

Репродуктивные биотехнологии

УДК 636.2:591.391.1:591.158.1

doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.824rus

ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ *in vitro* МЕТОДОМ МЕЖВИДОВОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК КОРОВ (*Bos taurus*) СЕМЕНЕМ ЗУБРА (*Bison bonasus*)*Г.Н. СИНГИНА, В.А. БАГИРОВ, С.С. ДАНЧ, Т.Е. ТАРАДАЙНИК, А.В. ДОЦЕВ,
Н.А. ЗИНОВЬЕВА

Малочисленный вид европейский бизон (*Bison bonasus*), или зубр, находится под угрозой исчезновения. Технология получения эмбрионов *in vitro* с использованием яйцеклеток коров и семени зубра может стать эффективным инструментом сохранения генетических ресурсов вида и их рационального использования в фундаментальных исследованиях по физиологии развития и для создания новых селекционных форм животных. Однако методы получения эмбрионов *in vitro* с участием вышеуказанных половых клеток в литературе не описаны. В настоящей работе впервые была предпринята попытка оплодотворения яйцеклеток коров спермой зубра и оценка их дальнейшего эмбрионального развития *in vitro* с использованием протокола IVM (*in vitro* maturation, созревание *in vitro*)/IVF (*in vitro* fertilization, оплодотворение *in vitro*)/IVC (*in vitro* culture, культивирование *in vitro*), применяемого для получения эмбрионов крупного рогатого скота (*Bos taurus*). Источником половых клеток самок служили яичники коров, отобранные после убоя. Ооцит-кумуляусные комплексы (ОКК) выделяли методом рассечения видимых фолликулов. ОКК культивировали группами по 25-35 ооцитов в 500 мкл модифицированной среды ТС-199 под слоем легкого минерального масла («Sigma», США) в течение 24 ч. Созревшие яйцеклетки переносили в среду оплодотворения. Замороженную эпидидимальную сперму зубра размораживали и обрабатывали методом «swim-up». Созревшие ооциты коров культивировали совместно со сперматозоидами в среде Fert-TALP в течение 18 ч, после чего их переносили в эмбриональную среду и культивировали до стадии бластоцисты. В качестве контроля часть яйцеклеток коров культивировали с эякулированным семенем быка. Результативность оплодотворения спермой обоих видов оценивали по характеру взаимодействия между исходными половыми клетками, а также по компетенции оплодотворенных яйцеклеток к раннему эмбриональному развитию. Доля ооцитов с признаками полиспермии была выше после оплодотворения спермой зубра, чем после оплодотворения бычьим семенем: соответственно 21,6 и 8,5 % ($P < 0,05$). При этом мы не выявили различий между двумя видами спермы в доле яйцеклеток с признаками проникновения сперматозоидов через зону пеллюцида ($90,0 \pm 0,3$ и $93,3 \pm 1,7$ % соответственно для спермы быка и зубра), а также в доле нормально оплодотворенных ооцитов ($78,3 \pm 1,7$ и $73,2 \pm 2,3$ %). Кроме того, в обоих случаях сходными были доля раздробившихся ооцитов и выход бластоцист. Представленные данные свидетельствуют о сходстве механизмов активации ооцитов и их эмбрионального развития у коровы и самок зубра. Также очевидно, что протокол IVM/IVF/IVC для крупного рогатого скота в целом позволяет получать *in vitro* гибридные эмбрионы коровы и зубра, но высокая степень полиспермии, наблюдаемая при гетерогенном оплодотворении, указывает на необходимость его корректировки.

Ключевые слова: ооциты коров, сперма Европейского бизона, оплодотворение *in vitro*, гибридные эмбрионы.

Европейский бизон, или зубр (*Bison bonasus*), — малочисленный вид, находящийся под угрозой исчезновения. Современная популяция европейского бизона сильно заинбридирована. Все современные зубры происходят от 12 особей, находившихся в начале XX века в зоопарках и заповедниках (1). Низкая генетическая изменчивость — одна из главных угроз для долгосрочного сохранения вида. Применение вспомогательных репродуктивных технологий, в частности получения эмбрионов *in vitro* с использованием яйцеклеток домашнего крупного рогатого скота и семени зубра, поможет не только сохранить имеющиеся генетические ресурсы вида, но и рационально использовать их в фундаментальных исследованиях по физиологии развития и для создания новых селекционных форм животных (2-4).

* Работа поддержана Программой Президиума Российской академии наук, номер проекта IV.13.3.

Яйцеклетки коров — универсальный объект для межвидовой гибридизации. В литературе имеются данные об их оплодотворении *in vitro* семенем гаура (5), антилоп (6), лошадей (7), овец (8) и ослов (9). Предпосылкой экстракорпоральной гибридизации между ооцитами коров и спермой зубра служит близкое родство видов, отсутствие специфических антигенов на зоне пеллюцида (ЗП) яйцеклеток коров к сперматозоидам зубра (10), а также описанная ранее возможность получения от их скрещивания гибридного потомства (11).

Современное развитие технологий *in vitro* делает возможным эффективное и масштабное получение эмбрионов у домашних животных (12-16). Однако при межвидовом экстракорпоральном оплодотворении (даже с участием близкородственных видов) биологическая полноценность ооцитов в процессе дальнейшего эмбрионального развития снижается (17). Один из вариантов решения проблемы — корректировка метода в зависимости от специфичности исходных половых клеток и эмбрионов.

При экстракорпоральной гибридизации с участием половых клеток редких и диких видов в качестве исходных протоколов для IVM (*in vitro* maturation, созревание *in vitro*)/IVF (*in vitro* fertilization, оплодотворение *in vitro*)/IVC (*in vitro* culture, культивирование *in vitro*), как правило, используют схемы, разработанные для домашних животных (17-19). Собственная технология получения эмбрионов *in vitro* для зубра пока не смоделирована. Случаи развития гибридов между *Bos taurus* и *Bison bonasus* в аналогичных условиях в литературе также не описаны.

В настоящей работе впервые показана возможность формирования и развития до стадии бластоцисты межвидовых гибридов, полученных после оплодотворения *in vitro* ооцитов коров спермой зубра.

Целью исследования было оплодотворение яйцеклеток коров спермой зубра и оценка их дальнейшего эмбрионального развития *in vitro* с использованием протокола, рутинно применяемого для получения *in vitro* эмбрионов домашнего крупного рогатого скота.

Методика. Источником половых клеток самок служили яичники коров, отобранные после убоя и доставленные в лабораторию в течение 2-3 ч при 30-35 °С.

Ооцит-кумулусные комплексы (ОКК) выделяли методом рассечения видимых фолликулов и промывали 3 раза в среде ТС-199, содержащей 5 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 10 мкг/мл гепарина, 0,2 мМ пирувата натрия и 50 мкг/мл гентамицина («Sigma», США). Для экспериментов отбирали ооциты округлой формы с гомогенной цитоплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные компактным кумулюсом. ОКК культивировали группами по 25-35 ооцитов в 500 мкл модифицированной среды ТС-199 (20) под слоем легкого минерального масла («Sigma», США) в течение 24 ч. Созревшие яйцеклетки переносили в среду оплодотворения Fert-TALP, содержащую 114 мМ NaCl, 3,2 мМ KCl, 0,4 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2 мМ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 мМ $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 25 мМ NaHCO_3 , 10 мМ HEPES, 10 мМ лактата натрия, 0,25 мМ пирувата натрия, 6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10 мкг/мл гепарина, 20 мкМ пенициламина, 10 мкМ гипотаурина, 1 мкМ эпинефрина, 0,1 % заменимых аминокислот и 50 мкг/мл гентамицина («Sigma», США).

Для оплодотворения яйцеклеток использовали замороженное эпидидимальное семя, полученное после вынужденного отстрела зубра в возрасте 7 лет (оплодотворение ♀ корова — ♂ зубр). Контролем служило семя быка (оплодотворение ♀ корова — ♂ бык). Перед процедурой сперму раз-

мораживали в течение 1 мин при 37 °С и обрабатывали методом «swim-up» (21) с использованием среды Sperm-TALP, содержащей 100 мМ NaCl, 3,1 мМ KCl, 0,3 мМ NaH₂PO₄ · 2H₂O, 2 мМ CaCl₂ · 2H₂O, 1,5 мМ MgCl₂ · 6H₂O, 25 мМ NaHCO₃, 10 мМ HEPES, 21,6 мМ лактата натрия, 1 мМ пирувата натрия, 6 мг/мл БСА («Sigma», США). Полученную фракцию активных сперматозоидов добавляли в чашки со средой Fert-TALP и созревшими ооцитами в дозе 1,0×10⁶ сперматозоидов/мл.

Через 18-20 ч совместного культивирования ооциты освобождали от клеток кумулюса и налипших сперматозоидов, после чего часть из них использовали для цитологического анализа доли пенетрации и оплодотворения. Остальные переносили в специализированную среду (22) и культивировали до 7-х сут. Определяли долю раздробившихся яйцеклеток и выход бластоцист.

Для цитогенетического исследования ядерного материала осемененных ооцитов их фиксировали в 4 % параформальдегиде, подвергали процедуре пермеабиллизации в 0,5 % растворе Triton X-100, окрашивали DAPI в концентрации 1 мкг/мл («Sigma», США), после чего переносили на сухое обезжиренное стекло и заключали в среду Vectashield («Vector Laboratories», Великобритания). Цитологические препараты исследовали с использованием флуоресцентной световой микроскопии (микроскоп Axiovert 40 CFL, «Carl Zeiss», Германия) при увеличении ×40.

При подсчете доли пенетрации учитывали наличие в цитоплазме созревших ооцитов конденсированных головок сперматозоидов и мужских пронуклеусов. Яйцеклетки с мужским и женским пронуклеусами или конденсированной головкой сперматозоида, а также находящиеся в анафазе II или телофазе II относили к клеткам с нормальным оплодотворением. Кроме того, ооциты, содержащие в цитоплазме более двух конденсированных головок сперматозоида и более двух мужских пронуклеусов, определяли как яйцеклетки с полиспермным оплодотворением.

Созревание и оплодотворение ОКК, а также культивирование эмбрионов осуществлялось при температуре 38,5 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и 90 % влажностью.

Эксперименты по культивированию ОКК были выполнены в 3-4 независимых повторах. Данные обрабатывали методом однофакторного дисперсионного анализа в программе SigmaStat («IMB SPSS», США). Достоверность различий сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки. Приведены значения в процентах (X) и ошибка средней (m).

Результаты. Домашний крупный рогатый скот (*Bos taurus*) — лидер по эффективности и масштабности получения эмбрионов *in vitro*. Существуют данные об экстракорпоральном оплодотворении яйцеклеток коров семенем различных видов животных (6-9), в том числе близкородственных: гаура (*Bos gaurus*), бантенга (*B. javanicus*) (5), яка (*B. grunniens*) (5, 18), африканского (*Syncerus caffer caffer*) и азиатского (*Bubalus bubalis*) буйволов (17, 19), а также американского бизона (*Bison bison*) (23).

Анализ данных, полученных в настоящей работе (табл. 1), показал возрастание доли ооцитов с признаками полиспермии при межвидовом оплодотворении (на 13,1 %, $P < 0,05$) по сравнению с внутривидовым, но не выявил различий между двумя видами оплодотворения ни в доле яйцеклеток с признаками проникновения сперматозоидов через зону пеллюцида, ни в доле нормально оплодотворенных ооцитов. По данным литературы, при IVF у коров полиспермия наблюдается в 8-55 % случаев и зависит

от индивидуальных особенностей быка, концентрации спермы, а также условий капацитации и оплодотворения (24–25).

Как и в большинстве других работ, для получения межвидовых гибридных эмбрионов мы использовали технологическую систему, применяемую при экстракорпоральном оплодотворении у крупного рогатого скота (26). Поскольку в случае контакта яйцеклеток коров со сперматозоидами быка полиспермия была ниже, чем при их взаимодействии со сперматозоидами зубра, можно предположить, что при межвидовом оплодотворении была использована слишком высокая концентрация мужских половых клеток или условия взаимодействия женских и мужских клеток оказались неадекватными. Следует отметить, что сходные результаты наблюдались также при оплодотворении *in vitro* яйцеклеток коров семенем яка (18).

1. Результаты экстракорпорального оплодотворения яйцеклеток коров (*Bos taurus*) заморожено-оттаянным эпидидимальным семенем быка и зубра (*Bison bonasus*) ($X \pm m$)

Оплодотворение	Число экспериментов	Осемененных ооцитов, <i>n</i>	Доля ооцитов, %		
			с признаками пенетрации	с признаками нормального оплодотворения	с признаками полиспермного оплодотворения
♀ корова—♂ бык	3	77	90,0±0,3	78,3±1,7	8,5±1,8 ^a
♀ корова—♂ зубр	3	81	93,3±1,7	73,2±2,3	21,6±0,8 ^b

^{a, б} Различия достоверны при $p < 0,05$.

В более раннем исследовании гетерогенное оплодотворение яйцеклеток коров было использовано для оценки фертильности спермы европейского бизона. Результативность осеменения определяли по проникновению спермиев через ЗП ооцита и по формированию пронуклеусов (10). Вместе с тем лучшим свидетельством успешного взаимодействия половых клеток служит образование и развитие эмбрионов.

В наших экспериментах доля раздробившихся ооцитов и выход бластоцист после осеменения яйцеклеток коров спермой зубра были высокими и не отличались от таковых после оплодотворения спермой быка (табл. 2). Кроме того, в обоих случаях показатели эмбрионального развития соответствовали традиционным значениям, получаемым при IVF у крупного рогатого скота (13, 26).

2. Раннее эмбриональное развитие яйцеклеток коров (*Bos taurus*) после *in vitro* оплодотворения заморожено-оттаянным эпидидимальным семенем зубра (*Bison bonasus*) ($X \pm m$)

Оплодотворение	Число экспериментов	Осемененных ооцитов, <i>n</i>	Доля раздробившихся ооцитов, %	Доля ооцитов, развившихся до стадии бластоцисты, %	
				от осемененных	от раздробившихся
♀ корова—♂ бык	4	143	72,4±2,5	26,7±1,9	37,1±2,6
♀ корова—♂ зубр	4	131	77,1±2,5	27,8±3,5	35,8±3,3

Результаты наших и проведенных другими авторами исследований (10) указывают на то, что мужские половые клетки самцов зубра способны распознавать специфическую углеводную последовательность гликопротеина прозрачной оболочки яйцеклеток коров и преодолевать межвидовой барьер, а ферменты акросом способствуют проникновению спермиев внутрь ксеногенных ооцитов. Кроме того, факт формирования двухклеточных гибридных эмбрионов и их развитие до стадии бластоцисты свидетельствует о сходстве механизмов активации ооцитов и их эмбрионального развития у коровы и самок зубра.

Таким образом, яйцеклетки коров могут быть оплодотворены спермой зубра, а полученные межвидовые зиготы способны формировать

эмбрионы предимплантационной стадии развития. Также очевидно, что протокол IVM/IVF/IVC крупного рогатого скота в целом позволяет получать *in vitro* гибридные эмбрионы коровы и зубра, но высокая степень полиспермии, наблюдаемая при гетерогенном оплодотворении, указывает на необходимость его корректировки.

ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства
им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: g_singina@mail.ru

Поступила в редакцию
28 сентября 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 6, pp. 824-829

IN VITRO PRODUCTION OF INTERSPECIES HYBRID EMBRYOS OF CATTLE (*Bos taurus*) AND WISENT (*Bison bonasus*)

G.N. Singina, V.A. Bagirov, S.S. Danch, T.E. Taradainik, A.V. Dotsev, N.A. Zinovieva

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 g_singina@mail.ru

Acknowledgements

Supported by the Program of Presidium of the Russian Academy of Science (project No IV.13.3)

Received September 28, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2016.6.824eng

Abstract

European bison or wisent (*Bison bonasus*) is a rare species that is endangered. The technology for producing *in vitro* embryos using oocytes of cows and wisent semen can be an effective tool for conservation of genetic resources of this species and their rational use in basic research on the physiology of development and to create the new animals' types. However, the methods for production of *in vitro* embryos using the above-mentioned germ cells are currently not described in the literature. In this work, we first attempted to obtain the hybrid cow-wisent embryos *in vitro* using the IVM/IVF/IVC protocol, developed for domestic cattle (*Bos taurus*). Frozen epididymal sperm derived from wisent was thawed and prepared by the swim-up procedure. Matured oocytes were co-incubated during 18 h together with prepared sperm in Fert-Talp medium, which was replaced then by embrional medium where the embryos were cultured until the blastocyst state. Additionally, for positive control, a part of matured bovine oocytes were fertilized with frozen/thawed ejaculated bull sperm. Fertilizing capacity of male cells of both species was assessed according to the nature of spermatozoa-egg interactions, as well as the capacity of fertilized bovine oocytes to subsequent embryonic development. It was found that the rate of oocytes with sing polyspermy was higher for fertilization with wisent sperm comparing to allogenic insemination (21.6 vs. 8.5 %, $P < 0.05$). There were no differences between two types of fertilizations nether for the sperm penetration rate (90.0 ± 0.3 vs. 93.3 ± 1.7 % for bull and wisent, respectively), nor for the rate of normal fertilization (78.3 ± 1.7 % vs. 73.2 ± 2.3 %). The similar cleavage and blastocyst formation rates were observed for two fertilization types. Our data indicate the similarity in the mechanisms of oocyte activation and embryonic development in cow and wisent females. In addition, it is obvious that IVM/IVF/IVP protocol, in general, allows *in vitro* producing cattle-wisent hybrid embryos, however, high levels of polyspermy observed in heterogeneous fertilization, indicates the necessity to adjust the method.

Keywords: cattle oocytes, the European bison sperm, fertilization *in vitro*, hybrid embryos.

REFERENCES

1. Olech W. Analysis of inbreeding in European bison. *Acta Theriologica*, 1987, 32: 373-387.
2. Kozdrowski R., Nizański W., Dubiel A., Olech W. Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2011, 9(1): 31 (doi: 10.1186/1477-7827-9-31).
3. Khandoker M.A.M.Y., Reza M.M.T., Asad L.Y., Saha S., Apu A.S., Hoque S.A.M. *In vitro* maturation of buffalo oocytes and fertilization by cattle spermatozoa. *Bang. J. Anim. Sci.*, 2012, 41(1): 6-12 (doi: 10.3329/bjas.v41i1.11969).
4. 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/agrobiol.2014.6.3eng) (in Engl.).
5. McHugh J.A., Rutledge J.J. Heterologous fertilization to characterize spermatozoa of

- the genus *Bos*. *Theriogenology*, 1998, 50(2): 185-193 (doi: 10.1016/S0093-691X(98)00125-3).
6. Kouba A.J., Atkinson M.W., Gandolf A.R., Roth T.L. Species-specific sperm-egg interaction affects the utility of a heterologous bovine in vitro fertilization system for evaluating antelope sperm. *Biol. Reprod.*, 2001, 65(4): 1246-1251 (doi: 10.1095/biolreprod65.4.1246).
 7. Campos-Chillun L.F., Barcelo-Fimbres M., Carnevale E.M., Seidel G.E.J. Use of bovine oocytes to evaluate in vitro fertilizing capacity of equine sperm. *Theriogenology*, 2007, 68(3): 515-516 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.036).
 8. Garcia-Alvarez O., Maroto-Morales A., Martínez-Pastor F., Fernández-Santos M.R., Estes M.C., Pérez-Guzmán M.D., Soler A.J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 2009, 71(4): 643-650 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.036).
 9. Taberner E., Morato R., Mogas T., Miro J. Ability of Catalonian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010, 118(2-4): 354-361 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.08.005).
 10. Pérez-Garnelo S.S., Oter M., Broque C., Talavera C., Delclaux M., Martínez-Nevado E., Palasz A.T., De la Fuente J. Post-thaw viability of European Bison (*Bison bonasus*) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous in vitro fertilization assay. *J. Zoo Wild Med.*, 2006, 37(2): 116-125 (doi: 10.1638/05-039.1).
 11. Ernst L.K., Abilov A.I., Sipko T.P., Shumov A.V., Sokolovskaya I.I., Kombarova N.A., Bronskaya A.V. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo*, 1993, 4: 19-21 (in Russ.).
 12. Cognie Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 171-188 (doi: 10.1016/S0093-691X(02)01270-0).
 13. Lonergan P., Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology*, 2008, 69(1): 17-22 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.007).
 14. Gil M.A., Cuello C., Parrilla I., Vazquez J.M., Roca J., Martínez E.A. Advances in swine in vitro embryo production technologies. *Reprod. Domest. Anim.*, 2010, 45: 40-48 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01623.x).
 15. Hinrichs K. In vitro production of equine embryos: state of the art. *Reprod. Domest. Anim.*, 2010, 45: 3-8 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01624.x).
 16. Dang-Nguyen T.Q., Somfai T., Haraguchi S., Kikuchi K., Tajima A., Kanai Y., Nagai T. In vitro production of porcine embryos: current status, future perspectives and alternative applications. *Anim. Sci. J.*, 2011, 82(3): 374-382 (doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00883.x).
 17. Owiny O.D., Barry D.M., Agabac M., Godke R.A. In vitro production of cattle × buffalo hybrid embryos using cattle oocytes and African buffalo (*Syncerus caffer caffer*) epididymal sperm. *Theriogenology*, 2009, 71(6): 884-894 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.016).
 18. Zi X-D., Lu H., Yin R-H., Chen S-W. Development of embryos after in vitro fertilization of bovine oocytes with sperm from either yaks (*Bos grunniens*) or cattle (*Bos taurus*). *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, 108(1-2): 208-215 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.08.005).
 19. Kochhar H.P.S., Appa Rao K.B.C., Luciano A.M., Totey S.M., Gandolfi F., Basrur P.K., King W.A. In vitro production of cattle-water buffalo (*Bos taurus – Bubalus bubalis*) hybrid embryos. *Zygote*, 2002, 10(2): 155-162 (doi: 10.1017/S0967199402002216).
 20. Singina G., Taradajnic T., Taradajnic N., Zinovieva N. Effects of in vitro culture system modification using CR1aa medium on embryo development and pregnancy rate in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2014, 26(1): 154 (doi: 10.1071/RDv26n1Ab81).
 21. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 1986, 25(4): 591-600 (doi: 10.1016/0093-691X(86)90143-3).
 22. Rosenkrans C.F.Jr., First N.L. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J. Anim. Sci.*, 1994, 72(2): 434-437.
 23. Krishnakumar S., Whiteside D., Dance A., Elkin B., Thundathil J. Effect of chilling duration on post-thaw characteristics of sperm from the North American bison (*Bison bison*). *Reprod. Dom. Anim.*, 2013, 48(4): 636-642 (doi: 10.1111/rda.12137).
 24. Chikamatsu N., Urakawa M., Fukui Y., Aoyagi Y., Ono H. In vitro fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured in different culture systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 1989, 35: 154-158.
 25. Long C.R., Pinto-Correia C., Duby R.T., Ponce de Leon F.A., Boland M.P., Roche J.F., Robl J.M. Chromatin and microtubule morphology during the first cell cycle in bovine zygotes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1993, 36(1): 23-32 (doi: 10.1002/mrd.1080360105).
 26. Singina G.N., Taradainik T.E., Taradainik N.P. *Problema biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2011, 4: 132-133 (in Russ.).