



II Всероссийская Школа-конференция  
«Клеточные и геномные технологии для  
совершенствования сельскохозяйственных животных»



**Сохранение генетических  
ресурсов сельскохозяйственных  
птиц *in vitro*: достижения,  
проблемы и пути решения**



Зав. лабораторией генетики,  
разведения и сохранения генетических  
ресурсов сельскохозяйственных птиц,  
ВНИИГРЖ, г.н.с., д.б.н.

**Станищевская О.И.**

[olgastan@list.ru](mailto:olgastan@list.ru)



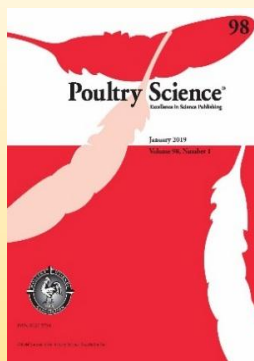
**Комиссия ФАО  
по  
генетическим  
ресурсам  
в сфере  
продовольствия  
и сельского  
хозяйства**



**Phylogeny and  
conservation  
priority  
assessment of  
Asian domestic  
chicken genetic  
resources**



**Avian Genetic  
Resources at  
Risk:  
An Assessment  
and Proposal for  
Conservation of  
Genetic Stocks in  
the USA and  
Canada**

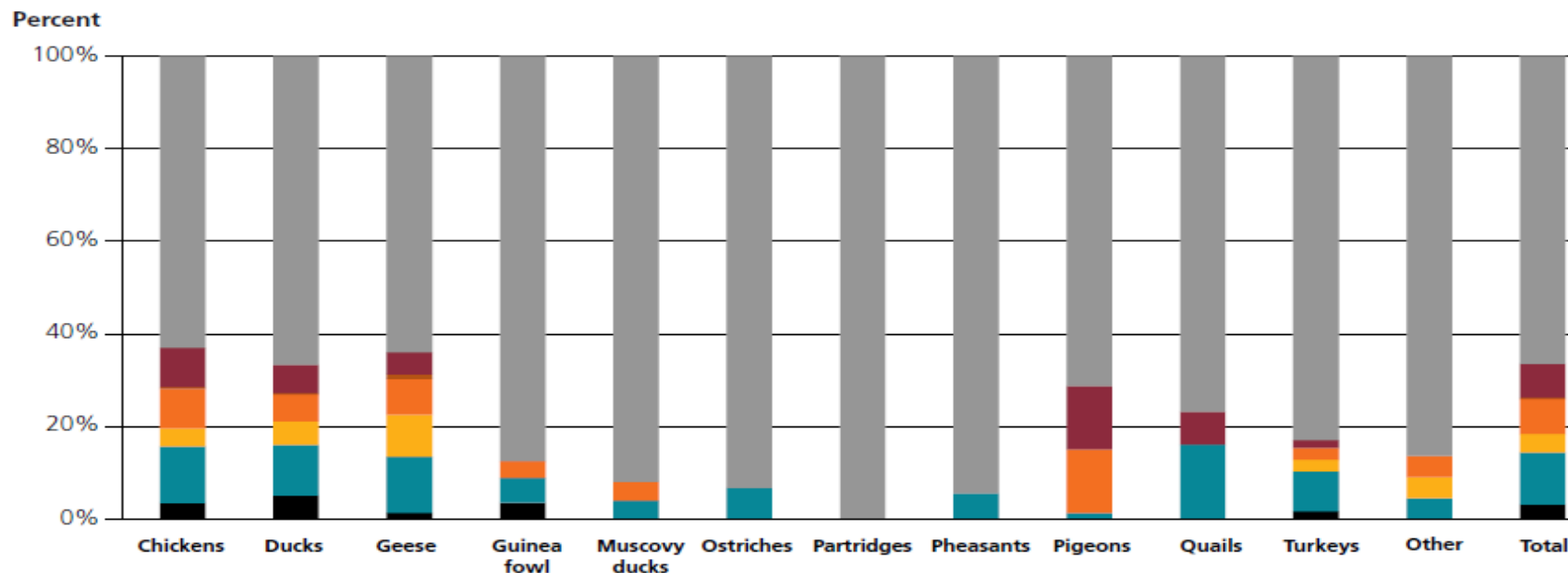


**Semen Cryopreservation for Ex Situ  
Management of Genetic Diversity in  
Chicken: Creation of the French Avian  
Cryobank**

**Проблема сохранения  
генетических ресурсов  
сельскохозяйственных животных**  
является глобальной, и на ее решение  
направлены усилия мирового  
сообщества.

Координирующую роль в области  
сохранения ГРЖ выполняет **FAO** и ее  
профильные подразделения (FAO,2015).  
**Сохранение генетических ресурсов  
животных** и устойчивое управление  
ими имеет решающее значение для  
глобального сохранения  
биоразнообразия, продовольственной  
безопасности и средств к  
существованию населения. Для  
сохранения генетического  
разнообразия сельскохозяйственных  
птиц необходимы согласованные  
усилия, включая установление  
международных и национальных целей  
и стратегий.

## Состояние мировых генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц



### RISK STATUS

Risk Status	Chickens	Ducks	Geese	Guinea fowl	Muscovy ducks	Ostriches	Partridges	Pheasants	Pigeons	Quails	Turkeys	Other	Total
Unknown	1 089	196	133	49	23	14	12	17	52	43	97	19	1 744
Critical	147	18	10	0	0	0	0	0	10	4	2	0	191
Critical-maintained	7	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Endangered	147	17	16	2	1	0	0	0	10	0	3	1	197
Endangered-maintained	67	15	19	0	0	0	0	0	0	0	3	1	105
Not at risk	212	32	25	3	1	1	0	1	1	9	10	1	296
Extinct	60	15	3	2	0	0	0	0	0	0	2	0	82
<b>Total</b>	<b>1 729</b>	<b>294</b>	<b>208</b>	<b>56</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>73</b>	<b>56</b>	<b>117</b>	<b>22</b>	<b>2 625</b>

Note: "Other" refers to duck × Muscovy duck crosses, Chilean tinamous, cassowaries, emus, ñandus, peacocks and swallows.

Source: DAD-IS (accessed July 2014).

**В настоящее время в мире существуют два основных метода сохранения генофонда малочисленных и исчезающих пород животных, в том числе и птицы:**

**1. Сохранение животных в живом разведении в генофондных хозяйствах и на коллекционных фермах  
(*ex situ in vivo*).**



**2. Сохранение репродуктивного материала в состоянии биостаза  
(*in vitro*).**





## Формы биостаза, используемые при сохранении генетических ресурсов птиц *in vitro*

**Криобиоз** - это форма криптобиоза, которая возникает в результате снижения температуры. Состояние криобиоза достигается, когда вода, окружающая клетки, замораживается, прекращение подвижности молекул позволяет организму выдерживать отрицательные температуры до тех пор, пока не вернутся более благоприятные условия.

Организмы, способные выдерживать эти условия, обычно имеют молекулы, которые способствуют замораживанию воды в предпочтительных местах, а также препятствуют росту крупных кристаллов льда, которые в противном случае могут повредить клетки.

**Криоконсервация репродуктивных клеток самцов, PGC-клеток, тканей яичников на разных стадиях раннего онтогенеза**

**Ангидробиоз** является формой криптобиоза, возникает в экстремальных ситуациях, связанных с высыханием.

термин ангидробиоз происходит от греческого слова «жизнь без воды» и чаще всего используется для обозначения устойчивости к высыханию.

**Сублимационная сушка сперматозоидов (лиофилизация)**

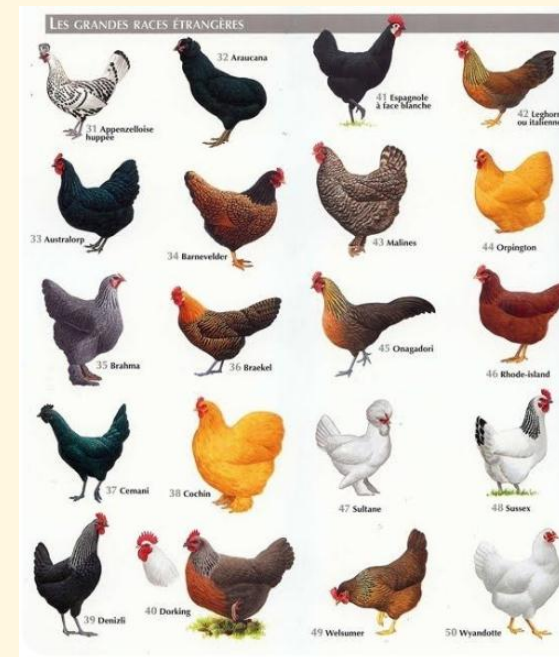
# Криобанки и их вклад в сохранение генетических ресурсов



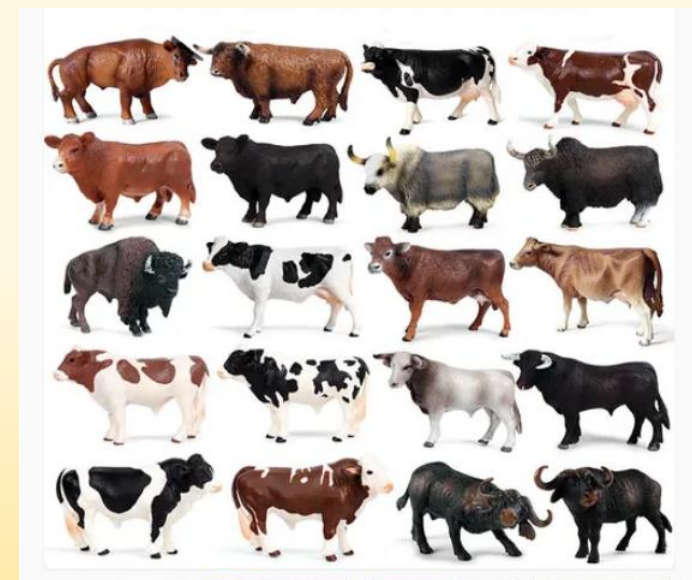
- **предотвращение исчезновения пород** из-за экстремального генетического состояния, такого как малая численность породы/популяции, высокая частота встречаемости генетических дефектов в результате интенсивной селекции и генетического дрейфа
- **источник генетически разнообразной и специализированной ДНК.** Сохраняемые материалы используются для исследований генетического разнообразия, исследований по геномным ассоциациям, исследований функции генов и других видов исследований
- генетические банки могут предоставлять образцы от разных поколений, что способствует **повышению точности геномной селекции.** (при условии, что информация будет каталогизирована с учетом фенотипа и генотипа, проведена геномная паспортизация закладываемых образцов)
- преимуществом сохранения генетического разнообразия *in vitro* в криобанках является **экономическая составляющая**
- деятельность генетического банка должна заключаться не только в получении и сохранении резервного биологического материала, но и в активном сотрудничестве с коллекциями в живом разведении для **расширения генетического разнообразия при сохранении *ex situ in vivo*.**

## Доля национальных пород с.-х. животных, сохраняемых в генетических банках, %

Регион	Доля национальных пород, сохраняемых в генетических банках, %		
	Статус	КРС	Птица
Африка	законсервировано	12	2
	достаточно материала	8	2
Азия	законсервировано	32	19
	достаточно материала	15	10
Европа и Кавказ	законсервировано	40	5
	достаточно материала	23	3
Латинская Америка и Карибы	законсервировано	15	0
	достаточно материала	12	0
Северная Америка	законсервировано	74	25
	достаточно материала	33	3
Ближний и Средний Восток	законсервировано	4	0
	достаточно материала	4	0
Мир	законсервировано	27	6
	достаточно материала	16	3



<https://www.pinterest.jp/pin/83879611802468915/>



<https://alitoools.io/ru/showcase/modelirovanie-milih-domashnih-zhivotnih-korova-telenok-angus-bik-buyvol-modely-figurki-razvivayushtie-pvh-milaya-igrushka-detskiy-podarok-4000867545298>

Источник: FAO, Country reports, 2014

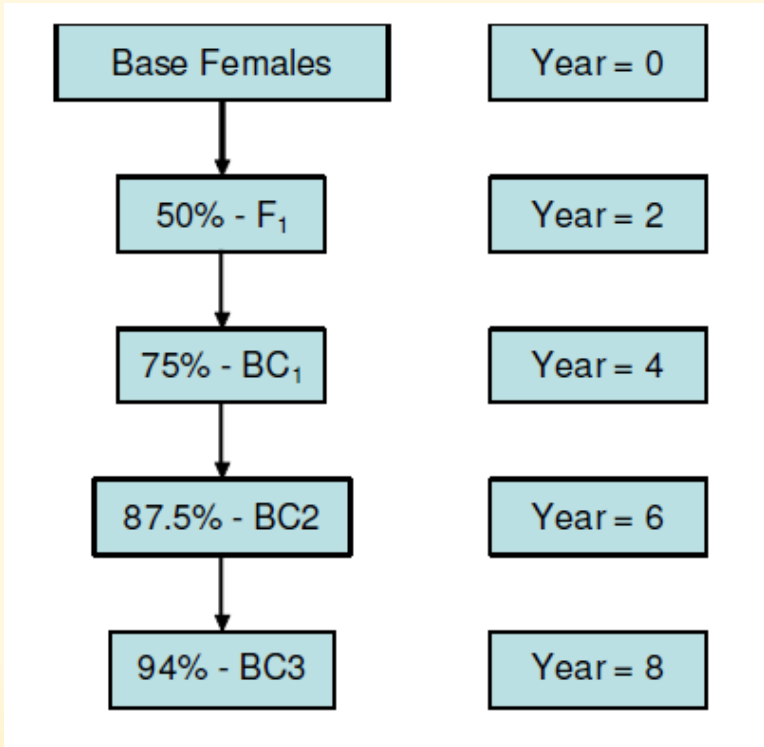
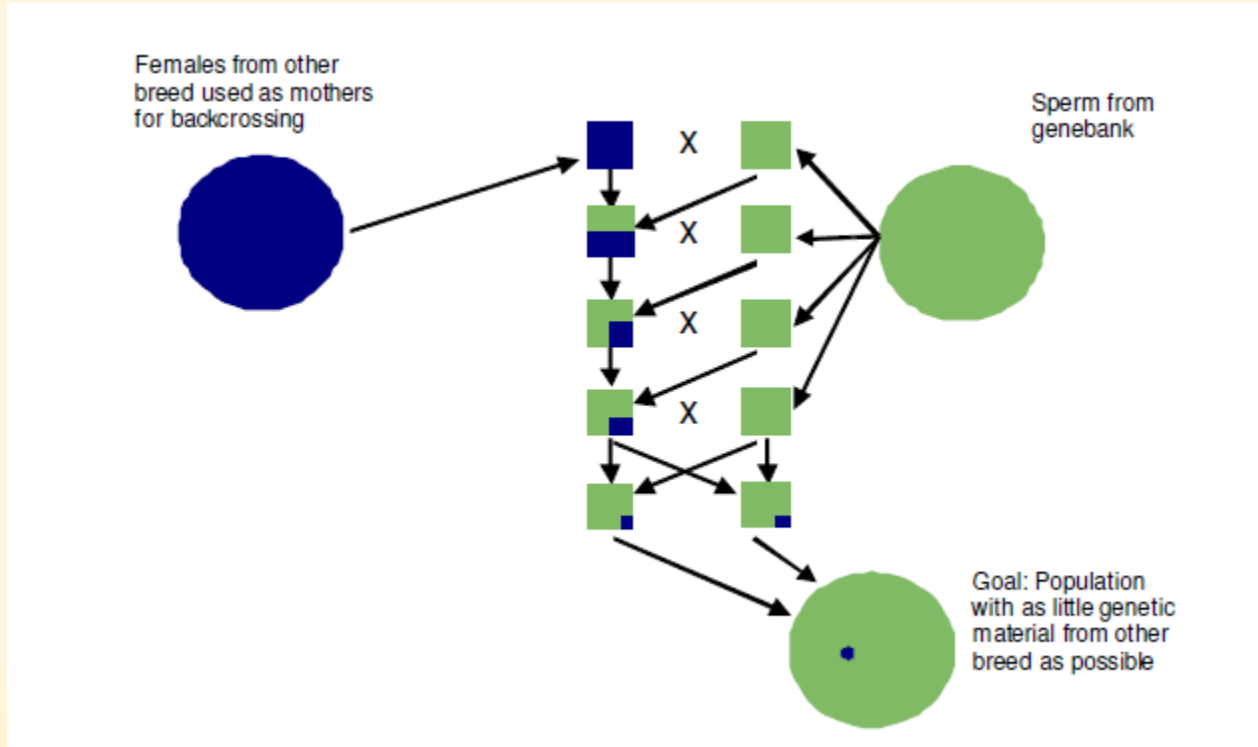


Рисунок . Демонстрация восстановления популяции с помощью криоконсервированной спермы\*

Рисунок . Стандартный план обратного скрещивания для восстановления породы\*

\* <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1404e/a1404e00.pdf>



Item 5.2 of the Provisional Agenda
COMMISSION ON GENETIC RESOURCES FOR FOOD AND AGRICULTURE
Thirteenth Regular Session
Rome, 18 – 22 July 2011
DRAFT GUIDELINES FOR THE CRYOCONSERVATION OF ANIMAL GENETIC RESOURCES

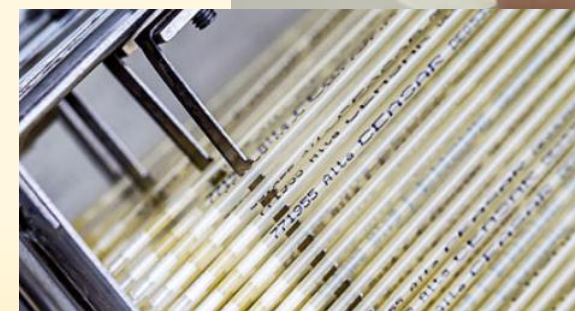
Таблица . Подходы к восстановлению для различных популяций кур\*.

Item	Single gene introgression	Quantitative trait lines (5 generation backcross)	Breed (5 generation backcross)
Total straws used <sup>a</sup>	7	127	257
Initial number of hens	14	100	140
Inseminations for entire reconstitution process	14	254	513
Generation number for multiple intramaginal inseminations per hen (N/hen) <sup>b</sup>	0 (0)	4 (3)	3 (3)
Final number of target population produced (generation number)	16 (1)	44 (5)	62 (5)
Minimum number of straws for 150% reconstitution	11 <sup>c</sup>	191 <sup>c</sup>	386 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Based upon a motile sperm concentration of  $200 \times 10^6$  (Purdy *et al.*, 2009).

<sup>b</sup> Generation 3 and 4 hens will have 87.5% and 93.7% of the genome of interest.

<sup>c</sup> Assumes a 0.5 ml straw and two inseminations per straw.



\* <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1404e/a1404e00.pdf>



## Качество заморожено/оттаянного семени петухов при использовании методов замораживания в соломе и гранулах

Breed	Semen parameters*		
	TM	PM	SMI
<i>Gallus gallus</i>			
BS	17.45 ± 7.37	0.83 ± 1.83	15.55 ± 5.61
BP	16.98 ± 5.21	1.50 ± 1.83	17.24 ± 5.61
MB	30.70 ± 13.81	4.97 ± 2.38	33.55 ± 13.52
<i>Meleagris gallopavo</i>			
RO	22.38 ± 0.10	2.57 ± 1.38	51.50 ± 7.40
BC	23.72 ± 3.10	1.88 ± 0.68	44.33 ± 1.42
ER	14.64 ± 1.28	0.89 ± 0.31	37.38 ± 4.46

\*TM: total motile sperm (%); PM: progressive motile sperm (%); SMI: sperm membrane integrity (%).

<https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1993094>  
Italian cryobank

Quality indicators	Native	Frozen/thawed sperm		
		LCM control	Treh20	Treh30
Concentration spermatozoa, billion/ml		3.15 ± 0.13		
Total motility (TM), %	86.30 ± 0.40	44,52±2,47	52.36 ± 1.60 <sup>a</sup>	32.51 ± 1.47 <sup>b</sup>
Progressive motility (PM), %	67.50 ± 2.01	28,34±2,52	32.64 ± 1.07 <sup>a</sup>	21.44 ± 0.35 <sup>b</sup>
Viability, %	72.63 ± 1.74	30,02±2,03	35.05 ± 0.62 <sup>a</sup>	26.90 ± 1.46 <sup>b</sup>

Note: <sup>a,b</sup>p < 0.05.

<https://doi.org/10.3390/ani13061023> Криобанк ВНИИГРЖ



Таблица . Результаты дизайна возвратного скрещивания для восстановления линий из замороженной спермы криобанка; от производства птицы F1 после осеменение

Line	Stage	Males, n	Dams, n	Artificial inseminations per dam, n	Fertile eggs, n	Chicks, n	Females, n	Layers, n	Straws, n	Donor genome, %
R+	F <sub>1</sub>	5	20	4	53	48	24	18	80	50
	BC1	5	18	5	60	54	27	20	90	75
	BC2	5	20	6	64	58	29	22	120	87.5
	BC3	5	21	9	76	68	34	26	189	93.75
	BC4	10	26	9	78	70	35	26	234	96.87
	BC5	10	26	10	87	78	39	29	260	98.4
Total Gauloise dorée									973	
	F <sub>1</sub>	5	20	2	45	41	20	15	48	50
	BC1	5	15	3	51	46	23	17	45	75
	BC2	5	17	4	61	55	28	21	68	87.5
	BC3	5	21	6	85	77	38	29	126	93.75
Total Y33									283	
	BC4	8	29	7	114	103	51	39	283	96.87
	F <sub>1</sub>	5	20	3	83	75	37	28	68	50
	BC1	5	26	2	72	65	32	24	52	75
	BC2	5	23	2	64	57	29	22	46	87.5
Total B4									492	
	BC3	7	20	4	111	100	50	37	80	93.75
	BC4	10	34	4	188	170	85	64	136	96.87
	BC5	10	40	4	222	200	100	75	168	98.4
									536	
Total B4									60	
	F <sub>1</sub>	5	20	3	54	48	24	18	60	50
	BC1	5	18	3	48	44	22	16	54	75
	BC2	5	16	4	46	41	21	15	64	87.5
	BC3	5	15	9	60	54	27	20	135	93.75
Total	BC4	10	20	8	29	26	13	10	160	96.87
									473	

\*<https://doi.org/10.1093/ps/86.3.555> по данным французского криобанка

Необходимый запас семени для воспроизводства породы 125 гол (FAO-2015)

**17 соломин на 1 голову**

**2125 соломин**

Доза осеменения 0,2 мл

**Общий объем з/о семени**

**~ 1000 мл\***

Средний объем эякулята петуха 0,5 мл

**Криобанк ВНИИГРЖ**

**125 голов**

**23 дозы осеменения в**

**гранулах на 1 голову**

**2865 доз в гранулах**

Доза осеменения 0,05 мл

**Общий объем з/о семени**

**~143 мл**

# МЕТОД КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СЕМЕНИ ПТИЦ – ПЛЮСЫ



- Практически единственный на сегодняшний день «работающий» метод сохранения генофонда *in vitro*.
- Менее затратный способ сохранения генетического разнообразия по сравнению с методом сохранения *in vivo*.
- Высокая степень разработанности проблемы - созданы многочисленные технологии замораживания семени (в гранулах, в пайетах, на фторопластовой пластине, в тонком слое) и оттаивания (в водяной бане, на металлической пластине), включая «медленные» и «быстрые протоколы».



# Проблемы криоконсервации семени с.-х. птиц



Криоконсервированное семя сельскохозяйственных птиц используется в коммерческих селекционных программах в ограниченной степени, поскольку высокий эффект селекции на поколение отбора делает использование самцов от предыдущих поколений нецелесообразным. Это не способствует развитию метода.

Генетическое разнообразие сохраняемого материала снижается на различных стадиях постсингамии по причине выбытия особей с пониженной криорезистентностью репродуктивных клеток.

Значительная межпородная и индивидуальная изменчивость криоустойчивости сперматозоидов; коэффициент вариации ( $C_v$ ) может достигать 23–25 % (Pleshanov et al., 2018; Stanishevskaya, Pleshanov, 2018).

Использование криоконсервированного семени от смешанных эякулятов из криобанков может приводить к увеличению степени инбридинга в популяции. поскольку генетический вклад каждого самца неодинаков в связи с эффектом избирательности оплодотворения (Pleshanov et al., 2018, 2019).



## Проблемы криоконсервации семени с.-х. птиц, требующие решения:

Сперматозоиды птиц, в отличие от сперматозоидов млекопитающих, вследствие морфологических особенностей, имеют повышенную чувствительность к повреждающему воздействию низких температур. Криоконсервация запускает не только процессы повреждения мембран на механическом уровне, но и химико-физические процессы денатурации белков и липидов бислоев мембран, приводит к сублетальному замерзанию и запуску процессов криокапцитаии, образованию активных форм кислорода и необратимым морфологическим изменениям в клетках (Pini et al., 2018), что выражается в снижении подвижности и фертильности заморожено-оттаянных сперматозоидов. Необходима разработка новых криопротекторных сред и протоколов замораживания/оттаивания.

При использовании заморожено/оттаянных сперматозоидов снижается не только показатель их фертильности, но и жизнеспособность эмбрионов.

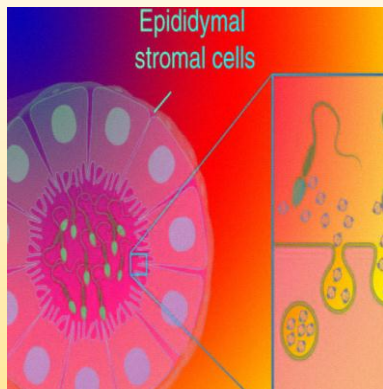
Одной из основных причин ранней эмбриональной смертности является повреждение ДНК, вызвавшее функциональные повреждения ядерных структур сперматозоида (Watson, 2000; Liptóí, Hidas, 2006).

Существующие на сегодняшний день «работающие» методы сохранения только репродуктивных клеток самцов птиц (спермиев) позволяют восстанавливать исчезающие породы/популяции лишь за счет поглотительного скрещивания; происходит потеря материнского наследственного материала, включая митохондриальный геном, поскольку гетерогаметным полом являются женский (Fulton, 2006). Необходимо развитие методов криоконсервации женских гамет. Невозможность прямого замораживания полилецитальных яйцеклеток птиц преодолевается через замораживание тканей яичников с последующей их трансплантацией самкам или через замораживание эмбриональных яичников с последующей трансплантацией половых клеток эмбрионам-донорам (Benesova D. et al, 2016; Tuanjun Hu et al, 2022).

# Эпигенетические изменения в сперматозоидах



- Установлено, что **клеточные и эпигенетические модификации** являются основными причинами, лежащими в основе снижения подвижности и фертильности сперматозоидов петухов в процессе замораживания-оттаивания. Экспериментально доказано, что состав криопротекторной среды может не оказывать влияния на процесс метилирования ДНК сперматозоида, но при этом приводит к значительному изменению степени ацетилирования гистона H3K9 и метилирования H3K4 (Masoumeh Salehi et al, 2020; Beck D. et al, 2021)
- Обнаружен механизм эпигенетического влияния **стресса** на сперму и развитие эмбриона. В ответ на хронический стресс во внеклеточных везикулах эпителиальных клеток придатка яичка изменялся состав микроРНК и белков, эти структуры в свою очередь влияли на микро-РНК сперматозоидов. Такое воздействие развивалось в течение продолжительного периода после стресса и влияло на **развитие нервной системы и реакцию на стресс у потомства** (Jennifer Chan et al. / Nature Communications, 2020).



**Необходимо изучение влияния протоколов замораживания/оттаивания семени птиц на трансгенеративное эпигенетическое наследование репродуктивных признаков.**



## **Пути решения проблемы повышения фертильности заморожено/оттаянного семени птиц**

- **Необходимо глубокое изучение физиолого-биохимических процессов, протекающих в семени при его замораживании/оттаивании, а также роли различных веществ в сохранении функциональной полноценности сперматозоидов (липидных фракций мембран - гликолипидов, фосфолипидов, стеринов; холестерина и соотношения холестерин/фосфолипиды, степени ненасыщенности жирных кислот; аминокислотного профиля семенной плазмы; микроэлементов и др.).**
- **Разработка принципиально новых сред для замораживания семени с использованием комбинаций проникающих и непроникающих криопротекторов эндо- и экзоцеллюлярного действия природного происхождения, в том числе сахаридов, антифризных гликопротеинов (АФГП) и антифризных протеинов (АФП), обнаруженных в крови и тканях пойкилотермных организмов, живущих в морозных средах (насекомые, морские рыбы).**
- **Разработка новых режимов замораживания/оттаивания семени с учетом видовых, породных и индивидуальных биологических особенностей семени.**





# Во ВНИИГРЖ в 70-х годах XX века основана и до настоящего времени поддерживается «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», включающая на сегодняшний день 32 породы и популяции отечественного и иностранного происхождения мяско-яичного, яично-мясного, яичного, спортивного, декоративного направления использования. На базе коллекции организован одноименный ЦКП.

### Чешская золотистая




**Происхождение:** Чешская «Золотая курица» — это порода. Заведена в 1874 году. Впервые описана в 1885 году. В настоящее время она встречается в Чехии, Словакии и Венгрии.

**Внешний вид:** Птица имеет золотистую окраску оперения, черную голову и гребень. Вес самки — 1,8 кг, самца — 2,2 кг. Высота — 30 см. Срок жизни — 10 лет.

**Назначение:** Птица используется для получения яиц и мяса.

### Гамбургская серебристо-пятнистая (карли)



**Происхождение:** Гамбургская серебристо-пятнистая (карли) — порода. Заведена в 1874 году. Впервые описана в 1885 году. В настоящее время она встречается в Гамбурге, Германии.

**Внешний вид:** Птица имеет серебристо-пятнистую окраску оперения, черную голову и гребень. Вес самки — 1,2 кг, самца — 1,5 кг. Высота — 25 см. Срок жизни — 10 лет.

**Назначение:** Птица используется для получения яиц и мяса.

### Леггорнская



**Происхождение:** Леггорнская — порода. Заведена в 1874 году. Впервые описана в 1885 году. В настоящее время она встречается в Леггорне, Италия.

**Внешний вид:** Птица имеет разноцветную окраску оперения, черную голову и гребень. Вес самки — 1,8 кг, самца — 2,2 кг. Высота — 30 см. Срок жизни — 10 лет.

**Назначение:** Птица используется для получения яиц и мяса.

### Орловская ситцевая



**Происхождение:** Орловская ситцевая — порода. Заведена в 1874 году. Впервые описана в 1885 году. В настоящее время она встречается в Орле, Франция.

**Внешний вид:** Птица имеет ситцевую окраску оперения, черную голову и гребень. Вес самки — 1,8 кг, самца — 2,2 кг. Высота — 30 см. Срок жизни — 10 лет.

**Назначение:** Птица используется для получения яиц и мяса.

### Род-Айленд красный



**Происхождение:** Род-Айленд красный — порода. Заведена в 1874 году. Впервые описана в 1885 году. В настоящее время она встречается в Род-Айленде, США.

**Внешний вид:** Птица имеет красную окраску оперения, черную голову и гребень. Вес самки — 1,8 кг, самца — 2,2 кг. Высота — 30 см. Срок жизни — 10 лет.

**Назначение:** Птица используется для получения яиц и мяса.

### Голландская белохвостая



**Происхождение:** Голландская белохвостая — порода. Заведена в 1874 году. Впервые описана в 1885 году. В настоящее время она встречается в Голландии.

**Внешний вид:** Птица имеет белую окраску оперения, черную голову и гребень. Вес самки — 1,8 кг, самца — 2,2 кг. Высота — 30 см. Срок жизни — 10 лет.

**Назначение:** Птица используется для получения яиц и мяса.

### Русская белая

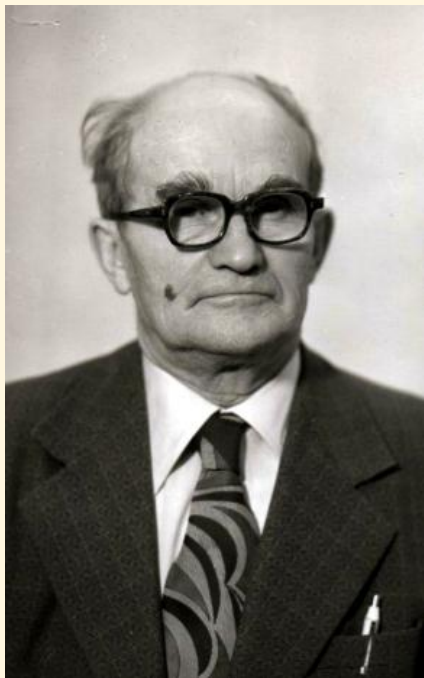


**Происхождение:** Русская белая — порода. Заведена в 1874 году. Впервые описана в 1885 году. В настоящее время она встречается в России.

**Внешний вид:** Птица имеет белую окраску оперения, черную голову и гребень. Вес самки — 1,8 кг, самца — 2,2 кг. Высота — 30 см. Срок жизни — 10 лет.

**Назначение:** Птица используется для получения яиц и мяса.

## Исследования ВНИИГРЖ в области сохранения генетических ресурсов с.- х. птиц методами *in vitro*.



Под руководством доктора с.-х. наук, профессора **А. Д. Курбатова** в 70-е годы XX века начаты исследования по разработке принципиально новых способов криоконсервации спермы самцов птиц, позволяющих сохранять генофонд исчезающих пород и видов, использовать заморожено-оттаянную сперму самцов с высокой племенной ценностью и при этом сохранять её высокую оплодотворяющую способность.

### Основные разработки:

- **Т.Г. Мавродина** «Способы замораживания и использования спермы гусаков для искусственного осеменения», а.с. № 965429, 1982 г.
- **Б.И. Иванов, И.И. Попов, Б.К. Тур, Г.Б. Розановский** «Способ обработки спермы», а.с. № 1119689, 1984 г.
- **Б.И. Иванов, А.Д. Курбатов, И.И. Попов** «Способ замораживания спермы птиц», а.с. № 1136806, 1985 г.
- **Л.Е. Нарубина** «Разработка способов длительного хранения спермы петухов и их использование при воспроизводстве птицы», дисс. на соискание уч. степ. д. с.-х. н., 1988 г.
- **К.В. Целютин, Б.К. Тур, Л.Е. Нарубина, Т.Г. Мавродина** книга «Теория и практика криоконсервации спермы сельскохозяйственной птицы (петухи, индюки, гусаки, селезни)», 2009 г.

# Исследования ВНИИГРЖ в области сохранения генетических ресурсов с.- х. птиц методами *in vitro*.



## Впервые разработаны практические рекомендации:

- замораживание спермы во флаконах с использованием разработанного сотрудниками лаборатории криостата (а.с. № 656621, 1978; а.с. № 994874, 1980 г.);
- замораживание индивидуальных эякулятов или большого количества смешанной спермы способом прямого накапывания в жидкий азот в виде мелких гранул (а.с. № 1343587, 1987 г.; а.с. № 1515443, 1989 г.);
- криоконсервация спермы кур яичного и мясного направления продуктивности с использованием разбавителя ЛКС -1 (а.с. № 1130339, 1984 г.);
- использование разбавителя «Ю» для спермы селезней (а.с. № 1298974, 1986 г.).
- 1998 году эффективность использования разработанных в лаборатории способов
- криоконсервации спермы птиц была подтверждена во Франции совместными исследованиями сотрудников ВНИИГРЖ (канд. биол. наук К.В. Целютин) и института INRA (Франция). Сравнительные испытания способов криоконсервации спермы птиц, разработанных российскими и французскими учёными, показали, что способ криоконсервации спермы петухов в гранулах с криопротектором деметилацетомидом, разработанный во ВНИИГРЖ, обеспечивает оплодотворенность яиц после осеменения кур деконсервированной спермой на уровне от 84,7 до 92,7 %; а использование деконсервированной спермы, замороженной по методике французских исследователей – только 53,7 - 63,9 % (Poultry Science, 1999).

# Исследования ВНИИГРЖ в области сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц методами *in vitro*.



## В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ

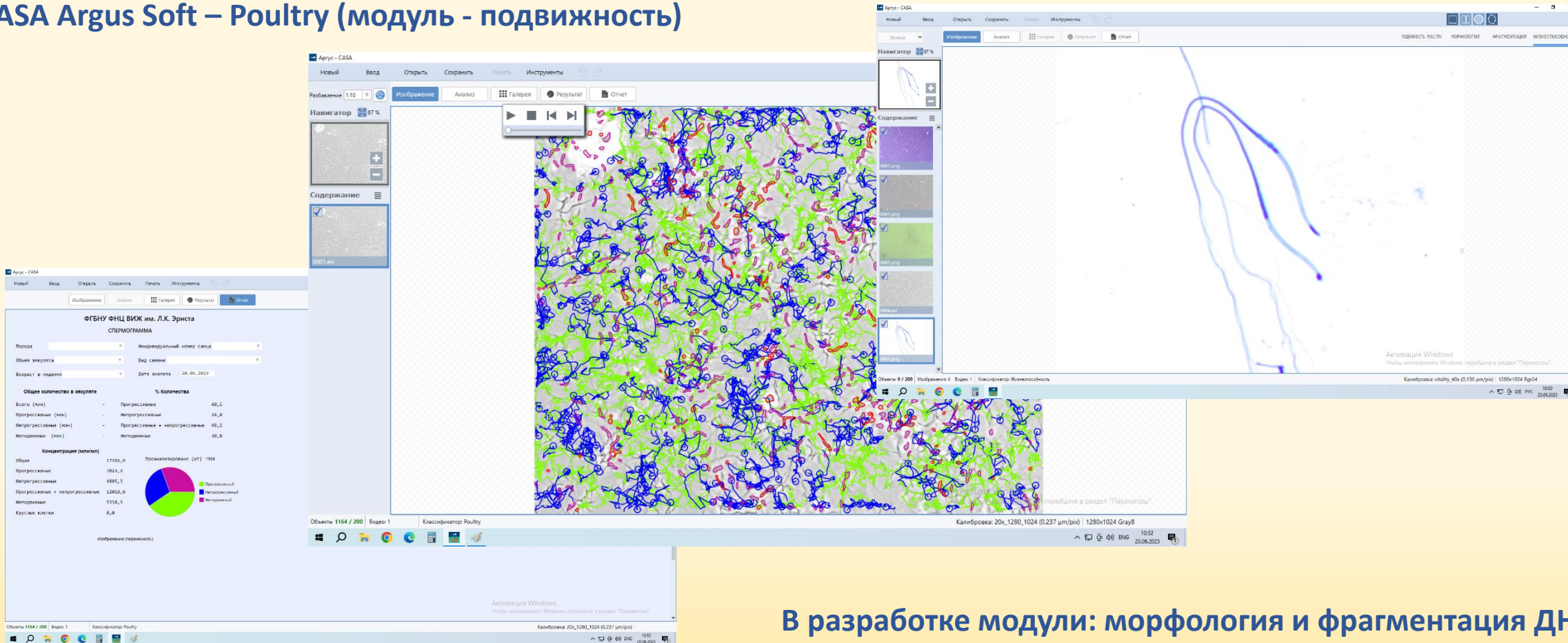
сотрудники отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ продолжают исследования по криоконсервации семени птиц в следующих направлениях:

- разработка методов оценки и отбора самцов по криоустойчивости их семени с целью создания криобанка; исследования по генетической обусловленности криоустойчивости семени;
- создание новых составов сред для криоконсервации семени самцов с.-х. птиц, обеспечивающих высокий уровень сохранности мембран сперматозоидов и их органоидов, хроматина, кинетического аппарата и, как следствие, фертильности;
- совершенствование биотехнологии криоконсервации индивидуальных эякулятов с целью получения высокой оплодотворенности яиц для сохранению генофонда самцов с.-х. птиц;
- совершенствование методов оценки функциональной полноценности сперматозоидов *in vitro*;
- разработка методов сублимационной сушки семени птиц для сохранения генофонда в виде «сухого биобанка»;
- создание криобанка семени с.-х. птиц 40 пород и популяций

# Разработка и использование программных продуктов по оценке качественных показателей с.-х. птиц

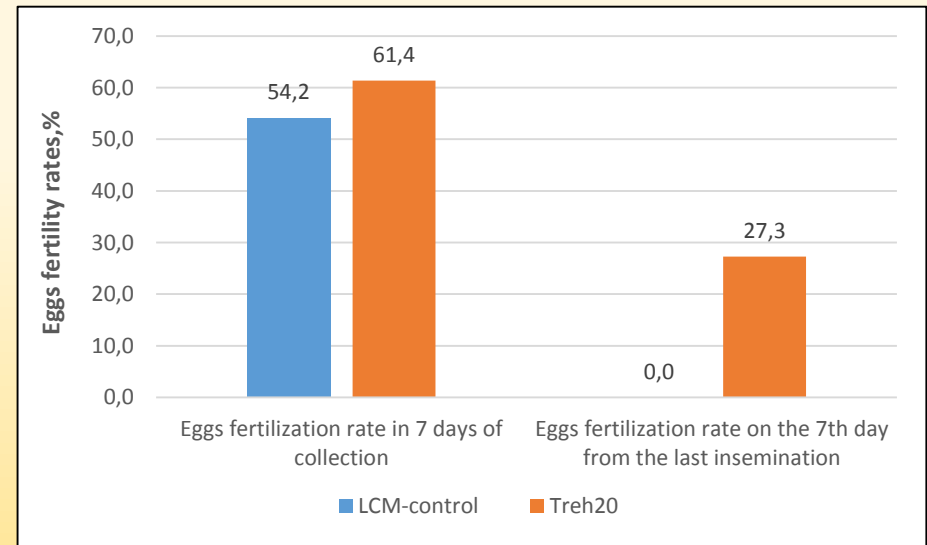
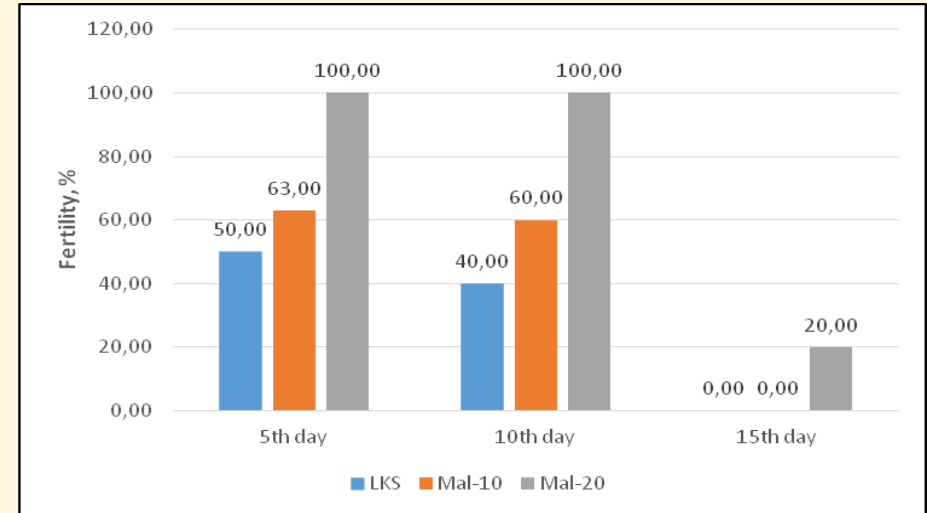
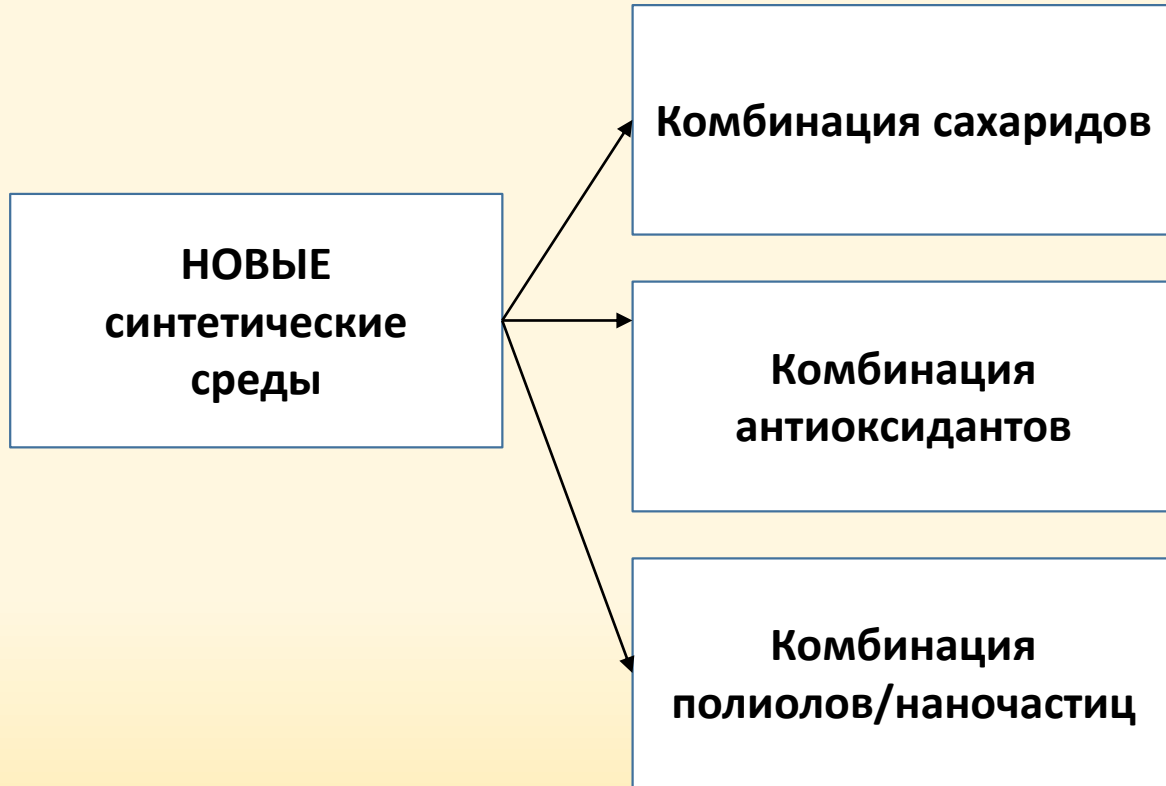


CASA Argus Soft – Poultry (модуль - подвижность)



В разработке модули: морфология и фрагментация ДНК

# СИНТЕТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ СЕМЕНИ ПЕТУХОВ



# Создание и пополнение криобанка семени петухов генофондных пород и электронного каталога.



№ кластера	Состав кластера	Дата закладки	Размещение в хранилище	Качество нативной		Качество замороз./оттаян.		Количество доз, ед.	Текущий остаток, ед.	Изъято доз		
				концентрация, млрд/млЗ	% общей подвижности	концентрация, млрд/млЗ	% общей подвижности			Дата	ФИО, цель	Количество, ед.
1	X1660	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,7-3,3	90	1,5	40	77	77			
	X1805											
2	X1765	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,2-2,8	85	1,4	50	84	84			
	B9166											
3	X1447	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,7-3,3	85	1,5	30	127	127			
	X1759											
4	X1551	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,7-3,3	85	1,5	50	99	99			
	X1539											
5	B9154	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	3,5	90	1,8	40	108	108			
	X1991											
6	X1660	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,0-2,5	80	1	40	60	60			
	X1805											
	X1738											
7	X1765	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,5-2,7	90	1,2	20	61	61			
	X1998											
8	X1998	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,5	80	1,3	30	42	42			
	X1998											
<b>ИТОГО ЗАЛОЖЕНО</b>									<b>658</b>			

Русская белая УИН 001РБ

Гамбургская УИН002ГАМ

Китайская шелковая УИН003КШ

Чешск ...

## «КРИБАНК ГЕНЕРАТИВНЫХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ПОРОД КУР И ДРУГИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ»



Порода	Количество доз
Русская белая	658
Гамбургская	268
Чешская	349
Китайская	628
Голландская белохохлая	296
Брама палевая	746
ЛЗС	307
Итакльянская куропатчатая	435
Орловская ситцевая	328
Фавероль	164
Бентамка синцевая	254
Кохинхин карликовый	453
Павловская золотистая	259
Курчавая	454
Нью - Гемпшир	650
Юрловская золотистая	250
Юрловская серебристая	320
Брама светлая	692
Голошейная	267
Пушкинская	506

Порода	Количество доз
Кохинхин голубой	129
Кохинхин черный	20
Амрокс	205
Суссекс светлый	303
Кампин	244
Полтавская глинистая	107
Минорка	241
Загорская лососевая	420
Узбекская бойцовая	316
Царскосельская	1033
Кампин	109
ЧПА	337,5
Черный австролорп	191,5
Панциревская	208
Первомайская	197
Московская бойцовая	207,5
Ушанка	224,5
Султанка	231,5
<b>ИТОГО</b>	<b>13008</b>

**Всего 39 пород и популяций**



# Сублимационная сушка репродуктивных клеток – инновационный метод сохранения генофонда ЖИВОТНЫХ



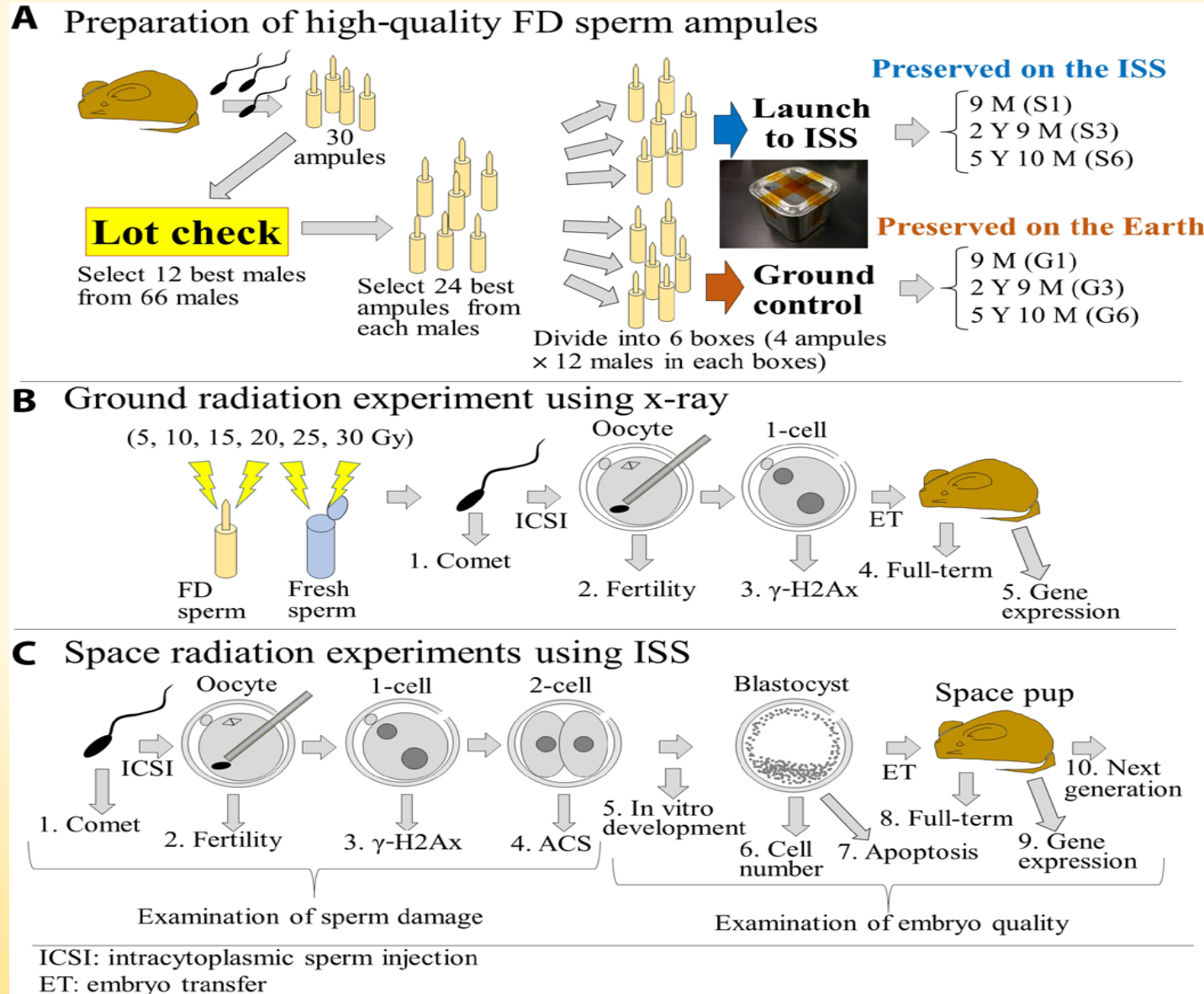
**Лиофилизация спермы**, может стать новым простым методом хранения генетических ресурсов.

На протяжении последних десятилетий были предприняты многочисленные попытки для осуществления лиофилизации семени различных видов животных, включая лабораторных, диких и домашних животных (кролики, мыши, хряки, бараны) с различной результативностью.

Однако, в экспериментах не использовались протоколы замораживания семени, применяемые для сохранения функциональной целостности сперматозоидов, а были использованы технологии, предназначенные для сохранения **лишь ДНК**.

Применение таких протоколов не позволяет получать сперматозоиды после регидратации с сохраненным кинетическим аппаратом; исследования по лиофилизации семени проводятся с целью последующего его использования с применением технологии **ICSI** (Intracytoplasmic Sperm Injection)

# Schematic diagram of the preparation of FD sperm and the type of experiments conducted.



КОСМИЧЕСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ НЕ ПОВЛИЯЛО НА ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ ИЛИ ФЕРТИЛЬНОСТЬ ПОСЛЕ КОНСЕРВАЦИИ НА МКС, И ГЕНЕТИЧЕСКИ НОРМАЛЬНЫЕ ПОТОМКИ БЫЛИ ПОЛУЧЕНЫ БЕЗ СНИЖЕНИЯ ПРОЦЕНТА УСПЕХА ПО СРАВНЕНИЮ С НАЗЕМНЫМ КОНТРОЛЕМ. РЕЗУЛЬТАТЫ НАЗЕМНЫХ РЕНТГЕНОВСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПОКАЗАЛИ, ЧТО СПЕРМАТОЗОИДЫ МОГУТ ХРАНИТЬСЯ БОЛЕЕ БОЛЕЕ 200 ЛЕТ В КОСМОСЕ.

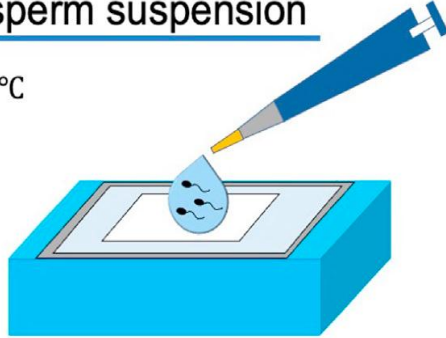
Wakayama *et al.*, *Sci. Adv.* 2021; 7 : eabg5554 11 June 2021

# Протокол сохранения лиофилизированных сперматозоидов мышей на тонких пластиковых листах



## Step1. Freezing of mouse sperm suspension

- Pre-incubation: 30 min-1 hour, 37°C
- Freezing: 10 min above LN<sub>2</sub>

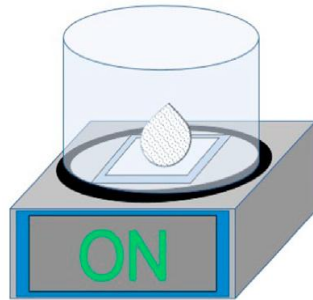


## Step2. Vacuum-drying

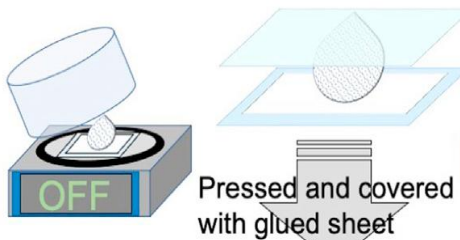


Vacuum-dryer

- Chamber: -50°C, 0.100 mbar
- Drying: 6 hours

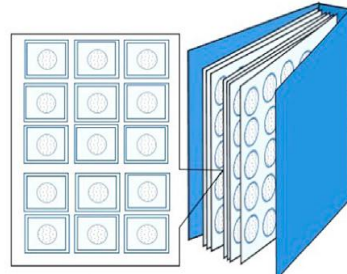


## Step3. Preservation of FD sperm as a "Sperm-book"



Pressed and covered with glued sheet

Sperm-sheet



A lot of sheets are contained in a card folder

Консервирование лиофилизированных (FD) сперматозоидов млекопитающих обычно выполняется с помощью стеклянных ампул; однако они громоздкие и хрупкие. В данном исследовании представлен протокол для подготовки и сохранения FD-спермы мыши с использованием тонких пластиковых листов. Такой подход позволяет хранить в папке тысячи штаммов мышей. Также возможно отправить FD-сперму по почте с помощью «открытки» без какого-либо дополнительного оборудования.

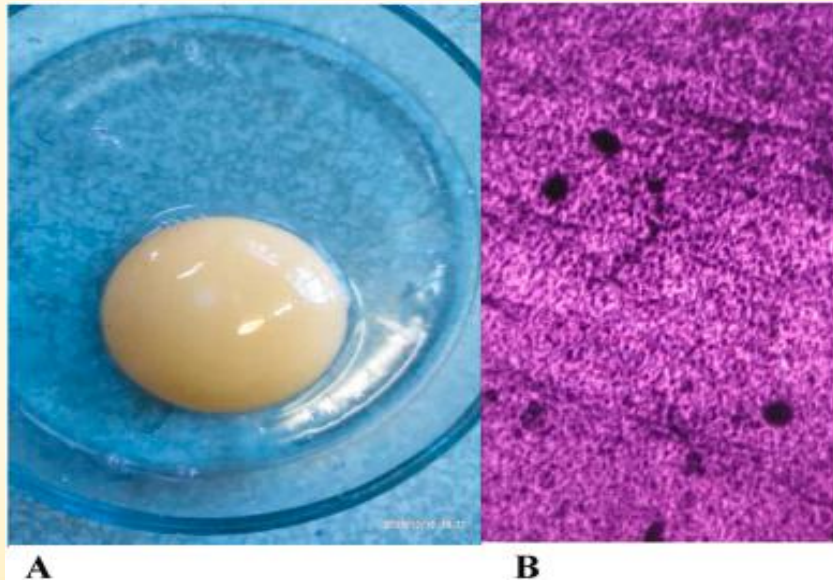


## • ЛИОФИЛИЗАЦИЯ СЕМЕНИ ПТИЦ

- В ДОСТУПНОЙ СОВРЕМЕННОЙ ЛИТЕРАТУРЕ ОТСУТСТВУЮТ ДАННЫЕ ОБ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПО ЛИОФИЛИЗАЦИИ СЕМЕНИ ПТИЦ. ВОЗМОЖНО, ЭТО СВЯЗАНО С ТЕМ, ЧТО ПРОЦЕДУРА ICSI У ПТИЦ ИЗ-ЗА ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И РАЗМЕРА ЯЙЦЕКЛЕТКИ В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИ НЕОСУЩЕСТВИМА.
- ЕДИНСТВЕННАЯ ОПУБЛИКОВАННАЯ ПОПЫТКА ЛИОФИЛИЗИРОВАТЬ СЕМЯ ПТИЦ БЫЛА ПРЕДПРИНЯТА В 1949 ГОДУ POLGE ET AL. ИССЛЕДОВАТЕЛЯМ УДАЛОСЬ СОХРАНИТЬ 50% ПОДВИЖНОСТИ У РЕГИДРАТИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ, НО ПРОЕКТ НЕ ПОЛУЧИЛ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПРОДОЛЖЕНИЯ.
- НА СЕГОДНЯШНИЙ ДЕНЬ, ОПУБЛИКОВАН ЕДИНСТВЕННЫЙ УСПЕШНЫЙ ПРОТОКОЛ СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКИ И РЕГИДРАЦИИ СЕМЕНИ ПТИЦ (*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*), РАЗРАБОТАННЫЙ ЛАБОРАТОРИИ ВНИИГРЖ. НАМ УДАЛОСЬ СОХРАНИТЬ НЕ ТОЛЬКО ПОДВИЖНОСТЬ, НО И ФЕРТИЛЬНОСТЬ СУБЛИМИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЕТУХОВ



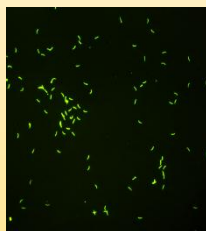
Во ВНИИГРЖ впервые в мире разработан и верифицирован протокол достижения обратимого ангидроброза - первичной лиофильной сушки семени петухов (с использованием лиофильной сушилки TFD-8501, IShinbiobase co., ltd, Корея), с дальнейшей регидратацией средой на основе несульфированного гликозаминогликана - гиалуроновой кислоты, обеспечивающий сохранность морфологической целостности сперматозоидов, в том числе кинетического аппарата, и их фертильность.



По результатам искусственного осеменения виргинных кур регидратированным семенем получены данные о взаимодействии сперматозоидов с вителлиновой мембраной желтка яиц - до 37 шт/см<sup>2</sup>, получено оплодотворенное яйцо (из 9 снесенных яиц, собранных за 1 день).

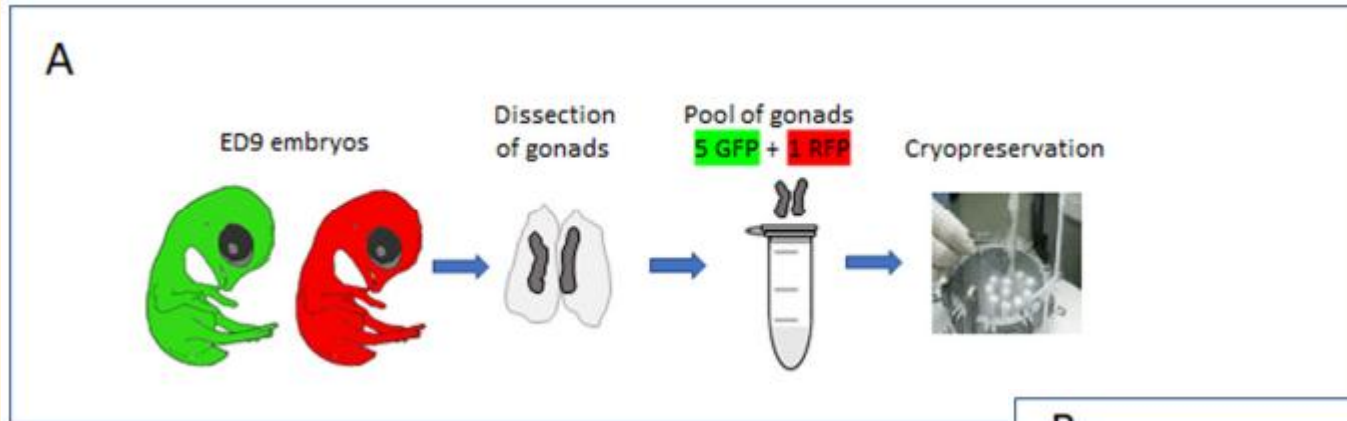
А - оплодотворенное яйцо, полученное при осеменении виргинных кур регидратированным семенем

В - точки взаимодействия регидратированных сперматозоидов с вителлиновой мембраной желтка яйца

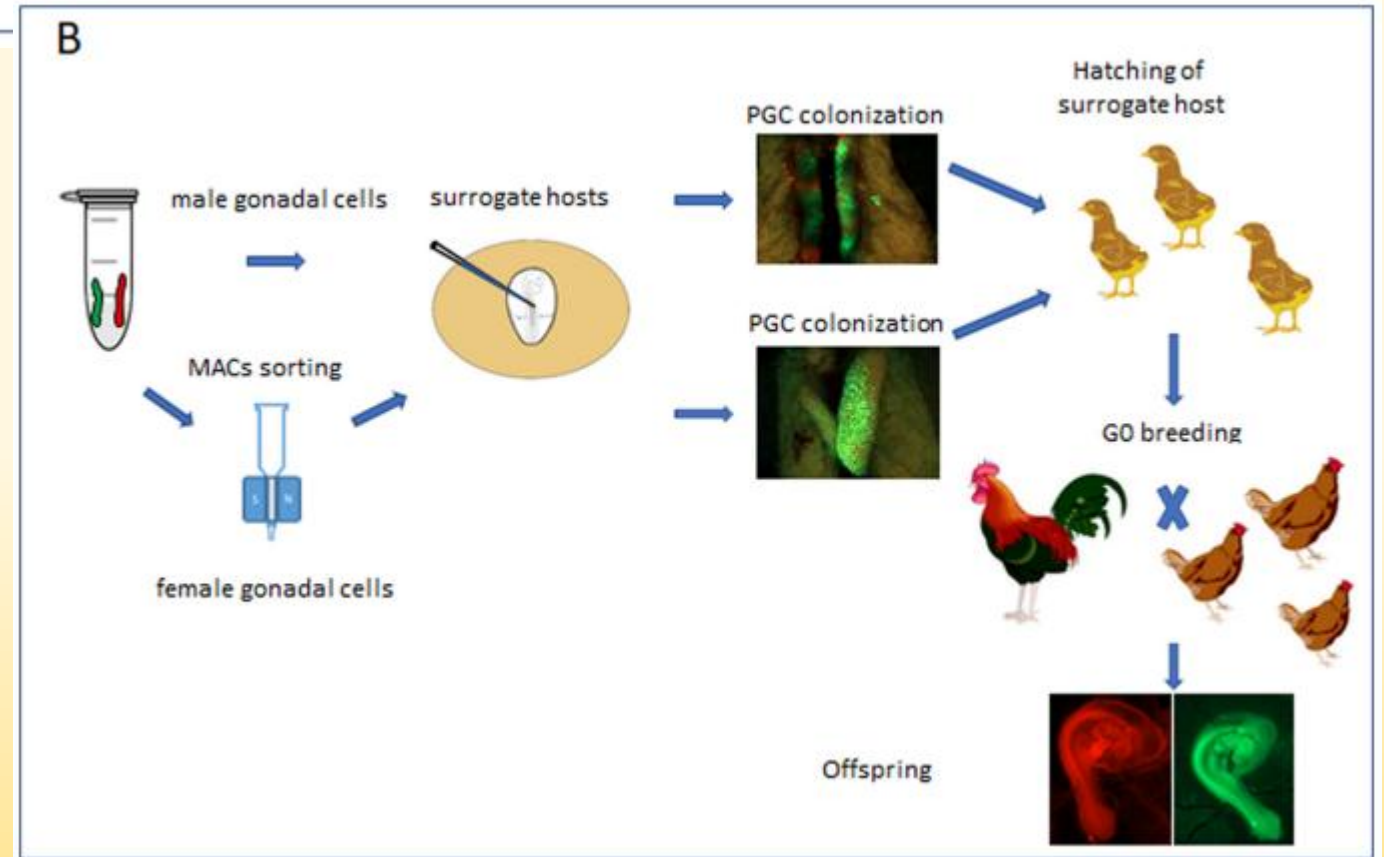


Ведутся дальнейшие исследования для совершенствования технологического процесса лиофильной сушки и разработки криопротекторных и регидрационных сред с целью повышения числа функционально полноценных сперматозоидов в образцах семени.

# МЕТОД СОХРАНЕНИЯ ЖЕНСКИХ ГАМЕТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ПТИЦ *IN VITRO*



Isolation and cryopreservation of embryonic gonads followed by transmission through sterile surrogate hosts. (A) Embryonic day (ED) 9 gonads are isolated from embryos, pooled by sex, and cryopreserved in liquid N<sub>2</sub>. (B) The frozen gonads are thawed, dissociated, and injected into sterile surrogate host embryos. The surrogate host embryos are incubated and hatched and bred to hatch donor gonadal offspring





## A successful protocol for achieving anhydrobiosis of *Gallus Gallus* Domesticus spermatozoa while maintaining their fertility *IN VIVO*

Olga Stanishevskaya<sup>a,c</sup>, Yulia Silyukova<sup>b,c,\*</sup>, Nikolay Pleshanov<sup>a,c</sup>, Anton Kurochkin<sup>a,c</sup>, Elena Fedorova<sup>b,c</sup>, Anton A. Radaev<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the LK Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, 198504, Russia  
<sup>b</sup> Chroma Care Facility, St. Petersburg University Research Park 2/5, Oranienbaum Highway, St. Petersburg, 198504, Russia  
<sup>c</sup> Department of Genetics, Breeding and Gene Pool Preservation Poultry, Moskovskoe Sh., 55a, Pushkin, Saint-Petersburg, 196601, Russia

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Freeze-drying  
Roosters  
Semen  
Fertility  
Media  
Rehydration

### ABSTRACT

Lyophilization of avian semen is a new method for gene pool preservation. The lyophilization of rooster semen with preservative was assessed by volume, motility, and concentration of spermatozoa in a medium LCM-T20 containing trehalose (9.5 mM), exogenous superoxide dismutase (1.5 U/ml), and catalase (1.5 U/ml). The supernatant was removed. Media LCM-T with trehalose (1.5 mM) was frozen in a thin layer in glass vials. Samples were lyophilized. The samples after lyophilization was 6.1 ± 0.5% (CV 20%), containing hyaluronic acid (40mg/100 ml, media). The total artificial insemination of virgin hens (n = 12) with rehydrated laid eggs. All samples of perivitelline membranes of the oviducts (7–37 pcs/cm<sup>2</sup>), which confirmed the presence of spermatozoa. To create a dry biobank for poultry, the first protocol to ensure sperm fertility *in vivo*.



## Influence of Technological Stages of Preparation of Rooster Semen for Short-Term and Long-Term Storage on Its Quality Characteristics

Yulia Silyukova<sup>a,\*</sup>, Elena Fedorova<sup>a</sup> and Olga Stanishevskaya<sup>a</sup>

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the LK Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moskovskoe Shosse, 55a, Pushkin, 196625 St. Petersburg, Russia  
<sup>\*</sup> Correspondence: [svadim33@mail.ru](mailto:svadim33@mail.ru)

**Abstract:** There is a problem of declining quality of rooster semen in the “native semen–equilibrium–long-term and long-term storage (cryopreservation)” cycle. The aim of this study was to determine the effects of various methods of preparing rooster semen on its qualitative characteristics, account the method of removing possible contaminants (centrifugation or filtration), and to determine the change in the composition of the cytosol of the spermatozoon of the native semen after equilibration of the diluted semen and during short-term storage. In this study, semen from roosters (n = 22) of the Russian White breed was used. Experiment 1: semen was divided into three groups: I—was diluted with synthetic cryoprotective medium (1:1 with LCM control), II—was diluted with synthetic cryoprotective medium (1:1 with LCM control), III—was centrifuged (at 3000 rpm for 10 min). Native semen was evaluated. Experiment 2: the composition of carbohydrates and proteins of spermatozoa of native semen was evaluated during equilibration and after storage (30 days). Results of Experiment 1 showed an advantage in the quality of filtered semen compared to centrifuged semen: progressive motility (41.0% vs. 27.0%) and chromatin integrity (56.6% vs. 33.6%). In Experiment 2, the number of spermatozoa in frozen/thawed samples of filtered semen compared to centrifuged semen were 25.5% vs. 5.5%, respectively, and in terms of chromatin integrity—83.5% vs. 25.5%. The results of Experiment 2 showed the main component in the composition of the cytosol of the spermatozoon of native semen.



Article

## Effects of Trehalose Supplementation on Lipid Composition of Rooster Spermatozoa Membranes in a Freeze/Thaw Protocol

Olga I. Stanishevskaya<sup>1</sup>, Yulia Silyukova<sup>1,\*</sup>, Elena Fedorova<sup>1</sup>, Nikolai Pleshanov<sup>1</sup>, Anton Kurochkin<sup>1</sup>, Vera M. Tereshina<sup>2</sup> and Elena Ianutsevich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the LK Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moskovskoe Shosse, 55a, Pushkin, 196625 St. Petersburg, Russia  
<sup>2</sup> Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia  
<sup>\*</sup> Correspondence: [svadim33@mail.ru](mailto:svadim33@mail.ru)

**Simple Summary:** Sperm cryopreservation is an important part of maintaining the genetic diversity of chicken breeds. However, a significant percentage of spermatozoa lose their viability and motility when frozen/thawed. Cell membranes are the most vulnerable in this process; and their cryoresistance largely depends on their lipid composition. Based on the study of the lipid composition of the plasma membranes of the spermatozoa of roosters of two breeds; a cryoprotective diluent was developed containing biocryoprotective trehalose with a concentration of 9.5 mM; which allows the optimal ratio of cell lipids and the kinetic ability of frozen/thawed spermatozoa (motility) to be maintained at a high level—52.4%.

**Abstract:** The plasma membrane of spermatozoa plays an important role in the formation and maintenance of many functions of spermatozoa, including during cryopreservation. As a result of chromatographic analysis, the content of lipids and fatty acids in the membranes of spermatozoa of roosters of two breeds was determined under the influence of cryoprotective media containing trehalose LCM-control (0 mM), Treh20 (9.5 mM), and Treh30 (13.4 mM). The use of the cryoprotective diluent Treh20 made it possible to maintain a dynamic balance between the synthesis and degradation



Citation: Stanishevskaya, O.I.



P11

## Modification of cock's sperm fertility evaluation method *in vitro*

Anton Kurochkin<sup>a</sup>, Nikolay Pleshanov<sup>a</sup>, Yulia Silyukova<sup>a</sup>, Olga Stanishevskaya<sup>a</sup>, Elena Fedorova<sup>a</sup>, Oksana Perinek<sup>a</sup>, Elena Fedorova<sup>a</sup>, Zoya Fedorova<sup>a</sup>, Inessa Meftah<sup>a</sup>

Send article to platform  
tendeley Share Cite

[/10.1016/j.anireprosci.2020.106371](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106371)

[Get rights and content](#)



Article

## Role of Mono- and Disaccharide Combination in Cryoprotective Medium for Rooster Semen to Ensure Cryoresistance of Spermatozoa

Olga Stanishevskaya, Yulia Silyukova<sup>\*</sup>, Nikolai Pleshanov and Anton Kurochkin

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the LK Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, Moskovskoe Shosse, 55a, 196625 St. Petersburg, Russia; [olgastan@list.ru](mailto:olgastan@list.ru) (O.S.); [Klaus-90@list.ru](mailto:Klaus-90@list.ru) (N.P.); [kurochkin.anton.66@gmail.com](mailto:kurochkin.anton.66@gmail.com) (A.K.)  
<sup>\*</sup> Correspondence: [svadim33@mail.ru](mailto:svadim33@mail.ru)

**Abstract:** The combination of saccharides in the composition of a cryopreservation medium may represent a promising method for the preservation of the reproductive cells of male birds. In the current study, cryoprotective media with a combined composition of mono- and di-saccharides were developed. The degree of penetration of reducing saccharide molecules (maltose—Mal20 medium) and non-reducing disaccharide molecules (trehalose—Treh20 medium) from the cryoprotective medium into the cytosol of rooster spermatozoa was studied. LCM control media without disaccharides were used as the control. The number of maltose molecules penetrating from the outside into the cytosol of the spermatozoon was 1.06 × 10<sup>4</sup>, and the number of trehalose molecules was 3.98 × 10<sup>4</sup>. Using a combination of maltose and fructose, the progressive motility of frozen/thawed semen and the fertility rates of eggs were significantly higher (p < 0.05) 40.2% and 68.5%, respectively) than when using a combination of trehalose and fructose in a cryoprotective diluent (33.4% and 62.4%, respectively). A higher rate of chromatin integrity at the level of 92.4% was obtained when using Treh20 versus 74.5% Mal20 (p < 0.05). Maltose positively affected the preservation of frozen/thawed sperm in the genital tract of hens. On the seventh day from the last insemination when using Mal20, the fertilization of eggs was 42.6% and only 27.3% when using Treh20. Despite the same molecular weight, maltose and trehalose have different physicochemical and biological properties that determine their function and effectiveness as components of cryoprotective media.



Citation: Stanishevskaya, O.; Silyukova, Y.; Pleshanov, N.; Kurochkin, A. Role of Mono- and Disaccharide Combination in Cryoprotective Medium for Rooster Semen to Ensure Cryoresistance of Spermatozoa. *Molecules* 2021, 26, 5920; <https://doi.org/10.3390/m26055920>







# Коллектив лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц



Благодарю за внимание!

ГЗ № 121052600357-8 (0445-2021-0012)