

Новые достижения клеточной биологии в птицеводстве

Аннотация.

Цель: разработка новых клеточных технологий в птицеводстве.

Материалы и методы. Для исследований были выбраны породы кур: русская белая, минорка, брама светлая и брама палевая в сравнении с межвидовой химерой японского перепела и пекинской утки. Все химеры получены методом трансплантации в последнем случае первично-зародышевых клеток, у остальных пород бластодермальных клеток в подзародышевую область эмбрионов реципиентов. Все эмбриональные клетки перед пересадкой культивировались двое суток в специальных культуральных средах с добавлением фетальной сыворотки коров и антибиотиков. Химерные особи определены по наличию контррастных перьев, не свойственных данной породе.

Результаты. В отличие от млекопитающих у птиц наблюдается совершенно иное эмбриональное развитие, что требует разработки новых разработок клеточной биологии для получения химерных птиц. Различают внутривидовые химеры и межвидовые, полученные от организмов разных видов. В качестве примера межвидовой химеры представлена химера японского перепела и пекинской утки с химерным фенотипом черных перьев на шее. Донорами служили первично-зародышевые клетки японского перепела. Нами получены межпородные химеры брамы светлой и брамы палевой, когда донорами были бластодермальные клетки брамы светлой, а реципиентами ранние эмбрионы брамы палевой. Другим вариантом химер служили химеры между породами русская белая (бластодермальные клетки доноры) и минорка (эмбрион реципиент).

Заключение. Наблюдаемое резкое снижение количества пород птиц требует новых методов (разработок) для их сохранения и создания новых генетических организмов. С помощью современных разработок клеточной биологии стало возможным создание новой стратегии получения химерных птиц. Применение плюрипотентных эмбриональных клеток привело к появлению межпородных и межвидовых химер птиц.

Ключевые слова: химеры птиц; бластодермальные клетки; эмбрионы-доноры; эмбрионы-реципиенты; редкие и исчезающие породы птиц; генетически модифицированные особи; первично-зародышевые клетки.

Авторы:

Козикова Лариса Васильевна — доктор биологических наук; e-mail: larkozik@list.ru;

Полтева Екатерина Андреевна — младший научный сотрудник; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196625, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, д. 55а.

Введение. В настоящее время как в нашей стране, так и во всем мире наблюдается резкое снижение количества пород птиц, что связано с интенсивной селекцией и созданием высокопродуктивных коммерческих пород и кроссов [1]. Благодаря развитию современных методов биотехнологии, клеточных и генных технологий возникли генетически новые организмы, что позволило разнообразить породы и кроссы, а также

привело к созданию уникальных химерных и трансгенных организмов, в том числе птиц [2]. Востребованность химер в биотехнологии обусловлена прежде всего тем, они являются промежуточным этапом получения трансгенных птиц, а также служат источником сохранения редких и исчезающих видов и пород. Химерные организмы состоят из генетически различающихся клеток, полученных из разных зигот. Химеры

могут быть сформированы либо из четырех гамет, либо из эмбрионов ранних стадий развития.

Цель исследований — применение клеточных технологий для создания межвидовых и межпородных химер птиц

Материалы и методы. Известны несколько методов получения химер птиц [3]. Как правило тип эмбриональных клеток определяет стратегию получения химер. Первично-зародышевые клетки (ПЗК) возникают из соматических и являются предшественниками гамет, мигрируют в кровотоки и в конечном варианте становятся

клетками гонад. Для создания химер изолированные ПЗК культивируют в питательных средах и переносят в эмбриональную кровь или эмбриональные гаметы [4].

Хранение или криоконсервация ПЗК от разных пород может служить эффективной системой сохранения и восстановления генетических ресурсов у птиц. Некоторые авторы получают химеры птиц путем инъекции клеток костного мозга в бластодерму реципиентов [5], другие авторы применяют длительно культивируемые эмбрионально-стволовые клетки [6].

Результаты и их обсуждение. Первые сообщения об искусственно созданных химерах появились в девяностых годах прошлого века [7]. Различают внутривидовые химеры и межвидовые. Как известно, у млекопитающих для сохранения вида применяют клонирование животных, используя ядра соматических клеток, тогда как у птиц наблюдается совершенно иное эмбриональное развитие, что требует разработки новых подходов. У птиц оплодотворение происходит в воронке яйцевода с последующей активной пролиферацией бластодермальных клеток, а снесенное яйцо уже содержит более 50 тысяч не дифференцированных клеток.

В настоящее время для получения химер птиц и сохранения генетического разнообразия одним из лучших подходов может быть использование бластодермальных клеток. Мы работали с бластодермальными клетками (БК), которые являются плюрипотентными [8], способными в дальнейшем дифференцироваться как в соматические, так и половые клетки. Объектами исследования служили несколько пород кур: брама светлая и брама палевая, русская белая, минорка, полученных из фондов биоресурсной коллекции ВНИИРГЖ ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» [9]. Донорами служили свежеснесенные яйца, у которых выделяли бластодиски, отмывали от желтка, ресуспендировали и БК помещали для культивирования в стерильные чашки Петри, содержащие питательную среду ДМЕМ с добавлением 10 % фетальной сыворотки коров с антибиотиком гентамицином. Культивировали клетки в CO_2 термостате при температуре 38°C в течение двух суток. Синхронно в инкубаторе культивировали эмбрионы реципиентов, у которых в скорлупе делали треугольные пропилы. С помощью микроманипулятора



Рис. 1. Оперение химеры, полученной после трансплантации БК брамы светлой в эмбрион-реципиент брамы палевой.

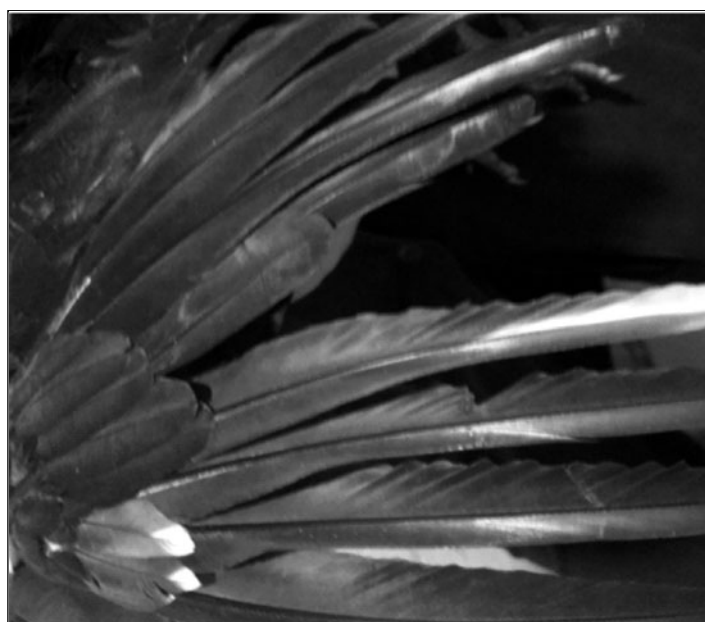


Рис. 2. Оперение химеры, полученной после трансплантации бластодермальных клеток птицы породы русская белая в ранний эмбрион птицы породы минорка.

вводили 3-5 мкл суспензии клеток доноров и помещали в инкубатор до стадии вылупления. Фенотип химер определяли по изменению окраски перьев в возрасте от суток и до половой зрелости.

Для создания межпородных химер были выбраны пары брама светлая и брама палевая, а также русская белая и минорка, обладающие контрастной окраской оперения, что является фенотипическим доказательством химеризма. Брама светлая и брама палевая выведены в США, относятся к декоративным и мясным породам. Обе породы имеют ген лохматоногости. В отличие от брамы палевой у брамы светлой есть ген серебристой окраски S (Silver), сцепленный с полом. Тогда как у брамы палевой имеется доминантный ген Co (Columbian) ограничивающий местами черный цвет. Пример межпородной химеры приведен на рис. 1. У полученной химеры можно видеть белые перья от донора брама светлая на фоне палевых перьев реципиента.

К интересной породе относится русская белая, которая была создана во Всесоюзном научно-исследовательском институте генетики и разведения сельскохозяйственных животных (ВНИИГРЖ) за счет селекции к устойчивости к низким температурам. Благодаря длительной се-

лекции птица обладает устойчивостью к неоплазмическим заболеваниям, адаптирована к пониженным температурам и относится к курам яичной породы с маркерным доминантным геном белой окраски оперения I (c – colour). Минорка относится к курам мясо-яичной породы, имеет черную окраску оперения и в настоящее время находится на грани исчезновения. Более подробная информация о породах кур представлена в альбоме пород и популяций кур ВНИИГРЖ, 2009 [10]. На рис. 2 представлена межпородная химера, где донором служили клетки эмбрионов породы русская белая, а реципиентом эмбрионы минорки.

Белые перья на рис. 2 указывают на фенотип химерной особи. Кроме того, как и в межвидовых химерах доминирует фенотип реципиентов, т.е. черная окраска перьев, свойственная породе минорка.

Наиболее часто химеры используются как промежуточный этап получения генетически модифицированных птиц. Разработанный метод получения инъекционных химер кур может быть применен при проведении исследований в области экспериментальной эмбриологии, токсикологии, криобиологии и птицеводстве.

Исследования проведены в рамках выполнения Государственного задания № 121052600352-3 по теме 0445-2021-0010.

Литература

1. Muir W. Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds / W. Muir, G. K. Wong, Y. Zhang, M. Groenen, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — V. 105. — №. 45. — P. 17312. — 17317. doi: 10.1073/pnas.0806569105.
2. Ricks C. A. The embryonated egg: a practical target for genetic based advances to improve poultry production / C. A. Ricks, N. Mendu, P. V. Pheips // Poultry Sci. — 2003. — V. 82. — Iss. 6. — P. 931–938.
3. Козикова Л. В. Химеры птиц: методы получения и перспективы их использования / Л. В. Козикова // Птицеводство. — 2019. — Т. 10. — №9. — С. 9–13.
4. Han J. Y. Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period / J. Y. Han, T. S. Park et al. // The Teriogenology. — 2002. — V. 58. — P. 1531–1539.
5. Heo Y. T. Production of somatic chimera chicks by injection of bone marrow cells into recipient blastoderms / Heo, Y. T., Lee et al. // J. Reprod. Dev. — 2012. — V. 58. — P. 316–322.
6. Van de Lavoie M.C. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells / M. C. Van de Lavoie, J. H. Diamond // Nature. — 2006. — V. 441. — P. 766–769.
7. Petite J. N., Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells / J. N. Petite, M. E. Clark, G. Liu, G. A. Verrinder and R. J. Etches // Development. — 1990. — V. 108. — P. 185–189.
8. Mañá Cruz Lypez-Díaz. Viable pluripotent chick blastodermal cells can be maintained long term in an alkaline defined medium. / Mañá Cruz Lypez-Díaz, Julia Bujón-Varela and Carlos Cadayniga-Valico // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal. — 2016. — V. 52. — V. 4. — P. 385.
9. ЦКП Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур. <https://vniigen.ru/ckp-geneticheskaya-kollekciya-redkix-i-ischezayushhix-porod-kur/>

10. Гераськина Г. Н. Альбом пород и популяций кур, сохраняемых и разводимых в «Экспериментальном хозяйстве ГНУ ВНИИГРЖ Россельхозакадемии» / О. П. Юрченко, И. И. Попов и др. г. Санкт-Петербург, Пушкин, 2009. С. 98.

Kozikova L., Polteva E.

New achievements in cell biology in poultry

Abstract.

Purpose: development of new cell technologies in poultry farming.

Materials and methods. The following breeds of chickens were selected for research: Russian White, Minorca, Light Brahma and Fawn Brahma in comparison with the interspecific chimera of Japanese quail and Beijing duck. All chimeras were obtained by transplantation in the latter case of primary germ cells, in other breeds of blastodermal cells into the sub-embryonic region of recipient embryos. All embryonic cells before transplantation were cultivated for two days in special culture media supplemented with fetal cow serum and antibiotics. Chimeras were identified by the presence of contrasting feathers, unusual for this breed.

Results. Unlike mammals, birds have a completely different embryonic development, which requires the development of new developments in cell biology to obtain chimeric birds. There are intrabreed chimeras and interspecies, obtained from organisms of different species. As an example of an interspecific chimera, a chimera of a Japanese quail and a Peking duck with a chimeric phenotype of black feathers on the neck is presented. Primary germ cells of Japanese quail served as donors. We obtained interbreeding chimeras of light and yellow brahma, when the donors were blastodermal cells of the light brahma, and the recipients were early embryos of the fawn brahma. Another variant of chimeras were chimeras between the breeds Russian White (donor blastodermal cells) and Minorca (embryo recipient).

Conclusion. The observed sharp decline in the number of bird breeds requires new approaches to their conservation and the creation of new genetic organisms. With the help of modern developments in cell biology, it has become possible to create a new strategy for obtaining chimeric birds. The use of pluripotent embryonic cells has led to the creation of interbreed and interspecies bird chimeras.

Key words: bird chimeras; blastodermal cells; donor embryos; recipient embryos; rare and endangered breeds of birds; genetically modified individuals; primary germ cells.

Authors:

Kozikova L. – Dr. Habil. (Bio Sci); e-mail: larkozik@list.ru;

Polteva E. – Junior Researcher; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; 196625, Russia, St. Petersburg, pos. Terolevo, Moscow highway, 55a.

References

1. Muir W. Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds / W. Muir, G. K. Wong, Y. Zhang, M. Groenen, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — V. 105. — №. 45. — P. 17312. — 17317. doi: 10.1073/pnas.0806569105.
2. Ricks C. A. The embryonated egg: a practical target for genetic based advances to improve poultry production / C. A. Ricks, N. Mendu, P. V. Pheips // Poultry Sci. — 2003. — V. 82. — Iss. 6. — P. 931–938.
3. Kozikova L. V. Himirers of birds: methods of obtaining and prospects for their use / L. V. Kozikova // Poultry farming. — 2019. — V. 10. — № 9. — P. 9–13.
4. Han J. Y. Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period / J. Y. Han, T. S. Park et al. // The Teriogenology. — 2002. — V. 58. — P. 1531–1539.

5. Heo Y. T. Production of somatic chimera chicks by injection of bone marrow cells into recipient blastoderms / Heo, Y.T., Lee et al. // J. Reprod. Dev. — 2012. — V. 58. — P. 316–322.
6. Van de Lavoie M.C. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells / M. C. Van de Lavoie, J. H. Diamond // Nature. — 2006. — V. 441. — P. 766–769.
7. Petitte J. N., Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells / J. N. Petitte, M. E. Clark, G. Liu, G. A. Verrinder and R. J. Etches // Development. — 1990. — V. 108. — P. 185–189.
8. Marna Cruz Lypez-Dhaz. Viable pluripotent chick blastodermal cells can be maintained long term in an alkaline defined medium / Marna Cruz Lypez-Dhaz, Julia Bujón-Varela and Carlos Cadayniga-Valico // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal. — 2016. — V. 52. — V. 4. — P. 385.
9. CCP Genetic collection of rare and endangered breeds of chickens. <https://vniigen.ru/ckp-geneticaya-kollekciya-redkix-i-ischezayushhix-porod-kur/>
10. Geraskina G. N. Album of breeds and populations of chickens, preserved and bred in the “experimental economy of the GNU VNIIGRZh Rosselkhozakademia” / O. P. Yurchenko, I. I. Popov and others. G. St. Petersburg, Pushkin, 2009. P. 98.