

УДК 636.52/58:57.089.36

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЗАРОДЫШЕВЫХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ В РАМКАХ СОЗДАНИЯ КРИБАНКОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**Н.Ю. Герман, Б.С. Иолчиев, Н.А. Волкова***ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, Московская область, Россия*

Создание криобанков биологического материала сельскохозяйственной птицы является одной из приоритетных задач современных агропромышленных технологий, направленных на сохранение, поддержание и восстановление генофонда ценных пород и линий. Благодаря определенным продуктивным и адаптационным качествам многие породы занимают прочные позиции. Однако в последние годы в мировой практике отмечается тенденция к снижению общего количества пород. Криоконсервация генетических ресурсов позволяет сохранить ценные генотипы. Основным генетическим материалом, используемым в программах по сохранению генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы, является сперма самцов, что связано с широким распространением метода искусственного осеменения в птицеводстве. Половые клетки самцов (спермии) могут быть использованы не только для поддержания сохраняемых популяций птицы, но и для воссоздания пород и линий путем поглотительного скрещивания. Однако в полученном потомстве определенный процент генов будет сохраняться от материнской родоначальной популяции, в связи с чем для восстановления генома породы необходимо получение более пяти генераций потомков. К настоящему времени накоплен значительный материал, касающийся различных аспектов криоконсервации спермы сельскохозяйственной птицы. Современные методы криоконсервации спермы обеспечивают в целом удовлетворительное получение потомства, однако существует проблема, связанная с низким выходом полноценных клеток: после цикла замораживание–оттаивание удается сохранить не более 50 % функционально полноценных спермиев. Применяемые в настоящее время защитные среды позволяют сохранять сперму птиц *in vitro* при положительных температурах и в глубокозамороженном состоянии без утраты основной функции сперматозоидов – оплодотворяющей способности. Однако поиск эффективных криозащитных сред продолжается, так как до сих пор не удается успешно криоконсервировать сперму некоторых видов птиц. Актуальным также является и разработка эффективных методов получения семени.

Нами были отработаны и оптимизированы методические приемы по получению семени от самцов разных видов сельскохозяйственной птицы. При использовании базового метода (массаж по Барроусу и Квинну) объем полученного эякулята семени варьировал у разных видов птицы в зависимости от индивидуальных особенностей и составил в среднем у петухов – $1,2 \pm 0,05$ мл, у селезней – $1,1 \pm 0,05$ мл, у гусakov и индюков – 1,5 мл.

Модификация данного подхода по получению спермы посредством использования специального станка для фиксации птицы позволила оптимизировать данный процесс за счет возможности проведения необходимых манипуляций одним оператором и снижения стрессовых ситуаций для самцов. Особенно актуальным это является для крупной птицы – гусakov, селезней и индюков. Модифицированный метод позволил упростить процедуру взятия семени. При этом не было установлено снижения качества получаемого семени. Наоборот, у большинства самцов отмечалось незначительное увеличение объема получаемого эякулята семени по сравнению с использованием базового метода на 15–38 %, что позволяет рекомендовать использование модифицированного метода для получения спермы наряду с базовым.

Использование высасывающей трубки со спермопремником, заполненным разбавителем (380С), для сбора спермы у крупной птицы – гусakov и индюков позволило значительно улучшить качество получаемого семени: подвижность спермиев в полученном эякуляте возросла на 5–8 %.

Установлено влияние на качество нативного семени самцов птиц ряда биотических и абиотических факторов. Однофакторный дисперсионный анализ показал зависимость объема получаемого семени от индивидуальных особенностей самцов на уровне 33 % ($P < 0,05$) для петухов, 30 % – для гусakov и 31 % – для индюков. На основании дисперсионного анализа также была установлена зависимость ряда показателей качества семени от индивидуальных особенностей самцов. Коэффициент вариации по содержанию подвижных сперматозоидов в эякуляте петухов, гусakov, селезней и индюков составил соответственно 25, 25, 18 и 23 %.

По показателям процента живых сперматозоидов и частоте встречаемости аномальных спермиев данный показатель достигал соответственно 10, 15, 17, 19 % и 18, 12, 17, 21 %. Нарушения морфологии сперматозоидов отмечались в разных сегментах – головке, шейке, жгутике. В исследованных образцах семени самцов независимо от вида птицы наибольший процент нарушений в морфологии спермиев был установлен в области жгутака.

Цикл замораживание-оттаивание отрицательно влиял не только на активность, но и на долю живых сперматозоидов. У петухов этот показатель снизился с 89,2 до 47,6 %, у гусаков – с 76,5 до 38,2 %, у индюков – с 87,2 до 48,5 %. В результате замораживания-оттаивания увеличивалась доля сперматозоидов с аномальной морфологией. Наблюдалось изменение в частоте встречаемости аномалий в отдельных сегментах, увеличилось количество сперматозоидов с патологией жгутака.

В качестве альтернативных подходов рассматривается использование в качестве генетического материала для криоконсервации предшественников половых клеток – примордиальных зародышевых клеток, присутствующих в эмбрионах птиц на ранних стадиях их развития. Использование данного типа клеток в программах по сохранению генетических ресурсов предполагает получение химерных особей по линии как мужских, так и женских половых клеток. При этом зародышевые клетки, полученные от генетических самцов, при их трансплантации в эмбрионы, развивающиеся по пути развития женской особи, могут дифференцироваться в полноценные женские половые клетки – яйцеклетки и, наоборот, донорские зародышевые клетки генетических самок в эмбрионах–реципиентах мужского пола могут развиваться до функционально нормальных сперматозоидов. Благодаря этому свойству примордиальных зародышевых клеток отпадает необходимость идентификации пола у отдельных особей как на этапе сбора генетического материала, так и на этапе воссоздания породы при введении донорских клеток.

В отличие от млекопитающих у птиц эмбрионы ввиду их развития вне материнского организма являются доступным материалом для проведения различных манипуляций с ними. Эта особенность птиц открывает широкие возможности для получения соматических химер различных типов. Данный подход также может быть использован в программах по воссозданию пород.

Нами были оптимизированы методические подходы по получению и криоконсервации примордиальных зародышевых клеток разных видов сельскохозяйственной птицы, в частности, уток, гусей и индеек. На основании гистологических исследований развития гонад эмбрионов данных видов птиц было установлено, что оптимальным возрастным периодом для получения культуры примордиальных зародышевых клеток является возраст эмбрионов от 6 до 7 дней. Культура эмбриональных клеток, полученная из ранних эмбрионов, состоит из разных типов клеток. Разделение эмбриональных клеток разных типов с учетом их различной способности к адгезии позволило получить культуру примордиальных зародышевых клеток, максимально очищенную от других типов клеток. Был оптимизирован состав криозащитной среды для криоконсервации зародышевых клеток. Высокая жизнеспособность данного типа клеток после криоконсервации отмечалась при использовании криозащитной среды, включающей 75 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 15 % среды ДМЕМ и 10 % криопротектора ДМСО.

Таким образом, возможность криоконсервации зародышевых и половых клеток птицы в условиях криобанков открывают широкие возможности для использования данных типов клеток в птицеводстве в программах по сохранению ценных пород и линий.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФ, проект № 16–16–04104.