

Современное состояние проблемы сохранения биоразнообразия сельскохозяйственных птиц с использованием гермоплазмы самок

Ольга Игоревна Станишевская, Юлия Леонидовна Силюкова

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных (ВНИИГРЖ) – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»

Аннотация: Обзор посвящен проблеме сохранения генофонда сельскохозяйственных птиц – поиску путей долговременного сохранения наследственного материала самок, включая митохондриальную ДНК. Приводятся результаты современных исследований по разработке методов получения, долговременного хранения *in vitro* и использования гермоплазмы самок сельскохозяйственных птиц с целью поддержания биоразнообразия. Рассматриваются методы орто-трансплантации тканей нативных и заморожено/оттаянных донорских женских гонад неонатальных цыплят; методы получения и криоконсервации первичных зародышевых клеток (PGCs) и гонадных зародышевых клеток (GGCs) для последующей реимплантации эмбрионам-реципиентам и получения потомства; метод использования соматических клеток (фибробластов) эмбрионов (CEFs) с последующим перепрограммированием для получения индуцированных первичных зародышевых клеток (iPGCs) и их использования для получения потомства. Сделано заключение о необходимости совершенствования рассмотренных методов с целью разработки практически-применимых технологий долговременного хранения в криобанках женских гамет птиц и их использования для поддержания биоразнообразия.

Ключевые слова: птицеводство, сохранение генофонда, криоконсервация, женские гонады, первичные половые клетки (PGCs).

Для цитирования: Станишевская, О.И. Современное состояние проблемы сохранения биоразнообразия сельскохозяйственных птиц с использованием гермоплазмы самок / О.И. Станишевская, Ю.Л. Силюкова // Птицеводство. – 2024. – №11. – С. 29-33.

doi: 10.33845/0033-3239-2024-73-11-29-33

Усовершенствование технологий долгосрочного хранения репродуктивных клеток сельскохозяйственных животных, направленных на сохранение генетического разнообразия, является в настоящее время актуальной задачей. Метод криоконсервации гамет обладает неоспоримыми преимуществами по сравнению с методом сохранения генофонда животных в живом разведении: возможность транспортировки биоматериалов на большие расстояния; легкость обмена генетическим материалом между популяциями; высокая степень надежности хранения; сведение до минимума эффекта

генетического дрейфа и инбридинга; обеспечение сохранения пород в случае эпидемий, экологических и социальных катастроф; использование отдаленной гибридизации; создание коллекций для фундаментальных исследований; снижение затрат на содержание и разведение животных; снижение необратимых потерь пород и генов; возможность воссоздания пород; поддержание малых популяций; сохранение генетического разнообразия в селекционных программах.

Технологии криосохранения как мужских, так и женских гамет млекопитающих разработаны

достаточно хорошо для их практического использования [1]. Иначе обстоит дело с криоконсервацией репродуктивных клеток сельскохозяйственных птиц: существующие технологии позволяют успешно сохранять только сперматозоиды. Низкотемпературное сохранение женских гамет птиц затруднительно по причине полилецитального строения яйцеклетки (размер ооцита – от 1 до 10 см в диаметре в зависимости от вида; объем желтка составляет более 95% содержимого яйцеклетки) и внеутробного развития эмбрионов.

Таким образом, возникает проблема полноценного сохранения





биоразнообразия птиц методами *in vitro* – невозможность сохранения женского генетического материала, включая митохондриальную ДНК. Для восстановления исчезнувшей породы с использованием криоконсервированного семени требуется не менее 5 поколений возвратных скрещиваний с близкой по фенотипу и происхождению породой [2]. Потери тем более значимы, что у птиц гетерогаметным полом являются самки [3].

Начало решению проблемы было положено в 2006 г., когда был разработан метод ортотопной трансплантации яичников неонатальных цыплят на стадии, когда ооциты еще не содержат желток [4]. Аналогичные исследования были проведены в России в 2007 г. [5], в которых также было показано, что аллотрансплантация в данном возрасте может быть успешной без применения иммунодепрессантов. Далее было доказано, что яичники цыплят можно трансплантировать цыплятам-реципиентам того же возраста, и после полового созревания у кур-реципиентов в донорских яичниках происходит овуляция. Эти яйцеклетки могут быть оплодотворены и получены цыплята [6]. Затем была разработана методика криоконсервации тканей гонад (кортикального слоя яичника неонатальных цыплят) в солонинках [7].

В ходе продолжения этих исследований была экспериментально доказана возможность получения гамет от реципиентов в результате трансплантации заморожено/оттаянных донорских яичников, причем с использованием различных пород кур [8]. Результативность этих экспериментов, как оказалось, зависит от комбинации

донор-реципиент, поэтому авторы дают рекомендацию тестировать сочетаемость перед проведением массовой трансплантации из-за несовместимости ряда пород и линий. Некоторым препятствием для использования этого типа сохранения зародышевой плазмы является большой объем хирургического вмешательства. Также необходим опыт применения местной и общей анестезии у домашней птицы и владение точными хирургическими методами. Однако, несмотря на то, что степень разработанности этой технологии находится на стадии отдельных экспериментов, и перспектива ее практического применения для получения живого потомства весьма далека, в национальных генетических банках Канады и США хранятся значительные запасы криоконсервированных яичников и семенников нескольких видов домашней птицы (курицы, японского перепела и чилийского тинаму) [9].

Следует отметить, что восстановление исчезнувшей породы или линии кур за счет использования криоконсервированной гермоплазмы значительно дешевле (в 2,9 раза) и быстрее (в 3,6 раза), если одновременно используется биоматериал самок (например, яичники) и самцов (семя), по сравнению с использованием только семени [10].

Проблема сохранения женских гамет птиц методами *in vitro* может быть также решена за счет криоконсервации и последующей трансплантации куриных первичных зародышевых клеток (primordial germ cells, PGCs), извлеченных из серповидной области эмбриона или из его сосудистой системы на стадии развития 13-17 НН. Стоит отметить, что PGCs птиц имеют более высокую

криоустойчивость по сравнению со сперматозоидами. Реимплантация PGCs эмбрионам-реципиентам на соответствующих стадиях развития позволяет получать химерное потомство донорской зародышевой линии и, в результате дальнейших спариваний, восстанавливать донорскую породу [9, 11-13]. Действительно, PGCs птиц предоставляют возможность криоконсервации всего генотипа репродуктивных клеток, что позволяет, теоретически, полностью восстанавливать исчезнувшие популяции. Ряд национальных программ по сохранению локальных пород кур и перепелов в разных странах предусматривает криосохранение PGCs в генетических банках [14-17]. Предполагается, что криоконсервация и последующая трансплантация PGCs могут использоваться и для практических целей животноводства. Например, высокопродуктивные породы и линии кур-несушек могут выступать в качестве суррогатных реципиентов трансплантированных половых клеток от менее плодовитых пород (и, возможно, даже других видов). Кроме того, межвидовая трансплантация PGCs с использованием эмбрионов-реципиентов для воспроизводства диких видов птиц открывает новые горизонты для сохранения диких видов, находящихся под угрозой исчезновения [18]. Однако, несмотря на полученные за последние десятилетия достижения в области исследования PGCs птиц, имеется ряд технологических препятствий для их широкого использования в качестве генетического материала для сохранения в криобанках. Необходимо проведение дальнейших исследований с целью повышения



качества клеток после их культивирования и криоконсервации, жизнеспособности эмбрионов-реципиентов после трансплантации донорских PGCs, полного устранения эндогенных зародышевых клеток реципиента, увеличения процента химер и числа гамет, полученных от них [9,19-21].

Разработан также метод выделения первичных зародышевых клеток из эмбриональных гонад на стадиях 29-35 НН [22-24]. Известно, что исходная популяция PGCs быстро увеличивается после колонизации зачатка гонад и насчитывает многие десятки тысяч митотически делящихся клеток. Таким образом, число первичных половых клеток, выделенных из эмбриональных гонад (GGCs), значительно превышает число PGCs, полученных из кровотока эмбрионов. Зародышевые клетки женских донорских гонад, введенные в эмбрионы-реципиенты на миграционной стадии, повторно мигрируют и колонизируют гонаду хозяина, далее образуя функциональные гаметы и потомство [23,25]. Опубликованы данные, что гонадные первичные половые клетки (GGCs) могут быть также заморожены и, в последующем, трансплантированы после оттаивания эмбрионам-реци-

пиентам, при этом было успешно получено потомство под контролем происхождения с использованием молекулярно-генетических методов [26]. Таким образом, гонадные половые клетки могут быть пригодны для биобанкинга и восстановления пород кур в сочетании со стерильной птицей-хозяином.

Разработка методов сохранения биоразнообразия *in vitro* за счет использования индуцированных PGCs (iPGCs) из соматических клеток также имеет большие перспективы. Исследователи Университета Yangzhou (КНР) разработали способ получения индуцированных первичных половых клеток из соматических клеток курицы и получили живое потомство донорского происхождения.

Фибробласты куриного эмбриона (CEFs) перепрограммированы в iPGCs путем экспрессии генов *Oct4/Sox2/Nanog/Lin28A (OSNL)*, которые далее индуцируются для дифференциации в PGCs с помощью BMP4/BMP8b/EGF. Деметилирование ДНК, ацетилирование гистонов и гликолитическая активация повышают эффективность индукции iPSCs, тогда как ацетилирование гистонов и гликолитическое ингибирование способствуют образованию PGCs. После транс-

плантации донорских iPGCs эти клетки были способны мигрировать и возвращаться в генитальные гребни эмбриона, производя жизнеспособное потомство. Соматические клетки легко доступны в больших количествах (10^7 на эмбрион) и могут быстро пролиферировать *in vitro*, хотя сложность и затраты при использовании соматических клеток намного выше. Тем не менее, в долгосрочной перспективе этот метод сохранения и восстановления генетических ресурсов представляется перспективным [27].

Таким образом, сохранение женской зародышевой плазмы сельскохозяйственных птиц методами *in vitro* является междисциплинарной задачей, и результаты ее решения зависят от комплексного использования методов криобиологии, клеточных, репродуктивных и генетических технологий. Необходимы дальнейшие исследования по созданию эффективных технологий ее долговременной криоконсервации с целью сохранения генофонда редких и исчезающих пород птиц и ценных промышленных линий в криобанках.

«Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по теме ГЗ №124020200127-7.»

Литература / References

1. Bojic, S. Winter is coming: the future of cryopreservation / S. Bojic, A. Murray, B.L. Bentley, R. Spindler, P. Pawlik, J.L. Cordeiro, R. Bauer, J.P. de Magalhães // BMC Biol. - 2021. - V. 19. - No 1. - P. 56. doi: 10.1186/s12915-021-00976-8
2. FAO. 2015. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. B.D. Scherf, D. Pilling (Eds.). FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome (available at <http://www.fao.org/3/a-i4787e/index.html>).
3. Boes, J. Innovations in cryoconservation of animal genetic resources – practical guide / J. Boes, P. Boettcher, M. Honkatukia // FAO Animal Production and Health Guidelines (Rome). - 2003. - V. 33. doi: 10.4060/cc3078en
4. Song, Y. The technique of orthotopic ovarian transplantation in the chicken / Y. Song, F.G. Silversides // Poult Sci. - 2006. - V. 85. - No 6. - P. 1104-1106. doi: 10.1093/ps/85.6.1104
5. Косенко, О.В. Ортопная трансплантация донорского яичника у птицы в качестве альтернативного метода ее искусственной репродукции / О.В. Косенко // Докл. РАСХН. - 2007. - №3 - С. 44-46. (Engl. ver. doi: 10.3103/S1068367407030160)



6. Song, Y. Offspring produced from orthotopic transplantation of chicken ovaries / Y. Song, F.G. Silversides // Poultry Sci. - 2007. - V. 86. - No 1. - P. 107-111. doi: 10.1093/ps/86.1.107
7. Silversides, F.G. Cryopreservation of germplasm from chickens kept in Canadian research institutions / F.G. Silversides, Y. Song, R. Renema, B.R. Rathgeber, H.L. Classen // Can. J. Anim. Sci. - 2008. - V. 88. - No 4. - P. 577-580. doi: 10.4141/cjas08030
8. Liptoi, K. Improvement of the application of gonadal tissue allotransplantation in the *in vitro* conservation of chicken genetic lines / K. Liptoi, K. Buda, E. Rohn, A. Drobnyak, E.E. Meleg, N. Palinkas-Bodzsar, B. Vegi, J. Barna // Anim. Reprod. Sci. - 2020. - V. 213. - P. 106280. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106280
9. Sun, Y. Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: advancement and future challenges / Y. Sun, Y. Li, Y. Zong, G.M.K. Mehaisen, J. Chen // J. Anim. Sci. Biotechnol. - 2022. - V. 13. - P. 115. doi: 10.1186/s40104-022-00768-2
10. Silversides, F.G. Comparative costs of programmes to conserve chicken genetic variation based on maintaining living populations or storing cryopreserved material / F.G. Silversides, P.H. Purdy, H.D. Blackburn // Br. Poultry Sci. - 2012. - V. 53. - No 5. - P. 599-607. doi: 10.1080/00071668.2012.727383
11. Tajima, A. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*) / A. Tajima, M. Naito, Y. Yasuda, T. Kuwana // Theriogenology. - 1993. - V. 40. - No 3. - P. 509-519. doi: 10.1016/0093-691x(93)90404-s
12. Nakamura, Y. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells / Y. Nakamura, H. Kagami, T. Tagami // Dev. Growth Differ. - 2013. - V. 55. - No 1. - P. 20-40. doi: 10.1111/dgd.12026
13. Santiago-Moreno, J. Animal board invited review: germaplasm technologies for use with poultry / J. Santiago-Moreno, E. Blesbois // Animal. - 2022. - V. 16. - No 3. - P. 100475. doi: 10.1016/j.animal.2022.100475
14. Nakamura, Y. Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells / Y. Nakamura // J. Reprod. Dev. - 2016. - V. 62. - No 5. - P. 431-437. doi: 10.1262/jrd.2016-052
15. Yu, F. Isolation, characterization and germline chimera preparation of primordial germ cells from the Chinese Meiling chicken / F. Yu, Z. Zhu, X. Chen, J. Huang, R. Jia, J. Pan // Poultry Sci. - 2019. - V. 98. - No 2. - P. 566-572. doi: 10.3382/ps/pey410.113
16. Lázár, B. Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells / B. Lázár, M. Molnár, N. Sztán, B. Végi, Á. Drobnyák, R. Tóth, N. Tokodyné Szabadi, M.J. McGrew, E. Gócza, E. Patakiné Várkonyi // Poultry Sci. - 2021. - V. 100. - No 8. - P. 101207. doi: 10.1016/j.psj.2021.101207
17. Ballantyne, M. Avian primordial germ cells are bipotent for male or female gametogenesis / M. Ballantyne, L. Taylor, T. Hu, D. Meunier, S. Nandi, A. Sherman, B. Flack, J.M. Henshall, R.J. Hawken, M.J. McGrew // Front. Cell Dev. Biol. - 2021. - V. 9. - P. 726827. doi: 10.3389/fcell.2021.726827
18. Kang, S.J. Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation / S.J. Kang, J.W. Choi, S.Y. Kim, K.J. Park, T.M. Kim, Y.M. Lee, H. Kim, J.M. Lim, J.Y. Han // Biol. Reprod. - 2008. - V. 79. - No 5. - P. 931-937. doi: 10.1095/biolreprod.108.069989
19. Ветох, А.Н. Эффективность использования бусульфана для элиминации примордиальных зародышевых клеток в гонадах у эмбрионов кур / А.Н. Ветох, Н.А. Волкова, Е.К. Томгорова, Л.А. Волкова, Н.А. Зиновьева // С.-х. биология. - 2017. - Т. 52. - №6. - С. 1194-1199. doi: 10.15389/agrobiol.2017.6.1194rus
20. Tonus, C. Cryopreservation of chicken primordial germ cells by vitrification and slow freezing: a comparative study / C. Tonus, D. Connan, O. Waroux, B. Vandenhove, J. Wayet, L. Gillet, D. Desmecht, N. Antoine, F.J. Ectors, L. Grobet // Theriogenology. - 2017. - V. 88. - P. 197-206. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.022
21. Ballantyne, M. Direct allele introgression into pure chicken breeds using Sire Dam Surrogate (SDS) mating / M. Ballantyne, M. Woodcock, D. Doddamani, T. Hu, L. Taylor, R.J. Hawken, M.J. McGrew // Nat. Commun. - 2021. - V. 12. - No 1. - P. 659. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20812-x>
22. Nakajima, Y. Development of a novel method for isolating gonadal germ cells from early chick embryos / Y. Nakajima, A. Tajima // J. Dev. Sustain. Agric. - 2013. - V. 8. - No 2. - P. 75-78. doi: 10.11178/jdsa.8.75
23. Nakajima, Y. Migratory ability of gonadal germ cells (GGCs) isolated from *Ciconia boyciana* and *Geronticus eremita* embryos into the gonad of developing chicken embryos / Y. Nakajima, H. Fukuda, M. Onuma, K. Murata, M. Ueda, E. Sunaga, T. Shiraiishi, A. Tajima // J. Vet. Med. Sci. - 2016. - V. 78. - No 6. - P. 1055-1058. doi: 10.1292/jvms.15-0664
24. Sopiayana, S. Isolation and number of gonadal primordial germ cells (gonadal PGCs) on the stages of early embryonic development of KUB chicken / S. Sopiayana, M.A. Setiadi, M. Fahrudin, I. Supriatna // Media Peternakan. - 2017. - V. 40. - No 1. - P. 1-6. doi: 10.5398/medpet.2017.40.1.1

25. Nakajima, Y. Production of germline chimeras by the transfer of gonadal germ cells (GGCs) recovered from 7-day-old chick embryos by using newly developed PBS[-] method / Y. Nakajima, M. Naito, A. Tajima // World's Poult. Sci. J. - 2012. - V. 68. - Suppl. 1.
26. Liu, G. PGC-mediated conservation strategies for germplasm resources of Rugao Yellow chicken and Shouguang chicken in China / G. Liu, W. Ren, K. Jin, D. Zheng, Q. Zuo, Y. Zhang, G. Chen, B. Li, Y. Niu // J. Integr. Agric. - 2024 (in press). doi: 10.1016/j.jia.2024.05.019
27. Zhao, R. Production of viable chicken by allogeneic transplantation of primordial germ cells induced from somatic cells / R. Zhao, Q. Zuo, X. Yuan [et al.] // Nat. Commun. - 2021. - V. 12. - No 1. - P. 2989. doi: 10.1038/s41467-021-23242-5

Сведения об авторах:

Станишевская О.И.: доктор биологических наук, главный научный сотрудник; olgastan@list.ru. **Силукова Ю.Л.:** младший научный сотрудник; svadim33@mail.ru.

Статья поступила в редакцию 26.08.2024; одобрена после рецензирования 28.09.2024; принята к публикации 10.10.2024.



Review article

**Current State of the Problem of Preservation of the Biodiversity
in Poultry Using Female Germplasm**

Olga I. Sanishevskaya, Yulia L. Silyukova

All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding - branch of the L.K. Ernst's Federal Research Center for Animal Husbandry

Abstract. *The problem of preserving of the gene pool of poultry and the results of the search for methods of long-term preservation of the genetic material from females including mitochondrial DNA are briefly reviewed. The results of the latest studies on the development of methods for isolation, long-term storage in vitro and usage of the germplasm of female poultry to maintain the biodiversity of the latter are presented. The methods of ortho-transplantation of tissues of native and frozen/thawed donor female gonads of neonatal chickens; isolation and cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) and gonadal germ cells (GGCs) for subsequent re-implantation into recipient embryos to obtain their progeny; the re-programming of somatic cells e.g. embryonic fibroblasts (CEFs) to obtain induced primordial germ cells (iPGCs) and their livable progeny are reviewed. The conclusion was made on the necessity of the improvement of these methods to develop practically applicable technologies for long-term storage of female poultry gametes in cryobanks and their usage in the maintenance of biodiversity.*

Keywords: *poultry, gene pool preservation, cryopreservation, female gonads, primordial germ cells (PGC).*

For Citation: Stanishevskaya O.I., Silyukova Y.L. (2024) Current state of the problem of preservation of the biodiversity in poultry using female germplasm. *Ptitsevodstvo*, 73(11): 29-33. (in Russ.)

doi: 10.33845/0033-3239-2024-73-11-29-33

(For references see above)

Authors:

Stanishevskaya O.I.: Dr. of Biol. Sci., Chief Research Officer; olgastan@list.ru. **Silyukova Y.L.:** Junior Research Officer; svadim33@mail.ru.

Submitted 26.08.2024; revised 28.09.2024; accepted 10.10.2024.