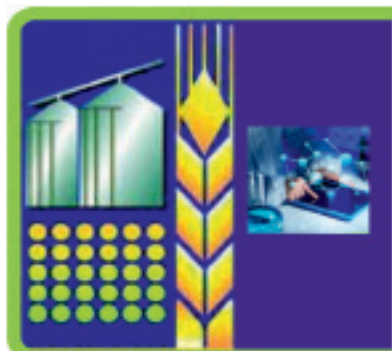




ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗВЕДЕНИЯ И СЕЛЕКЦИИ: БИОТЕХНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

GENETIC BASES OF BREEDING AND SELECTION: ANIMAL BIOTECHNOLOGY

УДК 636.03: 579.62

DOI:10.31677/2311-0651-2023-41-3-31-38

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАГЕНОМА СПЕРМЫ БЫКОВ

С.П. Яцентюк, кандидат биологических наук

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор)

E-mail: pcr-lab@vgnki.ru

Ключевые слова: сперма быков, метабеном, ДНК, микробиом, секвенирование нового поколения, биоразнообразие, качество спермопродукции.

Реферат. Целью работы было получение информации о микробных сообществах спермы быков, используемой для искусственного осеменения. Исследования 10 образцов криоконсервированной спермы быков, полученной в отечественном племенном хозяйстве, и 24 импортированных спермодоз проводили с использованием технологии секвенирования нового поколения на платформе Illumina Miseq. Для биоинформатического анализа использовали пакет программ QIIME2. Полученные данные полногеномного секвенирования показали невысокий уровень биоразнообразия исследованных образцов. Определены значения индексов разнообразия для двух групп образцов: спермы отечественных и иностранных быков. Значение индекса Шеннона составило $1,40 \pm 0,12$ и $1,30 \pm 0,08$ для каждой группы образцов соответственно. Расчет t-критерия Стьюдента показал отсутствие статистически значимых различий параметров α -биоразнообразия между этими группами. В образцах выявлено до 19 известных типов бактерий, из них только *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Tenericutes* присутствовали с частотой выше 5 %. В образцах спермы российских быков преобладали типы *Fusobacteria* и *Firmicutes*. В сперме иностранных быков преобладающим типом являлись *Proteobacteria*. Из детектированных в сперме 18 классов бактерий генетический материал 11 классов обнаружен хотя бы в одном из образцов с частотой, превышающей 5 %. В образцах российских быков выявлено до 13, а иностранных – до 15 родов бактерий с содержанием генетического материала выше 1 %. Преобладающим родом для образцов спермы отечественных быков был *Fusobacterium*, для иностранных – неидентифицированный род порядка *Clostridiales*. Отмечено присутствие в образцах представителей родов *Campylobacter* и *Pseudomonas*. Обсуждается возможная связь наличия определенных таксонов бактерий с морфофункциональными показателями качества спермы быков.

STUDY OF THE SPERM MICROBIOME OF BULLS USING METAGENOMIC ANALYSIS

S.P. Yatsentyuk, PhD in Biological Sciences

All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feeds of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor)

Keywords: bull sperm, metagenome, DNA, microbiome, next-generation sequencing, biodiversity, sperm quality.

Abstract. *The study aimed to obtain information about the microbial communities in bull sperm, which is used for artificial insemination. The research included ten samples of cryopreserved bull sperm obtained from domestic breeding farms and 24 imported sperm samples. Next-generation sequencing technology on the Illumina Miseq platform was used for the analysis. Bioinformatics analysis was performed using the QIIME2 software package. The obtained whole-genome sequencing data showed a low level of biodiversity in the analysed samples. Diversity index values were determined for two groups of samples: sperm from domestic and foreign bulls. The Shannon index values were 1.40 ± 0.12 and 1.30 ± 0.08 for each group, respectively. Student's t-test calculations indicated no statistically significant differences in the α -biodiversity parameters between these groups. Up to 19 known bacterial types were detected in the samples, with only Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Tenericutes present at frequencies exceeding 5%. Fusobacteria and Firmicutes dominated Russian bull sperm samples, while the predominant type in foreign bull sperm was Proteobacteria. Of the 18 detected bacterial classes, genetic material from 11 classes was found in at least one of the samples at a frequency exceeding 5%. Russian bull samples contained up to 13 genera of bacteria with genetic material above 1%, while foreign bull samples contained up to 15 genera. The predominant genus for domestic bull sperm samples was Fusobacterium, while for alien bull sperm, it was an unidentified genus of the Clostridiales order. The presence of representatives from the Campylobacter and Pseudomonas genera was also noted in the samples. Possible associations between the presence of specific bacterial taxa and morphofunctional indicators of bull sperm quality are discussed.*

По мере накопления информации о микробиоме различных систем крупного рогатого скота растет понимание того, какое влияние оказывают нормальные микробные сообщества на здоровье животных и как изменения микробиома воздействуют на такие качества, как продуктивность, фертильность и устойчивость к инфекциям. В последнее десятилетие идет накопление информации о метагеноме рубца крупного рогатого скота, изучается микробный состав молока здоровых и маститных коров [1–3]. При изучении микробиома репродуктивных органов коров была выявлена корреляция между составом микробиома и нарушениями репродуктивного здоровья [4–7]. Микробному сообществу, населяющему органы репродукции и сперму быков, уделялось значительно меньше внимания, первые публикации стали появляться лишь в последние 2 – 3 года. Отдельные исследования показали, что бактерии в сперме могут негативно влиять на сперматозоиды, вызывая снижение их подвижности, а также увеличение частоты агрегации [8, 9]. Недавние исследования показали, что присутствие бактерий в сперме встречается относительно часто, в том числе у быков с нормальными параметрами спермы, и следует предположить, что сперма имеет свою собственную специфическую микрофлору. Одной из причин нарушения подвижности сперматозоидов могут быть изменения в составе микробного сообщества, а специфическая бактериальная флора является необходимой для нормального функционирования сперматозоидов [10, 11].

Появление новых технологий секвенирования ДНК позволяет выявлять в образце наличие генетического материала как культивируемых, так и некультивируемых видов бактерий, оценивать представленность таксонов различного ранга, т.е. проводить метагеномные исследования. Метагеномом называют совокупность геномов и генов микроорганизмов в исследуемом образце, чаще всего имея в виду совокупность бактерий [5, 12]. Сбор информации о метагеноме спермы позволит прояснить сложную систему взаимосвязей между представителями микробного сообщества и сперматозоидами и понять влияние микроорганизмов разных групп на морфофункциональные качества сперматозоидов. Идентификация бактерий также может привести к изменениям использования антибиотиков в средах для разбавления спермы [13].

Целью настоящей работы было получение информации о составе микробных сообществ образцов криоконсервированной спермы быков, используемой для искусственного осеменения.

Для исследований были отобраны 34 образца криоконсервированной спермопродукции: 10 образцов спермы быков из отечественного племенного хозяйства, расфасованных в облицованные гранулы, и 24 спермодозы разных быков из иностранных племенцентров. ДНК из образцов выделяли с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), концентрацию выделенной ДНК измеряли на флуориметре Quantus (Promega) с использованием набора реагентов QuantiFluor®ONE dsDNA System (Promega). Библиотеку для метагеномных исследований готовили с использованием набора реактивов Nextera XT по инструкции производителя № 15044223 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Парно-концевое секвенирование 2•300 п.н. проводили на платформе Illumina Miseq с использованием набора реагентов MiSeq 600v3 Reagent Kit в соответствии с инструкцией Illumina Experiment Manager. User Guide (#15031335v05). Для биоинформатического анализа при метагеномных исследованиях использовали встроенное программное обеспечение Illumina Metagenomics 16S rRNA, версия 2.6.2.3, а также пакет программ QIIME2. Выравнивание полученных фрагментов ДНК выполнялось с помощью программы VSEARCH с использованием следующих параметров: идентичность 97 %, покрытие 95 %. При оценке результатов метагеномных исследований рассчитывали индексы Шеннона и Симпсона, характеризующие α -биоразнообразие. Расчет проводили с использованием интернет-ресурса [14].

Полученные данные полногеномного секвенирования показали невысокую бактериальную обсемененность образцов по сравнению с традиционно анализируемыми образцами животного происхождения, такими как, например, кишечник или образцы фекалий. Среднее значение индекса видового разнообразия Шеннона образцов спермы быков из отечественного племенного центра составило $1,40 \pm 0,12$, а образцов спермы иностранных быков – $1,30 \pm 0,08$, значения индекса Симпсона – $0,30 \pm 0,04$ и $0,31 \pm 0,03$ соответственно. Расчет t-критерия Стьюдента показал отсутствие статистически значимых различий параметров α -биоразнообразия между пробами из отечественных и иностранных племенных центров.

В образцах выявлено до 19 известных типов бактерий, однако, согласно проведенному филогенетическому анализу (рис. 1), таксономический состав микробного сообщества образцов спермы быков сформирован преимущественно представителями 6 типов (Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Tenericutes), которые определены хотя бы в одном из исследованных образцов с частотой выше 5 %.

Пять из шести выявленных в нашей работе доминирующих типов: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes и Fusobacteria – были ранее обнаружены в составе микробиоты семенной плазмы человека. Сходный состав был получен и при исследованиях спермы быков, но в отличие от данных, полученных при анализе микробиома свежеполученной спермы здоровых быков голштино-фризской породы, в микробиоме анализируемых нами образцов значительно меньше представлены Actinobacteria [12]. При этом в нашей работе в 76,5 % спермодоз были выявлены Tenericutes, не выявленные в образцах в исследовании словацких коллег [12], относительное содержание последовательностей которых в отдельных образцах достигало 18 %.

Анализ на уровне классов показал наличие в спермодозах 18 различных классов бактерий, но генетический материал только 11 из них обнаружен хотя бы в одном из образцов с частотой, превышающей 5 % (рис. 2).

Анализ двух отдельных групп образцов – спермы из отечественных и иностранных племенных хозяйств – показал четкие различия во встречаемости основных представителей бактериальной микрофлоры. В образцах спермы российских быков преобладающими типами были Fusobacteria и Firmicutes. На третьем месте по частоте были представлены Bacteroidetes. В сперме иностранных быков при этом в 87,5 % образцов преобладающим типом были представители Proteobacteria.

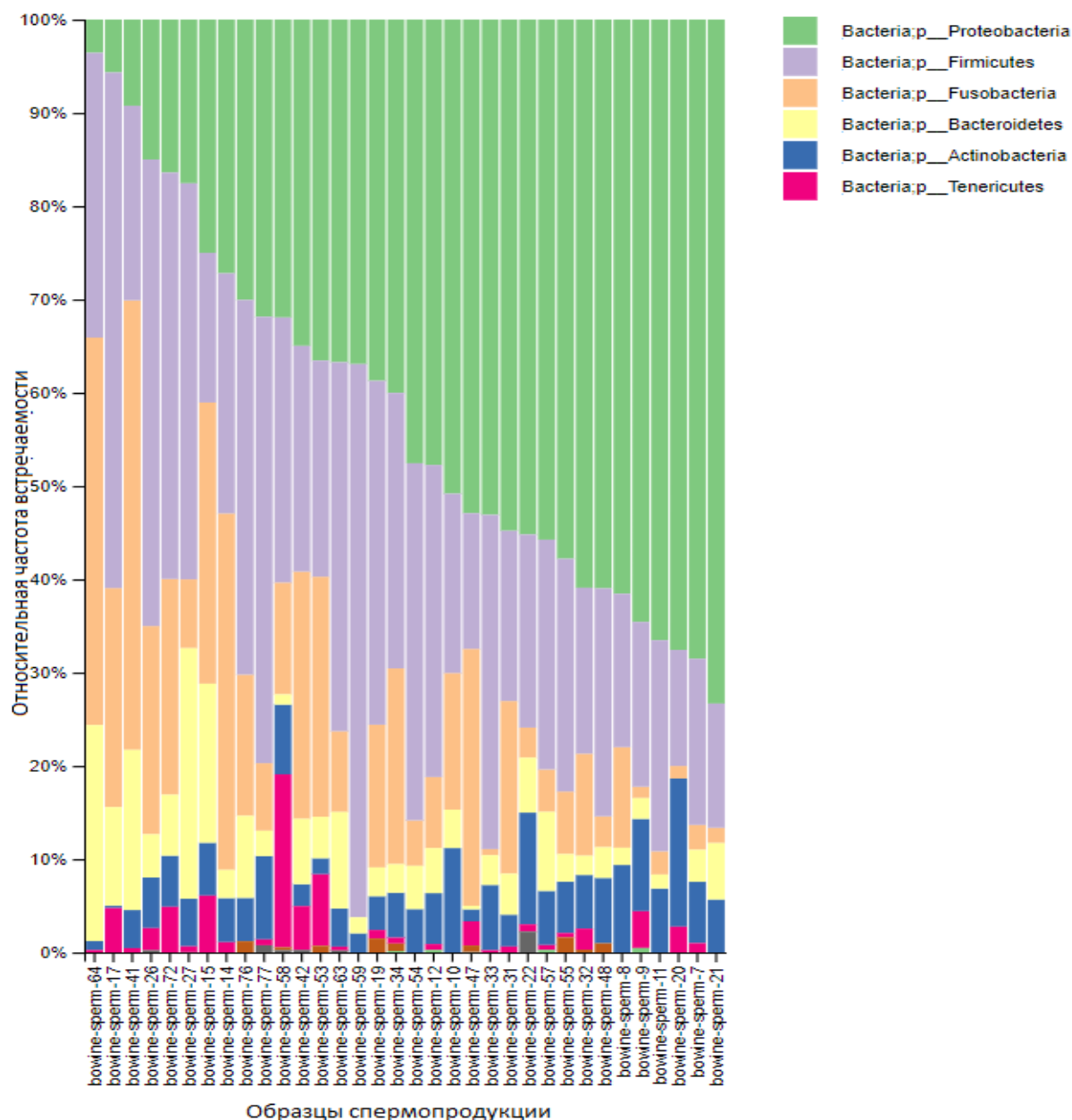


Рис. 1. Относительная представленность типов бактерий в анализируемых образцах криоконсервированной спермы быков

Fig. 1. Relative Abundance of Bacterial Types in Analyzed Cryopreserved Bull Sperm Samples

Различалось в отечественных и иностранных образцах и разнообразие на уровне родов. Так, в образцах российских быков зафиксировано в среднем 13, а в образцах иностранных быков – 15 родов бактерий с содержанием выше 1 %. В 7 из 10 проанализированных образцов от отечественных животных преобладающим родом в микробном сообществе был *Fusobacterium*, содержание последовательностей генома которого колебалось от 18,85 до 37,91 %. При этом род *Fusobacterium* доминировал только в 5 из 24 образцов от иностранных быков. На втором месте по частоте встречаемости во всех образцах был неидентифицированный род порядка Clostridiales с содержанием от 16,79 до 27,55 %. Третьим родом, встречающимся в большинстве образцов, был *Campylobacter*. Его содержание в сперме российских быков варьировало 5,99 до 9,68 %, а в образцах иностранных быков – от 1,55 до 23,7 %. Анализ полученных фрагментов генома позволил идентифицировать вид *Campylobacter ureolyticus*, который встречался в обеих группах образцов.

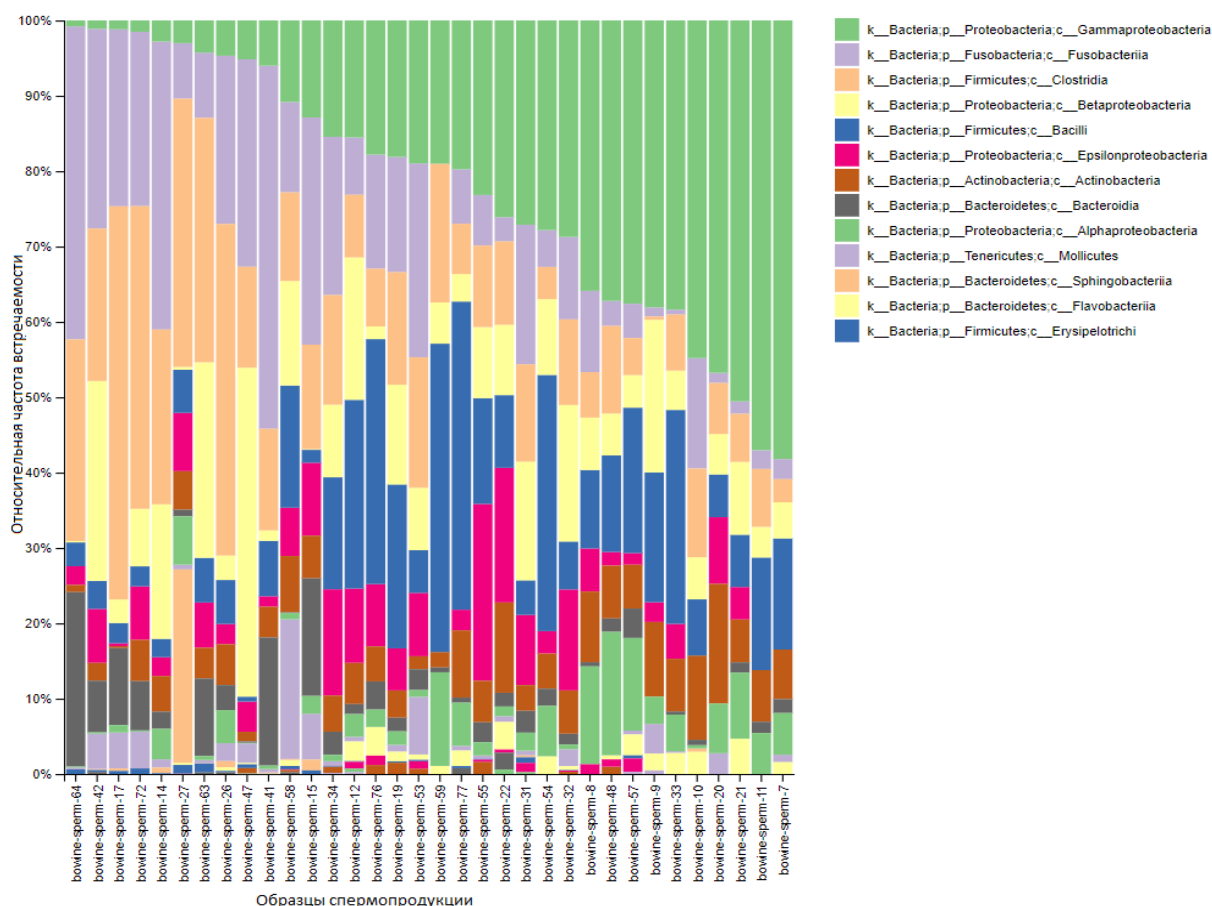


Рис. 2. Относительная представленность классов бактерий в анализируемых образцах криоконсервированной спермы быков

Fig. 2. Relative Abundance of Bacterial Classes in Analyzed Cryopreserved Bull Sperm Samples

Проведенный в работе, опубликованной в 2022 г., анализ встречаемости и сочетаний микроорганизмов в сперме быков с удовлетворительными и неудовлетворительными морфофункциональными показателями показал, что представители родов *Campylobacter* и *Fusobacterium* наиболее часто встречаются в образцах, характеризующихся аномальными показателями спермограммы [11]. В своей работе авторы акцентируют внимание на синергетической связи микроорганизмов родов *Campylobacter* и *Fusobacterium* с другими членами микробного сообщества, отмечая симбиотическое взаимодействие между представителями рода *Fusobacterium* и такими бактериями, как *Prevotella*, *Bacteroidetes* и *Trueperella*, выраженное в стимуляции фузобактериями пролиферации других бактерий за счет предоставления факторов роста и ослабления защиты организма-хозяина высвобождением белков-токсинов [11].

Согласно полученным нами результатам, нуклеотидные последовательности *Fusobacterium* были выявлены в 94 % образцов в сочетании с наибольшим количеством таксонов бактерий, что согласуется с предположением, что представители рода *Fusobacterium* являются активным членом семенного микробиома и могут оказывать влияние на качество спермы.

Кроме перечисленных выше родов микроорганизмов, в образцах спермы разных быков в нашей работе были выявлены следующие представители с содержанием последовательностей выше 1 %: *Pseudomonas* (в 64,7 % образцов), *Micrococcus* (44,1 %), *Prevotella* (38,2 %), *Oligella* (35,2 %), *Streptococcus* (26,5 %).

При проведенном анализе микробиома спермы человека в ранее опубликованных работах [10, 15] было отмечено, что преобладание представителей *Pseudomonas* и *Prevotella* коррели-

рует с аномальными параметрами качества спермы, влияние этих микроорганизмов на качество спермы крупного рогатого скота еще предстоит определить.

В нашем исследовании микроорганизмы рода *Prevotella* с содержанием последовательностей генома выше 5 % встречались исключительно в образцах спермы российских быков, а представители рода *Pseudomonas* в этих образцах выявлены не были. При этом в 9 из 24 проанализированных образцов импортированной спермы содержание генетического материала *Pseudomonas* было достаточно высоким и варьировало от 16,25 до 37,06 %. Биоинформатическая оценка на уровне вида показала, что в образцах присутствовали последовательности *P. stutzeri* и *P. mendocina*. Эти виды часто выделяют из почвы, навоза, сточных вод, их также описывали при анализе госпитальной микрофлоры [16, 17]. Возможно, высокая частота встречаемости этих видов в образцах связана с особенностями отбора спермы у быков и дальнейшей подготовки спермодоз. Полученная в нашей работе информация о микробиоме спермы в целом согласуется с выводами о низком качестве спермопродукции, используемой на территории России [18]. Оценивая полученные результаты, необходимо учитывать, что на состав микробиома криоконсервированной спермопродукции также влияет иммунный статус быка и микробный состав других систем органов животного, а также соблюдение санитарно-гигиенических норм при отборе спермы, ее подготовке, разбавлении и фасовке.

Таким образом, опубликованные в последнее время научные исследования показывают интерес ученых к микробным сообществам спермы крупного рогатого скота и подтверждают перспективность использования метагеномных исследований для изучения влияния микроорганизмов на морфофункциональные параметры спермы. Проведенный в нашей работе метагеномный анализ показал низкий уровень биоразнообразия и неоднородность состава микробного сообщества в образцах спермопродукции. Выявлены различия в представленности доминирующих типов бактерий в отечественной и иностранной спермопродукции.

Автор выражает благодарность сотрудникам ФГБУ «ВГНКИ» В.Д. Гордеевой, Е.В. Крыловой и С.М. Боруновой за консультации и помощь в подготовке статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Culture-independent* exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity / G. Braem, S. De Vliegher, B. Verbist [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2012. – Jun 15, Vol. 157 (3-4). – P. 383–90. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.12.031.
2. *Metagenomic* deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis / M.N. Hoque, A. Istiaq, R.A. Clement [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9 (1). – P. 13536. – DOI: 10.1038/s41598-019-49468-4.
3. *Whole* rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle / B. Delgado, A. Bach, I. Guasch [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 11–23. – <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36673-w>.
4. Santos T.M, Bicalho R.C. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. 53048.
5. *Interrogating* the bovine reproductive tract metagenomes using culture-independent approaches: a systematic review / C.T. Ong, C. Turni, P.J. Blackall [et al.] // *Anim Microbiome.* – 2021. – Jun 9, Vol. 3 (1). – P. 41. – DOI: 10.1186/s42523-021-00106-3.
6. *Investigation* of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene / V.S. Machado, G. Oikonomou, M.L. Bicalho [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2012. – Vol. 159. – P. 460–469.
7. *Vaginal* microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders / C. Gonzalez Moreno, C Fontana., P.S. Cocconcelli [et al.] // *J Appl Microbiol.* – 2016. – Vol. 121. – P. 232–241.

8. *The presence of bacteria species in semen and sperm quality* / E. Moretti, S. Capitani, N. Figura [et al.] // J Assist Reprod Gen. – 2009. – Vol. 26. – P. 47–56.
9. *Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with Pseudomonas aeruginosa introduced by contaminated lubricant* / I. Smole, A. Thomann, J. Frey, V. Perreten // Reprod Domest Anim. – 2010. – Vol. 45. – P. 737–742.
10. *Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters* / D. Baud, C. Pattaroni, N. Vulliemmoz [et al.] // Front Microbiol. – 2019. – Feb 12, Vol. 10. – P. 234.
11. *Composition and diversity of the seminal microbiota in bulls and its association with semen parameters* / J.H. Koziol, T. Sheets, C.L. Wickware, T.A. Johnson // Theriogenology. – 2022. – Apr 1, Vol. 182, P. 17–25.
12. *Core Microbiome of Slovak Holstein Friesian Breeding Bulls' Semen* / J. Medo, J. Žiarovská, M. Ďuračka [et al.] // Animals (Basel). – 2021. – Nov 22, Vol. 11 (11). – P. 3331.
13. *Identification of Bull Semen Microbiome by 16S Sequencing and Possible Relationships with Fertility* / A. Cojkcic, A. Niazi, Y. Guo [et al.] // Microorganisms. – 2021. – Nov 25, Vol. 9 (12), P. 2431.
14. *The Tanner M. Young Biodiversity Calculator* [Электронный ресурс] – URL: <https://www.alyoung.com/labs/biodiversity-calculator.html> (дата обращения: 25.03.2022).
15. *Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality* / S.L. Weng, C.M. Chiu, F.M. Lin. [et al.] // PLoS One. – 2014. – Oct 23, Vol. 9 (10). – P. 110152.
16. *Pseudomonas mendocina Bacteremia: A Case Study and Review of Literature* / M. Gani, S. Rao, M. Miller, S. Scoular // Am J Case Rep. – 2019. – Apr. 5, Vol. 20. – P. 453–458.
17. Федотова Т.А., Шестаков А.Г., Васильев Д.А. Изучение биологических свойств бактерий вида *Pseudomonas stutzeri* // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2019. – № 3 (47). – С. 116–123.
18. Борунова С.М. Комплексная оценка морфофункциональных и микробиологических показателей половых клеток быков-производителей: дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2019. – 379 с.

REFERENCES

1. Braem G., Vlieghe S.D., Verbist B., Heyndrickx M., Leroy F., Vuyst L.D., Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity, Vet Microbiol, 2012, Jun 15, Vol. 157 (3-4), pp. 383–90, DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.12.031.
2. Hoque M.N., Istiaq A., Clement R.A., Sultana M., Crandall K.A., Siddiki A.Z., Hossain M.A., Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis, Sci Rep, 2019, Vol. 9 (1), P. 13536, DOI: 10.1038/s41598-019-49468-4.
3. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36673-w>.
4. Santos T.M., Bicalho R.C., Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows, PLoS One, 2012, Vol. 7, P. 53048.
5. Ong C.T., Turni C., Blackall P.J., Boe-Hansen G., Hayes B.J., Tabor A.E., Interrogating the bovine reproductive tract metagenomes using culture-independent approaches: a systematic review, Anim Microbiome, 2021, Jun 9, Vol. 3 (1), P. 41, DOI: 10.1186/s42523-021-00106-3.
6. Machado V.S., Oikonomou G., Bicalho M.L., Knauer W.A., Gilbert R., Bicalho R.C., Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene, Vet Microbiol, 2012, Vol. 159, pp. 460–469.
7. Gonzalez Moreno C., Fontana C., Cocconcelli P.S., Callegari M.L., Otero M.C., Vaginal microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders, J Appl Microbiol, 2016, Vol. 121, pp. 232–241.
8. Moretti E., Capitani S., Figura N., Pammolli A., Federico M.G., Giannerini V., Collodel G., The presence of bacteria species in semen and sperm quality, J Assist Reprod Gen, 2009, Vol. 26, pp. 47–56.
9. Smole I., Thomann A., Frey J., Perreten V., Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant, Reprod Domest Anim, 2010, Vol. 45, pp. 737–742.

10. Baud D., Pattaroni C., Vullemoz N., Castella V., Marsland B.J., Stojanov M., Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters, *Front Microbiol*, 2019, Feb 12, Vol. 10, P. 234.
11. Koziol J.H., Sheets T., Wickware C.L., Johnson T.A., Composition and diversity of the seminal microbiota in bulls and its association with semen parameters, *Theriogenology*, 2022, Apr 1, Vol.182, pp. 17–25.
12. Medo J., Žiarovská J., Ďuračka M., Tvrdá E., Bañas Š., Gábor M., Kysel' M., Kačániová M., Core Microbiome of Slovak Holstein Friesian Breeding Bulls' Semen, *Animals (Basel)*, 2021, Nov 22, Vol. 11 (11), P. 3331.
13. Cojic A., Niazi A., Guo Y., Hallap T., Padrik P., Morrell J.M., Identification of Bull Semen Microbiome by 16S Sequencing and Possible Relationships with Fertility, *Microorganisms*, 2021, Nov 25, Vol. 9 (12), P. 2431.
14. The Tanner M. Young Biodiversity Calculator, available at: <https://www.alyoung.com/labs/biodiversitycalculator.html> (March 25, 2022).
15. Weng S.L., Chiu C.M., Lin F.M., Huang W.C., Liang C., Yang T., Yang T.L., Liu C.Y., Wu W.Y., Chang Y.A., Chang T.H., Huang H.D. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality, *PLoS One*, 2014, Oct 23, Vol. 9 (10), P. 110152.
16. Gani M., Rao S., Miller M., Scoular S., *Pseudomonas mendocina* Bacteremia: A Case Study and Review of Literature, *Am J Case Rep*, 2019, Apr 5, Vol. 20, pp. 453–458.
17. Fedotova T.A., Shestakov A.G., Vasil'ev D.A., *Vestnik Ul'yanovskoj GSKHA*, 2019, No. 3 (47) pp. 116–123. (In Russ.)
18. Borunova S.M. Kompleksnaya ocenka morfofunkcional'nyh i mikrobiologicheskikh pokazatelej polovyh kletok bykov-proizvoditelej (Comprehensive assessment of morphofunctional and microbiological parameters of germ cells of breeding bulls), Doctor's thesis of Biological Sciences, Moscow, 2019, 379 p. (In Russ.)