с жизнью травмы, или от выбракованных (предназначенных для охоты) особей. Количество и подвижность свежеполученного эпидидимального семени определяли по методике, применяемой для оценки качества семени быков-производителей. Семя замораживали в гранулах в соответствии с технологией криоконсервации спермы быков-производителей. Подвижность сперматозоидов оценивали с применением технологии computer-assisted semen analysis (CASA), степень фрагментации ДНК изучали в тесте с акридиновым оранжевым. Состояние акросом определяли с помощью Diff Quik окрашивания. Также изучали морфометрические показатели сперматозоидов, полученных от зубров (n = 4) и быков-производителей голштинской породы (n = 15) (использовали эякулированное семя быков). Сперма быков была криоконсервирована в пайетах, сперма зубров — в гранулах. Срок хранения семени зубров составлял более 20 лет, быков — не более 2 лет. Количество сперматозоидов с поступательно-прямолинейным движением у разных зубров существенно различалось: у Мутфиля и Моруса доля сперматозоидов класса А + В в замороженно-оттаянном семени составила более 28 %, у Авеля и Мисира неподвижных сперматозоидов было более 67 %, с манежным и колебательным движением — соответственно 12,1 и 10,4 %. Частота сперматозоидов с патологической морфологией значительно варьировала в зависимости от индивидуальных особенностей зубров: максимальное значение — 14,6 %, минимальное — 6,8 %. Степень фрагментации ДНК в хроматине сперматозоидов изменялась от 7 до 86 %. По всем морфометрическим параметрам, кроме ширины головки, сперматозоиды зубров уступали сперматозоидам быков-производителей. Следует отметить, что различия между группами по показателям, кроме площади головки, не были достоверны (площадь головки сперматозоида у быков оказалась на 3,14 мкм^2 больше, чем у зубров).

Ключевые слова: зубр, криоконсервация, сперматозоиды, акросомы, индекс фрагментации ДНК, хроматин.

В настоящее время один из глобальных вызовов человечеству — задача сохранения флоры и фауны (1, 2). Вследствие неблагоприятной экологической обстановки, техногенных, экономических и других факторов, большинство из которых носят антропогенный характер, некоторые виды находятся под угрозой исчезновения. Доказано, что устойчивость сообщества тем выше, чем больше число составляющих его видов, следовательно, сохранение биоразнообразия — единственный механизм обеспечения стабильности жизни на Земле (3, 4). Кроме того, при высокой скорости роста численности населения и ограниченности ресурсов серьезной проблемой становится обеспечение продуктами питания и сырьем для легкой промышленности. Ее эффективное решение — выведение высокопродуктив-

* Исследования выполнены при финансовой поддержке программы Президиума РАН № IV.13.3.

ных пород и одомашнивание диких видов животных. Генетическое разнообразие исходного материала влияет на успех селекции: длительный отбор сопровождается увеличением гомозиготности, что, в свою очередь, приводит к ряду нарушений — к снижению резистентности, появлению наследственных заболеваний и т.д. Для повышения гетерезиготности часто требуется интродукция нового генетического материала, источником которого могут служить дикие сородичи домашних животных (5-9).

Существуют две основных стратегии сохранения генофонда: in situ (содержание видов в естественной среде обитания или пород домашних животных в условиях выведения) и ex situ (сохранение компонентов биологического разнообразия вне их естественных мест обитания, например в питомниках, зоопарках и т.д., или посредством криоконсервации генетического материала). Метод in situ предполагает разведение и содержание животных и птиц в специальных генофондных хозяйствах и экономически затратен. Метод ex situ имеет важное значение для видов, реинтродукция которых в ближайшем будущем не представляется возможной (10-14). Во многих странах сохранение ex situ — неотъемлемая часть стратегии охраны окружающей среды (15). В зависимости от цели и задачи биологическим материалом для криоконсервации могут быть эмбрионы, ткани животных, мужские (спермии), женские (яйцеклетки) половые клетки (16-22). Криобанк генетических ресурсов дикой фауны можно использовать для сохранения видов, а также для создания новых селекционных форм и пород.

Зубр (*Bison bonasus* L.) — дикий лесной бык, относится к редким исчезающим видам. Это самое крупное копытное животное, единственный дикий вид подсемейства *Bovinae*, обитающий на Европейском континенте (23-25). В начале XX века вольноживущие популяции зубров были уничтожены. В результате длительной научной и селекционной работы численность зубров с 1927 по 2000 год увеличилась более чем в 70 раз и в настоящее время составляет свыше 3500 тыс. особей; в России обитает около 1500 вольноживущих зубров.

Криоконсервация и искусственная репродукция (in vitro) — методы, которые используются для сохранения и восстановления численности редких видов и рекомендованы к применению Конвенцией о биологическом разнообразии и другими международными документами (26-28). Во Всероссийском НИИ животноводства им. академика Л.К. Эрнста была разработана методика отбора и криоконсервации эпидидимального семени зубра, а также создан криобанк семени зубров популяции Приокско-Террасного и Окского государственных природных биосферных заповедников (29). С использованием криобанка эпидидимального семени зубра получены три поколения гибридных животных: от искусственного осеменения коров черно-пестрой породы семенем зубра родились четыре телочки, и в дальнейшем были изучены гибриды F_1 и F_2 от разных вариантов скрещивания с молочными (черно-пестрая, голштинская) и мясной (абердин-ангусская) породами (30, 31).

Эпидидимальное семя значительно отличается от эякулированного по морфофункциональным характеристикам. Эпидидимальные сперматозоиды неподвижны, имеют невысокий метаболизм. Подвижность спермиев инициируется после эякуляции, в результате чего метаболические процессы активируются. Криорезистентность сперматозоидов с низким метаболизмом выше.

Для криоконсервации сперматозоидов, в том числе извлеченных из эпидидимиса, используют среды, которые усиливают метаболизм. Известно, что последний этап конденсации хроматина в ядре сперматозоидов

происходит уже после эякуляции, следовательно, этот показатель в извлеченных из эпидидимиса клетках ниже, чем в эякулированных. То есть вероятность повреждения генетического материала при замораживании-оттаивании в ядрах сперматозоидов, полученных из эпидидимиса, выше, чем в эякулированных (32). Процесс криоконсервации отражается на морфометрических показателях: в результате замораживания-оттаивания уменьшаются размеры сперматозоидов, особенно площадь и периметр головки (33-36). Криоконсервация также влияет на ультраструктуру сперматозоидов (37-40). В настоящее время используют две технологии криоконсервации спермы — в пайетах и гранулах.

Мы впервые исследовали влияние криоконсервации и срока хранения на морфометрические и морфофункциональные свойства семени зубров.

Целью представляемой работы было изучение биологической полноценности замороженно-оттаянного эпидидимального семени зубра при длительном (более 20 лет) хранении.

Методика. Начиная с 1998 года, эпидидимальное семя получили от четырех самцов зубра (Приокско-Террасный и Окский государственные природные биосферные заповедники). Отбор осуществляли постмортально из придатка семенника у животных, получивших несовместимые с жизнью травмы или выбракованных (предназначенных для охоты). Содержимое хвоста эпидидимиса извлекали в синтетической среде (гомогенизация) с последующей фильтрацией для освобождения от клеточных примесей. Содержание и подвижность свежеполученных эпидидимальных спермиев в образце определяли по методике оценки качества семени быков-производителей. Семя замораживали в гранулах в соответствии с технологией криоконсервации спермы быков-производителей (41).

Рутинную оценку замороженно-оттаянного семени проводили на основании технологии computer-assisted semen analysis (CASA). Степень фрагментации ДНК изучали в тесте с акридиновым оранжевым (АО-тест) с последующей флуоресцентной микроскопией. Состояние акросом оценивали с помощью Diff Quik окрашивания (42-44).

Подвижность замороженно-оттаянных сперматозоидов определяли с использованием программного обеспечения Зоосперм 1.0 («ВидеоТест», Россия), камеры Маклера (Израиль) и микроскопа Nikon Eclipse Ni («Nikon Corp.», Япония). Подвижность оценивали по средним данным для 3 образцов на основе видеосъемки (продолжительность 1 с) трех полей.

Обработка данных и классификация сперматозоидов проходила в автоматическом режиме на основании следующих показателей: VAP — средняя скорость движения головки по усредненной траектории движения, мкм/с; VSL — скорость прямолинейного движения головки (средняя скорость движения головки сперматозоида вдоль прямого отрезка между начальной и конечной точкой траектории), мкм/с; VCL — средняя скорость движения сперматозоидов по реальной траектории движения, мкм/с; ALH — среднее отклонение головки (амплитуда латерального смещения головки сперматозоида от траектории движения), мкм; BCF — частота колебательных усредненных движений (частота пересечений), Гц; средняя частота пересечения криволинейной траекторией движения сперматозоида его усредненной траектории за единицу времени.

Степень прямолинейности направленного движения сперматозоидов (прямолинейность средней траектории движения, %) рассчитывали по формуле $STR = VSL/VAP \times 100$, степень волнистости треков (величина колебания истинной траектории движения по отношению к средней траектории, %) — как $LIN = VSL/VCL \times 100$.

В зависимости от перечисленных показателей сперматозоиды разделяли на следующие классы: A — с быстрым прямолинейно-поступательным движением (скорость не менее 25 мкм/с; сперматозоиды этого класса в течение 1 с преодолевали расстояние, равное своей длине); B — с медленным прямолинейным движением (скорость менее 25 мкм/с); C — с манежным или колебательным движением; D — неподвижные.

При изучении морфометрических показателей сравнивали сперматозоиды, полученные от зубров (n = 4) и быков-производителей голштинской породы (n = 15) (поскольку получать эякулированное семя от зубров в среде их обитания невозможно, были взяты образцы у их домашних сородичей). Сперму быков-производителей криоконсервировали в пайетах. Срок хранения семени зубров составлял более 20 лет, быков — не более 2 лет.

Данные подвергались математической обработке стандартным методом вариационной статистики в пакете программ Microsoft Excel. В таблицах приведены средние значения (X) и стандартные ошибки (x).

1. Доля (%) сперматозоидов разных классов в замороженно-оттаянном семени зубров (*Bison bonasus* L.) ($X \pm x$)

Кличка зубра	Класс			
	A	B	C	D
Мутфиль	10,3±0,2	18,8±0,9	20,3±1,2	50,6±1,6
Авель	8,4±0,1	12,3±0,7	12,1±0,9	67,2±1,8
Морус	6,3±0,2	22,3±0,8	13,2±0,6	58,2±2,1
Мисир	8,3±0,2	13,4±1,2	10,4±0,8	67,9±3,6

Примечание. Описание классов см. в разделе «Методика».

Результаты. Количество сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением в нативном и замороженно-оттаянном семени зависит от множества факторов, таких как индивидуальные особенности особи, вид, возраст, технология криоконсервации, используемые разбавители и криопротекторы, метод оттаивания (45-47).

2. Морфометрические показатели замороженно-оттаянных сперматозоидов зубров (*Bison bonasus* L.) и быков-производителей голштинской породы ($X \pm x$)

Показатель	Зубры (n = 4)	Быки (n = 15)
Длина сперматозоида, мкм	65,90±1,57	68,3±0,98
Длина головки, мкм	8,46±0,66	9,58±0,28
Ширина головки, мкм	4,72±0,42	4,60±0,12
Периметр головки, мкм	23,95±1,55	24,61±0,36
Площадь головки, мкм^2	38,46±1,67	41,6±1,32*
Длина жгутика, мкм	57,34±1,96	58,72±0,36

* $P \leq 0,05$.

Исследуемые образцы семени значительно различались по содержанию сперматозоидов классов A и B (табл. 1). Основными факторами, которые влияли на активность сперматозоидов, были возраст, индивидуальные особенности зубров и продолжительность хранения семени, поскольку состав среды, технология криоконсервации и оттаивания для всех образцов здесь были одинаковыми. У зубров Мутфиля и Моруса содержание сперматозоидов класса A + B в замороженно-оттаянном семени составляло более 28 %, у Авеля и Мисира неподвижных сперматозоидов было более 67 %, с манежным и колебательным движением — соответственно 12,1 и 10,4 %.

При получении и криоконсервации семени у быков и зубров применялись разные технологии. Эякулированные и извлеченные из эпидидимиса сперматозоиды существенно различались. По всем морфометрическим параметрам, кроме ширины головки, сперматозоиды зубров уступали сперматозоидам быков-производителей. Следует отметить, что различия между группами по изученным показателям не были статистически значимыми, за исключением площади головки сперматозоида: у быков она оказалась на 3,14 мкм^2 больше, чем у зубров (табл. 2).

Нами также были изучены органеллы и морфологические структуры спермиев зубров. Аномальное строение сперматозоидов обусловлено генетической компонентой (48), сезонными и экологическими факторами,

индивидуальной предрасположенностью (49-52), а также возрастом (53-56).

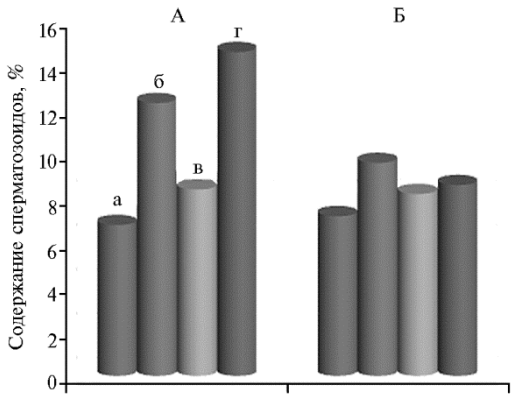

Рис. 1. Доля сперматозоидов с патологической морфологией (А) **и поврежденной акросомой** (Б) **в замороженно-оттаянном семени четырех зубров (*Bison bonasus* L.):** а — Мутфиль, б — Авель, в — Морус, г — Мисир (сроки хранения семени — более 20 лет).

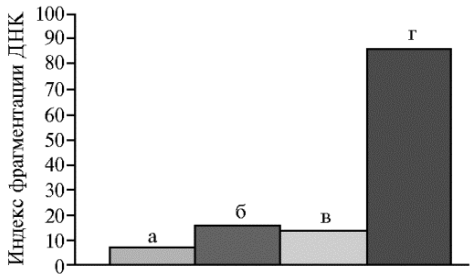

Рис. 2. Индекс фрагментации ДНК в хроматине сперматозоидов в замороженно-оттаянном семени четырех зубров (*Bison bonasus* L.): а — Мутфиль, б — Авель, в — Морус, г — Мисир (сроки хранения семени — более 20 лет).

Хроматин — один из важнейших структурных элементов сперматозоидов. Причиной идиопатического бесплодия может быть высокий индекс фрагментации ДНК в хроматине (57-61). Степень фрагментации ДНК в сперматозоидах также зависит от многочисленных биотических и абиотических факторов (62-69).

По содержанию сперматозоидов с нарушенной морфологией и поврежденной акросомой между зубрами обнаружили существенную разницу (рис. 1).

Частота встречаемости сперматозоидов с патологической морфологией была наибольшей у Мисира (14,6 %), наименьшей — у Мутфиля (6,8 %). У последнего частота поврежденных акросом по сравнению с другими зубрами оказалась незначительной и составила 7,2 %.

Индекс фрагментации ДНК в хроматине сперматозоидов существенно различался в изучаемых образцах (рис. 2). Высокая степень фрагментации наблюдалась в сперматозоидах Мисира (более 86 %), меньше всего сперматозоидов с фрагментированной ДНК было обнаружено в образцах, полученных от Мутфиля (7 %).

Таким образом, показатели, характеризующие биологическую полноценность сперматозоидов в замороженно-оттаянном семени зубров, хранившемся более 20 лет, зависели от индивидуальных особенностей особей. Содержание сперматозоидов с патологической морфологией варьировало от 6,8 до 14,6 %, степень фрагментация ДНК — от 7 до 86 % Результаты наших исследований продемонстрировали, что методы получения и технология криоконсервации влияют на морфометрические показатели сперматозоидов, которые в замороженно-оттаянном эпидидимальном семени оказались меньше, чем в эякулированном.

[1]*ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства им. академика Л.К. Эрнста,*
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: baylar1@yandex.ru;
[2]*Российский университет дружбы народов — РУДН,*
117198 Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;
[3]*ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии,*
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42;

Поступила в редакцию 30 декабря 2016 года

[4]ОАО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных»,
142143 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Быково, ул. Центральная, 2

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2017, V. 52, № 2, pp. 282-290

BIOLOGICAL INTEGRITY OF BISON EPIDIDYMAL SPERM UNDER CRYOCONSERVATION AND LONG STORAGE

B.S. Iolchiev[1], A.I. Abilov[1], A.V. Tadzhieva[2], V.A. Bagirov[1], Sh.N. Nasibov[3], I.N. Shaidullin[1], P.M. Klenovitskiy[1], N.A. Kombarova[4], M.A. Zhilinskiy[1]

[1]*L.K. Ernst All-Russian Research Institute of Animal Husbandry,* Federal Agency of Scientific Organizations, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail baylar1@yandex.ru (corresponding author);
[2]*Peoples' Friendship University of Russia,* 6, ul. Miklukho-Maklaya, Moscow, 117198 Russia;
[3]*All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology*, Federal Agency of Scientific Organizations, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia;
[4]*Head Centre for Reproduction of Farm Animals*, 2, ul. Tsentralnaya, pos. Bykovo, Podolsk municipal district, Moscow Province, 142143 Russia
ORCID:
Iolchiev B.S. orcid.org/0000-0001-5386-7263
Bagirov V.A. orcid.org/0000-0001-5398-8815
Shaidullin I.N. orcid.org/0000-0002-5857-4993
Klenovitskiy P.M. orcid.org/0000-0003-2266-1275
Zhilinskiy M.A. orcid.org/0000-0002-5541-9517
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially by RAS Presidium Program № IV.13.3
Received December 30, 2016
doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.282eng

Abstract

Conservation of biodiversity is one of the global challenges of the modern world. The preservation of animal genetic resources is considered essential for the food supply, since sustainable food production appears to be the greatest problem due to the human population growth, depletion of the Earth's natural resources, and many species becoming endangered. In situ and ex situ methods of preservation of the species (i.e. in/out of their natural habitats, respectively) are two major approaches to animal biodiversity conservation. Ex situ strategy involves the techniques for the genetic material cryopreservation. Cryopreservation of the wildlife biomaterials allows to use these genetic resources not only for the conservation and the renewal, but also for the introduction into the genotype of the farm animals. The bison (*Bison bonasus*) is identified as the rare and endangered species. At present, the free-living bison population in Russia comprises more than 1500 animals. A research concept of the Russian bison gene pool preservation includs creating cryo-preserved pool of bison spermatozoa. In this paper we report findings on biological adequacy of the cryopreserved epididymal bison semen after the long storage (for more than 20 years). The sperm samples were collected post-mortem from the testicular appendages of four bison males sustained the injuries incompatible with life or culled and used for hunting. For the assessment of semen motility we used a computer-assisted semen analysis (CASA) device; the DNA fragmentation index was assessed in AO-test with the acridine orange staining. The acrosomal integrity was studied by Diff-Quik staining method. It was shown that the semen quality parameters differed significantly due to the individual peculiarities of the bison. The spermatozoa of A + B grade which performed good motility and rectilinear motion reached more than 28 % in the semen of the males Mutfil and Morus, while in the Avel's and Misir's semen over 67 % spermatozoa were non-motile and 12.1 % and 10.4 % spermatozoa exhibited rotational and vibrational motions, respectively. The frequency of spermatozoa with pathomorphological changes significantly varied depending on the individual properties of the bison, with the greatest and the lowest values of 14.6 % and 6.8 %, respectively. The DNA fragmentation index reflecting sperm chromatin integrity can depend on the numerous biotic and abiotic factors and may vary in great ranges. In our surveys, it varied from 7 % to 86 %. For all the morphometric parameters, except the head width, the bison spermatozoa were inferior to the spermatozoa of the bulls though the differences between animal groups were not statistically significant. However, the area of the spermatozoa head in bulls was 3.14 μm^2 larger than that of bison.

Keywords: European bison, *Bison bonasus*, cryopreservation, spermatozoa, acrosome, index of DNA fragmentation, chromatin.

REFERENCES

1. Bagirov V.A., Ernst L.K., Klenovitskii P.M., Zinov'eva N.A. *Tsitologiya*, 2004, 46(9): 767-768. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=21635266. No date (in Russ.).

2. Gusev M.V., Melekhova O.P., Romanova E.P. *Cokhranenie i vosstanovlenie bioraznoobraziya* [Preservation and restoration of biodiversity]. Moscow, 2002 (in Russ.).
3. Ryumina E.V., Karachevtsev I.L. *Ekonomika prirodopol'zovaniya*, 2005, 1: 112-118 (in Russ.).
4. Tishkov A.A. *Biosfernye funktsii prirodnykh ekosistem Rossii* [Biospheric functions of natural ecosystems sht Russia]. Moscow, 2005 (in Russ.).
5. Shaidullin I.N. *Biologicheskie osobennosti akklimatizatsii ovets i gibridizatsii ikh so snezhnym baranom Ovis nivicola nivicola v usloviyakh Kamchatki. Doktorskaya dissertatsiya* [Biological features of sheep under acclimatization in Kamchatka and hybridization with *Ovis nivicola nivicola*. DSci Thesis]. Dubrovitsy, 1994 (in Russ.).
6. Bagirov V.A., Ernst L.K., Nasibov S.N., Klenovitskiy P.M., Iolchiev B.S., Zinov'eva N.A. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2009, 7: 54-56. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=13002971. No date (in Russ.).
7. Iolchiev B.S., Klenovitskii P.M., Bagirov V.A., Voevodin V.A., Kononov V.P., Nasibov Sh.N. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2011, 1: 29-31. Available http://elibrary.ru/it-em.asp?id=16092095. No date (in Russ.).
8. Nasibov Sh.N., Iolchiev B.S., Klenovitskiy P.M., Bagirov V.A., Voevodin V.A., Zinov'eva N.A. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2010, 9: 50-51. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=15253713. No date.
9. Bagirov V.A., Gladyr' E.A., Ernst L.K., Klenovitskii P.M., Zinov'eva N.A., Nasibov Sh.N. [Preservation and efficient use of genetic resources of yak (*Bos mutus*)]. *Agricultural Biology*, 2009, 2: 37-42 (in Russ.).
10. Ryabova E.V. *Bioraznoobrazie i sposoby ego sokhraneniya* [Biodiversity — the ways to preservation]. Kirov, 2012 (in Russ.).
11. Pereira R.M., Marques C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking*, 2008, 9(4): 267-277 (doi: 10.1007/s10561-008-9075-2).
12. Roldan E.R., Gomendio M., Garde J.J., Espeso G., Ledda S., Berlinguer F., DelOlmo A., Soler A.J., Arregui L., Crespo C., Gonzales R. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the organization of genetic resource banks. *Reprod. Domest. Anim.*, 2006, 41: 82-89 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00772.x).
13. Hanks J. Conservation strategies for Africa's large mammals. *Reprod. Fert. Develop.*, 2001, 13(7-8): 459-468.
14. Singina G.N., Volkova N.A., Bagirov V.A., Zinovieva N.A. Cryobanking of somatic cells in conservation of animal genetic resources: prospects and successes (review). *Agricultural Biology*, 2014, 6: 3-14 (doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.3eng) (in Engl.).
15. Blackburn H.D. Development of national animal genetic resource programs. *Reprod. Fert. Develop.*, 2004, 16: 27-32 (doi: 10.10371/RD03075).
16. Hiemstra S.J., van der Lende T., Woelders H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. Proc. Int. Workshop *«The role of biotechnology for the characterisation and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources»* (Italy, 5-7 March 2005). Turin, 2005: 25-36.
17. Boettcher P.J., Stella A., Pizzi F., Gandini G. The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. *Genet. Sel. Evol.*, 2005, 37(6): 657-675 (doi: 10.1186/1297-9686-37-7-657).
18. Niemann H., Lucas-Hahn A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, 47(5): 2-10 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02121.x).
19. Blackburn H.D. Genebank development for the conservation of livestock genetic resources in the United States of America. *Livestock Sci.*, 2009, 120: 196-203 (doi: 10.1016/j.livsci.2008.07.004).
20. Mariante A., Albuquerque M., Egito A., McManus C., Lopes M., Paiva S. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. *Livestock Sci.*, 2009, 120: 204-212 (doi: 10.1016/j.livsci.2008.07.007).
21. Martynik E. Animal genetic resources in Poland: successes and obstacles. *Proc. Workshop «International strategic programs for the conservation of animal genetic resources for food and agriculture»*. C. Lessard (ed.). Vancouver, B.C., 2010: 29-35 (ISBN: 978-0-88880-566-9).
22. Richards K., Lessard C., Plante Y., Anzar M. Canadian animal genetic resources program. *Proc. Workshop «International strategic programs for the conservation of animal genetic resources for food and agriculture»*. C. Lessard (ed.). Vancouver, B.C., 2010: 12-18 (ISBN: 978-0-88880-566-9).
23. Nemtsev A.S., Rautian G.S., Puzachenko A.Yu., Sipko T.P., Kalabushkin B.A., Mironenko I.V. *Zubr na Kavkaze* [Bison in the Caucasus]. Moscow, 2003 (in Russ.).
24. Flint V.E., Belousova I.P., Pererva V.I., Kaz'min V.D., Kiseleva E.G., Kudryavtsev I.V., Pirozhkov N.V., Sipko T.G. *Strategiya sokhraneniya zubrov v Rossii* [Strategy for bison preservation in Russia]. Moscow, 2002 (in Russ.).
25. Iolchiev B.S., Strekozov N.I., Abilov A.I., Klenovitskii P.M., Sipko T.P. *Sokhranenie genofonda zubrov i ikh ispol'zovanie v mezhvidovoi gibridizatsii* [Bison: gene pool

preservation and use in interspecies hybridization]. Dubrovitsy, 2005 (in Russ.).
26. Nishi J.S. *A Review of best practices and principles for bison disease issues: greater Yellowstone and Wood Buffalo areas*. Wildlife Conservation Society and American Bison Society (ABS), ABS Working Paper No. 3. Bronx, NY, USA, 2010.
27. McFarlane K., Wilson G.A., Nishi J.S. *Management strategies for conservation of genetic diversity in wood bison (Bison bison athabascae)*. File Report No. 135. Department of Environment and Natural Resources, Government of the Northwest Territories, Yellowknife, Northwest Territories, Canada, 2006.
28. Shury T.K., Woodley S.J., Reynolds H.W. *Proceedings of the Bison Diseases Technical Workshop*. Parks Canada, Gatineau, Quebec, 2005.
29. Abilov A.I., Ernst L.K., Strekozov N.I., Kononov V.P., Sipko T.P. *Metodicheskie rekomendatsii po polucheniyu gibridov putem osemeneniya domashnikh korov (Vos taurus) «epididimal'nym semenem» dikikh zubrov (Bison bonasus)* [Hybridisation of cows (*Vos taurus*) with wild bison (*Bison bonasus*) using epididymal semen — puidelines]. Dubrovitsy, 1994 (in Russ.).
30. Strekozov N.I., Iolchiev B.S., Abilov A.I., Vinogradov V.N., Kiseleva E.G., Sipko T.P. *Doklady RASKHN*, 1997, 6: 28-29 (in Russ.).
31. Iolchiev B.S., Abilov A.I., Strekozov N.I. *Doklady RASKHN*, 2004, 5: 35-36. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=18179672. No date (in Russ.).
32. Shishova N.V., Abilov A.I., Gakhova E.N., Maksudov G.Yu. *Veterinarnaya patologiya*, 2007, 20(1): 34-36. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=17012920. No date (in Russ.).
33. Petrunkina A.M., Topfer Petersen E. Heterogeneous osmotic behaviour in boar sperm populations and its relevance for detection of changes in plasma membrane. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2000, 12: 297-305 (doi: 10.1071/RD00087).
34. Thompson L.A., Brook P.F., Warren M., Barrat C., Cooke I. A morphometric comparison of the nuclear morphology of fresh and frozen-thawed human zona-bound and unbound sperm. *J. Androl.*, 1994, 15: 337-342 (doi: 10.1002/j.1939-4640.1994.tb00461.x).
35. Gravance C.G., Casey M.E., Case P.J. Pre-freeze bull sperm head morphometry related with post-thaw fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 2009, 114: 81-88 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.09.014).
36. Peña F.J., Saravia F., García Herreros M., Núñezmartínez I., Tapia J.A., Johannisson A., Wallgren M., Rodríguez-Martínez H. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. *J. Androl.*, 2005, 26: 716-723 (doi: 10.2164/jandrol.05030).
37. García Herreros M., Baryn F.J., Aparicio I.M., Santos A.J., García Marín L.J. Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation. *Int. J. Androl.*, 2008, 31: 490-498 (doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00794.x).
38. Arruda R.P., Ball B.A., Gravance C.G., Garcia R.P., Liu I.K. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, 2002, 58: 252-256 (doi: 10.1016/S0093-691X(02)00858-0).
39. Peña A.I., Lugilde L.L., Barrio M., Herradon P.G., Quintela L.A. Effects of Equex from different sources on post thaw survival, long evity and intracelular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 2003, 59: 1725-1739 (doi: 10.1016/S0093-691X(02)01233-5).
40. Thomas C., Garner D., De Jarnette J., Marshall C. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1997, 56: 991-998.
41. Vinogradov V.N., Strekozov N.I., Abilov A.I. et al. *Natsional'naya tekhnologiya zamorazhivaniya i ispol'zovaniya spermy plemennykh bykov-proizvoditelei* [National technology of freezing and use of pedigree bull sires]. Moscow, 2009 (in Russ.).
42. Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Klenovitskij P.M., Kononov V.P., Nasibov Sh.N., Voevodin V.A. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2011, 9: 54-56. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=16911151. No date (in Russ.).
43. Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Klenovitskiy P.M., Kononov V.P., Tadzieva A.V. The index of dna fragmentation in sperm chromatin as a criteria to predict an individual fecundity in bulls sires. *Agricultural Biology*, 2012, 4: 31-35 (doi: 10.15389/agrobiology.2012.4.31eng) (in Eng.).
44. Tadzhieva A.V., Sulima N.N. *Vestnik RUDN, seriya Agronomiya i zhivotnovodstvo*, 2015, 4: 89-92. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=24834978. No date (in Russ.).
45. Boiko E.V., Koropets L.A. *Vestnik Bryanskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii*, 2015, 3-1: 4-8. Available dostupa: http://elibrary.ru/item.asp?id=23478336. No date (in Russ.).
46. Aybazov M.M., Aksenova P.V., Serdyukov I.G. *Sel'skokhozyaistvennye zhivotnye*, 2013, 4: 9-10. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=20804276. No date (in Russ.).
47. Ozkavukcu S., Erdemli E., Isik A., Oztuna D., Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2008, 25(8): 403-411 (doi: 10.1007/s10815-008-9232-3).
48. Hammadeh M.E., Askari A.S., Georg T., Rosenbaum P., Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological and membrane integrity of

human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int. J. Androl.*, 1999, 22: 155-162 (doi: 10.1046/j.1365-2605.1999.00162.x).
49. Buhr M.M., Fiser P., Bailey J.L., Curtis E.F. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J. Androl.*, 2001, 22: 961-969 (doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb03436.x).
50. Gilmore J.A., Liu J., Gao D.Y., Critser J.K. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1997, 12: 112-118 (doi: 10.1093/humrep/12.1.112).
51. Chenoweth P.J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 2005, 64: 457-468 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.005).
52. Dahlbom M., Andersson M., Viertula M., Alanko M. Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyser: work in progress. *Theriogenology*, 1997, 48: 687-698 (doi: 10.1016/S0093-691X(97)00284-7).
53. Boersma A.A., Braun J., Stolla R. Influence of random factors and two different staining procedures on1 computer-assisted sperm head morphometry in bulls. *Reprod. Domest. Anim.*, 1999, 34: 77-82 (doi: 10.1111/j.1439-0531.1999.tb01387.x).
54. Purwantara B., Arifiantini R.I., Riyadhi M. Sperm morphological assessments of Friesian Holstein bull semen collected from three artificial insemination centers in Indonesia. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 2010, 2: 89-94 (doi: 10.14710/jitaa.35.2.90-94).
55. Söderquist L., Janson L., Heerd M., Einarsson S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy AI bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 1996, 44: 91-98.
56. Padrik P., Jaakma U. Sperm morphology in Estonian Holstein dairy bulls, factors affecting it and relation to fertility. *Agraarteadus*, 2002, 13: 243-256. Available http://agrt.emu.ee/pdf/2002_4_padrik.pdf. No date.
57. Hallap T., Nagy S., Hllrd M., Jaakma U., Johannisson A., Rodríquez-Martínez H. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. *Theriogenology*, 2005, 63: 1752-1763 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.001).
58. Makhzoomi A., Lundeheim N., Haard M., Rodríquez-Martínez H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology*, 2008, 70: 682-691 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.049).
59. Sarder M.J.U. Effects of age, body weight, body condition and scrotal circumference on sperm abnormalities of bulls used for artificial insemination (AI) programme in Bangladesh. *University Journal of Zoology, Rajshahi University*, 2008, 27: 73-78 (doi: 10.3329/ujzru.v27i0.1959).
60. Benchaib M., Braun V., Lornage J., Hadj S., Salle B., Herve L., François Guérin J. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.*, 2003, 18(5): 1023-1028 (doi: 10.1093/humrep/deg228).
61. Morris I.D., Ilott S., Dixon L., Brison D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (*Comet assay*) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.*, 2002; 17: 990-998 (doi: 10.1093/humrep/17.4.990).
62. Tomsu M., Sharma V., Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum. Reprod.*, 2002, 17(7): 1856-1862 (doi: 10.1093/humrep/17.7.1856).
63. Filatov M.V., Semenova E.V., Vorob'eva O.A., Leont'eva O.A., Drobchenko E.A. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5: 825-830 (doi: 10.1093/molehr/5.9.825).
64. Host E., Lindenberg S., Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 2000, 79: 559-563 (doi: 10.1034/j.1600-0412.2000.079007559.x).
65. Larson K.L., DeJonge C.J., Barnes A.M., Jost L.K., Evenson D.P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.*, 2000, 15(8): 1717-1722 (doi: 10.1093/humrep/15.8.1717).
66. Galimov Sh.N., Amirova Z.K., Galimova E.F. *Problemy reproduktsii*, 2005, 2: 19-22. Available http://elibrary.ru/item.asp?id=9157231. No date (in Russ.).
67. Evenson D.P., Jost L.K., Corzett M., Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J. Androl.*, 2000, 21: 739-746 (doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb02142.x).
68. Boe-Hansen G.B., Ersboll A.K., Greve T., Christensen P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*, 2005, 63: 2006-2019 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.006).
69. Bochenek M., Herjan T., Okylski A., Smorąg Z. Sperm chromatin abnormalities after semen sexing procedure — preliminary results. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, 2006, 18: 13-14.