

УДК: 575.162

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.4.413

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ

Никиткина Е.В.* – канд. биол. наук., лаборатория биологии развития (ORCID 0000-0002-8496-5277).

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»

* nikitkinae@mail.ru

Ключевые слова: сперма, жеребцы, GWAS, SNP

Keywords: semen, stallions, GWAS, SNP

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки, проект № 121052600354-7/

Поступила: 02.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ

Одним из важных факторов, влияющих на воспроизводительную функцию, является генотип животного. Метод геномной селекции основывается на использовании полиморфных однонуклеотидных замен (SNP) как маркеров для определения ценности генотипа животного или растения. Формирование и функционирование репродуктивной системы животных происходит в результате согласованного взаимодействия широкого спектра генов. Поиск геномных ассоциаций GWAS (Genome-Wide Association Studies) с признаками фертильности позволит в дальнейшем вести отбор животных по этим показателям на геномном уровне. Сперму получали при помощи кобыл в охоте и на фантоме с использованием искусственной вагины Hannover (Minitube, Германия). Сперму каждого жеребца собирали не менее трех раз. Было проанализировано качество спермы 96 жеребцов разных пород (арабская, ахалтекинская, тракененская, чистокоровная верховая, орловский рысак, французский рысак, советская тяжеловозная, шетлендский пони, уэльский пони, помести разных пород). Выявлена высокая изменчивость показателей качества спермы. Так, например, концентрация сперматозоидов в эякуляте варьировала от 59 до 514 млн/мл, прогрессивная подвижность от 20 до 87 %, а количество клеток без повреждений от 21,6 до 95,6 %. Такая вариабельность изучаемых признаков дает возможность предположить, что их формирование в процессе онтогенеза происходит под влиянием генетических факторов. Проведенный GWAS анализ по объему эякулята, концентрации и подвижности сперматозоидов жеребцов выявил потенциальные гены-кандидаты, ассоциированные с данными показателями. Ассоциации, выявленные в нашем исследовании, являются многообещающими кандидатами для дальнейшего выявления биологических механизмов, лежащих в основе качества спермы жеребцов.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Одним из важных факторов, влияющих на воспроизводительную функцию, является генотип животного. Метод геномной селекции основывается на использовании полиморфных однонуклеотидных замен (SNP) как маркеров для определения ценности генотипа животного или растения. Считается, что репродуктивное здоровье и признаки репродукции плохо наследуются и вести селекцию по этим признакам малоэффективно. Однако, формирование и функционирование репродуктивной системы животных происходит в результате согласованного взаимодействия широкого спектра генов. Поиск геномных ассоциаций GWAS (Genome-Wide Association Studies) с признаками фертильности позволит в дальнейшем вести отбор животных по этим показателям на геномном уровне [1]. Такая селекция позволит отбирать животных с хорошим сперматогенезом в раннем возрасте, до начала репродуктивного использования.

В связи с этим, основными задачами исследования было оценить сперму жеребцов по физиологическим, морфологическим и биохимическим показателям, оценить изменчивость и индивидуальные особенности сперматогенеза жеребцов и провести GWAS анализ по поиску потенциальных ассоциаций с качеством спермы жеребцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Сперму получали при помощи кобыл в охоте и на фантоме с использованием искусственной вагины Hannover (Minitube, Германия). Сперму каждого жеребца собирали не менее трех раз. Всего было проанализировано 288 образцов спермы 96 жеребцов. Объем эякулята определяли мерным стаканом. Концентрацию и прогрессивную подвижность сперматозоидов определяли с помощью Аргус-CASA (АргусСофт, Россия) и микроскопа Motic BA 410 (Motic, Китай). Морфологию сперматозоидов изучали, используя набор Дифф-Квик («АБРИС+», Россия) и с помощью Аргус-CASA и мик-

роскопа Motic BA 410. Целостность мембран определяли при помощи окрашивания образцов красителем нигрозин-эозин (Диаэм, Россия) и микроскопа Motic BA 410. Дыхание сперматозоидов определяли на приборе Эксперт-001 с помощью амперометрического датчика для измерения скорости клеточного дыхания. Функциональное состояние энергетической системы оценивали по реакции дыхания на добавление разобщителя дыхания и фосфорилирования – 2,4 динитрофенола (2,4-ДНФ) [2]. Оценку по морфологии, мембранам и стимуляции дыхания 2,4 ДНФ провели на 115 образцах. Для оценки взаимосвязи генотипа и качества спермы выбирали лучшие показатели по каждому жеребцу.

Для проведения поиска геномных ассоциаций с качеством спермопродукции жеребцов, была сформирована база данных, объединяющая генотипы, определенные на чипах использованием Axiom™ Equine Genotyping Array и фенотипические признаки качества спермы. ДНК выделяли из замороженных образцов спермы фенол/хлороформным методом. Концентрация ДНК составляла от 50 до 500 нг/мкл. Образцы ДНК были генотипированы с использованием Axiom™ Equine Genotyping Array. Для анализа были отобраны образцы ДНК с качеством генотипирования по локусам SNP более 98%. Выбор SNP производился с помощью программного обеспечения PLINK. После проверки качества 306522 варианта были доступны для дальнейшего анализа. Полногеномные исследования ассоциации (GWAS) были выполнены в программе EMMAX [3] с использованием матрицы родства (IBS). На основе результатов GWAS в программном обеспечении R были получены манхэттенские графики.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Основными параметрами, характеризующими сперматогенез, являются – объем эякулята, концентрация сперматозоидов, подвижность. Также учитываются морфология клеток и функциональное состояние митохондрий. Из данных таблицы 1 видно, что все показатели каче-

ства спермопродукции, характеризуются высокой индивидуальной изменчивостью. Объем эякулята варьировал от 10 до 150 мл, концентрация сперматозоидов в эякуляте от 59 до 514 млн/мл, прогрессивная подвижность от 20 до 87%. Для наглядности максимальные значения прогрессивной подвижности разных жеребцов представлены на рисунке 1. Рисунок демонстрирует значительную вариабельность.

Данные по морфологическим показателям и оценке сопряженности дыхания и фосфорилирования сперматозоидов жеребцов представлены в таблице 2. Из данных таблицы видно, что и эти показатели качества спермы варьировали, так количество клеток без повреждений было от 21,6 до 95,6%.

Таблица 1 – Показатели качества спермы жеребцов (n=288)

Показатель	Нативная сперма			
	Прогрессивная подвижность, %	Объем эякулята, мл	Концентрация сперматозоидов, млн/мл	Общее количество сперматозоидов, млрд
Среднее $\pm$ SD	72,7 $\pm$ 1,96	59,3 $\pm$ 5,12	246,6 $\pm$ 15,14	14,0 $\pm$ 1,82
Минимум	20	10	59	1,98
Максимум	87	150	514	25,50

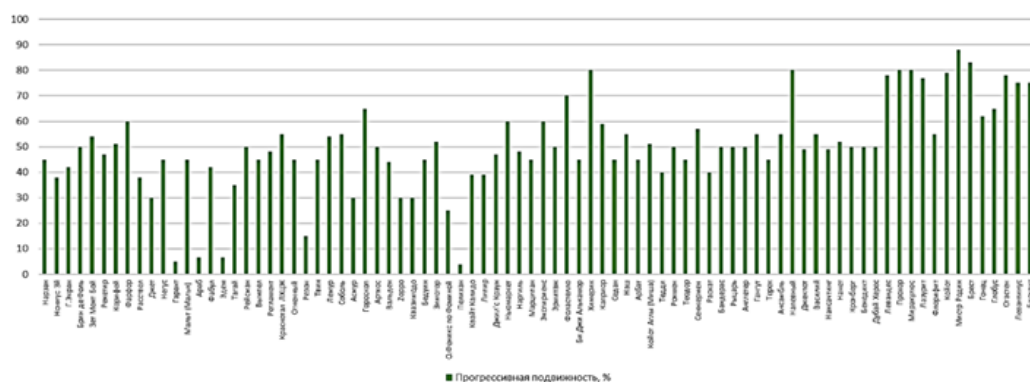


Рисунок 1 – Индивидуальная изменчивость по прогрессивной подвижности сперматозоидов жеребцов.

Таблица 2 – Морфологические показатели и оценка сопряженности дыхания и фосфорилирования в сперме жеребцов

Показатель	Клетки без повреждений, %	Повреждения акросом, %	Повреждения в области хвоста и шейки, %	Повреждения мембран, %	Стимуляция дыхания 2,4 ДНФ, раз
Кол-во образцов	115	115	115	115	115
Среднее $\pm$ Sd	75,4 $\pm$ 3,28	7,7 $\pm$ 1,93	21,9 $\pm$ 4,87	46,4 $\pm$ 3,74	2,13 $\pm$ 0,43
Максимум	95,6	33,4	79,6	69,4	3,8
Минимум	21,6	0,12	1,8	15,9	1,0

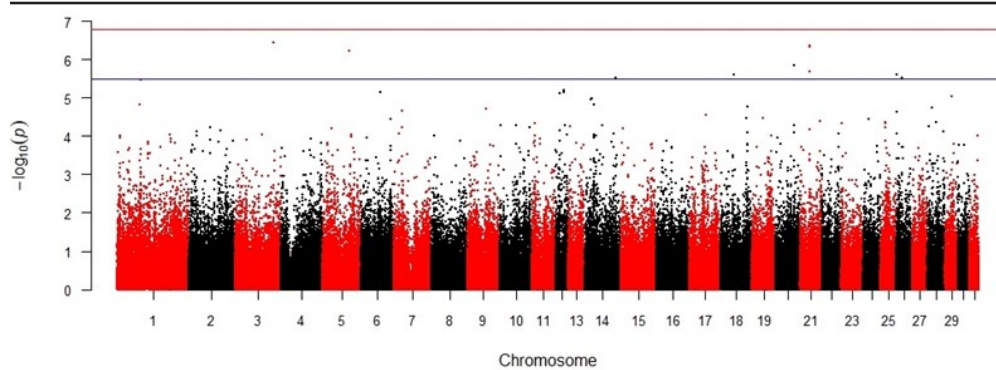


Рисунок 2 – Манхэттенский график GWAS по объему эякулята у жеребцов.

Таблица 3 – Однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с объемом эякулята жеребцов

SNP	Хро- мос- ома	SNP- Position, BP	P-value	Motif	MAF	Расположение	Кандидатные гены
rs68653574	1	61504816	3.47E-06	G/A	(G) 0.434	intron variant	<i>CFAP70</i>
rs1136439137	3	102464948	3.74E-07	A/C	(C) 0.066	intergenic variant	<i>GBA3</i>
rs1136002539	5	66713628	5.96E-07	A/C	(C) 0.098	intron variant	<i>EN- SECAG00000029394</i>
rs1140713201	6	51254530	7.10E-06	T/C	(C) 0.131	intergenic variant	<i>SOX5 BCAT1</i>
rs1148936458	12	22186622	6.46E-06	T/C	(C) 0.052	intergenic variant	<i>INCENP</i>
rs1140833161	12	12019674	7.82E-06	T/C	(C) 0.197	synonymous variant	<i>MTCH2</i>
rs1138079567	12	27038414	7.09E-06	G/A	(A) 0.111	5 prime UTR variant	<i>EN- SECAG00000030790</i>
rs1143966323	14	80457735	3.07E-06	G/A	(A) 0.098	intergenic variant	<i>RASA1, EDIL3, HAPLN1</i>
rs393801479	18	34222741	2.45E-06	C/T	(C) 0.085	intron variant	<i>STAM2</i>
rs1138016965	20	49320962	1.40E-06	G/T	(T) 0.157	intergenic variant	<i>TFAP2D, TFAP2B, PKHD1, IL17A, IL17F, MCM3</i>
rs1144502606	20	49320912	1.40E-06	T/C	(C) 0.157	intergenic variant	<i>TFAP2D, TFAP2B, PKHD1, IL17A, IL17F, MCM3</i>
rs1140720551	21	26929291	4.45E-07	A/G	(G) 0.190	intergenic variant	<i>DAB2</i>
rs69224996	21	26750556	4.63E-07	A/G	(G) 0.105	intron variant	<i>EN- SECAG00000040491</i>
rs396864707	21	26725393	2.13E-06	G/A	(A) 0.203	intron variant	<i>EN- SECAG00000038439</i>
rs395643783	21	26428669	2.12E-06	G/A	(A) 0.059	intron variant	<i>EN- SECAG00000033113</i>
rs397230196	26	2625580	2.55E-06	C/T	(T) 0.042	intron variant	<i>EN- SECAG00000004527</i>
rs1141953361	29	17942647	9.46E-06	A/G	(G) 0.164	intergenic variant	<i>MALRD1</i>

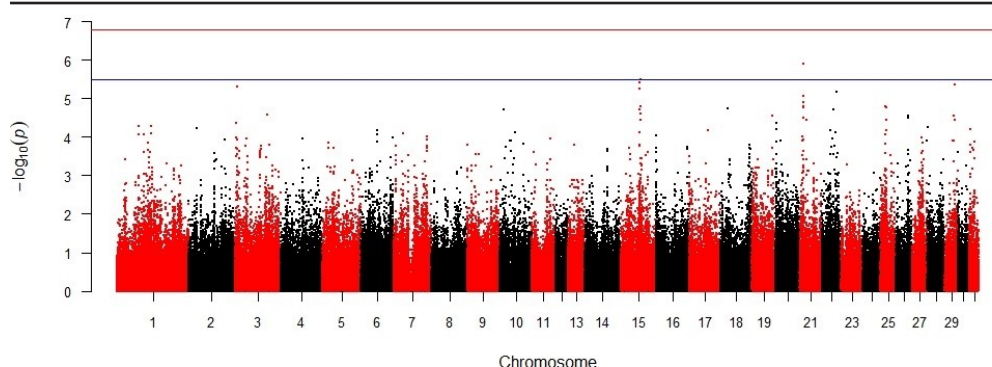


Рисунок 3 – Манхэттенский график GWAS концентрация спермы жеребцов.

Таблица 4 – Однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с прогрессивной подвижностью жеребцов

SNP	Хро-мосома	SNP-Position	P-value	Motif	MAF	Расположение	Кандидатные гены
rs1139020935	1	125935073	6.29E-06	T/G	(G) 0.485	intergenic variant	<i>PIAS1</i> <i>SKOR1</i>
rs396922769	4	60562305	6.14E-06	G/T	(T) 0.268	intergenic variant	<i>PRR15</i> <i>WIPF3</i>
rs69002540	15	42321830	3.28E-06	A/C	(C) 0.268	intergenic variant	<i>BCL11A</i> <i>FANCL</i>
rs1143223165	28	3587836	6.57E-06	A/G	(G) 0.104	intergenic variant	<i>ATXN7L3B</i> <i>KCNC1</i>
rs69417886	29	24334977	9.83E-06	A/C	(C) 0.463	intron variant	<i>CELF2</i>

Коэффициенты изменчивости по всем изучаемым признакам были достаточно высокими от 34,6 до 50,6%. В нашей выборке были животные как со стабильно очень хорошим качеством спермы, так и со стабильно плохим. Были животные, у которых качество спермы сильно варьировало. Такая вариабильность изучаемых признаков дает возможность предположить, что их формирование в процессе онтогенеза происходит под влиянием генетических факторов. Проведенный GWAS анализ по объему эякулята, концентрации и прогрессивной подвижности сперматозоидов показал потенциальные SNP ассоциированные с данными показателями. GWAS идентифицировал 14 предполагаемых SNP, расположенных на

7 хромосомах, связанных с объемом эякулята жеребцов (рис. 2, таблица 3).

Важной характеристикой производства спермы является концентрация сперматозоидов [8]. Предполагается, что найденные гены-кандидаты в регионах с найденными SNP связаны с формированием концентрации сперматозоидов в эякуляте (рис.3). На хромосоме 15 была идентифицирована область размером около 3 МБ (49561973-52355746). Внутри были обнаружены три значимых SNP - rs1148154272, rs1147919841, rs1136353842. Был идентифицирован регион, который включает гены, в той или иной степени влияющие на выработку сперматозоидов: NRXN1, FSHR, LHCGR,

GTF2A1L, STON1, PPP1R21, FOXN2, FBXO11, MSH6.

Гены GTF2A1L (ALF) и STON1 участвуют в сперматогенезе. Хуанг и др. (2006) показали, что аномальная экспрессия ALF у людей может быть частичной причиной мужского бесплодия [9]. В результате GWAS-анализа подвижности свежей спермы предполагаемые SNP были обнаружены в области генов PIAS1, SKOR1, WIPF3, PRR15, BCL11A, FANCL, ATXN7L3B, KCNC1, CELF2 (табл.4). Эффект PIAS1 на мРНК сильно выражен в сперматоцитах и клетках Сертоли во время сперматогенеза у крыс [10]. Максимальная экспрессия SKOR1 у человека отмечена в яйцках (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/390598>).

Ген WIPF3 высоко экспрессируется в семенниках, особенно в клетках Сертоли, которые содержат предшественников сперматозоидов и играют важную роль в сперматогенезе. У мышей с нокаутом CR16 сперма имела аномальную морфологию головки и значительно снижала фертильность в экспериментах по оплодотворению *in vitro* [11]. Другое исследование, направленное на секвенирование тестикулярного транскриптома у сезонно размножающихся рыб *Channa punctatus*, выявило предполагаемую экспрессию транскриптов, связанных со сперматогенезом и организацией цитоскелета [12]. На хромосоме 15 rs69002540 расположен в межгенной области между генами *In-cRNA*. Гены, кодирующие белок, BCL11A и FANCL, расположены на предполагаемом расстоянии более 1 Мб. Функция FANCL - выживание развивающихся половых клеток [13]. Ген KCNC1 кодирует член семейства интегральных мембранных белков, которые опосредуют потенциал-зависимую проницаемость для ионов калия возбудимых мембран.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, можно сделать вывод, что ассоциации, выявленные в нашем исследовании, являются многообещающими кандидатами для дальнейшего выявления биологических механизмов, лежащих в основе качества спермы жеребцов.

GENETIC BASES OF SEMEN QUALITY IN STALLIONS

Nikitkina E.V.* - Ph.D. biological sciences, laboratory of developmental biology (ORCHID 0000-0002-8496-5277)

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

* nikitkinae@mail.ru

Funding: *The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science, project No. 121052600354-7*

ABSTRACT

One of the important factors affecting the reproductive function is the genotype of the animal. The method of genomic selection is based on the use of polymorphic single nucleotide substitutions (SNP) as markers for determining the value of the genotype of an animal or plant. The formation and functioning of the reproductive system of animals occurs as a result of the coordinated interaction of a wide range of genes. The search for genomic associations of GWAS (Genome-Wide Association Studies) with signs of fertility will allow further selection of animals based on these indicators at the genomic level. Sperm was obtained with the help of mares in hunting and on a phantom using an artificial Hannover vagina (Minitube, Germany). The sperm of each stallion was collected at least three times. The semen quality of 96 stallions of different breeds (Arabian, Akhal-Teke, Trakenen, thoroughbred horse, Oryol trotter, French trotter, Soviet heavy horse, Shetland pony, Welsh pony, horses of different breeds) was analyzed. High variability of sperm quality indicators was revealed. For example, the concentration of sperm in the ejaculate varied from 59 to 514 million /ml, progressive mobility from 20 to 87%, and the number of cells without damage from 21.6 to 95.6%. Such variability of the studied features makes it possible to assume that their formation in the process of ontogenesis occurs under the influence of genetic factors. The GWAS analysis of ejaculate volume, concentration and motility of stallion sperm revealed potential candidate

genes associated with these indicators. The associations identified in our study are promising candidates for further identification of the biological mechanisms underlying the quality of stallion sperm.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Никиткина, Е.В. Поиск геномных ассоциаций с качеством спермы быков голштинской и черно-пестрой породы / Е.В. Никиткина, К.В. Племяшов, А.А. Мусидрай, А.А. Кудинов, А.А. Крутикова, Н.В. Дементьева // Генетика и разведение животных. - 2019. - № 4. - С.9-13. - <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2019-3-3-10>
2. Мороз, Л.Г. Полярографический метод оценки энергетического обмена в сперме по стимуляции дыхания 2,4 – динитрофенолом / Л.Г. Мороз, И.Ш. Шапиев // Бюллетень государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных - 1978. - № 33. - С. 28-30.
3. Leeb, T. The horse genome project—sequence based insights into male reproductive mechanisms / T. Leeb // *Reprod. Dom. Anim.* - 2007. - №42. - С. 45–50. - <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00897.x>
4. Beurois, J. CFAP70 mutations lead to male infertility due to severe asthenoteratozoospermia/ J. Beurois; G. Martinez, G.; C. Cazin, C.; Z. Kherraf, Z. E.; A. Amiri-Yekta, N. Thierry-Mieg, M. Bidart, G. Petre, V. Satre, S. Brouillet, A. Touré, C. Arnoult, P. Ray, C. Coutton // *A case report. - Hum. Reprod.* - 2019. - № 34. - С. 2071–2079. - <https://doi.org/10.1093/humrep/dez166>
5. Fagerberg, L. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics/ L. Fagerberg, B. Hallström, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpoor, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjöstedt, E. Lundberg, C. Szgyarto, M. Skogs, J. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, F. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen,

- M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten, M. Uhlén// *Mol. Cell. Proteomics.* - 2014. - № 13. - С. 397–406. - <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
6. Liu, J. Functional SNPs of INCENP Affect Semen Quality by Alternative Splicing Mode and Binding Affinity with the Target Btmir-378 in Chinese Holstein Bulls/ J. Liu, Y. Sun, C. Yang, Y. Zhang, Q. Jiang, J. Huang, Z. Ju, X. Wang, J. Zhong, C. Wang// *PloS one.* - 2016. - № 11. - С. e0162730. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162730>
7. Leahy, T. Quantitative Proteomic Analysis of Seminal Plasma, Sperm Membrane Proteins, and Seminal Extracellular Vesicles Suggests Vesicular Mechanisms Aid in the Removal and Addition of Proteins to the Rat Sperm Membrane/ T. Leahy, J. Rickard, T. Pini, B. Gadella, S. de Graaf// *Proteomics.* - 2020. - №20. - С. e1900289. - <https://doi.org/10.1002/pmic.201900289>
8. Атрощенко, М.М., Биохимические маркеры качества спермы жеребцов (обзор)/ М.М. Атрощенко, Д.В. Медведев// *Сельскохозяйственная биология* – 2023. - Т. 58. - № 2. - С. 249-259. doi: 10.15389/agrobiology.2023.2.249rus
9. Huang, M. Involvement of ALF in human spermatogenesis and male infertility/ M. Huang, H. Wang, J. Li, Z. Zhou, Y. Du, M. Lin, J. Sha, J.//*Int. J. Mol. Med.* - 2006. - № 17. - С. 599–604. - <https://doi.org/10.3892/ijmm.17.4.599>
10. Yan, W. Expression of the E3 SUMO-1 ligases PIASx and PIAS1 during spermatogenesis in the rat/ W. Yan, H. Santti, O. Jänne, J. Palvimo, J. Toppari // *Gene Expr. Patterns.* - 2003. - №3. - С. 301–308. - [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00045-0)
11. Suetsugu, S. Male-specific sterility caused by the loss of CR16/ S. Suetsugu, Y. Banzai, M. Kato, K. Fukami, Y. Kataoka, Y. Takai, N. Yoshida, T. Takenawa // *Genes Cells.* - 2007. - № 12. - С. 721–733 - <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01088.x>
12. Roy, A. De novo sequencing and comparative analysis of testicular transcriptome from different reproductive phases in

freshwater spotted snakehead *Channa punctatus* / A. Roy, R. Basak, U. Rai // PLoS One. - 2017. - №12. - C. e0173178. -<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173178>

13.Rodríguez-Marí, A. Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis/ A. Rodríguez-Marí, C. Cañestro, R. BreMiller, A. Nguyen-Johnson, K. Asakawa, K. Kawakami, J. Postlethwait, // PLoS Genet. - 2010.-№6. - C. e1001034. - <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001034>

REFERENCES

- 1.Nikitkina E. / E. Nikitkina E., K. Plemyashov, A. Musidray, A. Kudinov, A. Krutikova, N. Deme-tieva // Search for genomic associations with sperm quality of Holstein and Black and White bulls. Genetics and breeding of animals. 2019:4:9-13. (In Russ.) <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2019-3-3-10>
- 2.Moroz, L.G. Polarographic method for assessing energy metabolism in sperm by stimulating respiration with 2,4-dinitrophenol / L.G. Moroz, I.Sh. Shapiey // Bulletin of the state scientific institution All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals. 1978: 33: 28-30.
- 3.Leeb, T. The horse genome project—sequence based insights into male reproductive mechanisms / T. Leeb // Reprod. Dom. Anim.2007:42:45–50. -<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00897.x>
- 4.Beurois, J. CFAP70 mutations lead to male infertility due to severe astheno-teratozoospermia/ J. Beurois; G. Martinez, G.; C. Cazin, C.; Z. Kherraf, Z. E.; A. Amiri-Yekta, N. Thierry-Mieg, M. Bidart, G. Petre, V. Satre, S. Brouillet, A. Touré, C. Arnoult, P. Ray, C. Coutton // A case report. - Hum. Reprod. 2019:34:2071–2079. -<https://doi.org/10.1093/humrep/dez166>
- 5.Fagerberg, L. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics/ L. Fagerberg, B. Hallström, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpour, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjöstedt, E. Lundberg, C. Szigarto, M. Skogs, J. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, F. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten, M. Uhlén// Mol. Cell. Proteomics. 2014:13:397–406. - <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- 6.Liu, J. Functional SNPs of INCENP Affect Semen Quality by Alternative Splicing Mode and Binding Affinity with the Target Bta-miR-378 in Chinese Holstein Bulls/ J.Liu, Y. Sun, C. Yang, Y. Zhang, Q. Jiang, J. Huang, Z. Ju, X. Wang, J. Zhong, C.Wang// PloS one. 2016:11: e0162730. - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162730>
- 7.Leahy, T. Quantitative Proteomic Analysis of Seminal Plasma, Sperm Membrane Proteins, and Seminal Extracellular Vesicles Suggests Vesicular Mechanisms Aid in the Removal and Addition of Proteins to the Ram Sperm Membrane/ T. Leahy, J. Rickard, T. Pini, B. Gadella, S. de Graaf// Proteomics. 2020:20:e1900289. -<https://doi.org/10.1002/pmic.201900289>
- 8.Atroshchenko, M.M., Biochemical markers of stallion sperm quality (review) / M.M. Atroshchenko, D.V. Medvedev // Agricultural biology .2023:T.58:2:249-259. doi: 10.15389/agrobiol.2023.2.249rus
- 9.Huang, M. Involvement of ALF in human spermatogenesis and male infertility/ M. Huang, H. Wang, J. Li, Z. Zhou, Y. Du, M. Lin, J. Sha, J.//Int. J. Mol. Med.2006:17:599–604. - <https://doi.org/10.3892/ijmm.17.4.599>
- 10.Yan, W. Expression of the E3 SUMO-1 ligases PIASx and PIAS1 during spermatogenesis in the rat/ W. Yan, H. Santti, O. Jänne, J. Palvimo, J. Toppari // Gene Expr. Patterns. 2003:3:301–308. - [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00045-0)
- 11.Suetsugu, S. Male-specific sterility caused by the loss of CR16/ S. Suetsugu, Y. Banzai, M. Kato, K. Fukami, Y. Kataoka, Y. Takai, N. Yoshida, T. Takenawa //Genes Cells. 2007:12:721–733 - <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01088.x>
- 12.Roy, A. De novo sequencing and comparative analysis of testicular transcriptome from different reproductive phases in freshwater spotted snakehead *Channa punctatus* / A. Roy, R. Basak, U. Rai // PLoS One.2017:12:e0173178. -<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173178>
- 13.Rodríguez-Marí, A. Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis/ A. Rodríguez-Marí, C. Cañestro, R. BreMiller, A. Nguyen-Johnson, K. Asakawa, K. Kawakami, J. Postlethwait, // PLoS Genet.2010:6: e1001034. - <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001034>