

## **ROLA INSTYTUTU ZOOTECHNIKI W ROZWOJU TECHNOLOGII KRIOKONSERWACJI MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO ZWIERZĄT GOSPODARSKICH ORAZ ICH WYKORZYSTANIE W OCHRONIE *EX SITU***

Monika Trzcńska, Magdalena Bryła

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,  
32-083 Balice k. Krakowa

*Ochrona ras zagrożonych pozwala na zachowanie unikatowych genotypów w hodowli oraz zabezpieczenie ich przed wyginieniem. Zadania związane z ochroną zasobów genetycznych poszczególnych gatunków i ras są rozszerzane o ochronę ex situ. Polega ona na gromadzeniu w bankach materiału biologicznego w postaci m.in.: gamet, zarodków, komórek somatycznych oraz tkanek. Przechowywany materiał może zostać użyty w technikach wspomaganego rozrodu lub w zaawansowanych procedurach, np. do klonowania. W Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym opracowano efektywne metody kriokonserwacji, które wykorzystywane są do gromadzenia materiału biologicznego i realizacji założeń programu ochrony ex situ zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w Polsce.*

*Słowa kluczowe: materiał biologiczny, kriokonserwacja, zwierzęta gospodarskie, ochrona ex situ*

Głównymi zagrożeniami wpływającymi na zmniejszenie bioróżnorodności zwierząt są zmiany środowiska, związane z negatywnym powiększaniem obszarów pod uprawę, jak również wprowadzenie do środowiska gatunków o cechach preferowanych przez człowieka. Duże znaczenie ma zatem ochrona zasobów genetycznych zwierząt ras rodzimych, które są doskonale przystosowane do miejscowych, często bardzo trudnych warunków środowiskowych i odznaczają się wysoką odpornością oraz zdrowotnością. Zwierzęta te mogą być utrzymywane przy ubogich zasobach paszowych w oparciu o trwałe użytki zielone, co daje również możliwość zagospodarowania i chronienia obszarów o dużych walorach krajobrazowych (Krupiński, 2012). Według World Conservation Union (IUCN) 30 000 gatunków zwierząt i roślin jest zagrożonych wyginieniem, co stanowi 27% wszystkich gatunków na Ziemi (<https://www.iucnredlist.org/>). Ich wyginiecie może w konsekwencji doprowadzić do nieodwracalnej w skutkach utraty bioróżnorodności.

W Polsce działania na rzecz ochrony zwierząt opierają się na ochronie *in situ*, czyli zachowaniu zwierząt w ich naturalnym środowisku, z ograniczonym wykorzystaniem metod hodowlanych. Przesłanką do oparcia ochrony zwierząt gospodarskich o metodę *in situ* była konieczność odbudowania liczebności ginących populacji. Hiemstra i in. (2014) zwrócili jednak uwagę na fakt, że przy planowaniu długofalowej ochrony zasobów genetycznych doskonale sprawdza się uzupełnianie metody *in situ* o metodę *ex situ*, która polega na gromadzeniu w bankach materiału biologicznego w postaci m.in.: gamet męskich i żeńskich, zarodków czy komórek somatycznych. Szczególnie jest to istotne w odniesieniu do ras rodzimych, u których niewielkie populacje są narażone na wysoki stopień zimbredowania i efekt dryfu genetycznego. W programach zachowania bioróżnorodności kriokonserwacja materiału genetycznego może być wykorzystywana jako metoda pomocnicza w utrzymaniu populacji zwierząt chronionych żyjących na wolności, rekonstrukcji ras w przypadku ich zanikania lub istotnego zmniejszenia liczebności zwierząt. Kriokonserwacja stwarza możliwość zarówno kolekcjonowania i przechowywania materiału biologicznego pochodzącego od zwierząt o unikatowych cechach użytkowych i adaptacyjnych przez nieograniczony czas, jak również pozwala na racjonalne sterowanie rozrodem oraz w sposób istotny wpływa na postęp hodowlany i zachowanie genetycznie uwarunkowanej różnorodności. Ponadto ochrona *ex situ* jest jedyną metodą pozwalającą na zgromadzenie unikatowego materiału genetycznego i jego wykorzystanie po śmierci dawcy.

Na konferencji Narodów Zjednoczonych – Środowisko i Rozwój w Rio de Janeiro, która odbyła się w 1992 roku, 167 krajów zrzeszonych w ONZ podpisało Konwencję o Różnorodności Biologicznej i podjęto międzynarodowe działania na rzecz ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich ([www.cbd.int](http://www.cbd.int)). Polska ratyfikowała tę konwencję, a na mocy rozporządzenia MRiRW z dnia 6 czerwca 2008 r. (Dz. U. Nr 108, poz. 691) Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy został podmiotem upoważnionym do koordynacji działań związanych z ochroną zasobów genetycznych w Polsce oraz gromadzeniem i przechowywaniem materiału biologicznego pochodzącego od poszczególnych gatunków zwierząt gospodarskich.

Początki ochrony *ex situ* zasobów genetycznych w Instytucie Zootechniki sięgają lat 60. Ministerstwo Rolnictwa w roku 1968 powołało w Instytucie Centralny Bank Nasienia (CBN) (obecna nazwa Bank Materiałów Biologicznych). Głównym zadaniem CBN było przechowywanie nasienia od młodych buhajów, które początkowo dostarczano do CBN ze wszystkich zakładów unasienniania w Polsce. Ponadto, z uwagi na rozwijający się import nasienia Ministerstwo Rolnictwa zleciło CBN prowadzenie oceny i kwalifikacji tego nasienia do inseminacji w kraju. W roku 1968 zdeponowano w CBN pierwszy materiał biologiczny w postaci nasienia pochodzącego od buhaja rasy polskiej czerwonej. W ciągu 60 lat funkcjonowania banku jego zasoby były sukcesywnie powiększane o nasienie buhajów ras: polskiej czerwonej, polskiej czerwono-białej, polskiej czarno-białej oraz białogrzbiętej.

Dzięki temu powstała unikatowa i jedyna w Polsce kolekcja materiału biologicznego, oryginalna zarówno pod względem genotypu, jak i ilości zgromadzonego materiału. W chwili obecnej kolekcja Banku Materiałów Biologicznych składa się z 63 240 porcji nasienia pochodzącego od 165 buhajów ras rodzimych. Większość materiału

stanowi nasienie pozyskane przed wdrożeniem prac hodowlanych, a więc materiał pochodzący od zwierząt niepoddanych wypierającemu krzyżowaniu z wysoko wydajnymi rasami bydła mlecznego. Zgromadzona kolekcja materiału biologicznego ras rodzimych jest wykorzystywana jako element działań w programach hodowlanych w zakresie ochrony *in situ* zasobów genetycznych bydła w Polsce (tab. 1).

W 2014 roku w ramach Instytutu Zootechniki PIB powstał Krajowy Bank Materiałów Biologicznych (KBMB) mający na celu gromadzenie materiału biologicznego w postaci nasienia oraz zarodków i oocytów pochodzącego od kilku gatunków zwierząt gospodarskich: świń, koni, owiec i kóz oraz bydła. Do dnia dzisiejszego w KBMB zgromadzono nasienie buhajów oraz zarodki świń puławskiej i złotnickiej pstrej. Należy zaznaczyć, że technologie dotyczące kriokonserwacji nasienia m.in.: nasienia tryków (Kareta i Wierzbowski, 1993; Gogol i in., 2019) oraz knurów (Trzcińska i Bryła, 2015), jak i zamrażanie zarodków świń były rozwijane od wielu lat w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji. Prowadzone w ostatnim czasie badania nad kriokonserwacją nasienia knura doprowadziły do uzyskania w 2018 roku patentu nr PL 228192 B1 na wynalazek „Rozcieńczalnik do mrożenia nasienia knura i sposób mrożenia nasienia”. Dzięki opatentowanej metodzie możliwe jest uzyskanie wysokiej jakości nasienia po mrożeniu i jego wykorzystanie w programach ochrony zasobów genetycznych, jak i specjalistycznych programach hodowlanych mających na celu zachowanie w hodowli wybranych cech, również tych utraconych w wyniku intensywnej hodowli (Trzcińska i in., 2015). Ponadto zabezpieczenie materiału biologicznego świń jest problemem aktualnym ze względu na wzrost ryzyka eliminacji całych stad w momencie pojawienia się ogniska afrykańskiego pomoru świń (ASF). Problem ten w szczególności dotyczy nielicznych i mocno spokrewnionych stad ras rodzimych świń tj.: puławskiej, złotnickiej pstrej i złotnickiej białej. Zgromadzenie materiału biologicznego w postaci nasienia knurów tych ras jest jedyną możliwością zabezpieczenia puli genetycznej populacji na wypadek jej zubożenia, spadku zmienności czy wyginięcia.

W celu uzyskania wysokiej jakości nasienia po rozmrożeniu stosuje się selekcję samców, a także ejakulatów, przeznaczonych do kriokonserwacji. Dobór właściwych samców do mrożenia nasienia jest stosunkowo łatwy w przypadku dużej populacji zwierząt. Jednak u gatunków zwierząt zagrożonych lub hodowlanych, objętych programami zachowania bioróżnorodności, mamy do czynienia z niską liczbą samców w populacji, wśród której wybór odpowiedniego dawcy nasienia o wysokiej krioporności może być utrudniony. Dlatego w Instytucie prowadzone są badania nad opracowaniem skutecznych metod kriokonserwacji nasienia samców niezależnie od jakości materiału biologicznego. W tym celu stosuje się nowe rozwiązania technologiczne z wykorzystaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (ang. high hydrostatic pressure, HHP) (Bryła i Trzcińska, 2018) do poprawy jakości gamet męskich i żeńskich, jak również zarodków (Pribenszky i in., 2010) oraz komórek macierzystych (Dinnyes i in., 2010). Dotychczasowe badania wykazały, że zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w technikach wspomaganego rozrodu poprawia kriotolerancję oocytów, blastocyst (Pribenszky i in., 2008), a także plemników (Pribenszky i in., 2008; Huang i in., 2009).

Tabela 1. Izolowany materiał biologiczny zgromadzony w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym  
 Table 1. Biological material stored at the National Research Institute of Animal Production

Gatunek Species	Nazwa rasy Name of breed	Rodzaj materiału Type of material	Liczba słomek lub kulek Number of straws/pellets	Liczba dawców Number of male donors	Liczba dawczyń Number of female donors	Data pierwszego zdeponowania First year of storage	Data ostatniego zdeponowania Last year of storage
<b>BYDŁO CATTLE</b>	POLSKA CZERWONA POLISH RED	nasienie semen	48211	127	–	1966	2003
	POLSKA CZARNO-BIAŁA POLISH BLACK AND WHITE		9522	16	–	1973	1985
	POLSKA CZERWONO-BIAŁA POLISH RED AND WHITE		5457	21	–	1974	2001
	BIAŁOGRZBIETE WHITEBACKS		50	1	–	2007	2007
<b>BANK MATERIALÓW BIOLOGICZNYCH BANK OF BIOLOGICAL MATERIAL</b>							
<b>BYDŁO CATTLE</b>	POLSKA CZERWONA POLISH RED	nasienie semen	10725	53	–	2006	2017
	POLSKA CZARNO-BIAŁA POLISH BLACK AND WHITE		2870	16	–	2009	2017
	POLSKA CZERWONO-BIAŁA POLISH RED AND WHITE		3989	19	–	2008	2017
	BIAŁOGRZBIETE WHITEBACKS		1933	34	–	2005	2018
<b>KRAJOWY BANK MATERIALÓW BIOLOGICZNYCH NATIONAL BANK OF BIOLOGICAL MATERIAL</b>							
<b>BYDŁO CATTLE</b>	SIMENTAL SIMMENTAL		860	4	–	2009	2016
	LIMOUSINE LIMOUSINE		200	1	–	2018	2018

POLSKA HOLSZTYŃSKO-FRY- ZYJSKA ODMIANA CZARNO-BIAŁEJ POLISH HOLSTEIN-FRIESIAN BLACK AND WHITE	2298	3	–	2007	2011
POLSKA HOLSZTYŃSKO-FRY- ZYJSKA ODMIANA CZERWONO-BIAŁEJ POLISH HOLSTEIN-FRIESIAN RED AND WHITE	14714	14	–	2009	2014
PUŁAWSKA PULAWSKA	143	4	15	2017	2018
ZŁOTNICKA PSTRĄ ZŁOTNICKA SPOTTED	34	2	3	2018	2018
<b>ŚWINIE</b> <b>PIGS</b>					
				zarodki	
				embryos	

W odniesieniu do świń ogromne znaczenie miało również opracowanie metody wtryfikacji zarodków świni w wybranych mieszaninach wtryfikacyjnych (Gajda i Smorąg, 2002) uzyskanych *in vitro* i *in vivo* (Gajda i Smorąg, 2004). W wyniku prowadzonych badań w 2003 roku uzyskano pierwsze w Polsce potomstwo po transplatacji wtryfikowanych zarodków świni (Gajda i Smorąg, 2004). W kolejnych latach podjęto badania, które pozwoliły na określenie ilości i jakości związków lipidowych w poszczególnych stadiach rozwojowych zarodków świni uzyskanych *in vivo* i po hodowli *in vitro* (Romek i in., 2009, 2010, 2011a, b), oraz wpływu warunków hodowli zarodków świni na ich podatność na kriokonserwację (Gajda i Smorąg, 2002).

Oprócz badań nad doskonaleniem techniki kriokonserwacji prowadzono prace mające na celu opracowanie wiarygodnych, kompleksowych metod oceny jakości materiału biologicznego. W perspektywie długoterminowego przechowywania materiału biologicznego istotne jest, aby gromadzony materiał biologiczny był możliwie wszechstronnie oceniony pod względem jakości. Skuteczność wykorzystania w praktyce zgromadzonego materiału biologicznego zależy bowiem od jego jakości wyjściowej.

Stosowane w Instytucie kompleksowe metody diagnostyki andrologicznej opierają się nie tylko na standardowych metodach oceny ruchliwości oraz morfologii za pomocą systemu CASA (ang. Computer Assisted Sperm Analysis), ale również na ocenie fluorescencyjnej zmian apoptotycznych. Opracowano metody oceny zmian apoptotycznych plemników jako wyznacznika ich zdolności zapładniającej (Trzcńska i in., 2011). Z badań własnych wynika, że wykrywanie zmian apoptotycznych w plemnikach pozwala na określenie ich zdolności zapładniających *in vivo* (Bryła i Trzcńska, 2015; Bryła i in., 2009; Trzcńska i in., 2011; Trzcńska i in., 2015; Trzcńska i Bryła, 2015). W czasie procesu apoptozy dochodzi do otwarcia megakanałów mitochondrialnych i spadku mitochondrialnego potencjału transbłonowego. Badania własne (Trzcńska i in., 2008) na plemnikach knura wykazały pozytywną korelację pomiędzy ruchem, spadkiem potencjału mitochondrialnego a odsetkiem plemników apoptotycznych. Otwarcie megakanałów i wypływ jonów wapnia z mitochondriów poprzedzają inne zmiany charakterystyczne dla apoptozy, takie jak kondensacja chromatyny oraz fragmentacja DNA. Ocenę struktury chromatyny plemnikowej wykonuje się metodą Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) (Bochenek i in., 2001; Gogol i in., 2000; Gogol i in., 2002). Badania przeprowadzone przez Bochenek i in. (2001) wykazały występowanie wysokiej korelacji pomiędzy wrażliwością chromatyny plemnikowej buhajów na denaturację a płodnością uzyskiwaną po inseminacji tym nasieniem. Fragmentację DNA plemników ocenia się za pomocą metody TUNEL (ang. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Badania własne na nasieniu knura wykazały, że procedura zamrażania-rozmrażania plemników nie indukuje fragmentacji DNA (Trzcńska i Bryła, 2015).

W Instytucie prowadzono również badania nad wpływem czynników środowiskowych i technologicznych na stabilność błon plazmatycznych plemników oraz emisji fotonowej jako biofizycznego zjawiska związanego z intensywnością i prawidłowością procesów metabolicznych zachodzących w komórce. Wykonane prace wykazały przydatność pomiaru emisji fotonowej z plemników do oceny jakości nasienia (Gogol i in., 2007; Gogol i in., 2009).

Wielokierunkowa działalność Instytutu polegająca na opracowaniu i zastosowaniu biotechnologicznych metod w rozrodzie zwierząt oraz gromadzeniu materiału biologicznego pozwala na realizację założeń programu ochrony *ex situ* zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w Polsce.

### Piśmiennictwo

- Bochenek M., Smorąg Z., Pilch J. (2001). Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56 (4): 557–567.
- Bryła M., Trzcńska M. (2015). Quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics. *Anim. Reprod. Sci.*, 163: 157–163.
- Bryła M., Trzcńska M. (2018). The effect of hydrostatic pressure treatment (HHP) on quality of poor boar ejaculates after cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.*, 53 (2): 114.
- Bryła M., Trzcńska M., Wieczorek J. (2009). Analysis of in vivo- and in vitro-derived pig expanded blastocysts based on DNA fragmentation. *Anim. Sci. Pap.*, 27 (1): 59–68.
- Dinnyes A., Polgar Z., Pribenszky C., Pírity M.K. (2010). Improved embryoid body cryopreservation and cardiomyocyte differentiation following high hydrostatic pressure treatment. *Proc. 1st Int. Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs, Valencia, Spain (CometMed, Israel), A-7*.
- Gajda B., Smorąg Z. (1998). Kriokonserwacja oocytów i zarodków ssaków. *Biotechnologia*, 2: 10–32.
- Gajda B., Smorąg Z. (2002). Vitrification of cultured and non-cultured expanded and hatched blastocysts. *Cryolett.*, 23: 385–388.
- Gajda B., Smorąg Z. (2004). Cells number in pig blastocyst cultured in different media. *Ann. Anim. Sci.*, 4: 315–320.
- Gogol P., Bochenek M., Smorąg Z. (2000). Sperm chromatin integrity of bucks transgenic for the WAPbGH gene. *Anim. Reprod. Sci.*, 64 (1-2): 113–120.
- Gogol P., Bochenek M., Smorąg Z. (2002). Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod. in Domest. Anim.*, 37: 92–95.
- Gogol P., Wierchoś-Hilczer A., Cegła M. (2007). Iron-induced luminescence as a method for assessing lipid peroxidation of frozen-thawed goat spermatozoa. *Animal*, 1 (6): 844–848.
- Gogol P., Szczęśniak-Fabiańczyk B., Wierchoś-Hilczer A. (2009). The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod. Biol.*, 9 (1): 39–49.
- Gogol P., Bryła M., Trzcńska M., Bochenek M. (2019). Quality parameters and fertility of ram semen cryopreserved in egg yolk and soybean lecithin supplemented extenders. *Pol. J. Vet. Sci.*, 22 (1): 177–179.
- Hiemstra S.J., Martyniuk E., Duchev Z., Begemann F. (2014). European Gene Bank Network for Animal Genetic Resources (EUGENA). *Proc. 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, <http://www.racesdefrance.fr/bovins/tres-faible-effectif>
- Huang S.Y., Pribenszky C., Kuo Y.H., Teng S.H., Chen Y.H., Chung M.T., Chiu Y.F. (2009). Hydrostatic pressure affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, 112: 136–149.
- Kareta W., Wierzbowski S. (1993). An assessment of sperm motility estimation for evaluation of rams. *Theriogenology*, 40 (1): 205–209.
- Krupiński J. (2012). *Polskie rasy zachowawcze. Atlas zwierząt gospodarskich objętych programem ochrony w Polsce*, 114 ss.
- Pribenszky C., Du Y., Molnár M., Harnos A., Vajta G. (2008). Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim. Reprod. Sci.*, 106: 200–207.
- Pribenszky C., Vajta G., Molnár M., Du Y., Lin L., Bolund L., Yovich J. (2010). Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol. Reprod.*, 83: 690–697.

- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Smorąg Z. (2009). Lipid content in non-cultured and cultured pig embryo. *Reprod. Dom. Anim.*, 44: 24–32.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Smorąg Z. (2010). Changes of lipid composition in non-cultured and cultured pig embryos. *Theriogenology*, 74: 265–276.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kępczyński M., Smorąg Z. (2011a). Lipid content in pig blastocysts cultured in the presence or absence of protein and vitamin E or phenazine ethosulfate. *Folia Biologica (Kraków)*, 59: 45–52.
- Romek M., Gajda B., Rolka M., Smorąg Z. (2011b). Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and preimplantation non-cultured and cultured embryos. *Reprod. Domest. Anim.*, 46: 471–480.
- Trzcińska M., Bryła M. (2015). Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Pol. J. Vet. Sci.*, 18 (3): 473–480.
- Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z. (2008). Effect of liquid storage on membrane integrity and mitochondrial activity: a new diagnostic method of evaluating boar sperm quality. *J. Anim. Feed. Sci.*, 17: 372–380.
- Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z. (2011). Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced *in vivo*. *Anim. Reprod. Sci.*, 124 (1–2): 90–97.
- Trzcińska M., Bryła M., Gajda B., Gogol P. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, 83: 307–313.

Zatwierdzono do druku: 10 VII 2020

MONIKA TRZCIŃSKA, MAGDALENA BRYŁA

**The role of the National Research Institute of Animal Production in the development of cryopreservation technology of livestock biological material and its use in *ex situ* conservation**

SUMMARY

The protection of endangered breeds allows for the preservation of unique genotypes in breeding and protection against extinction. Tasks related to the protection of genetic resources of individual species and breeds are extended to *ex situ* conservation. It involves collecting biological material in banks in the form of semen, gametes, embryos, somatic cells and tissues. The stored material can be used in assisted reproduction techniques or advanced procedures, e.g. for cloning. Effective cryopreservation methods have been developed at the National Research Institute of Animal Production to collect biological material and implement the objectives of the *ex situ* conservation program for livestock genetic resources in Poland.

Key words: biological material, cryopreservation, livestock, *ex situ* conservation