

<https://doi.org/10.31043/2410-2733-2021-2-51-56>  
УДК 636.5.082

Л. В. Козикова, Е. А. Полтева, А. А. Курочкин, Н. В. Плешанов

## **Криоконсервация семени исходных форм и химер птиц двух пород: суссекс светлый и полтавская глинистая**

### **Аннотация.**

**Цель:** оценка качества семени химер и исходных форм до и после криоконсервации.

**Материалы и методы.** Для исследований были выбраны породы кур суссекс и полтавская глинистая. С использованием этих пород получены химеры методом трансплантации бластодермальных клеток. Оценку качества спермы петухов проводили под микроскопом при температуре 42°C. В разное время трехкратно определяли активность нативной спермы и ее концентрацию. Криоконсервацию проводили в мелких гранулах. Размораживание гранул производили на нагретой металлической пластине при температуре 60°C.

**Результаты.** Сравнительный анализ объема эякулята показал, что у химер в среднем он был несколько больше, чем у исходных форм. Активность спермиев у нативных половых клеток была достаточно высока у всех исследованных образцов и составляла 80% и более. Концентрация спермиев сохраняла ту же тенденцию и практически не отличалась друг от друга у всех исследованных образцов. Активность заморожено-оттаянного семени исходных пород и их химер значительно отличалась. Максимальная ее активность наблюдалась у породы суссекс, и достоверно ниже ( $P \leq 0,01$ ) она у остальных экспериментальных групп. Активность заморожено-оттаянного семени оказалась равной у химерных организмов и полтавской глинистой, хотя у химер реципиенты были суссексы. Следует отметить, что размах колебаний по степени активности заморожено-оттаянного семени у химерных птиц был значительным (от 10 до 40 баллов), а число наблюдений небольшое.

**Заключение.** В исследовании проведена оценка качества семени химер и исходных форм до и после криоконсервации. Продемонстрировано, что после размораживания активность заморожено-оттаянного семени исходных пород и их химер отличалась.

**Ключевые слова:** криобанк, породы кур, криопротекторы, химеры, криоконсервация, азот, сперма, диметилацетомид.

### **Авторы:**

Козикова Лариса Васильевна — доктор биологических наук; e-mail: larkozik@list.ru;

Полтева Екатерина Андреевна — младший научный сотрудник; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru;

Курочкин Антон Алексеевич — младший научный сотрудник; e-mail: kurochkin.anton.66@gmail.com;

Плешанов Николай Вячеславович — научный сотрудник; e-mail: Klaus-90@list.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196625, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, 55 а.

**Введение.** В настоящее время как в нашей стране, так и во всем мире наблюдается резкое снижение количества пород кур, что связано с интенсивной селекцией и созданием высокопродуктивных коммерческих пород и кроссов [1]. Возможными путями решения этой проблемы может быть создание химерных организмов и криобанков семени в разных регионах страны. Во многих странах мира созданы хранилища генетического

материала, в которых главным методом является криоконсервация — процесс сохранения клеток и тканей со всеми органеллами путем охлаждения до очень низкой температуры [2, 3, 4, 5].

В нашем институте (ВНИИГРЖ) в конце двадцатого века были начаты исследования по криоконсервации спермы петухов в гранулах [6]. В последние годы достижения клеточной и генной инженерии позволили создавать химерных и трансгенных

птиц при участии ранних эмбриональных клеток — предшественников соматических и половых клеток [7]. Получение химерных организмов востребовано, т.к. они могут служить резервом для сохранения редких и исчезающих видов и пород птиц. Возникает необходимость в ускорении создания криобанков половых клеток и их предшественников у уникальных организмов с анализом качества замороженного семени.

**Цель исследований** — оценка качества семени химер и исходных форм до и после криоконсервации.

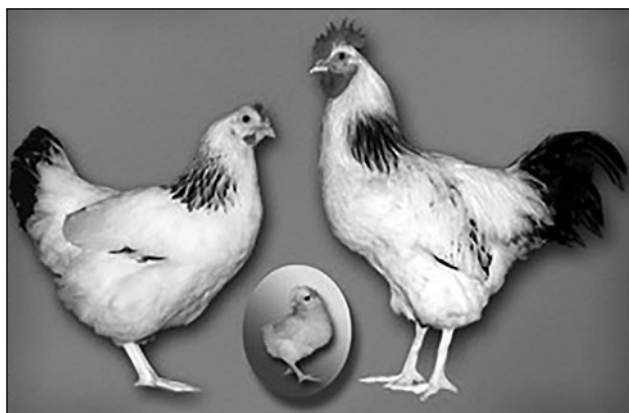
**Материалы и методы.** Химеры двух пород суссекс светлый и полтавская глинистая получены методом трансплантации бластодермальных клеток от яиц-доноров в эмбрионы реципиентов с дальнейшей инкубацией. Петухи индивидуально размещены по клеткам, их кормили дважды в день со свободным доступом к воде. Работа с семенем проводилась по модифицированному методу, предложенному Целютиным с соавт. [8]. Взятие спермы петухов происходило методом абдоминального массажа, после чего проводили оценку ее активности под микроскопом при температуре 42°C. Сперму оценивали в 100 баллов, когда 100% спермиев имели поступательные движения. Замораживание семени проводили в мелких гранулах путем накапывания спермы петухов в жидкий азот. Образцы спермы разбавляли синтетической средой LKS (авторское свидетельство № 1130339), в соотношении 1:1. Далее проводили эквilibрацию при изменении температуры от 18°C до 5°C в течение 40 минут. После охлаждения диметилацетамид был добавлен к каждому образцу в конечной концентрации 6%. Следующим этапом образцы проходили инкубацию при 5°C в течение одной минуты. В области размещения пипетки

температура колебалась от -15°C до -20°C. Средняя скорость раскапывания составляла ~1,4 гранулы в секунду. Гранулы размораживали на нагретой металлической пластине при температуре 60°C (разработка ВНИИГРЖ, 1989). Эта методика позволяет обходиться без дорогостоящего оборудования. Концентрацию спермиев подсчитывали в 1 см<sup>3</sup> разбавленной спермы с помощью прибора Accuread Photometer, IMV Technologies, (UK). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета анализа в Excel 2013.

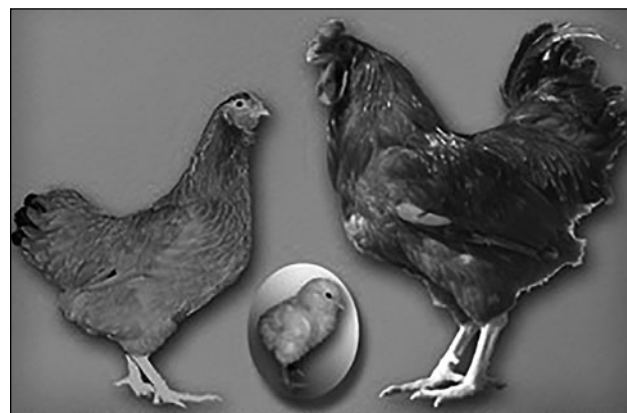
**Результаты и их обсуждение.** Породы суссекс светлый и полтавская глинистая выбраны из коллекции ВНИИГРЖ (Санкт-Петербург, Пушкин), содержащей около 40 редких и исчезающих пород кур.

**Краткая характеристика исходных форм.** Порода суссекс выведена в Англии путем скрещивания местных кур с породами доркинг, корниш, кохинхин, орпингтон, светлая брама и относится к курам мясояичного направления продуктивности. Птица массивная, выносливая и быстро растущая, гребень листовидный, средних размеров. Окраска оперения — серебристо-колумбийская на белом фоне черный цвет сохраняется только на гриве, крыльях и хвосте (рис. 1). Порода имеет прекрасные вкусовые качества мяса и высокое содержание белка в мясе.

Полтавская глинистая порода выведена в лесостепной зоне на Украине путем скрещивания аборигенных кур с палевыми орпингтонами и относится к курам мясояичного направления продуктивности, имеет средние размеры тела с палевой окраской оперения и с черными кончиками маховых и рулевых перьев, гребень розовидный (рис. 2). Птица выносливая, имеет ген, обуславливающий коричнево — желтую окраску оперения.



**Рис. 1.** Курица и петух породы суссекс светлый. Фото из альбома пород и популяций кур, сохраняемых и разводимых во ВНИИГРЖ, г. Санкт-Петербург, Пушкин 2009 г. Фотографии Г. Н. Гераськиной



**Рис. 2.** Курица и петух породы полтавская глинистая. Фото из альбома пород и популяций кур, сохраняемых и разводимых во ВНИИГРЖ, г. Санкт-Петербург, Пушкин 2009 г. Фотографии Г. Н. Гераськиной

**Фенотипическая характеристика химер.** Для создания химер выбраны породы с контрастным оперением, поэтому химеризм определяли по наличию контрастных перьев, несвойственных данной породе. Химеры были получены нами после трансплантации бластодермальных клеток полтавской глинистой эмбриону-реципиенту суссекса светлого. На спине и крыльях видны палевые перья от донора — полтавская глинистая.

**Получение спермы и оценка ее качества.** Активность спермы и ее концентрация у пород суссекс светлый, полтавская глинистая и химер представлены в таблицах 1–3.

Сравнительный анализ объема эякулята показал, что у химер в среднем он был несколько больше, чем у исходных форм. Активность спермиев у нативных половых клеток была достаточно высока у всех исследованных образцов и составляла 80% и более. Концентрация спермиев сохраняла ту же тенденцию и практически не отличалась друг от друга у всех исследованных образцов.

**Криоконсервация спермы.** В России криоконсервация спермы, как правило, применяется для сохранения локальных или редких пород птиц, и практически не встречаются такие исследования у химерных и трансгенных организмов. Известно, что сперма в процессе замораживания подвергается

повреждающим факторам, особенно в период фазового перехода от жидкого состояния к кристаллическому. В процессе разбавления и охлаждения до 20°C прежде всего нарушается проницаемость мембран, а при дальнейшем снижении температуры до 5°C у спермиев изменяется ионное равновесие [9]. В нашей работе сперму разбавляли в соотношении 1:1 синтетической средой LKS, а не в соотношении 1:3, как в других работах [8]. Гранулы размораживали на нагретой металлической пластине при температуре 60°C. Результаты анализа качества заморожено-оттаянного семени представлены в таблице 4.

Активность заморожено-оттаянного семени исходных пород и их химер значительно отличалась. Максимальная ее активность наблюдалась у породы суссекс, и достоверно ниже ( $P \leq 0,01$ ) она у остальных экспериментальных групп. Активность заморожено-оттаянного семени оказалась равной у химерных организмов и полтавской глинистой, хотя у химер реципиенты были суссексы. Следует отметить, что размах колебаний по степени активности заморожено-оттаянного семени у химерных птиц был значительным (от 10 до 40 баллов), а число наблюдений небольшое.

Понятно, что оттаивание спермы является важнейшим этапом для восстановления ее биологи-

*Таблица 1. Качество спермы у петухов полтавской глинистой*

| № п/п   | Дни взятия образцов семени | Объем (мл) | Активность нативной спермы, балл. | Концентрация (млрд) |
|---------|----------------------------|------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1       | 04.12.20                   | 0,47±0,19  | 77,50±5,95                        | 2,51±0,63           |
| 2       | 07.12.20                   | 0,65±0,23  | 81,25±3,75                        | 3,09±0,60           |
| 3       | 15.12.20                   | 0,40±0,16  | 83,75±1,25                        | 3,67±0,17           |
| Среднее | —                          | 0,508±0,07 | 80,83±181                         | 3,09±0,33           |

*Таблица 2. Качество спермы у петухов породы суссекс светлый*

| № п/п   | Дни взятия образцов семени | Объем (мл) | Активность нативной спермы, балл. | Концентрация (млрд) |
|---------|----------------------------|------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1       | 04.12.20                   | 0,58±0,07  | 85±0                              | 2,44±0,23           |
| 2       | 07.12.20                   | 0,5,2±0,11 | 85±0                              | 4,25±0,23           |
| 3       | 15.12.20                   | 0,66±0,09  | 85±0                              | 3,79±0,19           |
| Среднее | —                          | 0,59±0,04  | 85±0                              | 3,49±0,54           |

*Таблица 3. Качество спермы у химерных петухов*

| № п/п   | Дни взятия образцов семени | Объем (мл) | Активность нативной спермы, балл. | Концентрация (млрд) |
|---------|----------------------------|------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1       | 04.12.20                   | 0,75±0,15  | 82,5±2,50                         | 3,32±0,045          |
| 2       | 07.12.20                   | 0,90±0,10  | 82,5±2,50                         | 2,72±0,16           |
| 3       | 15.12.20                   | 0,75±0,15  | 85±0                              | 4,57±0,18           |
| Среднее | —                          | 0,80±0,02  | 83,33±1,18                        | 3,54±0,06           |

ческих свойств, хотя эта технология недостаточно разработана и изучена. Более того, разные авторы используют различную температуру водяной бани от 0 и 5°C и до 40°C [10–12]. Становится понятным, что химерные птицы, несущие в своем организме клетки кур от другой породы, становятся чувствительными к таким процедурам как криоконсервация спермы и оттаивание. Таким образом, криоконсервация позволяет продлить срок жизни сперматозоидов разных пород и популяций птиц на продолжительный период, сохраняя свои основные качества.

**Закключение.** Одним из путей сохранения исчезающих, редких и уникальных пород птиц может служить создание криобанков половых клеток, их предшественников, а также создание химерных организмов. Применение этих методов позволяет неограниченно долго сохранять генетический материал. Ранее нами были получены химеры птиц методом трансплантации эмбриональных клеток-доноров от породы полтавская глинистая в ранние эмбрионы — реципиенты породы суссекс светлый. В данной работе проведена оценка качества семени химер и исходных форм до и после криоконсервации.

**Таблица 4. Активность заморожено-оттаянного семени пород полтавская глинистая, суссекс светлый и их химер**

| Дата анализа | Название породы      | Активность заморожено-оттаянного семени в процентах |
|--------------|----------------------|-----------------------------------------------------|
| 12.01.21     | Полтавская глинистая | 23,75±7,18                                          |
| 19.01.21     |                      | 20,00±8,42                                          |
| 26.01.21     |                      | 33,75±4,27                                          |
| Среднее      |                      | 25,83±4,10                                          |
| 12.01.21     | Суссекс светлый      | 40,00±3,53                                          |
| 19.01.21     |                      | 41,00±2,45                                          |
| 26.01.21     |                      | 47,00±5,14                                          |
| Среднее      |                      | 42,67±2,19                                          |
| 12.01.21     | Химеры               | 10,00±5,83                                          |
| 19.01.21     |                      | 27,5±7,5                                            |
| 26.01.21     |                      | 40,00±0                                             |
| Среднее      |                      | 25,83±4,25                                          |

*Исследования были проведены в рамках выполнения Государственного задания № 0445-2021-0010.*

## 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. — 2012. — № 8.
2. Tae H. J. Cryopreservation and its clinical applications / H. J. Tae, C. P. Sung, H. Y. Ji, Y. K. Jung, H. S. Jae, S. P. Ui, W. C. Chang, R. L. Sung, H. Jin // Integr. Med. Res. — 2017. — V. 6(1). — P. 12–18.
3. Woelders H. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective / H. Woelders, C. A. Zuidberg, S. J. Hiemstra // Poultry Sci. — 2006. — V. 85. — P. 216–222.
4. 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 // Poultry Sci. — 2009. — V. 88. — P. 2184–2191.
5. 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, Lopez-Sebastian, M. T. Prieto, J. L. Campo // Poultry Sci. — 2011. — V. 90. — № 9. — P. 2047–2053.
6. Нарубина Л. Е. Способ криоконсервации спермы петухов в виде гранул / Л. Е. Нарубина, А. Д. Курбатов, Г. Б. Бубляева, К. В. Целютин // Авторское свидетельство СССР №1343587, 1987.
7. Козикова Л. В. Химеры птиц: методы получения и перспективы их использования / Л. В. Козикова // Птицеводство. — 2019. — Т. 10. — № 9. — С. 9–13.
8. Целютин К. В. Криоконсервация спермы птиц — как инструмент сохранения генофонда / К. В. Целютин, Б. К. Тур // Генетика и разведение животных. — 2009. — № 1. — С. 50–52.

9. Наук В. А. Усовершенствованный метод длительного сохранения семени быков производителей в глуккозамороженном состоянии / В. А. Наук // Совершенствование методов воспроизводства сельскохозяйственных животных. — Кишинев, 1979. — С. 3–37.
10. Fujihara N. Simple and rapid cryopreservation of rooster spermatozoa / N. Fujihara, S. Ohboshi // Low Temperature Medicine. — 1991. — V. 17. — P. 12.
11. Van Voorst A. Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen / A. Van Voorst, F. R. Leenstra // Poultry Sci. — 1995. — V. 74. — P. 136–140.
12. Wishart G. J. Quantitation of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa / G. J. Wishart // Br. Poultry Sci. — 1985. — V. 26. — P. 375–380.

Kozikova L., Polteva E., Kurochkin A., Pleshanov N.

## **Cryopreservation of semen of initial forms and chimeras of birds of two breeds: Sussex light and Poltava clay**

### **Abstract.**

**Purpose:** evaluation of the quality of seed chimer and source forms before and after cryopreservation.

**Materials and methods.** For research, the breed of Sussex chickens and Poltava clay. Using these rocks, chimeras were obtained by the method of transplantation of blastodermal cells. An assessment of the quality of sperm of the roosters was carried out under a microscope at a temperature of 42 degrees. At various times, the activity of native sperm and its concentration was determined. Cryoconservation was carried out in small granules. The defrosting of the granules was produced on a heated metal plate at a temperature of 60°C.

**Results.** A comparative analysis of the volume of the ejaculate showed that Himer on average it was somewhat larger than that of the initial forms. The activity of sperms in native genital cells was sufficiently high in all studied samples, and was 80% or more. The concentration of sperm retained the same trend and practically did not differ from each other in all studied samples. The activity of frozen-fatty seed of the initial breeds and their chimera was significantly different. The maximum activity was observed in the Sussex breed and reliably below ( $p \leq 0.01$ ) it has the remaining experimental groups. The activity of frozen-fatty seed turned out to be equal in chimeric organisms and Poltava clay, although Himer recipients were sussexes. It should be noted that the swing of oscillations according to the degree of activity of frozen-fatty seed in chimeric birds was significant (from 10 to 40 points), and the number of observations is small.

**Conclusion.** The study assess the quality of seed chimer and the source forms before and after cryopreservation. It was demonstrated that after defrosting the activity of frozen-fatty seed of the initial rocks and their chimera was different.

**Key words:** cryobank, chicken breeds, cryoprotectants, chimeras, cryopreservation, nitrogen, sperm, dimethylacetamide.

### *Authors:*

**Kozikova L.** — Dr. Habil. (Bio. Sci); e-mail: larkozik@list.ru;

**Polteva E. A.** — junior Researcher; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru;

**Kurochkin A. A.** — junior Researcher; e-mail: kurochkin.anton.66@gmail.com;

**Pleshanov N. V.** — researcher; e-mail: Klaus-90@list.ru.

Russian research institute of farm animal genetics and breeding — branch of the L. K. Ernst Federal science center for animal husbandry; Russia, St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601.

## References

1. Fisinin V. I. Cryopreservation of male germ cells as a method of preserving the genetic resources of agricultural poultry / V. I. Fisinin, V. A. Bagirov, N. A. Volkova, N. A. Zinovieva, J. S. Roiter // *Achievements of science and agro-industrial complex technology*. — 2012. — V. 8.
2. Tae H. J. Cryopreservation and its clinical applications / H. J. Tae, C. P. Sung, H. Y. Ji, Y. K. Jung, H. S. Jae, S. P. Ui, W. C. Chang, R. L. Sung, H. Jin // *Integr. Med. Res.* — 2017. — V. 6(1). — P. 12–18.
3. Woelders H. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective / H. Woelders, C. A. Zuidberg, S. J. Hiemstra // *Poultry Sci.* — 2006. — V. 85. — P. 216–222.
4. 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 // *Poultry Sci.* — 2009. — V. 88. — P. 2184–2191.
5. 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, Lopez-Sebastian, M. T. Prieto, J. L. Campo // *Poultry Sci.* — 2011. — V. 90. — № 9. — P. 2047–2053.
6. Narubina L.E. Method of cryopreservation of cock semen in the form of granules / L. E. Narubina, A. D. Kurbatov, G. B. Bublyaeva, K. V. Tselyutin // USSR author's certificate No. 1343587, 1987.
7. Kozikova L.V. Chimeras of birds: methods of obtaining and prospects for their use. / L. V. Kozikova // *Poultry*. — 2019. — Vol. 10. — № 9. — P. 9–13.
8. Tselyutin K. V. Cryopreservation of bird sperm as a tool for preserving the gene pool / K. V. Tselyutin, B. K. Tur // *Genetics and breeding of animals*. — 2009. — V. 1. — P. 50–52.
9. Nauk V. A. An improved method of long-term preservation of the semen of bulls of producers in deep frozen state / V. A. Nauk // *Improvement of methods of reproduction of farm animals*. — Chisinau, 1979. — P. 3–37.
10. Fujihara N. Simple and rapid cryopreservation of rooster spermatozoa / N. Fujihara, S. Ohboshi // *Low Temperature Medicine*. — 1991. — V. 17. — P. 12.
11. Van Voorst A. Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen / A. Van Voorst, F. R. Leenstra // *Poultry Sci.* — 1995. — V. 74. — P. 136–140.
12. Wishart G. J. Quantitation of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa / G. J. Wishart // *Br. Poultry Sci.* — 1985. — V. 26. — P. 375–380.