



Til NaturErhvervstyrelsen

**Vedr. bestillingen: ”Hvordan kan man konservere genmateriale fra fjerkræ?”**

NaturErhvervstyrelsen har i en bestilling dateret d. 6. oktober 2015 bedt DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug om et notat der belyser muligheder for konservering af genmateriale fra fjerkræ. Notatet der følger nedenfor er udarbejdet af lektor Bernt GuldbRANDTSEN, Institut for Molekylærbiologi og Genetik – Center for Kvantitativ Genetik og Genomforskning, Aarhus Universitet.

Besvarelsen er udarbejdet som led i ”Aftale mellem Aarhus Universitet og Fødevareministeriet om udførelse af forskningsbaseret myndighedsbetjening m.v. ved Aarhus Universitet, DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, 2015-2018” (punkt FB-4 i Aftalens Bilag 2).

Venlig hilsen

Klaus Horsted  
Koordinator for myndighedsrådgivning, DCA

Kopi til: Center for Innovation

DCA - Nationalt Center for  
Fødevarer og Jordbrug

Klaus Horsted

Specialkonsulent

Dato 14. januar 2016

Direkte tlf.: 87157975

Mobiltlf.:

Fax: 8715 6076

E-mail:

klaus.horsted@dca.au.dk

Afs. CVR-nr.: 31119103

Reference: khr

Journal 105788

Side 1/1

# Notat vedr. indsamling og opbevaring af biologisk materiale med henblik på kryobevaring af høns

Bernt Guldbrandtsen  
Center for Kvantitativ Genetik og Genomstudier  
Aarhus Universitet

12. januar 2016

## Indhold

<b>1</b>	<b>Forespørgsel</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Kryobevaring af biologisk materiale til genressourcebevaringsformål</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Strategier for Opbevaring af Levedygtigt Materiale fra Høns i Bio-banker</b>	<b>2</b>
3.1	Opbevaring af Sædceller . . . . .	3
3.2	Opbevaring af Æggestokke og Sædceller . . . . .	3
3.3	Opbevaring af Befrugtede Æg . . . . .	4
3.4	Opbevaring af Somatisk Væv . . . . .	4
3.5	Delkonklusion . . . . .	4
<b>4</b>	<b>Kloning</b>	<b>4</b>
4.1	Typer af kloning . . . . .	5
4.2	Donormateriale til kernetransfer . . . . .	5
4.3	Status for Kloning . . . . .	5
4.4	Status for Kloning i Høns . . . . .	6
4.5	Juridiske Forhold vedr. Kloning . . . . .	6
<b>5</b>	<b>Konklusioner</b>	<b>6</b>
<b>6</b>	<b>Anbefaling</b>	<b>7</b>

## 1 Forespørgsel

Følgende spørgsmål er modtaget:

Bevaringsudvalget for Danske Husdyrgenetiske Ressourcer (Bevaringsudvalget) rådgiver Miljø- og Fødevareministeriet om hvilket genmateriale, der bør opbevares i Statens Genbank. Genmaterialet konserveres med henblik på at sikre *ex situ* bevaring med henblik på en evt. anvendelse i forbindelse med genetablering af racen, og gerne efter eventuelle internationale retningslinjer. Der kan også blive tale om anvendelse af genmaterialet for at reducere indavlsgraden. Der er endnu ikke konserveret genmateriale fra fjerkræ i Statens Genbank, hvorfor konservering af genmateriale fra bevaringsværdige fjerkræracers, også andre end Den Danske Landand og Den Danske Landgås, er relevant.

Med hensyn til fjerkræ vedrører forskningen overvejende bevaring af materiale høns (*Gallus gallus*), hvorfor disse dominerer nedenstående udredning.

## 2 Kryobevaring af biologisk materiale til genresourcebevaringsformål

Der er i princippet tre teknikker til kryobevaring af materiale, som kan benyttes til at genskabe en levende population.

- Frysning af kønsceller eller kønsorganer
- Frysning af levende organismer i frossen tilstand - for høns f.eks. frysning af befrugtede æg
- Frysning af materiale, som indeholder cellekerner, med henblik på kloning

Der henvises i øvrigt til FAOs nylige status for kryobevaring af husdyrgenetiske ressourcer (FAO, 2012).

## 3 Strategier for Opbevaring af Levedygtigt Materiale fra Høns i Biobanker

Der er p.t. flere mulige strategier for hvilke væv, der kan opbevares med henblik på senere genskabelse af levende individer.

### 3.1 Opbevaring af Sædceller

Dette er en af de foretrukne teknikker i pattedyr. Der er udviklet teknikker, som kan anvendes i høns, men generelt er succesraten ikke overbevisende.

For høns vedkommende har Shahverdi *et al.* (2015) konkluderet, at: "Although numerous attempts have been made to develop a suitable procedure for cooled preservation of rooster semen, a successful protocol for cryopreservation has not been achieved", på dansk: „Selvom der har været gjort talrige forsøg på at udvikle egnede procedurer til kølet opbevaring af hanesæd, så er det ikke lykkedes at finde en velfungerede metode til kryobevaring.“

Genskabelse af en race baseret alene på frossen sæd vil kræve et antal generationers tilbagekrydsning. Høns af en anden race befrugtes med sæd fra genbanken. I hver efterfølgende generation befrugtes hunlige afkom herefter med sæd fra genbanken. Efter 10 generationers tilbagekrydsning vil bidraget fra de oprindelige recipienthøns være dalet til 1 ud af 1000.

Selvom inseminering er mulig i forbindelse med tilbagekrydsning, så kan denne teknik ikke genskabe hele bevaringspopulationens genom: Donorpopulationens mitokondrier (som ikke videregives fra hanner i fugle) og W-kromosomet, som findes i hunlige fugle, men ikke hanlige fugle, vil ikke kunne genskabes på denne vis.

Et særligt problem med frysning af sædceller i høns er, at der skal tilsættes glycerol, som beskytter sædcellerne ved frysningen. Glycerol modvirker desværre undfangelse i høns (Neville *et al.*, 1971).

### 3.2 Opbevaring af Æggestokke og Sædceller

Systemet baserer sig på, at æggestokke udtages og fryses, og at sædprøver gemmes. Når en population skal genskabes, transplanteres æggestokkene til recipienter, der herefter vil lægge æg med donorens arveanlæg. Sædceller kan enten fryses som sædceller, eller hele testikler fryses. En række protokoller er publicerede, se blandt andet (Song & Silversides, 2007a,b).

Teknikken, der involverer indsamling af kønsorganer, kræver aflivning af donorerne.

FAO (2012) citerer Etches (2010) for at stamceller kan høstes fra fire til seks dage gamle hønseembryoer. Også her skal donoren aflives, men donoren vil her være en embryo. Protokollerne er vanskelige. Et eksempel baseret på stamceller er beskrevet i Kim *et al.* (2013).

Petitte (2006) har gennemgået metoder baseret på bevaring af stamceller og lignende, men det konkluderes, at: "the low efficiency rate of reconstitution and the high cost associated with current technologies makes these approaches prohibitive," på dansk: „den lave effektivitet ved genskabelse og den høje pris forbunden med de aktuelle teknologier gør disse metoder urealistiske“.

### **3.3 Opbevaring af Befrugtede Æg**

Ingen rapporter om succes med længere tids frysning af befrugtede hønseæg er blevet fundet. Metoden ville ellers have flere fordele, hvis den kunne bringes til at fungere. Prøveindsamling er enkel, reetablering af populationen må antages at være enkel, og hele genomet vil automatisk blive genskabt.

### **3.4 Opbevaring af Somatisk Væv**

Der kan udtages prøver af væv fra levende differentieret væv med henblik på senere kernetransfer.

En situation, hvor denne strategi har en særlig fordel, er, hvor der er en interesse i at bevare en specifik genotype - i modsætning til den normale situation, hvor interessen er rettet mod at bevare den genetiske egenart og genetiske variation, som kendetegner en bestemt race.

En anden situation, hvor kloning kan være af interesse, er, når andre teknikker til bevaring af genomet ikke er til rådighed.

Et særligt forhold ved fugle er, at fugles røde blodlegemer har cellekerner. Det vil sige, at i princippet bør fugleblod kunne udgøre en kilde til donorcellekerner til kernetransfer.

Det skal imidlertid understreges, at der forindeværende ikke er publiceret teknikker til kloning i høns.

### **3.5 Delkonklusion**

Frysning af sæd er en anvendelig teknologi til bevaring af høns genetik i genbanker, om end metoden stadig har skavanker. Et væsentligt minus ved metoden er, at man på grund af fugles genetik og i modsætning til, hvad der gælder i pattedyr, ikke kan bevare hele populationen genetiske sammensætning.

Forskellige strategier ud over frysning af sæd til bevaring af biologisk materiale fra høns i genbanker med henblik på senere genskabelse af populationer har været afprøvet. Flere teknikkerne fungerer, men for alles vedkommende rapporteres der om lave succesrater og høje omkostninger. Ingen af de kendte strategier er umiddelbart overbevisende til brug for genresourcebevaring.

## **4 Kloning**

Målet med kloning er at skabe genetisk identiske eller næridentiske kopier (kloner) af andre levende organismer.

## 4.1 Typer af kloning

Der skelnes mellem flere typer af kloning - naturligt forekommende såvel som menneskeskabte. De menneskeskabte baserer sig på overførsel af cellekernen fra en celle fra en donor til en recipientcelle, hvis kerne er blevet fjernet. Genetisk forskelle mellem donoren og klonen skyldes mutationer. Afkommets mitokondrier hidrører fra recipienten og altså ikke fra donoren.

## 4.2 Donormateriale til kernetransfer

Der skelnes mellem to strategier for kernetransfer. Voksenkloning (soma-tisk kloning) og embryokloning. Der er ingen principiel forskel på de to metoder, men de adskiller sig på det tekniske plan. Nedenstående refererer til pattedyr, da der, som det fremgår nedenfor, indtil videre ikke er rapporteret om kloning af høns eller andre fugle.

**Embryokloning** består i udtagning af cellekerner fra celler i den tidligere embryonaludvikling. Disse cellekerner er fra naturens hånd i stand til at udvikle sig til samtlige celletyper i den voksne krop (totipotens). Dette gør embryokloning relativt let i forhold til voksenkloning.

**Voksenkloning** består i, at der udtages cellekerner fra fuldt udviklede (differentierede) celler fra et voksent individs krop. Normale, differentierede celler kan i langt de fleste tilfælde kun dele sig for at producere flere celler af den samme type, som de selv tilhører (i det omfang de overhovedet er i stand til at dele sig). For at kunne benytte differentierede celler til kernetransfer skal en totipotent tilstand genskabes. Der findes teknikker til dette.

Teknisk set er voksenkloning relativt vanskelig og dyr. Succesraten med de eksisterende teknikker er lav. Der er rapporter om diverse udviklingsmæssige forstyrrelser hos voksentklonede individer. Dette skyldes muligvis, at voksentklonede individer ikke har undergået den nulstilling af den epigenetiske information, som normalt finder sted i den tidligste udvikling af den befrugtede ægcelle.

Da der har været mange cellegenerationer fra den befrugtede ægcelle til den fuldt differentierede celle, som benyttes som donor, så er der en høj sandsynlighed for, at donorkernens kromosomer bærer nye mutationer. Det betyder, at der kan være sket uønskede genetiske ændringer, eller at den resulterende klon ikke er levedygtig.

## 4.3 Status for Kloning

Singina *et al.* (2014) rapporterer, at det til dato er lykkedes at klonе følgende hvirveldyr:

Får, mus, kvæg, geder, svin, gaur (slægtning til kvæg, *Bos gaurus*), muflon (vildform af får, *Ovis aries orientalis*), huskat, kanin, muldyr (hanligt æsel × hunlig tamhest), tamhest, rotte, vildkat (*Felis silvestris*, altså ikke forvildet kat), hund, banteng (slægtning til kvæg, *Bos javanicus*), fritte (underart af ilder, *Mustela putorius furo*), ulv, bøffel, kronhjort (*Cervus elaphus*), sneged (*Oreamnos americanus*), kamel og prærieulv (*Canis latrans*).

Kendetegnende for de arter, hvor det er lykkedes at klonе, er, at det alle er pattedyr.

#### 4.4 Status for Kloning i Høns

Det er til dato ikke lykkedes at klonе høns (eller andre fugle).

Der er rapporter om, at ubefrugtede æg kan udvikles til voksne individer (Mittwoch, 1978). Diploid afkom produceret fra ubefrugtede fugleæg er hanlige - dette tyder på, at den underliggende proces involverer kromosomfordobling, så der er ikke tale om en form for kloning.

#### 4.5 Juridiske Forhold vedr. Kloning

Europaparlamentet har den 8. september vedtaget, at kloning til landbrugsformål af kvæg-, svine-, fåre-, gede- og hestearter skal forbydes. Den vedtagne tekst foreligger i skrivende stund endnu ikke, men høns lader ikke til at være omfattet. Om genbankers kloning med henblik på bevaring derfor vil være omfattet, er ikke klart. EU-parlamentet har vedtaget, at klonede dyr eller deres afkom ikke må bruges som fødevarer.

### 5 Konklusioner

**Sædprøver** er billige og nemme at indsamle og gemme. Teknikken vides at fungere, men med ikke tilfredsstillende succesrater. Reetablering af en population fra frossen sæd kræver flere generationers tilbagekrydsning og vil efterlade en genetisk rest af recipientpopulationen. Teknikken bevarer ikke W-kromosomet og mitokondriegenomet.

**Kønsorganer og stamceller** vides at kunne indsamles, men ligesom kloning kræver det dyre, specialiserede teknikker. Der er rapporter om, at levende dyr kan genskabes, men dette er indtil videre ikke tilfældet i høns. Teknikken kræver aflivning af donorerne - som dog for stamcellernes vedkommende skal være embryoer. Ligesom ved kloning bevares hele populationens genom, dvs. inklusive W-kromosomet og mitokondriekromosomet.

Blesbois *et al.* (2007) har gennemgået bevaring af genetiske ressourcer af høns i Frankrig. Den strategi, som vælges for Frankrig, er kryobevaring af sædceller.

**Kloning** er ikke aktuelt en mulighed for bevaring, eftersom der ikke er nogen publicerede teknikker. Generelt er kloning en dyr teknik, og reetablering af levende dyr ved kloning er teknisk vanskelig og kræver specialiserede tekniske færdigheder. Blandt fordelene er, at prøvetagning (afhængigt af hvilket væv, der udtages prøver fra) kan være enkel, og at kloning bevarer hele genomet – inklusive W-kromosomet og mitokondriekromosomet.

Da der ikke er publiceret nogen teknikker til kloning af høns (eller andre fugle), er der ikke noget grundlag for at formulere en anbefaling for, hvilke væv der er egnede til indsamling som ressource for fremtidig kloning.

## 6 Anbefaling

1. Ingen af kryobevaringsteknikkerne for høns er fuldt udviklede.
2. Den teknik, som at dømme efter litteraturen teknisk er mest velegnet, er frysning af sæd. Denne teknik har dog den kritiske svaghed, at den ikke bevarer W-kromosomet, som er et kønskromosom fugle, som findes i hunner, men ikke i hanner.
3. Der er ikke rapporteret nogen fungerende kloningsteknik. Det vil sige, at et eventuelt udvalg af væv til indsamling effektivt ville foregå i blinde.
4. Det specielle forhold, at røde blodlegemer i fugle har kerner, gør blodet til en let tilgængelig kilde til cellekerner. Der er imidlertid ikke grundlag for at vurdere, om disse cellekerner vil være egnede til kernetransfer.

## Litteratur

- BLESBOIS, E., SEIGNEURIN, F., GRASSEAU, I., LIMOUZIN, C., BESNARD, J., GOURICHON, D., COQUERELLE, G., RAULT, P., & M., TIXIER-BOICHARD. 2007. Semen Cryopreservation for Ex Situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*, **86**(3), 555-564.
- FAO. 2012. *Cryoconservation of animal genetic resources*. Animal Production and Health Guidelines 12. FAO, Rome.
- KIM, H., KIM, D.H., HAN, J.Y., DO, Y.J., KIM, J.H., KIM, Y.S., SEONG, H.H., KO, Y.G., & KIM, S.W. 2013. Cryopreservation of promordial germ cells (PGCs) from Korean native chicken (Ogye) embryos using commercial cryoprotectants. *Korean Journal of Poultry Science*, **40**(3), 163-169.
- MITTWOCH, URSULA. 1978. Parthenogenesis. *Journal of Medical Genetics*, **15**(3), 165-181.



- NEVILLE, W.J., MACPHERSON, J.W., & REINHART, B. 1971. The Contraceptive Action of Glycerol in Chickens. *Poultry Science*, **50**(5), 1411-1415.
- PETITTE, J.N. 2006. Avian Germplasm Preservation: Embryonic Stem Cells or Primordial Germ Cells? *Poultry Science*, **85**, 237-242.
- SHAHVERDI, A., SHARAFI, M., GOURABI, H., AMIRI YEKTA, A., ESMAEILI, V., SHARBATOGHLI, M., JANZAMIN, E., HAJNASROLLAHI, M., & MOSTAFAYI, F. 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*, **83**, 78-85.
- SINGINA, G.N., VOLKOVA, N.A., BAGIROV, V.A., & ZINOVIEVA, N.A. 2014. Cryobanking of Somatic Cells in Conservation of Animal Genetic Resources: Prospects and Successes (review). *Agricultural Biology*, **6**, 3-14.
- SONG, Y., & SILVERSIDES, F.G. 2007a. Offspring produced from orthotopic transplantation of chicken ovaries. *Poultry Science*, **86**, 107-111.
- SONG, Y., & SILVERSIDES, F.G. 2007b. Production of offspring from cryopreserved chicken testicular tissue. *Poultry Science*, **86**, 1390-1396.