

**ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СЕМЕНИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ*****Б.С. ИОЛЧИЕВ, В.А. БАГИРОВ, М.А. ЖИЛИНСКИЙ, Н.А. ВОЛКОВА,
Н.А. ЗИНОВЬЕВА**

Формирование криобанков — важнейшее условие применения вспомогательных репродуктивных технологий, которые позволяют эффективнее использовать генетический материал, обеспечивать максимальную численность потомства, восстанавливать и сохранять редкие и исчезающие виды. Наиболее распространенным биоматериалом в программах по сохранению и восстановлению генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы служат сперматозоиды. При замораживании и оттаивании они подвергаются сильному технологическому воздействию. Некоторые этапы этой процедуры приводят к гибели значительной части клеток, повреждению их органелл или сегментов. В настоящей работе впервые получены данные, подтверждающие, что в процессе эквilibрации содержание мертвых сперматозоидов в генеративной плазме значительно увеличивается, независимо от вида птиц. Целью нашей работы было изучение влияния цикла замораживания и оттаивания на биологические характеристики сперматозоидов у разных видов сельскохозяйственной птицы. Объектом исследований служили половозрелые петухи *Gallus gallus* L. ($n = 6$), перепела *Coturnix coturnix* L. ($n = 10$), цесари *Numida meleagris* L. ($n = 6$), индюки *Meleagris gallopavo* L. ($n = 3$) и гусаки *Anser anser* L. ($n = 4$). Были изучены следующие показатели свежеполученного и замороженного семени: содержание подвижных сперматозоидов, доля сперматозоидов с аномальной морфологией, процентное соотношение сперматозоидов с аномальной морфологией в области головки, средней части и жгутика. Сбор семени осуществляли 3 раза в неделю. Полученный эякулят разбавляли в соотношении 1:1 средой для разбавления спермы птиц, после чего проводили процедуру эквilibрации образцов при температуре 5 °С в течение 180 мин. Перед криоконсервацией в образцы добавляли диметилацетамид в качестве криопротектора, поэтапно доводя его концентрацию до 8 %. Замораживали образцы в соломинках объемом 0,25 мл. Использовали автоматический замораживатель Biofreeze BV-65 («Consarctic Entwicklung Und Handels GmbH», Германия). Качество спермы оценивали при микроскопировании (Nikon, «Nikon Corporation», Япония, микроскоп оборудован системой ввода изображений) с помощью программного обеспечения Зоосперм 1.0 (ООО «ВидеоТесТ», Россия). Для определения доли жизнеспособных сперматозоидов применяли суправитальную окраску мазка клеток 5 % раствором эозина. Показатели качества свежеполученного семени соответствовали установленным требованиям. Было выявлено ухудшение биологической полноценности сперматозоидов в процессе цикла замораживание-оттаивание у всех видов сельскохозяйственной птицы, обусловленное снижением активности половых клеток. В то же время можно говорить о видоспецифичности повреждающего воздействия криоконсервации на различные характеристики спермы. У всех видов в процессе эквilibрации семени доля живых сперматозоидов уменьшалась на 7,0-10,6 %. После цикла замораживание-оттаивание доля живых сперматозоидов в эякуляте у петухов снижалась на 41,6 % (по сравнению с показателями для свежеполученной спермы) при увеличении числа сперматозоидов с аномальной морфологией на 22,0 %, у перепелов эти значения составили 43,8 и 21,8 %, у цесарей — 49,1 и 28,8 %. Наиболее выраженные дефекты (визуально обнаруживаемые под микроскопом) в морфологии сперматозоидов отмечались в области шейки и жгутика.

Ключевые слова: *Gallus gallus* L., петухи, *Coturnix coturnix* L., перепела, *Numida meleagris* L., цесари, *Meleagris gallopavo* L., индюки, *Anser anser* L., гусаки, криоконсервация, сперматозоиды, аномалии, замораживание-оттаивание, эквilibрация, качество спермы.

Птицепродукты — один из основных источников белков, жиров, минеральных веществ и витаминов среди продуктов питания (1). Быстрые мировые темпы развития птицеводства (с 2012 по 2016 год численность кур в России увеличилась на 14,6 %, в мире — на 10,8 %) (2) обусловлены его экономической эффективностью (известно, что птица превосходит других сельскохозяйственных животных по скороспелости и конверсии корма). Объем производства мяса птицы составляет более 300 млн т/год, но потребность в продукции птицеводства удовлетворяется лишь на 34 %. Это в соче-

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-16-04104 (оценка биологических параметров семени перепелов, гусаков, индюков) и в рамках задания Федерального агентства научных организаций (ФАНО России) № АААА-А18-118021590132-9 (оценка биологических параметров семени петухов).

тании с технологичностью отрасли стимулирует ее развитие (3, 4).

К сдерживающим факторам относится недостаточное применение вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе криоконсервации и искусственного осеменения — методов, позволяющих компенсировать репродуктивные потери, которые связывают с ростом продуктивности животных (5). Криоконсервация биологического материала служит важнейшим звеном интеграции репродуктивных технологий в практику (6-8). Однако в птицеводстве использование криоконсервированной спермы ограничено, что во многом обусловлено неудовлетворительным качеством оттаянного семени. При замораживании и оттаивании генеративной плазмы птиц снижается фертильность сперматозоидов (9, 10). Сперматозоиды птиц имеют минимальный размер цитоплазмы при относительно большой поверхности плазматической мембраны, единственные цитоплазматические органоиды — митохондрии (11, 12), ядро содержит очень конденсированный хроматин. В цикле замораживания-оттаивания в основном повреждаются плазматические и митохондриальные мембраны, в результате нарушается целостность ядерной и митохондриальной ДНК, теряется активность сперматозоидов (13-15). У птиц строение сперматозоидов значительно отличается от такового у млекопитающих: длина жгутика составляет 90-100 мкм, что примерно в 8 раз больше длины головки (16-18).

Химические и физические воздействия в процессе замораживания-оттаивания неизбежно приводят к изменениям в ультраструктуре сперматозоидов и отражаются на их биологической полноценности. Криоконсервация вызывает повреждение органелл и сегментов клеток. Имеющиеся в клетках незначительные повреждения при замораживании и оттаивании усиливаются, и клетки теряют биологическую полноценность. Криорезистентность сперматозоидов и способность противостоять повреждающему эффекту ультранизкой температуры зависят от состояний мембран, их проницаемости, липидного состава, текучести (19, 20). Вследствие таких изменений коэффициент эффективности осеменения оттаянной спермой значительно ниже, чем свежеполученной и охлажденной (21-24).

Криорезистентность сперматозоидов птиц зависит от видовой особенности, несмотря на сходство морфологии (25). Отмечают внутривидовую вариабельность по криоустойчивости в зависимости от линейной принадлежности самцов петухов (26). У мускусного селезня сперматозоиды более криоустойчивы, чем у пекинской утки, сперма цесарей, если сравнивать со спермой петуха и индюка, очень чувствительны к криоконсервации (27). На биологическую полноценность сперматозоидов влияют абиотические факторы при технологической обработке. Основной из них — состав разбавителей и криопротекторов, режим замораживания и оттаивания (28, 29). Реакция сперматозоидов на эти факторы зависит от видовой особенности птиц. С увлечением срока хранения доля мертвых и аномальных сперматозоидов увеличивается. Это также зависит от породной и видовой особенности птицы: например, в сперме цесарей процесс происходит интенсивнее, чем у петухов (30).

В настоящей работе мы впервые сравнили биологические параметры спермиев у основных видов сельскохозяйственной птицы (петухи, перепела, цесари, индюки, гусаки) на разных технологических этапах в цикле замораживания-оттаивания и получили данные, подтверждающие, что в процессе эквilibрации содержание мертвых сперматозоидов в генеративной плазме значительно увеличивается независимо от вида птицы.

Нашей целью было изучение влияния цикла замораживания и оттаивания на биологические параметры сперматозоидов у разных видов

сельскохозяйственной птицы.

Методика. Полновозрастных петухов *Gallus gallus* L. ($n = 6$), перепелов *Coturnix coturnix* L. ($n = 10$), цесарей *Numida meleagris* L. ($n = 6$), индюков *Meleagris gallopavo* L. ($n = 3$) и гусаков *Anser anser* L. ($n = 4$), отобранных для опыта, содержали в индивидуальных клетках (физиологический двор, ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2017-2018 годы). Рацион птицы соответствовал нормативам, предусмотренным для каждого вида.

Семя получали 3 раза в неделю с помощью спинно-брюшинного массажа. Для разбавления, хранения и криоконсервации готовили синтетическую среду (бидистиллированная вода — 100 мл; фруктоза — 1,0 г; глюкоза — 1,0 г; Трис-НСI — 0,195 г; натрий фосфорнокислый двузамещенный — 1,1 г; глутамат натрия — 3,0 г). Эякуляты разбавляли синтетической средой в соотношении 1:1, после чего проводили эквilibрацию образцов при температуре 5 °С в течение 180 мин. Перед криоконсервацией в образцы добавляли диметилацетамид в качестве криопротектора, поэтапно доводя его концентрацию до 8 %. Образцы замораживали в соломинках объемом 0,25 мл. Использовали автоматический замораживатель Biofreeze BV-65 («Consarctic Entwicklung Und Handels GmbH», Германия).

Качество спермы оценивали при микроскопировании (Nikon Eclipse Ni, «Nikon Corporation», Япония; микроскоп оборудован системой ввода изображений) с помощью программного обеспечения Зоосперм 1.0 (ООО «ВидеоТест», Россия). Учитывали долю и сравнивали морфологию спермиев, перемещающихся прогрессивно-поступательно, непрямолинейно, а также неподвижных клеток. Для определения доли жизнеспособных сперматозоидов применяли суправитальную окраску мазка 5 % раствором эозина.

Обработку данных осуществляли в пакете программ Microsoft Excel. В таблицах представлены средние (M) и стандартные ошибки средних (\pm SEM). Достоверность различий оценивали по t -критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Показатели качества свежеполученного семени соответствовали установленным требованиям (табл. 1). Содержание подвижных сперматозоидов в эякулятах варьировало в зависимости от вида птицы. Наибольший показатель отмечали у перепелов — 87,5 %, минимальный — у гусаков (64,5 %). Средняя активность сперматозоидов в свежеполученной сперме у гусаков была ниже, чем у петухов, перепелов, цесарей и индюков соответственно на 21,4; 23,0; 17,0 и 17,0 %. Различия между средней подвижностью спермиев у гусаков и других исследуемых видов были статистически значимы ($p \leq 0,001$). Доля сперматозоидов с аномальной морфологией также была выше у гусаков (от 10,9 до 18,6 %, в среднем $14,6 \pm 1,2$ %). У перепелов, цесарей, петухов и индюков она была ниже соответственно на 1,8; 1,1; 5,4 и 5,0 % ($p \leq 0,001$). У цесарей сперматозоиды с морфологическими отклонениями от нормы встречались чаще, чем у петухов и перепелов, — соответственно на 4,3 и 3,9 % ($p \leq 0,01$).

1. Качественные показатели свежего семени, полученного от самцов разных видов сельскохозяйственной птицы

Вид	Размер выборки, n	Подвижные сперматозоиды, %	Сперматозоиды с аномальной морфологией, %	Живые сперматозоиды, %
Петухи	6	86,1 \pm 6,4	9,2 \pm 2,7	89,2 \pm 8,1
Перепела	10	87,5 \pm 3,8	9,6 \pm 1,2	92,5 \pm 6,1
Цесари	6	82,1 \pm 3,5	13,5 \pm 2,7*	91,6 \pm 5,4
Гусаки	4	64,5 \pm 8,2**	14,6 \pm 1,2**	76,5 \pm 8,1
Индюки	3	81,5 \pm 3,6	12,8 \pm 1,6	87,2 \pm 4,2

* Различия между цесарями, петухами и перепелами статистически значимы при $p \leq 0,01$.

** Различия между гусаками и остальными видами статистически значимы при $p \leq 0,001$.

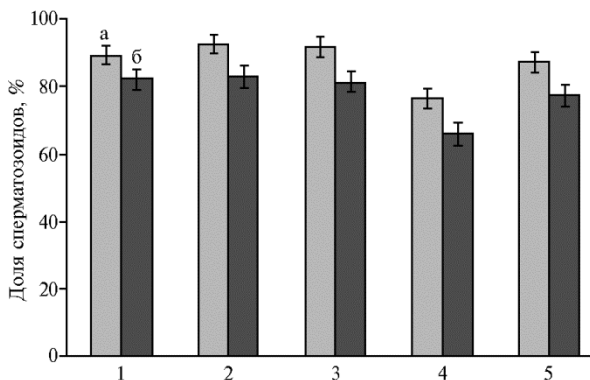


Рис. 1. Доля живых сперматозоидов в свежеполученном (а) и эквilibрированном (б) семени петухов (1), перепелов (2), цесарей (3), гусakov (4) и индюков (5).

стически значимы при $p \leq 0,01$.

После эквilibрации отмечалось некоторое снижение количества сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением.

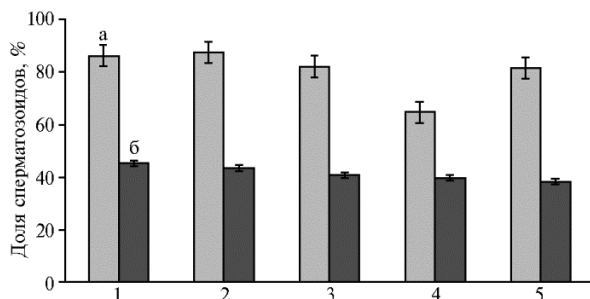


Рис. 2. Доля сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением в свежеполученном (а) и заморожено-оттаянном (б) семени петухов (1), перепелов (2), цесарей (3), гусakov (4) и индюков (5).

У петухов этот показатель снизился с 89,2 до 47,6 %, у перепелов — с 92,5 до 48,7 %, у цесарей — с 91,6 до 45,2 %, у гусakov — с 76,5 до 38,2 %, у индюков — с 87,2 до 48,5 %.



Рис. 3. Патология головки (1), шейки (2) и жгутика (3) у сперматозоидов цесаря (окрашивание эозином).

дов с патологией головки, среднего отдела и жгутика соответственно на

Доля живых сперматозоидов варьировала в зависимости от вида птицы от 76,5 до 92,5 %. В процессе эквilibрации она снижалась. Число мертвых сперматозоидов в образцах семени петухов после эквilibрации увеличилось на 7,0 %, у перепелов — на 9,5 %, цесарей — на 10,2 %, гусakov — на 10,6 % и у индюков — на 9,8 % (рис. 1). Различия в содержании живых сперматозоидов во всех исследуемых образцах были статисти-

чески значимы при $p \leq 0,01$. После эквilibрации отмечалось некоторое снижение количества сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением. В процессе дальнейшей криоконсервации и последующего оттаивания этот показатель значительно снижался. После оттаивания доля сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением у петухов уменьшилась на 40 %, перепелов — на 43 %, цесарей — на 41 %, гусakov — на 30 % и у индюков — на 44 % (рис. 2).

Цикл замораживания и оттаивания отрицательно влиял не только на актив-

ность, но и на долю живых сперматозоидов. У петухов этот показатель снизился с 89,2 до 47,6 %, у перепелов — с 92,5 до 48,7 %, у цесарей — с 91,6 до 45,2 %, у гусakov — с 76,5 до 38,2 %, у индюков — с 87,2 до 48,5 %.

В результате замораживания-оттаивания увеличилась доля сперматозоидов с аномальной морфологией (рис. 3). Наблюдалось изменение в частоте встречаемости аномалий в отдельных сегментах, увеличилось количество сперматозоидов с патологией жгутика (табл. 2). Так, у петухов в заморожено-оттаянных образцах по сравнению с показателями, установленными для свежеполученного эякулята, увеличилась доля сперматозои-

0,4, 0,4 и 1,3 % ($p \leq 0,001$). Аналогичная тенденция отмечалась и у других видов сельскохозяйственной птицы.

2. Доля (%) сперматозоидов с аномальной морфологией в свежеполученном (СПС) и семени и в образцах после замораживания-оттаивания (ЗО) у разных видов сельскохозяйственной птицы

Вид	Область аномалии					
	головка		средняя часть		жгутик	
	СПС	ЗО	СПС	ЗО	СПС	ЗО
Петухи	2,4±0,02	2,8±0,03*	2,6±0,02	3,0±0,03*	4,2±0,03	5,5±0,03*
Перепела	2,5±0,01	2,8±0,05*	2,3±0,03	3,1±0,02*	4,8±0,03	5,8±0,03*
Цесари	3,6±0,01	3,9±0,01*	3,7±0,02	4,6±0,03*	6,2±0,08	8,9±0,03*
Гусаки	4,8±0,02	5,2±0,06*	3,9±0,03	4,2±0,01*	5,9±0,02	7,4±0,02*
<u>Индюки</u>	4,3±0,02	4,9±0,02*	3,3±0,05	3,9±0,02*	4,6±0,03	5,8±0,04*

* Различия между средними значениями для СПС и ЗО статистически значимы при $p \leq 0,001$.

Цикл замораживания-оттаивания существенно изменяет биологические параметры спермиев, на которые влияют многие факторы. В ряде исследований подтверждена зависимость криоустойчивости сперматозоидов сельскохозяйственных птиц от видовых особенностей (например, по криоустойчивости сперматозоидов цесари и гуси уступают другим видам) (30, 31). При общности строения сперматозоидов ряд свойства, от которых зависит биологическая полноценность спермиев, видоспецифичны. Так, видоспецифичны различия в клеточных субфракциях сперматозоидов, длине, количестве митохондрий, в жгутиковых фиброзных оболочках и метаболических возможностях. Поэтому технологии криоконсервации, успешно используемые для одного вида, неприемлемы для других. Сперматозоиды цесаря и петуха по морфологическим и морфометрическим показателям имеют много сходств, но различаются по биохимическому составу (по соотношению холестерина и фосфолипидов), это отражается на биофизических свойствах мембраны. Мембраны сперматозоида цесаря по сравнению со сперматозоидом петуха жесткие, следовательно, по криоустойчивости уступают последним. При криоконсервации спермы цесаря по технологии, используемой для спермы петуха, коэффициент фертильности составляет всего 15 %. На биологическую полноценность сперматозоидов влияние методы расфасовки (в гранулах или паетах), скорость замораживания, оттаивания.

Доля сперматозоидов с аномальной морфологией зависит от видовых особенностей, используемых разбавителей и срока хранения. Ультраструктурные исследования подтверждают высокую корреляцию активности сперматозоидов с ультраструктурными повреждениями в жгутике и средней части спермия, от которых зависит кинематика сперматозоидов (32). Полученные нами данные световой микроскопии о нарушениях морфологии средней части и жгутика, а также о снижении активности после замораживания-оттаивания косвенно указывают на накопление в средней части и жгутике сперматозоидов ультраструктурных повреждений.

Таким образом, в процессе криоконсервации семени, полученного от самцов сельскохозяйственной птицы разных видов, ухудшается биологическая полноценность сперматозоидов вследствие снижения их активности. Эквилибрация семени перед криоконсервацией приводила к снижению доли живых сперматозоидов у всех видов сельскохозяйственной птицы. При этом доля половых клеток с аномальной морфологией возрастала. В процессе замораживания-оттаивания эти показатели значительно увеличивались. По сравнению со свежеполученной спермы содержание живых сперматозоидов после замораживания-оттаивания в эякулятах петухов снизилось на 41,6 % при увеличении содержания сперматозоидов с

аномальной морфологией на 22,0 %. У перепелов и цесарей значения этих показателей составили соответственно 43,8 и 21,8 %; 49,1 и 28,8 %. Наиболее выраженные нарушения в морфологии сперматозоидов отмечались в области жгутика.

ФГБНУ Федеральный научный центр
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: baylar2@mail.ru ✉, vugarbagirov@mail.ru, naitkin888@mail.ru,
natavolkova@inbox.ru, n_zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию
17 сентября 2018 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 6, pp. 1230-1237

CHANGE OF BIOLOGICAL PARAMETERS OF POULTRY SEMEN AT CRYOPRESERVATION

B.S. Iolchiev, V.A. Bagirov, M.A. Zhilinskiy, N.A. Volkova, N.A. Zinovieva

L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Federal Agency of Scientific Organizations, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail: baylar2@mail.ru (✉ corresponding author), vugarbagirov@mail.ru, naitkin888@mail.ru, natavolkova@inbox.ru, n_zinovieva@mail.ru

ORCID:

Iolchiev B.S. orcid.org/0000-0001-5386-726

Bagirov V.A. orcid.org/0000-0001-5398-8815

Zhilinskiy M.A. orcid.org/0000-0002-5541-9517

Volkova N.A. orcid.org/0000-0001-7191-3550

Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation (grant No. 16-16-04104, study of roosters with transplanted donor spermatogonia) and within the Program of Federal Agency of Scientific Organization (Agreement No. AAAA-A18-118021590132-9, study of transgenic roosters produced with the use of lentiviral vectors)

Received September 17, 2018

doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1230eng

Abstract

The cryobanks of genetic material are an important element of assisted reproductive technologies. This technology allows more efficient use of genetic material, ensuring to obtain the maximum possible number of offspring for to preserve and restore of rare and endangered species. The most common biomaterial used in programs for the conservation and restoration of the genetic resources of agricultural poultry are spermatozoa. The spermatozoa undergo significant technological treatment during freezing and thawing. Some stages of this cycle are lead to the death of a large part of the cells, damage to their individual organelles or segments. The aim of the research was to study the effect of the freezing and thawing cycle on the biological parameters of spermatozoa in agricultural poultry. The objects of research were adult males of different types of agricultural poultry: roosters *Gallus gallus* ($n = 6$), quails *Coturnix coturnix* ($n = 10$), guinea fowls *Numida meleagris* ($n = 6$), turkeys *Meleagris gallopavo* ($n = 3$) and geese *Anser anser* ($n = 4$). Qualitative and quantitative indices of freshly received and frozen semen were studied. These indicators include the percentage of mobile spermatozoa, the proportion of spermatozoa with abnormal morphology, the percentage ratio of spermatozoa with abnormal morphology in the head, middle part and flagellum. Sperm was collected 3 times a week. The ejaculates were diluted with the medium for bird sperm dilution (1:1) followed by equilibration of samples at a temperature of 5 °C for 180 minutes. Before cryopreservation, dimethylacetamide was added to the samples as a cryoprotectant by gradually increasing its concentration to 8 %. The samples were frozen in straws (0.25 ml) with an automatic freezer Cryobath Biofreeze BV-65 (CONSARCTIC, Germany). Sperm quality was assessed using software Zoo-sperm 1.0 (LLC VideoTesT Goss) and Nikon microscope (Nikon Corporation», Japan) equipped with an image input system. To determine the proportion of viable spermatozoa, a supravital staining of a cell smear with 5 % eosin solution was used. The quality indicators of freshly obtained semen complied with the requirements. It was found that the biological value of spermatozoa decreases during the freeze-thaw cycle in all species of poultry conditioned by a decrease in the activity of germ cells. The sperm of the goose was more cryoresistant than the sperm of roosters, quails and turkeys. In geese, after thawing frozen sperm, the content of sperm cells with a straight-forward movement decreased by 30 %, while in roosters, quails and turkeys up to 40-44 %. During semen equilibration, in all poultry species the proportion of live spermatozoa decreased by 7.0-10.6 %. After the freeze-thaw cycle, the proportion of live spermatozoa in the ejaculate decreased compared to the values found for freshly sperm. In roosters, this indicator decreased by 41.6 % with an increase in the percentage of spermatozoa with an abnormal morphology by 22.0 %. In quails these indicators were 43.8 % and 21.8 % and in guinea fowls — 49.1 % and 28.8 %. The most visible disturbances in the morphology of spermatozoa were noted in the flagellum.

Keywords: *Gallus gallus* L., roosters, *Coturnix coturnix* L., quails, *Numida meleagris* L., guinea fowl, *Meleagris gallopavo* L., turkeys, *Anser anser* L., geese, cryopreservation, spermatozoa, abnormalities, freeze-thaw, equilibration, semen quality.

REFERENCES

1. Tarasova N.V., Chernyakevich L.M. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2013, 4. Available <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9934>. Accessed September 10, 2018 (in Russ.).
2. FAOSTAT. *Livestock Primary*. Available <http://www.fao.org/faostat/ru/#data/QL>. Accessed September 10, 2018.
3. Mottet A., Tempio G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World Poultry Sci. J.*, 2017, 73(2): 245-256 (doi: 10.1017/S0043933917000071).
4. Vetrivel S.C., Chandrakumarmangalam S. The role of poultry industry in Indian economy. *Braz. J. Poult. Sci.*, 2013, 4(15): 287-293 (doi: 10.1590/S1516-635X2013000400001).
5. Lucy M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.*, 2001, 84(6): 1277-1293 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0).
6. Bagirov V.A., Iolchiev B.S., Volkova N.A., Zinov'eva N.A. Effect of cryopreservation on biological parameters of semen in Romanov breed x Argali hybrid rams. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, 2017, 52(2): 268-273 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.268rus).
7. Andrabi S.M.H., Maxwell W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim. Reprod. Sci.*, 2007, 99(3-4): 223-243 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.07.002).
8. Boettcher P.J., Akin O. Current arrangements for national and regional conservation of animal genetic resources. *Animal Genetic Resources*, 2010, 47: 73-83 (doi: 10.1017/S2078633610000949).
9. Mal'tsev A.B., Dymkov A.B. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*, 2008, 2: 50-52 (in Russ.).
10. Kurbatov A.D., Tsarenko R.G., Mavrodina T.G. *Byul. nauch. rabot VNIIRGZH*, 1979, vyp. 9: 35-39 (in Russ.).
11. Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F. Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction*, 2005, 129(3): 371-378 (doi: 10.1530/rep.1.00454).
12. Varadi E., Vegi B., Liptoi K., Barna J. Methods for cryopreservation of guinea fowl sperm. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e62759 (doi: 10.1371/journal.pone.0062759).
13. Blanco J.M., Gee G., Wildt D.E., Donoghue A.M. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and falcon spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 2000, 63(4): 1164-1171.
14. Blesbois E., Brillard J.P. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal*, 2007, 1(10): 1472-1481 (doi: 10.1017/S175173110700081X).
15. Tsel'yutin K.V. V sbornike nauchnykh trudov: *Teoriya i praktika seleksii yaichnykh i myasnykh kur* [Theoretical and practical aspects of egg and meat chickens breeding]. St. Petersburg—Pushkin, 2002: 48-55 (in Russ.).
16. Tur B.K., Mavrodina T.G., Klyushchinskaya G.I. V sbornike nauchnykh trudov: *Teoriya i praktika seleksii yaichnykh i myasnykh kur*. St. Petersburg—Pushkin, 2002: 76-83 (in Russ.).
17. Novgorodova I.P., Zhilinskii M.A., Volkova N.A., Bagirov V.A., Zinov'eva N.A. *Ptitsevodstvo*, 2016, 8: 2-7 (in Russ.).
18. Santiago-Moreno J., Esteso M.C., Villaverde-Morcillo S., Toledano-Déaz A., Castaño C., Velázquez R., López-Sebastián A., Goya López A.L., Gimeno Martínez J. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian J. Androl.*, 2016, 18(6): 882-888 (doi: 10.4103/1008-682X.188660).
19. Amann R., Pickett B. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, 1987, 7(3): 145-173 (doi: 10.1016/S0737-0806(87)80025-4).
20. Purdy P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res.*, 2006, 63(3): 215-225 (doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.02.015).
21. 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(3): 155-162 (doi: 10.1046/j.1365-2605.1999.00162.x).
22. 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(6): 961-969 (doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb03436.x).
23. Chenoweth P.J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 2005, 64(3): 457-468 (doi: 10.1016/J.theriogenology.2005.05.005).
24. Seigneurin F., Grasseau I., Chapuis H., Blesbois E. An efficient method of guinea fowl sperm cryopreservation. *Poultry Sci.*, 2013, 92(11): 2988-2996 (doi: 10.3382/ps.2013-03166).
25. Hudson G.H., Omprakash A.V., Premavalli K. Effect of semen diluents, dilution rates and storage periods on live and abnormal spermatozoa of pearl guinea fowls. *Asian Journal of Animal*

- and *Veterinary Advances*, 2016, 11(7): 411-416 (doi: 10.3923/ajava.2016.411.416).
26. Lukaszewicz E., Chrzanowska M., Jerysz A., Chelmonska B. Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser* L.) gander semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2004, 80(1-2): 163-173 (doi: 10.1016/S0378-4320(03)00119-2).
 27. Seigneurin F., Grasseau I., Chapuis H., Blesbois E. An efficient method of guinea fowl sperm cryopreservation. *J. Poultry Sci.*, 2013, 92(11): 2988-2996 (doi: 10.3382/ps.2013-03166).
 28. Alvarenga M.A., Landim-Alvarenga F.C., Moreira R.M., Cesarino M.M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal*, 2000, 32: 541-545 (doi: 10.2746/042516400777584749).
 29. Barbas J.P., Mascarenhas R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, 2009, 10(1): 49-62 (doi: 10.1007/s10561-008-9081-4).
 30. Dumpala P.R., Parker H.M., McDaniel C.D. The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen. *International Journal of Poultry Science*, 2006, 5(9): 838-845 (doi: 10.3923/ijps.2006.838.845).
 31. Siudzinska A., Lukaszewicz E. Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *Journal of Applied Poultry Research*, 2008, 17(1): 101-108 (doi: 10.3382/japr.2007-00048).
 32. Visco V., Raffa S., Elia J., Delfino M., Imbrogno N., Torrissi M.R., Mazzilli F. Morphological sperm defects analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy and their correlation with sperm motility. *International Journal of Urology*, 2010, 17(3): 259-266 (doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02451.x).