

ХАРЬКОВСКИЙ ЭКСПЕДИЦИОННО–СТАЦИОНАРНЫЙ МЕТОД КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ

А.Б. Сушко, ИЖ УААН

Предложен оригинальный метод и оборудование для криоконсервации спермы жеребцов в форме шприц-тюб. Проведены сравнительные испытания и определены качественные показатели деконсервированной спермы при использовании разных технологических форм. Использование разработанного метода криоконсервации в форме шприц-тюб обеспечивает подвижность спермиев на уровне 3,6 балла, 50 % выживаемости спермиев после размораживания.

Ключевые слова: жеребцы, криоконсервация, криобанк, замораживатель, шприц-тюба, пайета, сперма, подвижность.

KHARKIV FREEZING PRESERVATION TECHNIQUE OF THE STALLION SEMEN BY THE SYRINGE TUBE APPLICATION

O. Sushko , the Institute of animal science, UAAS

This article highlights the experimental research results on the syringe tubes application by freezing preservation of the stallion semen. The equipment for freezing preservation was elaborated. The comparative analysis of the semen was fulfilled. & qualitative characteristics of the sperm were defined by the various techniques use. Qualitative characteristics were identified by thaw. The new elaborated method application of freezing preservation procures motility & sperm survival rate boost. Motility rate equals 3,6 degree & survival rate amounts 50% after thaw respectively.

Key words: stallions, freezing preservation, refrigerated tank, chiller, syringe tube, inseminating tube, sperm, motility.

УДК: 575.222.75:591.3

СОХРАНЕНИЕ ЗАРОДЫШЕВОЙ ПЛАЗМЫ ПТИЦ

М.Т.Тагиров, А.В.Терещенко

Институт птицеводства УААН

Дан анализ современного состояния проблемы сохранения зародышевой плазмы птиц. Рассмотрены такие объекты, как бластодермальные клетки, эмбриональные стволовые клетки и первичные зародышевые клетки с точки зрения их использования в качестве материала для криоконсервации. Дана оценка методам использования химерных посредников для реализации генетического потенциала сохраняемого материала, выделены преимущества и недостатки данных методов, намечены основные направления их дальнейшего усовершенствования.

Ключевые слова: первичные зародышевые клетки, химеры, генетические ресурсы, криоконсервация, культивирование клеток.

Не вызывает сомнения тот факт, что наилучший способ сохранения генетических ресурсов птиц – это создание коллекционных стад, где не только тщательно следят за определенными генетически закрепленными признаками, но и сама птица имеет возможность приспосабливаться к меняющимся кормовым и технологическим условиям. К сожалению, в последние годы во всем мире наблюдается тенденция сокращения финансирования и государственной

поддержки коллекционных центров, которые часто создавались при учебных и научно-исследовательских институтах. В то же время крупные частные компании тратят огромные средства на селекционные программы с привлечением очень узкого генетического материала, как в мясном, так и в яичном птицеводстве. Это может привести к потере ценных признаков, возникающих и закрепляющих то ли в ходе эволюции, то ли путем многолетней селекции трудом человека и необратимому обеднению генофонда птицы. В настоящее время проблема сохранения генетических ресурсов птиц решается частично путем криоконсервации спермы самцов, генетический материал самки - ни яйцеклетки, ни зародыши на ранних стадиях развития - не поддается успешному замораживанию. Криоконсервация спермы применима только для сохранения признаков, обусловленных единичными генами (например, такими как голошейность, чубатость некоторых пород кур) [1], но не позволяет провести полную реконструкцию генетики линии или породы.

Успехи, достигнутые за последние 15 лет в исследованиях раннего эмбрионального развития птиц, изучения первичных зародышевых клеток (ПЗК), культивирования эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), дают возможность использования криоконсервации этих типов клеток в качестве способов сохранения всего генома специализированных стад сельскохозяйственной птицы. Как эффективность замораживания этих клеток, так и эффективность создания химер по линии половых клеток с использованием бластодермальных клеток, ПЗК, и ЭСК значительно различаются. Низкая эффективность данных методов и высокая стоимость работ, связанных с данными технологиями, являются основными факторами, препятствующими их широкому применению, но в то же время стимулирующими интенсивные научные разработки в данном направлении.

Цикл зародышевой клетки. Цикл зародышевой клетки начинается от оплодотворения. Так же, как и у других позвоночных, зародышевая линия клеток птиц закладывается во внеэмбриональной области на ранних стадиях развития. В последующем зародышевые клетки мигрируют к месту формирования гонад и заселяют гонадные валики и пролиферируют в ходе первой недели эмбриогенеза. Зародышевые клетки самца в основном начинают интенсивно делиться при достижении половозрелого возраста, когда начинается процесс сперматогенеза. У самок ооциты застывают на стадии первого мейотического деления на последних стадиях эмбриогенеза вплоть до полового созревания, когда начинается их рост и созревание. В последующем вместе с оплодотворением цикл зародышевой клетки вновь повторяется. Таким образом, для целей криоконсервации наиболее приемлемыми являются зародышевые клетки в промежутке между оплодотворением и началом половой дифференциации.

Оплодотворение у кур происходит в воронке яйцевода через 20-40 мин после овуляции (рис. 1). 4-20 сперматозоидов проникают в яйцеклетку и каждый из них формирует мужской пронуклеус. Один из них сливается с женским пронуклеусом и становится оплодотворенным яйцом (4 часа после овуляции). В последующем яйцо начинает покрываться яйцевыми оболочками, сначала плотным белком в белковом отделе и подскорлупными мембранами – в перешейке, после чего оно попадает в матку, куда открываются многочисленные скорлуповые железы.

После первого деления дробления, которое происходит через 4-5 часов после оплодотворения, начинается интенсивное размножение клеток и ко времени откладки яйца зародыш состоит из 40 000-60 000 клеток. В ходе прохождения яйца по яйцеводу устанавливается передне - задняя полярность эмбриона, хотя визуально он имеет радиальную структуру.

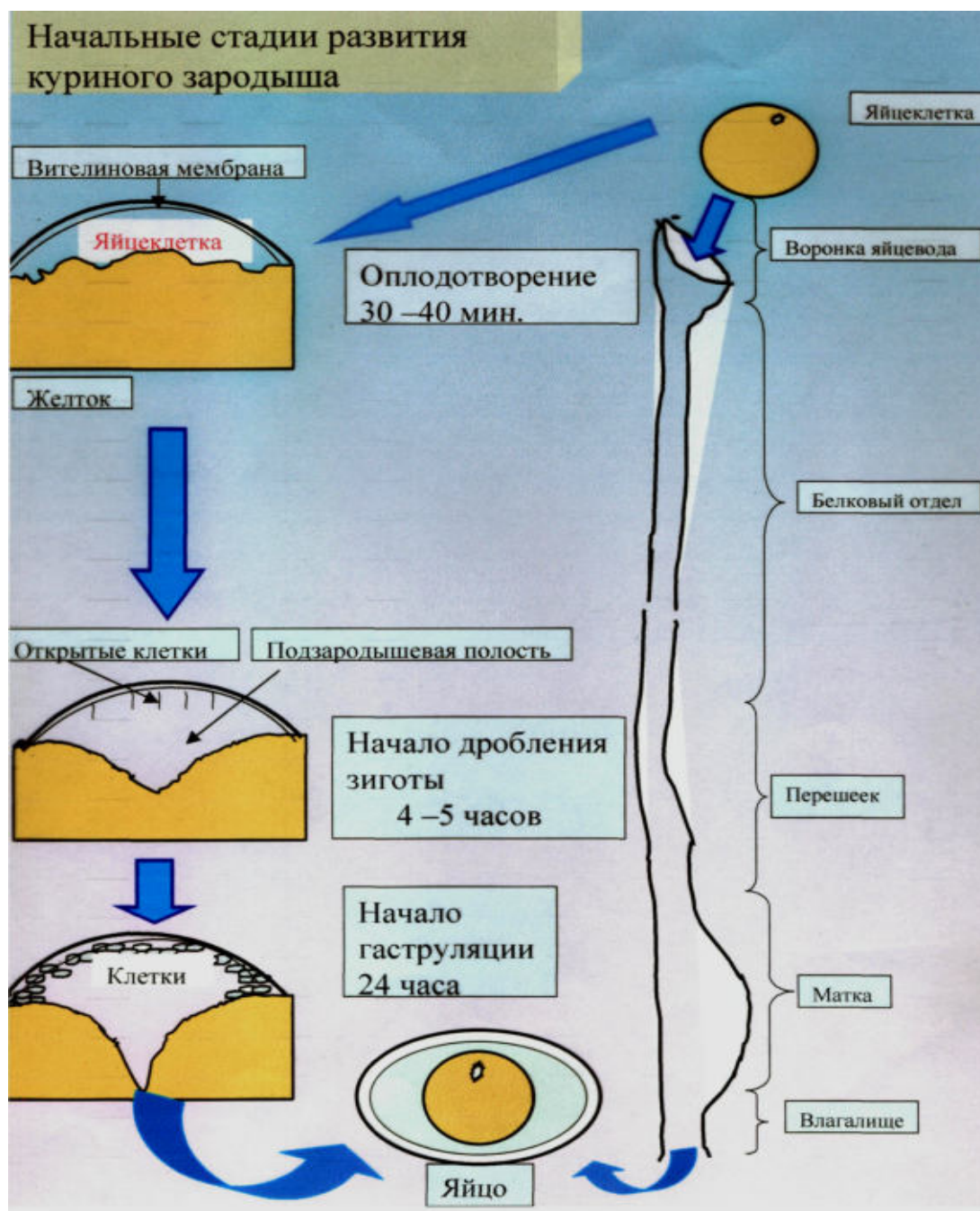


Рис. 1. Начальные стадии развития куриного зародыша.

К моменту отложения яйца бластодерма состоит из двух различающихся областей: центральная – зона пеллюцида – более прозрачная область, формирующая ткани тела зародыша, и периферическая – зона опака – непрозрачная область, участвующая только в формировании внеэмбриональных структур. В начале инкубации зона пеллюцида дифференцируется в два слоя: верхний – эпибласт и нижний – гипобласт. Клетки гипобласта участвуют в формировании только внеэмбриональных тканей. Этот период развития от оплодотворения до формирования гипобласта классифицируют на 14 стадий развития по Eyal-Giladi и Kochav (1976) с использованием римских цифр [2]. Последующее эмбриональное развитие классифицируют по Hamburger и Hamilton (1951), используя арабские цифры [3].

Следующим важным моментом, с точки зрения сохранения зародышевой плазмы птиц, является закладка зародышевой линии клеток (рис. 2). ПЗК изначально обнаруживают в эпибласте в центральной области на стадии X [4]. На этой стадии ПЗК фиксируются с помощью иммуногистохимического анализа с использованием моноклональных антител SSEA-1 и EMA-1. Из вентральной поверхности эпибласта они постепенно переходят в дорсальную область гипобласта на стадии X1-X1V [5]. В ходе формирования первичной полосы энтодерма оттесняет ПЗК, находящиеся в гипобласте, в переднюю область зародыша и к 18 часам инкубации (стадия 4) ПЗК локализируются в районе зародышевого полумесяца (фиксируются как йодная кислота-Шифф реакция позитивные). Оттуда они попадают в кровоток, некоторое время находятся в кровотоке и проникают в гонады. После заселения ПЗК гонад начинается половая дифференциация.

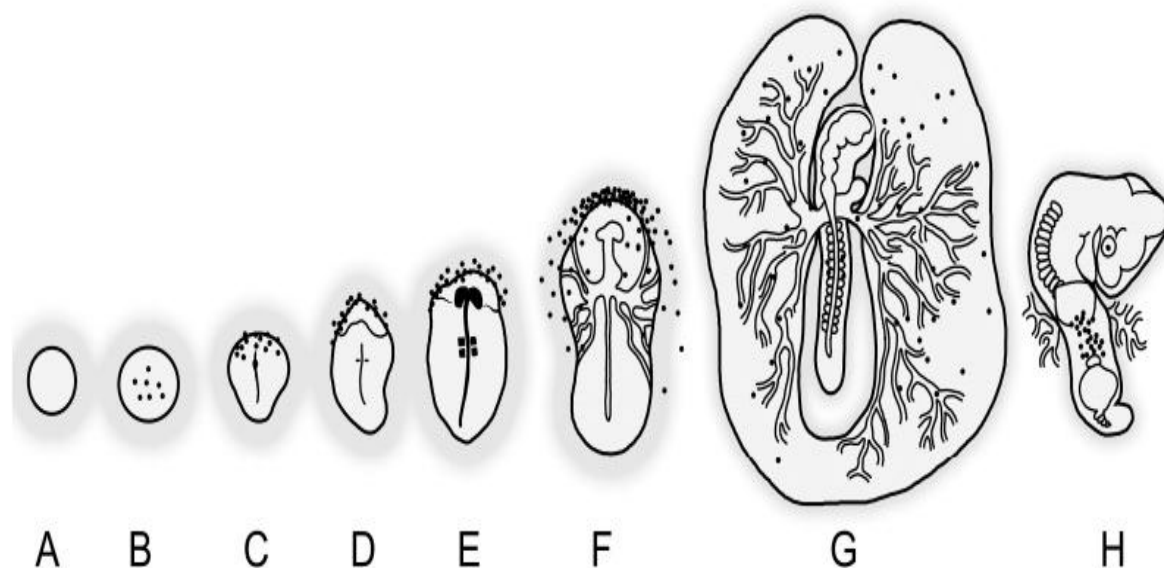


Рис. 2. А–Е: Схематическое представление развития первичных зародышевых клеток птиц от момента снесения яйца до заселения первичных гонад.

Зародышевые клетки, вероятно, начинают свое развитие на стадиях X (А) - XIII (В). Дефинитивные ПЗК появляются вместе с формированием зародышевого полумесяца (С–Е). F–H: В ходе формирования кровяных островков (F), ПЗК проникают в кровеносную систему (G), активно мигрируют и заселяют гонадные бугорки (H).

ПЗК, проникшие в гонады, в случае самца, начинают активно делиться после 13 дней инкубации и дифференцироваться в сперматогонии [6].

В возрасте около 10 недель у цыплят сперматогонии в семенных канальцах начинают делиться как стволовые клетки путем митоза: часть из них дает сперматогонии, а другая часть дифференцируются в первичные сперматоциты.

Первичные сперматоциты путем первого деления мейоза делятся на вторичные сперматоциты и в дальнейшем в результате второго деления мейоза, превращаются в сперматиды и, наконец, дифференцируются в сперматозоиды.

В семенных канальцах клетки на каждой стадии сперматогенеза переходят из периферии в просвет канальца и, наконец, освобождаются как сформированные спермии.

ПЗК, попавшие в левый яичник эмбриона, в случае самки, дифференцируются для формирования оогоний после 8 дней инкубации и начинают активно делиться в процессе дифференциации в первичные ооциты. К 16 дням инкубации первичные ооциты входят в профазу мейоза [7].

Количество первичных ооцитов доходит до максимума к 17 дням инкубации [8], а затем быстро падает, возможно благодаря апоптозу. Дальнейшая дифференциация временно прекращается на профазе мейоза. Правая гонада прекращает развитие после 7-го дня инкубации из-за отсутствия формирования кортекса.

Возобновление развития первичного ооцита происходит при достижении половозрелости. Первичный ооцит выталкивает первое полярное тельце путем второго мейотического деления около 1 часа перед овуляцией и превращается во вторичный ооцит. В это время определяется, какая из хромосом Z или W содержит вторичный ооцит, фактически происходит генетическое определение пола эмбриона.

После овуляции происходит оплодотворение, и вторичный ооцит выталкивает второе полярное тельце и становится зрелой яйцеклеткой.

Гонады позвоночных состоят из двух различных компонентов. Строма формируется из целомического эпителия и тканей мезонефроса, в то время как гаметы формируются из первичных зародышевых клеток (ПЗК). Во что разовьются ПЗК - в сперму или ооциты не зависит от их генотипа (т.е. от ZZ или ZW), а определяется типом стромы, в котором они развиваются. У нормальных самок птиц развивается левый яичник, а правый остается рудиментом. Удаление левого яичника приводит к пролиферации правого яичника, но уже как семенника, продуцирующего сперму из ПЗК самок [9].

Кагами и др. в 1995 году сообщили, что ПЗК генетических самцов птиц могут дифференцироваться в функционирующие яйца и ПЗК генетических самок – в функционально нормальные сперматозоиды. Это было показано путем анализа судьбы бластодермальных клеток самок и самцов, инъецированных в реципиентные эмбрионы противоположного пола [10].

Приведенные данные важны с точки зрения использования ПЗК в качестве материала для сохранения генетических ресурсов птиц. Во-первых, отпадает необходимость идентификации пола у отдельных особей на этапе сбора материала для сохранения; во-вторых, на этапе воссоздания породы, также можно игнорировать пол эмбриона-реципиента, куда вводятся чужеродные клетки.

Последующее развитие (после откладки яйца) происходит в скорлупе и при этом критическую роль играет разница в плотности желтка (1,029) и белка (1,040).

Предпосылки для криоконсервации генетических ресурсов птиц. Для успешной криоконсервации зародышевой линии нужны два условия – это наличие подходящей линии клеток и эффективные методы реконструкции сохраняемой популяции. На рис. 3 представлены необходимые элементы и технологическая схема реализации этой концепции.

В первую очередь должны быть получены определенные типы клеток из эмбрионов. Это могут быть бластодермальные клетки, выделенные из эмбрионов на X-стадии развития, ПЗК, полученные из крови эмбрионов на 14-16, или из гонад на 26-28 стадий. Ввиду того, что часто численность популяции птицы, нуждающиеся в сохранении, мала, то возникает необходимость увеличения количества клеток в условиях *in vitro*.



Рис.3. Схема использования половых химер для сохранения зародышевой плазмы птиц.

После выделения необходимого типа клеток путем их инъекции в эмбрионы-реципиенты соответствующей стадии развития могут быть получены химеры по зародышевой линии. При скрещивании химер между собой можно реконструировать сохраняемую линию в первом поколении. В настоящее время используются три типа клеток для криоконсервации: бластодермальные клетки, ПЗК и ЭСК.

Бластодермальные клетки. Химеры по зародышевой линии клеток могут быть получены путем использования бластодермальных клеток, выделенных из эмбрионов на X стадии развития. Petite et al. инъецировали суспензию бластодермальных клеток в подзародышевую полость и получили химерных по зародышевой линии петушков [11]. Хотя уровень трансмиссии зародышевой линии был около 0,3 %, эта работа стимулировала исследования в данном направлении. Уровень химеризма зависит от линии птицы, используемой в качестве донора или реципиента [12]. Клетки должны быть выделены из центральной области эпибласта и по уровню развития доноры и реципиенты должны находиться на одинаковой стадии. Желательно использовать доноров и реципиентов одного пола [13]. И, наконец, очень важным условием, от которого зависит процент химеризма, является уровень стерильности эмбрионов-реципиентов. Эмбрионы, стерильные в той или иной степени, достигаются путем применения сублетальных доз (500-600 рад) гамма радиации, или путем удаления около 700 клеток из центральной области бластодермы [14]. Даже использование

данных приемов не обеспечивает гарантированной трансмиссии линии зародышевых клеток индивидуально для каждой птицы.

Bednarczyk et al. в 2002 году сообщили о реконструкции породы кур польские зеленоножки (viz. Green-legged Partridge) путем использования в качестве реципиентов породы белый леггорн [15]. Из 20 особей (10 самок и 10 самцов), которые были выращены до половозрелого возраста, половой химеризм проявлялся у двух самцов (17,6 и 50 %) и четырех самок (5, 20, 23 и 23 %). При скрещивании самца (17,6 %) со всеми самками, только одна самка дала в потомстве чистых зеленоножек (из 477 цыплят только 10). Хотя данная работа и показывает принципиальную возможность реконструкции сохраняемой линии через использование химерных организмов, она также демонстрирует, что еще существуют значительные препятствия, пока данная технология станет рутинной.

Заморожено-оттаянные клетки могут быть использованы для получения соматических химер птиц [16-17]. В связи со значительными потерями клеток в процессе замораживания и размораживания возникает необходимость очистки такой суспензии путем градиентного центрифугирования, прежде чем инъектировать их в эмбрион-реципиент [18]. Такая обработка бластодермальных клеток позволила получить 5 химер по зародышевой линии из 53 инъектированных особей. Степень химеризма не превышала 6 %. Таким образом, прежде чем использовать бластодермальные клетки для сохранения генетических ресурсов птиц необходимо значительное усовершенствование методов криоконсервации и повышения эффективности получения половых химер.

ЭСК. Эмбриональные стволовые клетки – это плюрипотентные клетки, из которых по определению могут развиваться ткани любых типов, включая зародышевую линию. ЭСК птиц были выделены из зародышей на Х стадии развития и культивированы *in vitro* и использованы для получения соматических и половых химер [19]. В настоящее время уровень трансмиссии ЭС клетками зародышевой линии очень низкий, а после нескольких недель культивирования они вообще теряют эту способность, что делает данный тип клеток не совсем подходящим объектом для целей сохранения генофонда птицы.

ПЗК. Используются три источника ПЗК для создания химер зародышевой линии: зародышевый полумесяц, зародышевые клетки, циркулирующие в эмбриональной крови и зародышевые клетки, выделенные из примитивных гонад. Reynaud (1969) впервые показал, что ПЗК из зародышевого полумесяца могут быть инъектированы в кровеносные сосуды эмбриона-реципиента и внедрены в гонады растущего зародыша [20]. Однако зародышевый полумесяц меньше всего подходит для целей криоконсервации из-за малого количества ПЗК на этой стадии развития (Стадии 4-8).

Simkiss et al. (1989) демонстрировали, что ПЗК, циркулирующие в крови, могут быть использованы в качестве доноров для получения половых химер [21]. Гонадные ПЗК также можно использовать для создания химер зародышевой линии. Более того, ПЗК, выделенные из гонад на 5-7 сутки инкубирования и инъектированные в кровеносную систему эмбрионов на 14-17 стадии развития, способны мигрировать в гонады и формировать химерные организмы [22].

Как и в случае с бластодермальными клетками, при инъекции ПЗК возникает необходимость стерилизации эмбриона-реципиента. Количество эндогенных ПЗК можно снизить инъекцией бусульфана [23].

Предпринимались также попытки концентрирования ПЗК в градиенте различных веществ, в частности фикол и никоденз, иммуномагнитного разделения клеток. Не так давно были получены чистые популяции ПЗК из

эмбриональной крови и гонад использованием метода сортировки клеток на основе флуоресценции [24].

Предпринимались также попытки культивирования ПЗК, выделенных из крови и гонад. Chang et al. культивировали ПЗК из крови в течение 5 суток и получили химер зародышевой линии [25]. Han et al. сообщили о возможности культивирования ПЗК до 2 месяцев с сохранением характерных для них морфологических и культуральных свойств [26]. По данным Park et al. при культивировании гонадных ПЗК в течение 10 дней их способность к созданию химер зародышевой линии усиливается [27]. Долговременная культура ПЗК послужила бы незаменимым инструментом для сохранения генетических ресурсов птиц.

Есть несколько сообщений об успешном замораживании ПЗК. Naito et al. выделили циркулирующие в крови на стадиях 13-15 ПЗК, концентрировали их в градиенте фикола и заморозили их под защитой диметилсульфоксида [28]. Химеры зародышевой линии были получены путем инъекции 100 размороженных ПЗК на 1 эмбрион. Tajima et al. показали, что криоконсервированные гонадные ПЗК сохраняют способность создавать химер зародышевой линии клеток [29]. Следует отметить, что во всех случаях уровень химеризма был крайне низким, что не позволяет применение данных методов для рутинного использования.

Другие факторы, препятствующие эффективному замораживанию зародышевой плазмы птиц. Кроме типа клеток и эффективности химеризма существуют еще несколько факторов, определяющих практичность технологии использования химерных организмов.

Прежде всего, следует отметить значительное снижение выводимости яиц после вскрытия для проведения необходимых манипуляций. Наименее трудоемкий путь доступа к куриному зародышу – через окошко в скорлупе, которое проделывают с помощью абразивного материала. Данный способ обеспечивает в лучшем случае до 40-45 % выводимости яиц. Разрабатывались также различные методы культивирования желтков в суррогатных яйцах [30]. Хотя данные методы и обеспечивают более высокий уровень выводимости яиц (до 75 %), они значительно более трудоемки и требуют подготовки определенных условий.

Второй фактор – это выбор реципиента. В настоящее время, на этапе разработки и усовершенствования технологии, часто в качестве реципиентов используют наиболее доступную породу белый леггорн, а донорами служат контрастные по цвету оперения породы домашних кур. Нужно иметь в виду, что не все линии, нуждающиеся в сохранении, обладают контрастным оперением. На практике может оказаться, что одни линии или породы больше подходят для данной роли, чем другие. В идеальном варианте, универсальным реципиентом послужила бы птица с низким содержанием эндогенных ПЗК и обладающая каким-либо маркерным признаком, позволяющим легкую идентификацию донорских потомков.

И, наконец, когда криоконсервацию рассматривают как способ сохранения генетических ресурсов, подразумевают, что процедуры, связанные с реконструкцией линии, будут нетрудоемкими и недорогими. Только при удовлетворении этих условий сохраняемые в криобанках ресурсы станут доступными для нужд исследователей и производства.

Вывод. На основе анализа проблемы сохранения зародышевой плазмы птиц можно заключить что, несмотря на положительные результаты практически на всех этапах данной технологии, результативность их остается на довольно

низком уровне. Все подходы, включая использование бластодермальных клеток, ЭСК и ПЗК, нуждаются в дальнейшем усовершенствовании, пока они будут предложены для рутинного использования. В настоящее время наиболее приемлемыми являются использование бластодермальных клеток и ПЗК. Однако если ПЗК будут культивированы с сохранением своих потенций, это позволит решить многие вопросы, связанные как с отработкой режимов замораживания, так и с повышением общей эффективности технологии сохранения генетических ресурсов птиц.

Библиографический список

1. Сахацкий Н.И., Терещенко А.В., Артеменко А.Б., Тагиров М.Т. Влияние девятилетнего хранения в жидком азоте на воспроизводительные качества деконсервированной спермы петухов // Материалы 7-ой конф. Балт. стран по птицеводству (Рига).- 1999. - С.86-88.
2. Eyal-Giladi, H., and S. Kochav. 1976. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick // J. General morphology.- Dev. Biol. 49:321-337.
3. Hamburger, V., and H. L. Hamilton. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo // J. Morphol.- 88:49-92.
4. Ginsburg M. 1994 Primordial germ cell formation in birds. In: Ciba Foundation Symposium 182, Germline Development. Chichester Uk: John Wiley and Sons.- P.52-67.
5. Karagenc L.; Cinnamon Y.; Ginsburg M.; Petite J.N. 1996 Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. Developmental Genetics 19, 290-301.
6. Howarth B. 1995 Physiology of reproduction: the male. In: Poultry Production (edited by Hunton P.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B.V. P. 243-270.
7. Ukeshima A. 1994 Abandonment of germ cells in the embryonic chick ovary: TEM and SEM studies. Anatomical Record 240, 261-266.
8. Hughes G.C. 1963 The population of germ cells in the developing female chick // J. Embryology and Experimental Morphology 11.- 513-536.
9. Simkiss K. Asymmetrical Germ Cell Commitment in the avian Gonad VI International Symposium on Avian Endocrinology March 31-April 5, 1996 Chateau Lake Louise, Alberta.
10. Kagami H., Clark M.E., Verrinder Gibbins A.M. & Etches R.J. 1995 Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. Molecular Reproduction and Development, 42.- 379-387.
11. Petite, J. N., M. E. Clark, G. Liu, A. M. Verrinder Gibbins, and R. J. Etches. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. Development 108:185-189.
12. Thoraval, P., F. Lasserre, F. Coudert, and G. Dambrine. 1994. Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white leghorns by transfer of early blastodermal cells. Poult. Sci. 73:1897-1905.
13. Shaw, D. L., R. S. Carscience, R. J. Etches, and A. M. Verrinder Gibbins. 1992. The fate of female donor blastodermal cells in male chimeric chickens. Biochem. Cell. Biol. 70:1218-1229.
14. Kagami, H., T. Tagami, Y. Matsubara, T. Harumi, H. Hanada, K. Maruyama, M. Sakurai, T. Kuwana, and M. Naito. 1997. The developmental origin of

primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 48:501–510.

15. Bednarczyk, M., P. Lakota, R. Slomski, A. Plawski, D. Lipinski, B. Siemieniako, M. Lisowski, P. Czekalski, B. Grajewski, and P. Dluzniewska. 2002. Reconstitution of a chicken breed by inter se mating of germline chimeric birds. *Poult. Sci.* 81:1347–1353.

16. Naito, M., K. Nirasawa, and T. Oishi. 1992. Preservation of quail blastoderm cells in liquid nitrogen. *Br. Poult. Sci.* 33:449–453.

17. Кальченко Ю.В., Терещенко А.В. Совершенствование метода получения инъекционных химер кур // Птахівництво. - Харків. – 2003. – Вип.53. – С.433-436.

18. Kino, K., B. Pain, S. P. Leibo, M. Cochran, M. E. Clark, and R. J. Etches. 1997. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poult. Sci.* 76:753–760.

19. Pain, B., M. E. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut, and R. J. Etches. 1996. Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122:2339–2348.

20. Reynaud, G. 1969. The transfer of turkey primordial germ cells to chick embryos by intravascular injection // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 21:485–507.

21. Simkiss, K., K. Rowlett, N. Bumstead, and B. M. Freeman. 1989. Transfer of primordial germ cell DNA between embryos. *Protoplasma*, 151:164–166.

22. Wentworth, A. L., and B. C. Wentworth. 2000. The avian primordial germ cell...An enigma of germline evolution, development and immortality. *Avian Poult. Biol. Rev.* 11:173–282.

23. Song, Y., S. D'Costa, S. L. Pardue, and J. N. Petitte. 2005. Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion. *Mol. Reprod. Dev.* 70:438–444.

24. Mozdziak, P. E., J. Angerman-Stewart, B. Rushton, S. L. Pardue, and J. N. Petitte. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.* 84:594–600.

25. Chang, I. K., D. K. Jeong, Y. H. Hong, T. S. Park, Y. K. Moon, T. Ohno, and J. Y. Han. 1997. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* 21:495–499.

26. Han, J. Y., T. S. Park, Y. H. Hong, D. K. Jeong, J. N. Kim, K. D. Kim, and J. M. Lim. 2002. Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period // *Theriogenology*, 58:1531–1539.

27. Park, T. S., D. K. Jeong, J. N. Kim, G. H. Song, Y. H. Hong, J. M. Lim, and J. Y. Han. 2003. Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos // *Biol. Reprod.* 68:1657–1662.

28. Naito, M., A. Tajima, T. Tagami, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1994a. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring // *J. Reprod. Fertil.* 102:321–325.

29. Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1998. Production of germline chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gpgcs) in chicken // *J. Exp. Zool.* 280:265–267.

30. Rowlett, K., and K. Simkiss. 1987. Explanted embryo culture: In vitro and in ovo techniques for the domestic fowl. *Br. Poult. Sci.* 28:91–101.

ЗБЕРЕЖЕННЯ ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ПТАХІВ

М.Т.Тагіров, А.В.Терещенко, Інститут птахівництва УААН.

Дано аналіз сучасного стану проблеми збереження зародкової плазми птахів. Розглянуто такі об'єкти, як бластодермальні клітини, ембріональні стовбурові клітини і первинні зародкові клітини з погляду на їхнє використання як матеріалу для кріоконсервації. Дано оцінку методам використання химерних посередників для реалізації генетичного потенціалу матеріалу, що зберігається, виділені переваги і недоліки даних методів, намічені основні напрями їхнього подальшого удосконалення.

Ключові слова: первинні зародкові клітини, химери, генетичні ресурси, кріоконсервація, культивування клітин.

POULTRY GERM PLASMA STORAGE

M. Tagirov, A. Tereshchenko, the Institute of poultry breeding

This article the experimental research results on poultry germ plasma storage. Blastoderm embryonic germinal cells were investigated by freezing preservation. Temperate intermediates were evaluated by genetic resources storage. Advantage & drawbacks of the above-mentioned methods application were analyzed & the development trends were identified.

Key words: germinal cells, temperate intermediates, genetic resources, freezing preservation, cell cultivation

УДК 636.082.4

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ СМЕРТНОСТИ У МОЛОЧНЫХ КОРОВ

В.А. Титова, Х.Н. Насибов, С.Ф. Абилова

ГНУ ВИЖ Россельхозакадемия

В статье определена динамика эмбриональных потерь на начальных этапах стельности молочных коров. Установлено, что основными факторами, влияющими на эмбриональную смертность, являются возраст коров, уровень молочной продуктивности, сезон года, но не зависит она от породной принадлежности.

Основные эмбриональные потери приходились на 17 и 22 дни после осеменения, в дальнейшем они снижаются. Чем выше молочная продуктивность, тем чаще эмбриональные потери. Случаи эмбриональных потерь в летний период возрастают до 42,9 % и снижаются в стойловый - до 19,0-28,5 %

Ключевые слова: корова, уровень продуктивности, сезон года, возраст, эмбриональная смертность.

Эмбриональная смертность - основной фактор экономических потерь в скотоводстве [1]. Поэтому для выполнения программ по воспроизводству поголовья основное внимание должно быть сфокусировано на решении задач по минимизации эмбриональных потерь. Точно диагностировать сроки как ранней, так и поздней эмбриональной смертности, очень сложно. Индикатором времени эмбриональной гибели в период формирования жёлтого тела может служить удлинение межэстрального интервала [2]. Опыты с регулярным определением концентрации прогестерона в крови показали, что эмбриональная смертность, приходящаяся на