



УДК 636.082:57.085

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.2.215

ХИМЕРЫ ПТИЦ (GALLUS GALLUS), ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПОРОД ПАНЦИРЕВСКАЯ ЧЕРНАЯ И КОХИНХИН КАРЛИКОВЫЙ

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

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



РЕФЕРАТ

Для решения многих проблем сохранения видов и пород птиц, создания новых форм стали востребованы химерные организмы, полученные путем введения генетически различающихся клеток, выделенные от других пород или видов. Для производства химерных организмов в нашей работе использовали две породы: панциревская черная и карликовый кохинхин, взятые из ЦКБ БК «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» ВНИИРГЖ. Инъекционные химеры получали методом трансплантации бластодермальных клеток от яиц-доноров в эмбрионы реципиентов с помощью микроманипулятора. Фенотип химер определяли по изменению окраски в возрасте от суток и до смены оперения. В среднем у контрольных пород 90% яиц были оплодотворены. Выводимость экспериментальных птиц изменялась от 25% до 40%. При создании химерных птиц при сочетании пар панциревская – донор, кохинхин – реципиент получено 10,5% химер. Среднее количество химерных организмов птиц составило 8,3%. В опыте, где карликовый кохинхин – донор, панциревская черная – реципиент, получена химера, у которой концы маховых перьев и часть головы имеют белый окрас, как результат трансплантации донорских клеток кохинхина чёрно-пёстрой окраски. У других химер после трансплантации бластодермальных клеток панциревской породы реципиентным эмбрионам кохинхина появляются черные пятна на клюве и коже. Экспериментальные химеры птиц имели уникальные фенотипы.

Актуальность работы заключается в том, что создание половых химер позволит увеличить популяции находящихся под угрозой исчезновения птиц или для восстановления вымерших видов и получения трансгенных организмов.

Цель работы: разработка и оптимизация техники получения химер кур, полученных от пород панциревская черная и кохинхин карликовый и изучения их фенотипа.

ВВЕДЕНИЕ

Современные достижения клеточной и геномной инженерии позволяют манипулировать с клетками и генами и создавать уникальные организмы. В последние де-

сятилетия достаточно востребована методика создания химер. Модель химерной ткани птиц очень важна для изучения фундаментальной биологии. Первые химеры птиц были получены в девяностых

годах прошлого века путем трансплантации бластодермальных клеток в субгерминальную полость эмбрионов – реципиентов, но эффективность получения химер была низкой и составляла 1,9%. Из каждого эмбриона можно выделить десятки тысяч плюрипотентных клеток, способных вносить вклад в развитие соматических и зародышевых тканей. Для получения трансгенных птиц эти клетки можно трансфицировать различными методами [1-3]. С целью длительного сохранения ранних эмбриональных клеток стали разрабатывать методы криоконсервации птиц [4,5]. В более поздних работах изменялись стратегии и методы получения химерных организмов, что позволило значительно увеличить эффективность создания химер [6,7]. Метод создания инъекционных химер находит широкое применение в области криобиологии, экспериментальной биологии, токсикологии, ветеринарии и сельском хозяйстве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследований служили эмбрионы кур двух пород: панциревская черная и карликовый кохинхин, полученные из ЦКБ БК «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИРГЖ Санкт-Петербург, Пушкин). Панциревская черная относится к курам мясо-яичного направления продуктивности. Окраска оперения черная. Карликовый кохинхин относится к выносливой, красивой и декоративной породе со светлой окраской оперения. В качестве реципиента использовалась линия с маркерным геном *Bl* (*blue*) – неполнодоминантный ген ослабителя черной окраски. Из свежеснесенных яиц выделяли бластодиски, которые отмывали от желтка в растворе фосфатно-солевого буфера (РН – 7,2), содержащего 0,125% трипсина и 0,02% ЭДТА. Бластодиски измельчали, ресуспензировали и центрифугировали 1 минуту при 1000 об/мин. Суспензию клеток помещали в питательную среду следующего состава: питательная среда ДМЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки коров с антибиотиком гентамицином. Культивирование клеток прово-

дили в термостате при температуре 38°C в течение двух суток. Синхронно (по времени) в инкубаторе культивировали эмбрионы реципиентов. В скорлупе яиц реципиентов делали треугольные пропилы 3-5 мм в поперечнике, через которую с помощью микроманипулятора вводили 5-7 мкл суспензии клеток доноров, далее их заклеивали и помещали в инкубатор, где находились эмбрионы до стадии вылупления. Фенотип химер определяли по изменению окраски в возрасте от суток и до 3-х месячного возраста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для получения химерных организмов использовали по 20 яиц в качестве доноров и по 20 – реципиентов для каждой породы. Все эмбрионы были проанализированы по следующим показателям: оплодотворяемость, выводимость реципиентов и эффективность получения химер (табл. 1). На овоскопе проверяли количество неоплодотворенных яиц. Максимальное количество неоплодотворенных яиц оказалось при сочетаниях карликовый кохинхин – донор, панциревская – реципиент (15%), также показатель выводимости был низким (25%) по сравнению с другим сочетанием пород. При сочетаниях карликовый кохинхин - донор, панциревская - реципиент из 20 инкубированных яиц 3 были не оплодотворены. Получена 1 химера, что составляет 5,9% от числа оплодотворенных яиц. При обратном сочетании пород получено 2 химеры из 19 оплодотворенных яиц, что составляет 10,5%. В среднем эффективность получения химерных птиц составила 8,2%.

Фенотипические характеристики исходных форм и особенности фенотипа химерных птиц.

При сочетании карликовый кохинхин – донор, панциревская черная – реципиент получена одна химера № 3171726 (рис. 1). Птица отличается необычным окрасом. Концы маховых перьев и часть головы имеют светлые перья, полученные после трансплантации клеток кохинхина. После линьки белые перья на крыльях сохраняются. Химеры, созданные после

Таблица 1

Выводимость цыплят и получение химер после трансплантации бластодермальных клеток разных пород кур.

Варианты подбора	Инкубировано яиц	Неоплодотворенных яиц		Замерших эмбрионов		Выводимость		Химеры n
		n	%	n	%	n	%	
Карликовый кохинхин – донор панцирская – реципиент	20	3	15	12	60	5	25	1
панцирская – донор карликовый кохинхин – реципиент	20	1	5	11	55	8	40	2
всего	40		4		23		13	3



Рис. 1. Химерный цыпленок № 3171726 в суточном возрасте (слева) и после линьки (справа).



Рис. 2. Постепенно разрастающееся с возрастом черное пятно на клюве у химерной птицы б/н. Также можно заметить черную кожу вокруг глаз. Слева — суточный цыпленок, справа — птица в трехмесячном возрасте.



Рис. 3. Химера № R070422. Слева — суточный цыпленок, справа — после линьки.

трансплантации бластодермальных клеток панциревской породы реципиентам кохинхина светлого окраса представлены на рис. 2-3. У кохинхинов с геном ослабления черной окраски BI (Blue) черный пигмент превращается в голубой, поэтому черные пятна на клюве и коже являются признаком химеризма. Таким образом, методом трансплантации бластодермальных клеток, выделенных на стадии развития X (по Хамильтону) от одной породы и пересадки в эмбрион другой породы были получены межпородные химеры, обладающие уникальным фенотипом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимо учитывать, что работа проводилась на базе коллекции редких и исчезающих видов, где для достижения результатов проводится селекция, создание стандартных линий с желательными признаками, и сохранение спермы ценных организмов [8]. Несмотря на то, что уже в девяностых годах прошлого века были разработаны основные стратегии по производству химерных птиц, в настоящее время произведено мало химерных организмов и недостаточно хорошо исследовано влияние манипуляций с бластодермальными клетками и их культивирования *in vitro* в различных условиях на эффективность создания химер и их генотип. Также непонятны механизмы межпородного взаимодействия клеток. Эффективность получения химер птиц у изученных нами пород составила в среднем 8,3%. По мнению многих исследователей, для повышения эффективности производства химерных птиц акценты делаются на увеличении количества клеток доноров и уменьшении

клеток реципиентов за счет частичной стерилизации различными агентами [9]. Как показали наши исследования, при производстве химерных птиц в сочетании пород карликовый кохинхин – донор и панциревская черная эффективность получения химер – 5,9%, тогда как при обратном сочетании получено 10,5% химер. Становится очевидным, что одни и те же клетки (бластодермальные), полученные от птиц разных пород, имеют разный потенциал развития в качестве доноров и реципиентов. Пока трудно объяснить этот феномен, но, возможно, одной из причин может быть наличие разных половых хромосом в химере; донорские и реципиентные клетки, полученные от разных пород кур, могли иметь ZZ и ZW хромосомы. В ряде работ были идентифицированы клетки по полу методами Саузерн-анализа ДНК и показано, что эффективность продукции химер была выше, когда донор и реципиент одного пола [10]. Тем не менее, как однополые, так и смешанные по полу химеры давали начало жизнеспособному потомству.

ВЫВОДЫ

Таким образом, ранние бластодермальные клетки при трансплантации в эмбрионы других пород птиц способны к пролиферации и созданию организмов с уникальными фенотипами. Разработка простых методов выделения бластодермальных клеток, их интеграции в организм реципиентов является необходимым и важным этапом сохранения исчезающих видов и производства трансгенных кур-продуцентов биологически ценных веществ.

Chimeras of birds (*Gallus gallus*) obtained using the rocks Pansirevskaya black and Kokhinhin

karlikovy. Kozikova L.V. Dr. habil.(Biol. Sci), a leading researcher at the Laboratory of Molecular Genetics; Ekaterina Polteva, Junior researcher at the Laboratory of Molecular Genetics. « Russian research institute of farm animal genetics and breeding - branch of the L.K. Ernst Federal science center for animal husbandry, St. Petersburg p. Tjarlevo.

ABSTRACT

Progress in creating new forms of poultry is possible due to the rapid development of methods of cell and molecular biology. The creation of chimeric organisms is necessary to solve many problems of fundamental biology, to increase the population of endangered birds, or to restore extinct species and obtain transgenic organisms. The purpose of the work is the development and optimization of the technique for producing chimeras obtained from the Pantsirevskaya black, Kokhinhin karlikovy breeds and the study of their phenotype.

The research material was, obtained from the «Genetic Collection of Rare and Endangered Breeds of Chickens» (VNIIRGZH Saint Petersburg). Blastodisks were isolated from donors at the stage of freshly eggs (stage X according to Hamilton), which were crushed and cultured for two days at a temperature of 38°C in DMEM nutrient medium supplemented with 10% fetal bovine serum and gentamicin antibiotic. At the same time, the embryos of the recipients were cultured in the incubator, in which a small window was cut out after two days. Using a micromanipulator, 5-7 µl of a suspension of donor cells was injected, they were glued with adhesive tape and placed in an incubator until the hatching stage.

To obtain chimeric organisms, 20 eggs were used as donors and 20 recipients for each breed. All were analyzed by the following indicators: fertility, hatchability of recipients, and experiments on transplantation of blastoderm cells in order to obtain chimeras (Table 1). On average, 90% of the eggs in the breeds studied were fertilized. The hatchability of experimental birds varied from 25% to 40%. The average number of chimeric organisms obtained by birds of two breeds was 8.3%. With the selection options Kokhinhin - donor, Pantsirevskaya - the recipient received chimera (Fig. 1) with unusual color. The ends of the feathers and part of the head are bluish in color, obtained after transplantation of cochinquin donor cells. Two chimeras obtained after transplantation of blastoderm cells of an armored breed to cochinhin

karlikovy recipients are shown in Fig. 2-3. In Cochinchins with the gene for the weakening of the black color Bl (Blue), the black pigment turns into blue, so black spots on the beak and skin of two experimental chickens are a sign of chimerism. Thus, by the method of transplantation of blastoderm cells isolated at the stage of development X from one breed and transplantation into an embryo of another breed, interbreed chimeras with a unique phenotype were obtained.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козикова Л.В. 2017. Трансгенные животные. /Л.В. Козикова //Учебное пособие для студ. высш. учеб. завед. под ред. К.В. Племешова. СПб. Проспект науки.-2017.-224 С.
2. Zinovieva N.A., Volkova N.A., Bagirov V.A. Genome Editing: State of the Art and Application to Animal Husbandry. / Zinovieva N.A., Volkova N.A., Bagirov V.A.// Biotekhnologiya.- 2018.-P. 9-22
3. Han J.Y. Germ cells and transgenesis in chickens. /Han J.Y. //Sci. Reprod. -2018.- V. 8(1).- PP.15126. doi: 10.1038/s41598-018-33244-x.
4. Nandi S., Whyte J., Taylor L. Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. / Nandi S., Whyte J., Taylor L // Poult. Sci. -2016. -V.95.- PP.1905–1911.
5. Nakamura Y. Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. / Nakamura Y. // J. Reprod. Dev. -2016.- V.62(5).- PP.431–437.
6. Macdonald J., Glover J.D., Taylor L, Sang H.M., McGrew M.J. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. / Macdonald J., Glover J.D., Taylor L, Sang H.M., McGrew M.J.// PLoS One. -2010. - V.5(11).- e15518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015518> cells. V.5(11).
7. Bednarczyk, M., Kozłowska, I., Łakota, P. et al. Generation of transgenic chickens by the non-viral, cell-based method: effectiveness of some elements of this strategy. / Bednarczyk, M., Kozłowska, I., Łakota, P. // J. Appl. Genetics.- 2018.- V.59.- PP. 81. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0429-6>
8. Pleshanov N., O. Stanishevskaya, K. Plemyashov. A method of evaluation and selection of cocks for cryotolerance of their sperm with aim of gene pool preservation. / Pleshanov N., O. Stanishevskaya, K. Plemyashov. // Reproduction in Domestic Animals. - 2016. - Vol. 51. Supplement 2. – P.131.
9. Park K.J., Kang S.J., Kim T.M., Lee Y.M.,

Lee H.C., Song G., Han J.Y. Gamma irradiation depletes endogenous germ cells and increases donor cell distribution in chimeric chickens in vitro cell. / Park K.J., Kang S.J., Kim T.M., Lee Y.M., Lee H.C., Song G., Han J.Y. // Dev. Biol. Animal. -2010. -V.46.- PP. 828-833 (doi: 10.1007/s11626-010-9361-8

10. Ono, T., Yokoi, R. and Aoyama, H. Transfer of male or female primordial germ cells of quail into chick embryonic gonads. / Ono, T., Yokoi, R. and Aoyama, H. // Exp. Anim., -1996. -V.45. -PP. 347-352.

*Работа выполнена по госзада-
нию: проект № ААА-А18-
18021590132-9. № темы: 0445-
2019-0030*

ИНФОРМАЦИЯ

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35,
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**