



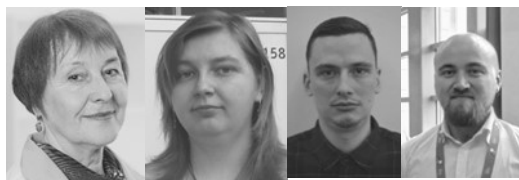
УДК 636.5.082

DOI:10.52419/issn2072-2419.2022.1.175

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА НАТИВНОЙ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ ПТИЦ ПОРОД БРАМА СВЕТЛАЯ И БРАМА ПАЛЕВАЯ И ИХ ХИМЕР

Л.В. Козикова, – д.б.н., в.н.с., SCOPUS ID 7801518289, <https://orcid.org/0000-0002-1595-8604>; Е.А. Полтева – м.н.с., <https://orcid.org/0000-0001-9082-3059> – м.н.с.; А.А. Курочкин. – м.н.с. <https://orcid.org/0000-0003-4430-4770>; Н.В. Плешанов – н.с. <https://orcid.org/0000-0002-4634-7515> «ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных. – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»

Ключевые слова: птицы, Gallus gallus, химеры, бластодермальные клетки, фенотип, трансплантация, криоконсервация. **Key words:** birds, Gallus gallus, chimeras, blastoderm cells, phenotype, transplantation, cryopreservation



РЕФЕРАТ

В связи со значительным снижением разнообразия пород и популяций птиц возникает необходимость в сохранении половых клеток редких пород и уникальных организмов, таких как химеры. Основным методом для сохранения генофонда у птиц служит метод криоконсервации семени, который применяется во многих странах мира в виде создания криобанков. Сперму от птиц породы брама светлая и брама палевая и их химер получали методом абдоминального массажа. Криоконсервацию семени проводили в мелких гранулах при добавлении 6% раствора диметилацетамида. Гранулы размораживали на нагретой металлической пластине при температуре 60°C. Объем эякулята, активность спермы и ее концентрация у исследованных пород и их химер статистически не отличались. Максимальная активность заморожено-оттаянного семени наблюдалась у семени породы брама палевая (40,0%), а минимальная у породы брама светлая 30%, тогда как у химер активность семени занимала промежуточное положение и составила 35%. Таким образом, заморожено-оттаянные сперматозоиды химер птиц жизнеспособны, как и нативное семя.

ВВЕДЕНИЕ

В связи со значительным снижением разнообразия пород, породных форм птиц актуальным становится создание новых пород и кроссов особенно сельскохозяйственного назначения [1]. Другим подходом для решения этих про-

блем может служить создание уникальных животных, таких как химеры и сохранение их репродуктивных клеток и органов методом криоконсервации [2]. Основным методом для сохранения генофонда у птиц служит метод криоконсервации семени, который применяется во

многих странах мира в виде создания криобанков (3-4). Тем не менее, генетический материал может сохраняться не только в виде семени, но и ДНК, кусочков различных тканей. Актуальность работы заключается в том, что создание химер и криоконсервация семени петухов позволит увеличить популяции находящихся под угрозой исчезновения птиц. Цель работы: провести анализ качества нативной и замороженно-размороженной спермы петухов породы брама светлая и брама палевая в сравнении с их химерами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Во ВНИИГРЖ имеется база ЦКБ БК «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», содержащая 40 пород и популяций. В наших исследованиях объектом исследования были эмбрионы кур двух пород: брама палевая и брама светлая. Птицы находились в стандартных условиях содержания и питания. Куриц осеменяли еженедельно, чтобы обеспечить оплодотворенные яйца.

Получение химер и их фенотип. Химеры были получены после трансплантации бластомеральных клеток брамы палевой эмбриону-реципиенту брама светлая и наоборот. Наличие контрастных перьев, не свойственных данной породе служило фенотипическим проявлением химеризма. Более подробный метод получения химер отражен в нашей предыдущей статье [5]. Петухов размещали по индивидуальным клеткам.

Получение спермы и ее криоконсервация. В основе метода работы с семенем использовали модифицированный метод

Целютина К.В. [6]. У полученной спермы активность оценивали под микроскопом при температуре 42 °С. Криоконсервация семени проходила в мелких гранулах. Разбавляли сперму в соотношении 1:1 синтетической средой LKS. Эквивилибрацию проводили в течение 40 минут. Диметилацетамид был добавлен в конечной концентрации 6%. Замораживание производили в гранулах путем прямого накапывания семени в жидкий азот. Гранулы размораживали на нагретой металлической пластине при температуре 60°С. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета анализа в Excel 2013.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Породы брама палевая и брама светлая были выбраны из коллекции ВНИИГРЖ (Санкт-Петербург, Пушкин).

Краткая характеристика исходных форм. Брама светлая выведена в США в середине девятнадцатого века, а в Европе появилась спустя век в 1950-х годах. Это крупная и красивая птица, мясной породы. Масса петухов достигает до 5 кг, а кур – 4,5 кг. Курицы сносят крупные яйца коричневого цвета до 120 штук в год. Окраска оперения светлая, отличается от брамы палевой наличием сцепленного с полом гена серебристой окраски S (Silver). Брама палевая отселекционирована в США. Эта порода имеет крупные размеры и яйценоскость, сопоставимые с брамой светлой. Окраска оперения – палевая, имеет доминантный ген Co (Columbian) ограничивающий местами черный цвет. Яйценоскость 125

Таблица 1

Качество спермы у петухов породы брама светлая

Номер петухов	Объем (мл)	Активность нативной спермы	Концентрация (млрд)
48	0,6	85	2,87
47	0,3	80	2,05
46	0,8	75	3,37
45	0,3	85	1,43
Среднее	0,5	81,25	2,43

Таблица 2

Качество спермы у петухов породы брама палевая

Номер петухов	Объем (мл)	Активность нативной спермы	Концентрация (млрд)
71	0,5	85	2,65
70	0,4	80	2,34
69	0,5	85	3,56
50	0,4	80	2,05
49	0,5	85	2,91
Среднее	0,46	83	2,70

Таблица 3

Качество спермы у петухов химер

Номер петухов или клетки	Объем (мл)	Активность нативной спермы	Концентрация (млрд)
1020926	0,5	80	4,17
1710326	0,4	85	2,36
б/н Клетка 1	0,3	80	1,29
б/н Клетка 7	0,4	85	2,24
Среднее	0,4	82,5	2,51

-140 яиц. Живая масса кур 3,0-4,5 кг, петухов 3,5-5,0 кг.

Фенотипическая характеристика химер. Для создания химер были выбраны породы с контрастным оперением, поэтому химеризм определяли по фенотипу при наличии перьев, не свойственных данной породе. Химеры были получены нами после трансплантации бластодермальных клеток от эмбриона-донора породы брама светлая эмбрионам – реципиентам породы брама палевая и наоборот, и представлены в статье, напечатанной в журнале «Птицеводство» [5].

Оценка качества спермы. У полученной спермы определяли активность и ее концентрацию у пород брама светлая и брама палевая и их химер (табл.1-3). Объем эякулята и активность нативной спермы у химер статистически не отличались от исходных пород. Следует отметить высокий уровень активности нативных сперматозоидов, составляющие более 80%. Концентрация спермы у химер была немногим выше, чем у породы брама

светлая и ниже, чем у породы брама палевая. Таким образом, качество спермы химер по таким показателям, как объем, активность и концентрация практически не отличается от показателей исходных форм пород брама светлая и брама палевая, что указывает на полноценность спермы у химерных организмов.

Криоконсервация спермы петухов. В процессе замораживания сперма подвергается различным повреждающим факторам особенно в период фазового перехода от жидкого состояния к кристаллическому. Как правило, вначале криоконсервации идет повреждение мембран, а при более низких температурах изменяется ионное равновесие [7]. Результаты анализа качества замороженно-оттаянного семени представлены в таблице 4. Было проведено три повторности опытов. Максимальная активность замороженно-оттаянного семени наблюдалась у семени породы брама палевая (40,0%), а минимальная у породы брама светлая (30,0%), тогда как у химер активность

Таблица 4

Активность замороженно-оттаянного семени пород брама светлая, брама палевая и их химер.

Порода	Петух	Активность замороженно-оттаянного семени (%)		
Брама светлая	48	40	45	40
	47	10	35	35
	45	25	20	35
	44	10	50	15
	Среднее	21,25	37,5	31,23
Брама палевая	71	45	35	45
	70	20	30	40
	60	40	55	50
	50	25	50	40
	49	45	55	25
	Среднее	35,0	45,0	40,0
Химеры	1020926	15	25	35
	1710326	25	20	30
	1	40	30	25
	7	20	20	20
	Среднее	33,3	31,7	40,0

семени занимала промежуточное положение и составила в среднем 35,0%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в нашей статье «Создание фенотипических химер кур с использованием бластодермальных клеток пород брама светлая и брама палевая» [5] было показано, что эффективность получения химер между породами брама палевая брама светлая при разных сочетаниях в качестве доноров и реципиентов различалась и в среднем составила 28,1%. Возможно, различия в количестве получения химер связаны с особенностями взаимодействия клеток разной генетической природы, объединенных в один организм. К сожалению, механизмы этого феномена не изучены, как и биологические особенности химер. Наши результаты указывают, что как нативные, так и замороженно-оттаянные сперматозоиды химер птиц жизнеспособны. Подтверждением могут

служить проведенные ранее исследования о создании потомков химер (8). Для разработки и длительном сохранении генофонда в нашей стране и ряде других стран созданы криобанки генетических ресурсов (9-10). В криобанках созреваются половые клетки и их предшественники, зародыши разных организмов при использовании методов глубокого замораживания в жидком азоте при -196 °С.

ВЫВОДЫ

Таким образом, дана характеристика репродуктивных свойств межпородных химер-петухов, полученных при сочетании пород брама светлая и брама палевая. Показано, что по объему эякулята, концентрации и активности замороженно-оттаянного семени химеры достоверно не отличались от исходных форм по нативному и замороженно-оттаянному семени. Создание химер птиц, сохранение и криоконсервация их половых клеток могут

сыграть важную роль при создании новых высокопродуктивных генотипов, при решении проблем, связанных с сохранением генетического разнообразия в популяции птиц, а также при получении трансгенных птиц.

Работа проводилась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 20-016-00017 «Оценка жизнеспособности предшественников половых клеток, используемых для сохранения генетического разнообразия редких и исчезающих пород кур (Gallus gallus), при криоконсервации».

EVALUATION OF THE QUALITY OF NATIVE AND CRYOPRESERVED SEMEN OF BIRDS OF BREEDS BRAMA LIGHT AND BRAMA FAWN AND THEIR CHIMERAS . Kozikova L.V. Dr. habil.(Biol. Sci), a leading researcher at the Laboratory of Molecular Genetics; Ekaterina Polteva, Junior researcher at the Laboratory of Molecular Genetics. A.A. Kurochkin, Junior researcher at the Department of genetics, breeding and conservation poultry's genetic resources; N.V. Pleshanov, Researcher at the Department of genetics, breeding and conservation poultry's genetic resources. «Russian research institute of farm animal genetics and breeding - branch of the L.K. Ernst Federal science center for animal husbandry, Sankt-Petersburg, Pushkin.

ABSTRACT

Due to the significant decline in the diversity of bird breeds and populations, there is a need to preserve germ cells of rare breeds and unique organisms, such as chimeras. The main method for preserving the gene pool in birds is the method of semen cryopreservation, which is used in many countries of the world in the form of creating cryobanks. Sperm from the birds of the breeds Brama light and Brama fawn and their chimeras were obtained by abdominal massage. Cryopreservation of the semen was carried out in small granules with the addition of a 6% solution of dimethylacetamide. The granules were thawed on a heated metal plate at 60°C. The ejaculate volume, sperm activity and its concentration in the studied breeds and their chimeras did not differ sta-

tistically. The maximum activity of the frozen-thawed semen was observed in the semen of the Brahma fawn breed (40.0%), and the minimum activity in the Brahma light breed was 30%, while in chimeras the semen activity occupied an intermediate position and amounted to 35%. Thus, frozen-thawed spermatozoa of bird chimeras are viable, as well as native semen.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

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. 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.
3. Тагиров М.Т., Замораживание клеток ранних эмбрионов кур. Проблемы криобиологии, тезисы докладов Всеукраинской научной конференции. / Тагиров М.Т., Артеменко А.Б., Кальченко Ю.В. // Успехи и перспективы развития криобиологии и криомедицины", - 2001, - N 3. - С.56.
4. Nicolaia Iaffaldano Italian semen cryobank of autochthonous chicken and turkey breeds: a tool for preserving genetic biodiversity. / Nicolaia Iaffaldano, Michele Di Iorio, Icon, Giusy Rusco, Emanuele Antenucci, Luisa Zaniboni // Journal of Animal Science. V. 20, 2021 - Issue 1. P. 2022-2033
5. Козикова Л.В. Создание фенотипических химер кур с использованием бластодермальных клеток пород брама светлая и брама палевая. / Л.В. Козикова, Е.А. Полтева // Птицеводство – 2021 - №6. – С.7-11
6. 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.

7. Наук В. А. Усовершенствованный метод длительного сохранения семени быков производителей в глубоком замороженном состоянии / В. А. Наук // Совершенствование методов воспроизводства сельскохозяйственных животных. — Кишинев, 1979. — С.3-37

8. Tajima, A., M. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gpgcs) in chicken. / J. Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda, and T. Kuwana. //Exp. Zool.-1998-V. 280-P.265-267.

9. Naito M., Tajima A., Tagami T., Yasuda

Y., Kuwana T. 1994 Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. Naito M., Tajima A., Tagami T., Yasuda Y., Kuwana T. |Journal of Reproduction and Fertility-1994-V. 102,-P. 321-325.

10. Грищенко В. И. Проблемы криобиологии и сохранения генетических ресурсов /В. И. Грищенко, Е. Ф. Копейка, М. П. Петрушко // Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов». Цитология.- 2004.- Том 46.- № 9.- С. 784.

УДК 619:616-078.37:636.2:612.616.3

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.1.180

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЯИЧНИКОВ ПРИ СИНХРОНИЗАЦИИ ПОЛОВОЙ ОХОТЫ У КОРОВ

Перерядкина С. П.-к. вет.н , доц.; Гальченко В. А.- асп.; Лисиченко Г. О. –асп. ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный аграрный университет»

Ключевые слова: синхронизация, гормон программа, яичники, фолликул, желтое тело, простагландин, гонадотропин-рилизинг-гормон, искусственное осеменение. **Key words:** synchronization, hormone program, ovaries, follicle, corpus luteum, prostaglandin, gonadotropin-releasing hormone, artificial insemination.



РЕФЕРАТ

В статье представлены результаты экспериментальной оценки эффективности программы синхронизации половой охоты под контролем УЗИ диагностики состояния яичников у коров. В данной работе определено влияние гормональных препаратов на динамику лизиса желтого тела и роста фолликулов в яичниках у коров с помощью УЗИ аппарата. Оценку эффективности синхронизации половой охоты и определения влияния гормональных препаратов на состояние яичников у дойных коров проводили с марта по август 2021 года в Волгоградской области в хозяйстве ООО СП «Донское». Для проведения производственного опыта сформировали две опытные группы коров голштинской породы по 30 голов в каждой.

Для ультразвукового исследования яичников у второй опытной группы использовали УЗИ сканер Easi-Scan Curve фирмы BCF Technology. Линейно-матричные преобразователи с частотным диапазоном от 5,0 до 7,5 МГц. Трансректальное ультразвуковое исследование проводили путем введения ультразвукового преобразователя в прямую кишку. Это позволило визуализировать и оценить архитектуру яичников.

В результате анализ УЗИ снимком выявили, что двукратное применение Прогестерона способствует регрессии желтого тела. Перед применением простагландина желтое тело имело размер 3х2 см, но после внутримышечного введения Прогестерона произошла регрессия желтого тела, его размеры стали уменьшаться, затем оно полно-