

К. В. Целютин, Б. К. Тур

Криоконсервация спермы птиц — как инструмент сохранения генофонда

Аннотация. Одним из инструментов сохранения генофондных пород является создание криобанков, где хранится замороженная сперма. Вместе с тем встает вопрос о создании надежного способа криоконсервации спермы птиц, не требующего дорогостоящего оборудования и легко воспроизводимого, как в лабораторных, так и в производственных условиях.

Ключевые слова: сперма, замораживание, искусственное осеменение, генофонд, криобанк.

Авторы:

Целютин К. В. — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетики и разведения с.-х. птиц ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601; e-mail: ktselutin@yahoo.com;

Тур Б. К. — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетики и разведения с.-х. птиц ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601.

По данным Фисинина В. И. и др. [1] существует достаточно большое количество пород, как местных, имеющих ограниченный ареал распространения, так и разводимых в масштабах одной или нескольких стран. Однако перевод птицеводства на промышленную основу обусловил резкое сокращение их числа из-за создания высокопродуктивных специализированных линий и кроссов для производства яиц и мяса. В результате большое число пород и породных групп птиц мясо-яичного или яично-мясного направления продуктивности, ранее созданных путем межпородного скрещивания, а также местные популяции оказались на грани исчезновения.

В результате селекции или генетического дрейфа внутривидовое разнообразие подвергается давлению. В Европе, так и во всем мире, имеет место генетическая эрозия, потеря или риск потери пород [2]. Именно поэтому одной из основных задач на современном этапе развития птицеводства является обязательное сохранение генетического разнообразия пород и птиц.

Аборигенная птица обычно обладает такими положительными качествами, как повышенная жизнеспособность к различным заболеваниям, крепость конституции и костяка. Поэтому сохранение генетических ресурсов домашней птицы стало проблемой мирового масштаба.

Все страны пошли по пути создания спермобанков редких и исчезающих пород.

В странах Европы и США созданы национальные банки для сохранения генетического материала.

На базе научно-исследовательского центра в Голландии создан спермобанк, где заморожена спер-

ма 11 пород петухов [3]. Сперму разбавляли разбавителем ASG и замораживали в пайетах на программной установке. В качестве криопротектора использовали диметилацетамид. Также сперму замораживали в виде гранул методом прямого накапывания в жидкий азот. В качестве разбавителя использовали разбавитель Лейка. Процент оплодотворенности яиц после осеменения кур деконсервированной спермой составил 87,6% при замораживании в пайетах и 85,9% в гранулах. В дальнейшем авторами было принято решение замораживать сперму для хранения в пайетах.

В 2009 г. в США министерством сельского хозяйства National Center for Genetic Resources Preservation Agricultural Research Service USDA разработана программа по сохранению генетических ресурсов и создан спермобанк [4]. Сперму петухов замораживали с глицерином (способ 1) и диметилацетамидом (способ 2) в пайетах с разбавителем Лейка [5].

Способ 1. После получения сперму разбавляли 1:1 разбавителем Лейка и охлаждали до температуры 5°C. Затем разбавляли 1:2 разбавителем Лейка с глицерином (11%) и переносили в пайеты фирмы IMV по 0,5 мл. Пайеты охлаждали 10 минут в парах азота и погружали в жидкий азот. Оттаивали при температуре 5°C. После оттаивания глицерин удаляли центрифугированием с применением раствора Accudenz на приборе Accudenz column.

Способ 2. Сперму разбавляли разбавителем Лейка с криопротектором диметилацетамидом 1:2 и переносили в пайеты 0,5 мл. Пайеты выдерживали на подставке в парах азота в течение 7 минут, затем погружали в жидкий азот. Оттаивали в водяной бане при температуре 50°C.

Во Франции под руководством сотрудников научно-исследовательского центра INRA создан криобанк, где хранится сперма различных пород птиц [6]. Сперму замораживали в пайетах на программной установке, в качестве криопротекторов использовали глицерин и диметилацетамид. Сперма заморожена от 18 пород петухов в количестве 12000 пайет.

В Испании создан криобанк спермы [7] от 12 пород кур. Для разбавления спермы использовали разбавитель Лейка с диметилацетамидом. После разбавления сперму эквilibрировали в течение 1, 10, 30, 60 и 120 минут при температуре 5°C, затем переносили в пайеты IMV 0,25 мл, выдерживали в парах азота 10 минут и погружали в азот. Пайеты оттаивали в водяной бане при температуре 37°C.

Совместно с сотрудниками Французского института INRA и Венгерского института Institute for Small Animal Research разработан проект Cryobirds WPC 2012 создания криобанка спермы птиц в Венгрии. Проект охватывает период 2010 – 2014 г.г. и посвящен сохранению и улучшению генетических ресурсов в Венгрии. Одно из основных направлений этого проекта – замораживание спермы цесарок (8).

В 2013 году ученые из Канады также приступили к созданию банка половых гамет птиц [9].

Из выше приведенного видно, что для замораживания спермы птиц в криобанках используют криопротекторы глицерин и диметилацетамид, а сперму замораживают в пайетах. Пайеты легче маркировать, удобнее хранить, а также исключен прямой контакт спермы с жидким азотом.

В России, в отличие от стран Европы, единая программа по сохранению генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы только начинает создаваться. Ключевым аспектом при этом остается разработка научно обоснованных подходов к формированию криобанков, которые позволят избежать необратимых потерь пород и генов и могут быть использованы для воссоздания породы, поддержания малых популяций и сохранения генетического разнообразия (генов, свойств, пород) в селекционных программах [1]. На основании этого встает вопрос о создании простого надежного метода криоконсервации спермы птиц для

хранения замороженного материала в спермобанке, с получением относительно высокого процента оплодотворенных яиц (не ниже 60–70%) при осеменении самок деконсервированной спермой.

В лаборатории искусственного осеменения птиц ВНИИГРЖ разработаны методы криоконсервации спермы петухов в гранулах и пенициллиновых флаконах. Эти методы позволяют получать довольно высокие проценты оплодотворенности яиц – 70–90% при использовании деконсервированной спермы [10]. При использовании технологии криоконсервации спермы смешанных эякулятов в гранулах во Франции (институт INRA) на яичных курах (630 яиц) была получена оплодотворенность 92,7% [11].

Наряду с достоинством этих способов, в особенности криоконсервации спермы в гранулах, простота изготовления, отсутствия дорогостоящего оборудования, имеются и недостатки. Это соприкосновение флаконов и гранул с азотом при хранении в сосудах Дьюара, а также сложности с маркировкой.

В настоящее время в отделе генетики и разведения сельскохозяйственных птиц ВНИИГРЖ начаты исследования по разработке способа криоконсервации спермы петухов в пайетах. Криоконсервация спермы в пайетах состоит из нескольких этапов: получение спермы, разбавление разбавителем, эквilibрация с криопротектором, замораживание, оттаивание и искусственное осеменение кур. Все эти этапы имеют важное значение и нарушение хотя бы одного из них ведет к снижению результатов. Одним из важных составляющих способа является процесс эквilibрации спермы с криопротектором. Сперму после получения разбавляют средой Ю 1:1 и после охлаждения в термосе со льдом добавляют криопротектор диметилацетамид в количестве 8%. Далее пайеты со спермой выдерживают в парах азота от 1 до 4 минут. После охлаждения пайеты погружают в жидкий азот. Наиболее высокие результаты получены при охлаждении пайет в парах азота в течение 3 и 4 минут. Процент оплодотворенности яиц после осеменения кур деконсервированной спермой составил 61,7 и 63,6% соответственно [12].

Таким образом, доказана возможность замораживания спермы петухов в пайетах без наличия дорогостоящего оборудования.

Литература

1. Фисинин В. И. Криоконсервация мужских половых клеток, как метод сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы / В. И. Фисинин, В. А. Багиров, Н. А. Волкова, Н. А. Зиновьева, Я. С. Ройтер // Достижения науки и техники АПК, № 8. – 2012.
2. Тагиров М. Сохранение генофонда птиц путем криоконсервации / М. Тагиров, А. Артеменко, А. Терещенко // Аграрное решение № 10 Октября, 2010.

3. Woelders H. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective / H. Woelders, C. A. Zuidberg and S. J. Hiemstra // Poultry Sci., 2006, 85:216–222.
4. Blackburn H. D. Insemination fresh or cryopreserved semen for maximum efficiency: Implications for gene banks and industry / H. D. Blackburn, F. Silversides and P. H. Purdy // Poultry Sci., 2009, 88:2192–2198.
5. Purdy P.H. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both / P. H. Purdy, Y. Song, F. G. Silversides and H. D. Blackburn // 2009 Poultry Sci., 88:2184–2191.
6. Blesbois E. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank / E. Blesbois, F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerelle, P. Rault and M. Tixier-Boichard // 2007. Poultry Science, 86 (3):555–564.
7. Santiago-Moreno J. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time / J. Santiago-Moreno, C. Castano, A. Toledano-Diaz, M. A. Coloma, A. Lopez-Sebastian, M. T. Prieto, J. L. Campo // Poultry Sci., September 2011 vol. 90 no. 9 2047–2053.
8. Blesbois E. Development of avian reproductive biotechnologies for the management of genetic diversity: cryobirds / E. Blesbois, M. Govoroun, A. Hidas, K. Kiptoi, B. Pain, F. Seigneurin, E. Potakine-Varkonyi, J. Barna // WPC. 2012 World's Poultry Science Journal 2012:281.
9. Silversides F. G. Cryoconservation of avian gonads in Canada / F. G. Silversides, M. C. Robertson, J. Liu // Poultry Sci., 2013 Oct; 92 (10):2613–7.
10. Целютин К. В., Тур Б. К., Мавродина Т. Г., Нарубина Л. Е. Теория и практика криоконсервации сельскохозяйственной птицы. СПб. Пушкин, 2009.
11. Нарубина Л. Е., Курбатов А. Д., Бубляева Г. Б., Целютин К. В. Способ криоконсервации спермы петухов в виде гранул. // авт.свидетельство №1343587. – СССР, 1987.
12. Целютин К. В. Влияние времени эквilibрации на оплодотворяющую способность спермы петухов, замороженную в пайетах / К. В. Целютин, Б. К. Тур // Бюл. ВНИИГРЖ, Вып.151. 2012.

Tselutin K. V., Tur B. K.

Cryopreservation of poultry semen is management of genetic resources

Abstract. *The main use of semen cryopreservation in birds is the management of genetic resources in the context of dramatic decrease in avian genetic biodiversity. This is achieved through cryobanks. There are main national avian cryobank programmes in The Netherlands, Centre for Genetic Resources, 2006; The national cryobank, INRA, France, 2007; The National Center of Genetic Resources Preservation Agricultural Research Service, USDA, USA, 2009; The Spanish poultry breeds cryobank, Spain, 2011 and Cryobirds, French-Hungarian project, Hungary, 2012. They mainly include semen from different breeds. The future need for semen cryopreservation programmes will focus mainly on some objectives: improvement of predictors of male suitability for semen freezing, emergence of standardized methods of semen freezing and increasing development of avian cryobanks.*

Key words: poultry, sperm, freezing, cryopreservation.

Authors:

Tselutin K. V. — PhD (Biology), Senior Research Scientist of the Department of Poultry Genetics and Breeding for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601; e-mail: ktselutin@yahoo.com;

Tur B. K. — PhD (Biology), Senior Research Scientist of the Department of Poultry Genetics and Breeding for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601.