

ROLA KRIOBANKÓW LINII KOMÓRKOWYCH W PROGRAMACH ZACHOWANIA RÓŻNORODNOŚCI BIOLOGICZNEJ SSAKÓW I PTAKÓW HODOWLANYCH*

Marcin Samiec*, Monika Trzcńska*

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

E-mail: marcin.samiec@iz.edu.pl; E-mail: monika.trzcinska@iz.edu.pl

*Marcin Samiec i Monika Trzcńska przyczynili się do powstania tego artykułu naukowego w jednakowym stopniu (równy wkład autorski).

Marcin Samiec ORCID: 0000-0002-4060-1893

Monika Trzcńska ORCID: 0000-0001-9758-1304

Abstrakt

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie obecnego stanu badań oraz rolniczych, biologicznych i biotechnologicznych uwarunkowań, a także roli Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego (IZ-PIB) w zakresie generowania biorepozytoriów w postaci kriokonserwowanych linii komórek somatycznych i zarodkowych komórek macierzystych pochodzenia blastodermalnego wybranych gatunków ssaków i ptaków hodowlanych. Wymienione wyżej repozytoria biologiczne stanowią nowatorski instrument badawczy kriogenicznie wspomaganej, gatunkowo-specyficznej ochrony ex situ, zapewniający – w sze-

*Niniejsza praca naukowa uzyskała finansowanie ze środków zadania badawczego nr 04-19-13-11 w ramach Funduszu Badań Własnych Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego (IZ-PIB).

rokiem horyzoncie czasowym – nie tylko przywracanie, lecz również utrzymanie stabilnej bioróżnorodności leżącej u podstaw genotypowej i fenotypowej zmienności wewnątrz- i międzypopulacyjnej w stadach zarodowych krajowych ras zachowawczych zwierząt gospodarskich.

Słowa kluczowe: biorepozytoria, linie komórkowe, komórki somatyczne, zarodkowe komórki macierzyste, ssaki i ptaki hodowlane

Wstęp

Gwałtowny lub postępujący spadek liczebności osobników w krajowych subpopulacjach ras zachowawczych wybranych gatunków zwierząt gospodarskich (owce, kozy, bydło, świnie, kaczki) generuje osłabienie zjawiska dryftu genetycznego między subpopulacjami rzadkich rodzimych ras oraz erozję genetyczną prowadzącą do obniżenia poziomu wewnątrzpopulacyjnej i międzyosobniczej zmienności genotypowej (Woelders i in., 2012; Bolton i in., 2022; Sun i in., 2022). Z kolei, relatywnie lub skrajnie niski stopień genetycznej zmienności w utrzymywanych subpopulacjach ras zachowawczych wybranych gatunków zwierząt gospodarskich prowadzi do drastycznego osłabienia wewnątrz- i międzypopulacyjnej różnorodności biologicznej, co kwalifikuje te rasy zachowawcze do grupy ras rzadkich lub zagrożonych wyginięciem (Rege i Gibson, 2003; Blackburn, 2006). Z wymienionych wyżej powodów istotnym kierunkiem działań podejmowanych przez Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy (IZ-PIB) w Balicach jest przywrócenie i ustabilizowanie genetycznej bioróżnorodności w subpopulacjach zagrożonych wyginięciem, autochtonicznych ras wybranych gatunków zwierząt hodowlanych poprzez odtworzenie stad zarodowych i zwiększenie liczebności osobników w poszczególnych subpopulacjach tych ras za pośrednictwem strategicznych i innowacyjnych rozwiązań biotechnologii reprodukcyjnej zwierząt gospodarskich i embriologii stosowanej w praktyce rolniczej (Trzcńska i Samiec, 2021).

Wymierną korzyścią wynikającą z takich działań jest trwałe zachowanie biotechnologicznej ochrony *ex situ* oraz zwiększenie poziomu bioróżnorodności genotypowej rzadkich, rodzimych ras zachowawczych wybranych gatunków zwierząt gospodarskich poprzez kompleksowe wdrażanie rozwiązań z zakresu technologii wspomaganego rozrodu zwierząt oraz genetycznej inżynierii embrionalnej (Samiec i Trzcńska, 2022).

Dlatego też nadrzędnym celem tego artykułu naukowego jest zaprezentowanie szerokiego spektrum możliwości aplikacyjnych prac badawczych, podejmowanych przez IZ-PIB w zakresie tworzenia biorepozytoriów w postaci kriokonserwowanych linii komórek somatycznych i zarodkowych komórek macierzystych pochodzenia blastodermalnego wybranych gatunków ssaków i ptaków hodowlanych.

Zastosowanie nowatorskich technologii wspomaganego rozrodu oraz genomowej inżynierii zarodkowej w ochronie genetycznych zasobów krajowych ras zachowawczych wybranych gatunków zwierząt gospodarskich

Priorytetowym kierunkiem badań prowadzonych w IZ-PIB jest tworzenie genetycznych rezerw w postaci kriogenicznie zabezpieczonych linii komórek somatycznych oraz zarodkowych komórek macierzystych (wywodzących się z blastodermi tarczki zarodkowej/embriodysków zapłodnionych jaj ptasich) na potrzeby przywracania i genotypowej/fenotypowej stabilizacji różnorodności biologicznej wśród nielicznych subpopulacji rzadkich, rodzimych ras zachowawczych. Te ostatnie obejmują wybrane gatunki ssaków i ptaków hodowlanych, takie jak: owca wrzosówka, owca romanowska, merynos w starym typie, koza karpacka, bydło polskie czerwone, świnia puławska, świnia złotnicka pstra, kaczka w typie pomniejszonym K-2, pekin krajowy P-33, pekin angielski – linia syntetyczna Ls-A, pekin duński P-8, pekin francuski P-9, mieszaniec Kh0-01. Ów strategiczny model prac badawczych jest wdrażany w sektorze rolniczym i agrobiotechnologicznym poprzez rozwiązania z zakresu innowacyjnych technologii wspomaganego rozrodu oraz genetycznej inżynierii zarodkowej zwierząt gospodarskich, które zostały kompleksowo opracowane w IZ-PIB. Do wymienionych działań w ramach biotechnologii reprodukcyjnej oraz embriologii stosowanej należą pozaustrojowe uzyskiwanie zarodków (IVP; ang. *in vitro embryo production*) w oparciu o takie procedury badawcze jak: klonowanie somatyczne, a także zapłodnienie pozaustrojowe technikami współinkubacji gamet (IVF) oraz docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI), czy też mikroniekcja egzogenego DNA lub RNA do zapłodnionych komórek jajowych (zygot) (Mara i in., 2013; Kikuchi i in., 2016; Ryder i Onuma, 2018). Wyżej wspomniane nowoczesne instrumenty biotechnologii rozrodu zwierząt hodowlanych mogą być wdrażane: 1) w programach odtwarzania stad zarodowych zagrożonych wyginięciem, autochtonicznych ras tych zwierząt, a także 2) w programach przywracania

i stabilizacji genetycznej bioróżnorodności w ekosystemach rolniczych, których nisze są rezerwuarem i środowiskiem bytowania odtworzonych subpopulacji endemicznych ras wybranych gatunków zwierząt gospodarskich (Caroli i Pizzi, 2012; Smits i in., 2012; Hu i in., 2022).

Opracowanie efektywnych metod pozyskiwania i kriogenicznego zabezpieczania materiałów biologicznych w postaci linii komórek somatycznych jest warunkiem *sine qua non* nie tylko utworzenia rezerw genetycznych wybranych gatunków i ras zwierząt gospodarskich, lecz również późniejszego wykorzystania tych materiałów biologicznych w innowacyjnych technologiach wspomaganego rozrodu zwierząt (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*). Te ostatnie dotyczą klonowania techniką transplantacji jąder komórek somatycznych (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*), zapłodnienia *in vitro* technikami IVF oraz ICSI, a także procedur inżynierii genomu zarodkowego (ang. *embryonic genome engineering*), takich jak doprzedjądrzowa lub docytoplazmatyczna mikroiniekcja konstrukcji genowych do zygot (Men i in., 2012; Enya i in., 2016; Gavin-Plagne i in., 2020). Wśród potencjalnych korzyści leżących u podstaw przywrócenia i ustabilizowania bioróżnorodności oraz nasilenia częstości dryftu genetycznego między krajowymi subpopulacjami rzadkich i ginących ras zachowawczych – za pośrednictwem metod biotechnologii reprodukcyjnej i embriologii stosowanej – będzie zapewnienie trwałości ochrony cennych zasobów genetycznych w postaci endemicznych ras zwierząt gospodarskich (Liu i in., 2008; Chen i in., 2018; Dua i in., 2021; Soglia i in., 2021). Taka biotechnologiczna ochrona genotypowo-fenotypowa *ex situ* zagrożonych wyginięciem ras ssaków i ptaków hodowlanych wpisuje się również w zakres zrównoważonej ochrony środowiska bytowania zwierząt hodowlanych w ekosystemach rolniczych, a także długotrwałego zachowania i stabilnego utrzymania dynamicznej równowagi ekologicznej między środowiskiem naturalnym a antropogenicznymi ekosystemami gospodarstw rolniczych (Bai i in., 2011; León-Quinto i in., 2014; Silyukova i in., 2020; Elyasi Gorji i in., 2021; Son i in., 2021; Bolton i in., 2022).

Generowanie repozytoriów biologicznych w postaci kriogenicznie zabezpieczonych linii komórkowych dla celów biotechnologii rolniczej i reprodukcyjnej wybranych gatunków ssaków i ptaków hodowlanych

W IZ-PIB skutecznie zainicjowano działalność naukowo-badawczą w zakresie funkcjonowania repozytoriów materiału biologicznego w posta-

ci kriogenicznie zabezpieczonych zasobów hodowanych *in vitro* komórek somatycznych oraz zarodkowych komórek macierzystych, pochodzących odpowiednio: od zagrożonych wyginięciem krajowych ras owiec, kóz, bydła i świń oraz od krajowych stad zarodowych różnych ras kaczek domowych. Efektywne funkcjonowanie biorepozytoriów IZ-PIB, ze zdeponowanymi *ex situ*, kriokonserwowanymi hodowlami pierwotnymi i liniami komórek somatycznych ginących, endemicznych ras zwierząt gospodarskich, w tym przedstawicieli małych i dużych przeżuwaczy, tj. odpowiednio: owiec, kóz oraz bydła, a także świń i kaczek domowych, pozwoli na poszerzenie możliwości potencjału aplikacyjnego działań z zakresu ochrony *ex situ* zabezpieczonych kolekcji rezerw genetycznych (Li i in., 2009a; Liu i in., 2014; Ryder i Onuma, 2018; Elyasi Gorji i in., 2021). Działania te mogą być w przyszłości ukierunkowane na opracowanie programów odtworzenia zagrożonych wyginięciem stad zwierząt hodowlanych. Niniejsze programy mogą być skutecznie realizowane poprzez wykorzystanie zgromadzonych biorepozytoriów komórek somatycznych na potrzeby takich technologii wspomaganego rozrodu ssaków jak: wewnątrzgatunkowe klonowanie somatyczne w wariantach: wewnątrz- i międzyrasowym, a także międzygatunkowe klonowanie somatyczne – jako narzędzie biotechnologii reprodukcyjnej, oferujące ostatnią szansę na przywrócenie danej rasy do ekosystemu rolniczego (Li i in., 2009b; Zhang i in., 2012; Hu i in., 2013; Yang i in., 2016).

Do chwili obecnej wyprowadzono z biopłatów tkankowych ucha zewnętrznego (eksplantów tkanki skórno-powłokowej małżowin usznych), a następnie kriogenicznie zabezpieczono stabilne, pod względem aktywności podziałowej:

- 1) hodowle pierwotne dermalnych komórek fibroblastycznych, pochodzących od 6 młodocianych osobników owcy rasy wrzosówka (3 macierek-dawczyń i 3 tryczków-dawców materiału biologicznego) – ogółem, w ramach biorepozytorium dedykowanego dla owiec rasy wrzosówka zgromadzono zasoby genetyczne w postaci 15 subpopulacji komórkowych;
- 2) linie klonalne dermalnych komórek fibroblastycznych, pochodzących od 6 młodocianych osobników owcy rasy romanowskiej (3 macierek-dawczyń i 3 tryczków-dawców materiału biologicznego) – ogółem, w ramach biorepozytorium dedykowanego dla owiec rasy romanowskiej zgromadzono zasoby genetyczne w postaci 32 subpopulacji komórkowych;
- 3) linie klonalne dermalnych komórek fibroblastycznych, pochodzących od 6 młodocianych osobników owcy rasy merynos w starym typie (3 macierek-dawczyń i 3 tryczków-dawców materiału biologicznego) –

ogółem, w ramach biorepozytorium dedykowanego dla owiec rasy merynos w starym typie zgromadzono zasoby genetyczne w postaci 22 subpopulacji komórkowych;

- 4) hodowle pierwotne dermalnych komórek fibroblastycznych, pochodzących od 6 młodocianych osobników kozy rasy karpackiej (3 maciorek-dawczyń i 3 koziołków-dawców materiału biologicznego) – ogółem, w ramach biorepozytorium dedykowanego dla kóz rasy karpackiej zgromadzono zasoby genetyczne w postaci 13 subpopulacji komórkowych;
- 5) linie klonalne dermalnych komórek fibroblastycznych, pochodzących od dojrzałych reprodukcyjnie osobników bydła polskiego czerwonego (5 krów-dawczyń materiału biologicznego) – ogółem, w ramach biorepozytorium dedykowanego dla bydła polskiego czerwonego zgromadzono zasoby genetyczne w postaci 45 subpopulacji komórkowych;
- 6) linie klonalne dermalnych komórek fibroblastycznych, pochodzących od 11 dojrzałych reprodukcyjnie osobników świni rasy puławskiej (10 loch-dawczyń i 1 knura-dawcy materiału biologicznego) – ogółem, w ramach biorepozytorium dedykowanego dla świń rasy puławskiej zgromadzono zasoby genetyczne w postaci 71 subpopulacji komórkowych.
- 7) linie klonalne dermalnych komórek fibroblastycznych, pochodzących od dojrzałych reprodukcyjnie osobników świni rasy złotnickiej pstrej (6 loch-dawczyń materiału biologicznego) – ogółem, w ramach biorepozytorium dedykowanego dla świń rasy złotnickiej pstrej zgromadzono zasoby genetyczne w postaci 22 subpopulacji komórkowych.

Wszystkie wyprowadzone z eksplantów małżowin usznych subpopulacje fibroblastów dermalnych, niezależnie od pochodzenia gatunkowego, rasowego, osobniczego (ontogenetycznego), a także kryteriów przedziału wiekowego oraz płci biologicznej (genetycznej), charakteryzowały się wysoką przeżywalnością i zdolnością adhezji komórkowej do kolagenowego substratu naczynek hodowlanych. Ponadto, znamioną cechą hodowanych *in vitro* komórek fibroblastycznych wywodzących się od osobników wyżej wspomnianych ras owiec, kóz, bydła i świń był wysoki potencjał proliferacyjny. Potencjał ten znajdował odzwierciedlenie nie tylko w dynamicznej i stabilnej kinetyce podziałów mitotycznych, lecz również w szybkim tempie synchronizacji cyklu mitotycznego komórek w fazach G1/G0 wskutek zahamowania, czyli inhibicji kontaktowej ich migracji oraz aktywności podziałowej po osiągnięciu stanu pełnej konfluencji, tj. stanu, w którym gęstość hodowanych komórek limituje ich proliferacyjny wzrost.

Tabela 1. Specyfikacja kriogenicznie zabezpieczonego materiału biologicznego w postaci subpopulacji komórek somatycznych zdeponowanych w biorepozytoriach IZ-PIB

Table 1. Specifying the cryogenically preserved biological material in the form of somatic cell subpopulations deposited in the biorepositories collected within the framework of the National Research Institute of Animal Production in Poland

Gatunek Species	Rasa Breed	Rodzaj i pochodzenie namnożonych <i>in vitro</i> komórek somatycznych The type and origin of <i>in vitro</i> -proliferated somatic cells	Liczba zamrożonych subpopulacji komórkowych Number of cryopreserved cell subpopulations	Liczba samic- dawczyń biopłatów tkankowych Number of female donors of tissue bioplates	Liczba samców dawców biopłatów tkankowych Number of male donors of tissue bioplates
Bydło Cattle	Polskie czerwone Polish Red		45	5	–
Świnie Pigs	Puławska	Mitotycznie stabilne hodowle pierwotne i/lub klonalne linie komórek	71	10	1
	Złotnicka pstra Złotnicka Spotted	fibroblastycznych tkan- ki skórno-powłokowej	22	6	–
Owce Sheep	Wrzosówka Polish Heath		15	3	3
	Romanowska Romanov	Mitotically stable primary cultures and/or clonal lines of fibroblast	32	3	3
	Merynos w starym typie Old-type Merino	cells derived from dermo-integumentary system	22	3	3
Kozy Goats	Karpacka Carpathian		13	3	3

Działania ukierunkowane na uruchomienie struktury organizacyjnej i opracowanie warsztatu biotechnologicznego z wykorzystaniem technik wyprowadzania i kriogenicznego zabezpieczania zasobów hodowanych *in vitro* komórek somatycznych oraz zarodkowych komórek macierzystych, pochodzących od zagrożonych wyginięciem krajowych ras ssaków i ptaków hodowlanych posłużyły lub posłużą do stworzenia efektywnie funkcjonujących, a także unikatowych w skali krajowej i ogólnoeuropejskiej biorepozytoriów IZ-PIB. W ramach tych repozytoriów biologicznych zgromadzono rezerwy genetyczne w postaci zdeponowanych *ex situ*, kriokonserwowanych hodowli pierwotnych i/lub linii fibroblastów dermalnych, pochodzących od owiec takich ras zachowawczych jak: wrzosówka, romanowska i merynos w starym typie oraz od kóz rasy karpackiej i bydła polskiego czerwonego, a także linii fibroblastów dermalnych, pochodzących od zagrożonych wyginięciem świń rasy puławskiej oraz złotnickiej pstrej (tab. 1). Zorganizowanie i utrzymanie bazy infrastrukturalno-technologicznej biorepozytoriów IZ-PIB, z kriogenicznie zabezpieczonymi zasobami

komórek somatycznych, jest doskonałym narzędziem biotechnologicznej ochrony *ex situ* oraz genetycznego ratowania ginących, endemicznych ras zwierząt hodowlanych dla potrzeb zachowania trwałej i stabilnej bioróżnorodności w antropogenicznych ekosystemach rolniczych.

Ponadto, na obecnym etapie prowadzone są badania zmierzające do utworzenia – dedykowanych ptakom hodowlanym – biorepozytoriów w postaci kriogenicznie zabezpieczonych linii zarodkowych komórek macierzystych (ESCs; ang. *embryonic stem cells*), wywodzących się z blastodermy tarczki zarodkowych, tj. embriodysków wyizolowanych z jaj zniesionych około 24 godziny po zapłodnieniu. W tym celu realizowane są działania pod kątem selekcji samic-dawczyń zapłodnionych jaj spośród osobników płci żeńskiej tworzących stada zarodowe następujących ras kaczki domowej, objętych ochroną zasobów genetycznych: pekin krajowy P-33 i/lub pekin angielski – linia syntetyczna Ls-A i/lub pekin duński P-8 i/lub pekin francuski P-9 i/lub mieszańiec Kh0-01 i/lub kaczka w typie pomniejszonym K-2. Zapłodnione jaja ptaków hodowlanych stanowią źródło komórek tarczki zarodkowej (blastodermy), które w jajach poli- i telolecytalnych ptaków prowadzą do powstania w wyniku bruzdkowania częściowego tarczkiowego (meroblastycznego) – w obrębie bieguna animalnego (twórczego) jaj – zarodków w stadiach blastuli/dyskoblastuli lub gastruli. Z wyizolowanych komórek blastodermy wyprowadzane są stabilne linie zarodkowych komórek macierzystych (pierwotnych komórek zarodkowych). Badania ukierunkowane na tworzenie repozytoriów biologicznych dedykowanych ptakom hodowlanym będą stanowić podstawę dla dalszych prac z zakresu biotechnologii rolniczej i reprodukcyjnej, ochrony *ex situ* zagrożonych wyginięciem i rzadkich ras zachowawczych wybranych gatunków drobiu oraz badań interdyscyplinarnych na styku biomedycyny, transgeniki oraz biologii i biotechnologii molekularnej (Wu i in., 2008; Guan i in., 2010; Na i in., 2010; Bai i in., 2013; Nandi i in., 2016; Svoradová i in., 2018; Xiong i in., 2020).

Wnioski końcowe i przyszłe kierunki badań

Wymiernym efektem realizacji działań naukowo-badawczych IZ-PIB podjętych w kierunku generowania kriogenicznych repozytoriów materiału biologicznego w postaci subpopulacji komórek somatycznych stanowią strategiczne narzędzie nowoczesnej biotechnologii rolniczej i reprodukcyjnej oraz inżynierii hodowli komórkowych, które znajduje obecnie i/lub może znaleźć w najbliższej przyszłości zastosowanie w procedurach:

- 1) ochrony zasobów genetycznych i tworzenia rezerw genetycznych zagrożonych wyginięciem, rodzimych ras wybranych gatunków ssaków i ptaków hodowlanych (Men i in., 2012; Woelders i in., 2012; Ryder i Onuma, 2018; Gavin-Plagne i in., 2020);
- 2) restytucji oraz multiplikacji subpopulacji wymarłych, ginących i rzadkich ras zwierząt hodowlanych w celu zachowania bioróżnorodności oraz podwyższenia stopnia wewnątrzpopulacyjnej i międzyosobniczej zmienności genetycznej (Rege i Gibson, 2003; Soglia i in., 2021; Bolton i in., 2022);
- 3) poprawy wskaźników wartości hodowlanej i użytkowej zwierząt gospodarskich, w tym zwiększenia ich wydajności mlecznej, mięsnej i rozplodowej (Hoshino i in., 2009; Smits i in., 2012; Woodcock i in., 2019; Dua i in., 2021);
- 4) przełożenia wyników prac rozwojowych na wdrożenia w różnych dyscyplinach sektora agrobiotechnologicznego, których celem jest tworzenie odzwierzęcych bioproduktów dla przemysłu rolno-spożywczego i biofarmaceutycznego oraz medycyny weterynaryjnej, transplantacyjnej i regeneracyjnej tkanek zwierząt gospodarskich, a także na potrzeby przedklinicznych i klinicznych testów w terapiach genetycznie uwarunkowanych lub nabytych chorób zwierząt hodowlanych (Caroli i Pizzi, 2012; Hu i in., 2012; Woodcock i in., 2019; Rieblinger i in., 2021).

Piśmiennictwo

- Bai C., Wang D., Li C., Jin D., Li C., Guan W., Ma Y. (2011). Establishment and biological characteristics of a Jingning chicken embryonic fibroblast bank. *Eur. J. Histochem.*, 55 (1): e4.
- Bai C., Li X., Hou L., Zhang M., Guan W., Ma Y. (2013). Biological characterization of chicken mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord Wharton's jelly. *Mol. Cell Biochem.*, 376 (1-2): 95–102.
- Blackburn H.D. (2006). The National Animal Germplasm Program: challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poult. Sci.*, 85 (2): 210–215.
- Bolton R.L., Mooney A., Pettit M.T., Bolton A.E., Morgan L., Drake G.J., Appeltant R., Walker S.L., Gillis J.D., Hvilson C. (2022). Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. *Reprod. Fertil.*, 3 (3): R121–R146.
- Caroli A.M., Pizzi F. (2012). Livestock biodiversity: from genes to animal products through safeguard actions. *Theor. Biol. Forum.*, 105 (2): 71–82.
- Chen F., Zhao C., Zhao Y., Li L., Liu S., Zhu Z., Guan W. (2018). The biological characteristics of sheep umbilical cord mesenchymal stem cells. *Can. J. Vet. Res.*, 82 (3): 216–224.
- Dua S., Sharma P., Saini M., Rawat N., Rajendran R., Bansal S., Wakil A.M., Beniwal M., Parashar A., Bajwa K.K., Selokar N.L., Kumar R., Kumar D., Yadav P.S.

- (2021). Cryobanking of primary somatic cells of elite farm animals – A pilot study in domesticated water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Cryobiology*, 98: 139–145.
- Elyasi Gorji Z., Farzaneh P., Nasimian A., Ganjibakhsh M., Izadpanah M., Farghadan M., Vakhshiteh F., Rahmati H., Shahzadeh Fazeli S.A., Khaleidi H., Daneshvar Amoli A. (2021). Cryopreservation of Iranian Markhoz goat fibroblast cells as an endangered national genetic resource. *Mol. Biol. Rep.*, 48 (9): 6241–6248.
- Enya S., Kawarasaki T., Otake M., Kangawa A., Uenishi H., Mikawa S., Nishimura T., Kuwahawa Y., Shibata M. (2016). Preservation and reproduction of microminipigs by cloning technology. *In Vivo*, 30 (5): 617–622.
- Gavin-Plagne L., Perold F., Osteil P., Voisin S., Moreira S.C., Combourieu Q., Saïdou V., Mure M., Louis G., Baudot A., Buff S., Joly T., Afanassieff M. (2020). Insights into species preservation: Cryobanking of rabbit somatic and pluripotent stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (19): 7285.
- Guan W., He X., Li L., Liang H., Zhao Q., Pu Y., Ma Y.H. (2010). Establishment and biological characterization of fibroblast cell line from the Langshan chicken. *Cell Prolif.*, 43 (2): 157–163.
- Hoshino Y., Hayashi N., Taniguchi S., Kobayashi N., Sakai K., Otani T., Iritani A., Saeki K. (2009). Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80 degrees c freezer for a decade. *PLoS One*, 4 (1): e4142.
- Hu P.F., Guan W.J., Li X.C., Ma Y.H. (2012). Construction of recombinant proteins for reprogramming of endangered Luxi cattle fibroblast cells. *Mol. Biol. Rep.*, 39 (6): 7175–7182.
- Hu P.F., Guan W.J., Li X.C., Zhang W.X., Li C.L., Ma Y.H. (2013). Study on characteristics of *in vitro* culture and intracellular transduction of exogenous proteins in fibroblast cell line of Liaoning cashmere goat. *Mol. Biol. Rep.*, 40 (1): 327–336.
- Hu T., Taylor L., Sherman A., Keambou Tiambo C., Kemp S.J., Whitelaw B., Hawken R.J., Djikeng A., McGrew M.J. (2022). A low-tech, cost-effective and efficient method for safeguarding genetic diversity by direct cryopreservation of poultry embryonic reproductive cells. *eLife*, 25 (11): e74036.
- Kikuchi K., Kaneko H., Nakai M., Somfai T., Kashiwazaki N., Nagai T. (2016). Contribution of *in vitro* systems to preservation and utilization of porcine genetic resources. *Theriogenology*, 86 (1): 170–175.
- León-Quinto T., Simón M.A., Cadenas R., Martínez A., Serna A. (2014). Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology*, 68 (2): 227–233.
- Li L.F., Guan W.J., Li H., Zhou X.Z., Bai X.J., Ma Y.H. (2009a). Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Texel sheep. *Biochem. Cell Biol.*, 87 (3): 485–492.
- Li L.F., Guan W.J., Hua Y., Bai X.J., Ma Y.H. (2009b). Establishment and characterization of a fibroblast cell line from the Mongolian horse. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 45 (7): 311–316.
- Liu C., Guo Y., Guan W., Ma Y., Zhang H.H., Tang X. (2008). Establishment and biological characteristics of Luxi cattle fibroblast bank. *Tissue Cell*, 40 (6): 417–424.
- Liu C., Guo Y., Lu T., Li X., Guan W., Ma Y. (2014). Establishment and genetic characteristics analysis of *in vitro* culture a fibroblast cell line derived from Wuzhishan miniature pig. *Cryobiology*, 68 (2): 281–287.
- Mara L., Casu S., Carta A., Dattena M. (2013). Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim. Reprod. Sci.*, 138 (1-2): 25–38.
- Men H., Walters E.M., Nagashima H., Prather R.S. (2012). Emerging applications of sperm, embryo and somatic cell cryopreservation in maintenance, relocation and rederivation of swine genetics. *Theriogenology*, 78 (8): 1720–1729.
- Na R.S., Bai C.Y., Jin D.P., Su X.H., Feng B.G., Guan W.J., Ma Y.H. (2010). Establishment and biological characteristics of Qingyuan partridge chicken fibroblast line. *Poult. Sci.*, 89 (6): 1207–1216.
- Nandi S., Whyte J., Taylor L., Sherman A., Nair V., Kaiser P., McGrew M.J. (2016). Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. *Poult. Sci.* 95 (8): 1905–1911.
- Rege J.E.O., Gibson J.P. (2003). Animal genetic resources and economic development: issues in relation to economic valuation. *Ecol. Econ.*, 45 (3): 319–330.

- Rieblinger B., Sid H., Duda D., Bozoglu T., Klinger R., Schlickerrieder A., Lengyel K., Flisikowski K., Flisikowska T., Simm N., Grodziecki A., Perleberg C., Bähr A., Carrier L., Kurome M., Zakhartchenko V., Kessler B., Wolf E., Kettler L., Luksch H., Hagag I.T., Wise D., Kaufman J., Kaufer .BB., Kupatt C., Schnieke A., Schusser B. (2021). Cas9-expressing chickens and pigs as resources for genome editing in livestock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118 (10): e2022562118.
- Ryder O.A., Onuma M. (2018). Viable cell culture banking for biodiversity characterization and Conservation. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 6: 83–98.
- Samiec M., Trzcńska M. (2022). Perpetuating biological diversity in threatened indigenous livestock breeds by creating biorepositories for the purpose of assisted reproductive technologies. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 40 (4): 393–410.
- Silyukova Y.L., Stanishevskaya O.I., Dementieva N.V. (2020). The current state of the problem of *in vitro* gene pool preservation in poultry. *Vavilovskii Zhurnal Genet. Selektcii*, 24 (2): 176–184.
- Smits K., Hoogewijs M., Woelders H., Daels P., Van Soom A. (2012). Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. *Reprod. Domest. Anim.*, 47 (4): 239–248.
- Soglia D., Sartore S., Lasagna E., Castellini C., Cendron F., Perini F., Cassandro M., Marzoni M., Iaffaldano N., Buccioni A., Dabbou S., Castillo A., Maione S., Bianchi C., Profiti M., Sacchi P., Cerolini S., Schiavone A. (2021). Genetic diversity of 17 autochthonous Italian chicken breeds and their extinction risk status. *Front. Genet.*, 14 (12) :715656.
- Son Y.B., Jeong Y.I., Jeong Y.W., Yu X., Cai L., Choi E.J., Hossein M.S., Tinson A., Singh K.K., Rajesh S., Noura A.S., Hwang W.S. (2021). Vitrification of camel skin tissue for use as a resource for somatic cell nuclear transfer in *Camelus dromedarius*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 57 (5): 487–492.
- Sun Y., Li Y., Zong Y., Mehaisen G.M.K., Chen J. (2022). Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: advancement and future challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 13 (1): 115.
- Svoradová A., Kuželová L., Vašíček J., Olexíková L., Chrenek P. (2018). Cryopreservation of chicken blastodermal cells and their quality assessment by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Biotechnol. Prog.*, 34 (3): 778–783.
- Trzcńska M., Samiec M. (2021). *Ex situ* conservation and genetic rescue of endangered Polish cattle and pig breeds with the aid of modern reproductive biotechnology. *Ann. Anim. Sci.*, 21 (4): 1193–1207.
- Woelders H., Windig J., Hiemstra S.J. (2012). How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. *Reprod. Domest. Anim.*, 47 (4): 264–273.
- Woodcock M.E., Gheyas A.A., Mason A.S., Nandi S., Taylor L., Sherman A., Smith J., Burt D.W., Hawken R., McGrew M.J. (2019). Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116 (42): 20930–20937.
- Wu H., Guan W., Li H., Ma Y. (2008). Establishment and characteristics of white ear lobe chicken embryo fibroblast line and expression of six fluorescent proteins in the cells. *Cell Biol. Int.*, 32 (12): 1478–1485.
- Xiong C., Wang M., Ling W., Xie D., Chu X., Li Y., Huang Y., Li T., Otieno E., Qiu X., Xiao X. (2020). Advances in isolation and culture of chicken embryonic stem cells *in vitro*. *Cell. Reprogram.*, 22 (2): 43–54.
- Yang J., Zhao Q., Wang K., Liu H., Ma C., Huang H., Liu Y. (2016). Isolation and biological characterization of tendon-derived stem cells from fetal bovine. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 52 (8): 846–856.
- Zhang Y.L., Liu F.J., Zhuang Y.F., Wang X.A., Zhai X.W., Li H.X., Hong Z.Y., Chen J.J., Zhong L.C., Zhang W.C. (2012). Blastocysts cloned from the Putian Black pig ear tissues frozen without cryoprotectant at –80 and –196 degrees Celsius for 3 yrs. *Theriogenology*, 78 (5): 1166–1170.

Marcin Samiec, Monika Trzcińska

**THE IMPORTANCE OF CRYOBANKS OF CELL LINES FOR
THE PROGRAMMES AIMED TO MAINTAIN THE BIOLOGICAL
DIVERSITY OF FARM MAMMALIAN AND AVIAN SPECIES**

SUMMARY

The current article seeks to present not only the state of the art, but also agricultural, biological and biotechnological determinants, and the importance of the National Research Institute of Animal Production in Poland for creating the biorepositories of cryopreserved somatic cell lines and blastoderm-derived embryonic stem cell lines of the selected farm mammalian and avian species. The aforementioned biological repositories serve as an innovative research tool used for cryogenically-assisted and species-specific *ex situ* conservation. The latter ensures, in the long term, not only restitution, but also perpetuation of sustainable biodiversity that underlies genotypic and phenotypic, intra- and inter-population variability within pure-breeding herds (nucleus holdings) of the national conservative livestock breeds.

Key words: biorepositories, cell lines, somatic cells, embryonic stem cells, farm mammals and aves