

УДК: 636.5.082.453

ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕР ГЕРМИНАТИВНОЙ ЛИНИИ ПТИЦ

М. Т. Тагиров

Институт птицеводства УААН, Борки, Змиевский район,
Харьковская область

E-mail: tagirov-m@yandex.ru

Для получения химер герминативной линии птиц были использованы клетки кур, выделенные из трех источников: бластодермы, эмбриональной крови и гонад. Бластодермальные клетки выделяли из свежеснесенных яиц, клетки крови и гонад — из зародышей 13–14-й и 28-й стадий развития соответственно и культивировали в течение 15 сут. Впервые в качестве агента, подавляющего развитие первичных зародышевых клеток, был использован бусульфан для получения бластодермальных химер птиц. Только в случае применения бластодермальных клеток были получены половые химеры. Разработанный метод позволяет получать химеры зародышевой линии птиц на уровне 70%, а выраженность данного признака варьирует в пределах от 4 до 61%.

Ключевые слова: птица, бластодермальные клетки, первичные зародышевые клетки, химеры, бусульфан.

Криоконсервация половых клеток — способ сохранения генетического материала для улучшения видов сельскохозяйственной птицы в будущем и сохранения исчезающих видов. Для некоторых видов сельскохозяйственных птиц уже разработаны методы криоконсервации спермы, однако консервация оплодотворенных яиц или эмбрионов, как у млекопитающих, до сих пор не достигнута. Это связано главным образом с крупными размерами яиц птиц и большим количеством желтка в них. Восполнение данного пробела — основная цель многочисленных работ последних двух десятилетий, посвященных изучению клеток ранних эмбрионов птиц [1–3]. Предметом исследований в этих работах являются три типа клеток: 1) бластодермальные; 2) эмбриональные стволовые (ЭСК); 3) первичные зародышевые клетки (ПЗК).

Недавно была доказана плюрипотентность ПЗК, которые являются предшественниками клеток спермы и яйцеклеток. Стволовые клетки, полученные из ПЗК, называются эмбриональными герминативными клетками.

У птиц, в частности у кур, на X стадии развития, что соответствует свежеснесенному яйцу, в бластодерме имеется немногочисленная (до 30–40 шт.) популяция клеток, обладающая плюрипотентными свойствами. Эти клетки локализованы в центральной области бластодермы. В литературе отсутству-

ют данные о непосредственном выделении ПЗК на более ранних стадиях развития и их изучении.

Основная проблема, возникающая на пути интенсивного использования ПЗК в программах по сохранению генофонда и получению трансгенной птицы, — это малое их количество при выделении. Для решения этой проблемы применяют следующие приемы:

1. Концентрирование ПЗК в градиенте различных веществ.

2. Различные методы для уменьшения количества ПЗК эмбриона-реципиента: облучение ультрафиолетом [4], гамма-радиацией [5], лазером [6], химическая обработка бусульфаном [7], механическое вырезание зародышевого полумесяца [8].

3. Увеличение количества путем культивирования ЭСК и ПЗК. Очень важно обеспечить культивирование данных типов клеток в чистоте, т.е. без включений других типов клеток. Это условие необходимо для точного контроля за результатами исследований по замораживанию и уровнем трансмиссии чужеродными генами при трансгенезе птиц. Кроме того, отпадает необходимость проведения процедур по концентрированию нужной популяции клеток. Поэтому основное внимание уделяется именно проблеме культивирования эмбриональных стволовых клеток, обладающих плюрипотентными свойствами.

Наиболее приемлемым и доступным средством подавления размножения ПЗК ре-

ципиентных эмбрионов является бусульфан (1,4-butandiol dimethanesulfonate). Бусульфан — алкилирующий агент, механизм действия которого основан на сшивании нитей ДНК, в результате чего нарушается процесс репликации молекулы. В отличие от других алкилирующих веществ, бусульфан может оказывать действие на неделящиеся клетки. Время полужизни бусульфана составляет 10–12 ч. Он находит широкое применение в медицинской практике при лечении различных видов лейкемии. В многочисленных работах на млекопитающих и птице доказан супрессивный эффект бусульфана на развитие половых клеток [9, 10, 11].

Согласно данным литературы бусульфан используют в качестве агента для подавления размножения хозяйских первичных зародышевых клеток на стадии их миграции (48, 60 и 72 ч инкубации) к месту локализации гонад [12]. С применением сравнительно высоких концентраций — от 25 до 125 мкг/яйцо — достигается почти полная стерильность гонад обработанных зародышей. Имеются сообщения о неэффективности применения концентраций меньше 400 нг/яйцо [13] и довольно высоком уровне стерильности гонад при концентрации в пределах до 250 нг/яйцо [14]. Разработаны также различные способы растворения и доставки бусульфана к развивающемуся зародышу: растворение в диметилформамиде или диметилсульфоксиде и доставка при помощи кунжутного масла. Хотя авторы и отмечают довольно высокий индекс стерильности обработанных гонад (элиминация 2/3 половых клеток), однако уровень трансмиссии зародышевой линии при инъекции донорских клеток увеличивался всего лишь от 4 (в контроле) до 14% [15].

Следует отметить, что во всех случаях, когда применяли бусульфан, последующая инъекция донорских клеток производилась в кровяное русло зародышей 3–3,5-суточного возраста. Технику микроинъекций в кровяное русло на ранних стадиях развития значительно сложнее осуществить из-за частых случаев кровоизлияний и гибели зародышей, чем введение клеток в подзародышевую полость.

Таким образом, несмотря на положительный эффект, наблюдаемый во многих работах, результаты действия бусульфана часто непредсказуемы. Поэтому такие параметры, как продолжительность и место воздействия, концентрация бусульфана, стадия развития эмбриона, нуждаются в уточнении для получения стабильных результатов.

Целью наших исследований была разработка эффективного метода получения химер птиц по линии герминативных клеток.

Материалы и методы

Все эксперименты с животными проведены с соблюдением положений «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей». Объектом исследований служили куры (*Gallus gallus domesticus*) пород род-айленд красный и белый леггорн, которые содержатся в условиях опытного хозяйства «Борки» Института птицеводства УААН.

Выделение бластодермальных клеток.

Бластодиски выделяли из свежеснесенных оплодотворенных яиц при помощи кольца из фильтровальной бумаги [16]. Полученные эмбрионы дважды отмывали от желтка в растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (170 мМ NaCl; 3,4 мМ KCl; 4 мМ Na₂HPO₄; 1,8 мМ KH₂PO₄; pH 7,2). Затем по 10–12 эмбрионов переносили в 1 мл ФСБ, содержащей 0,25% трипсина и 0,04% этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), и инкубировали 10 мин при 37 °С, после чего пипетировали пастеровской пипеткой и центрифугировали 10 с при 1 500 об/мин. Далее осажденные клетки ресуспендировали в 1 мл питательной среды 199, содержащей 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота. Суспензию клеток концентрировали центрифугированием 10 с при 1 500 об/мин с последующим удалением 0,7 мл супернатанта, а затем клетки вновь ресуспендировали в оставшейся среде.

Выделение ПЗК для культивирования

Для получения первичных зародышевых клеток из крови использовали эмбрионы 13–14-й стадии, для чего яйца инкубировали на протяжении 48–52 ч. От каждого эмбриона было получено по 2–4 мкл крови. Для выделения клеток крови в чашку Петри с питательной средой переносили кровь от 7–10 эмбрионов. Суспензию клеток отмывали путем центрифугирования (1 000 об/мин) в течение 2 мин, а затем переносили в 2–3 лунки 24-луночного планшета для культивирования.

Для выделения ПЗК из гонад использовали эмбрионы 28-й стадии развития. С этой целью яйца инкубировали на протяжении 6 сут в стандартных условиях. Гонады 6-суточных эмбрионов выделяли и переносили в фосфатно-солевой буфер (pH 7,2) без ионов кальция и магния. В одном эксперименте выделяли гонады от 10–12 эмбрионов, кото-

рые помещали в центрифужную пробирку с теплым раствором трипсина (0,25%) и ЭДТА (0,05%). После инкубации с раствором в течение 5 мин проводили пипетирование пастеровской пипеткой до получения гомогенной суспензии. Действие трипсина инактивировали добавлением питательной среды с сывороткой. После отмывания полученную суспензию использовали для культивирования.

Культивирование клеток. Культивирование клеток гонад, выделенных из 6-сут. эмбрионов, проводили в питательной среде следующего состава: ДМЕМ+F12(НАМ) (Sigma-Aldrich, США) (1:1) + 12% сыворотки плода коровы (Пан-Эко, Москва) + 56 мкМ меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США). Клетки крови, выделенные из эмбрионов 13–14-й стадии развития по Гамбургеру и Гамильтону [17], культивировали в среде, кондиционированной первичными клетками гонад. Для приготовления кондиционированной среды клетки гонад культивировали до достижения монослоя (3–4 сут), после чего среду частично заменяли свежим питательным раствором. Полученный супернатант очищали от клеточных включений центрифугированием при 3 000 об/мин 15 мин. Кондиционированную среду перед использованием разбавляли свежим питательным раствором в соотношении 1:3.

Клетки культивировали в лунках 24-луночного планшета в течение 10–15 сут.

Получение химер птиц. В качестве реципиентов использовали эмбрионы кур породы белый леггорн, которые являются гомозиготами по доминантному признаку белой окраски (*II*), а в качестве доноров — эмбрионы кур породы род-айленд красный гомозиготный по аллели дикого типа в этом локусе (*ii*).

Донорские клетки инъецировали в подзародышевую область яйц-реципиентов микропипеткой (внешний диаметр 50–70 мкм) через круглое отверстие диаметром 0,7 см в скорлупе. В каждый эмбрион вводили 3–4 мкл суспензии, содержащей 600–1 000 донорских клеток. Отверстие в яйце закрывали кусочком тонкой пленки, которую приклеивали к скорлупе при помощи белка и затем сверху заклеивали кусочком лейкопластыря большего размера.

В качестве химического агента, подавляющего деление ПЗК эмбрионов-реципиентов, использовали бусульфан (Sigma-Aldrich, США).

Результаты и обсуждение

Для учета времени действия бусульфана при инъекции донорских клеток в эмбрион-реципиент был проведен эксперимент по

Таблица 1. Влияние кратковременного снижения температуры во время инкубации на выводимость яиц

Варианты	Количество (шт.)	Выводимость яиц (количество/%)
К	27	23 (85,2)
1	20	13 (65,0)
2	16	5 (31,3)
3	18	14 (77,5)

Примечание. К — свежие неинкубированные яйца; 1 — яйца в течение 5 сут прогревали до 37,8 °С по 2 ч, после чего инкубировали при стандартных условиях до вывода; 2 — яйца на протяжении 5 сут прогревали до 37,8 °С по 2 ч, просверливали отверстие в скорлупе, заклеивали, после чего инкубировали при стандартных условиях до вывода; 3 — яйца в течение 48 ч прогревали до 37,8 °С, после чего инкубировали на протяжении 35 ч при 33 °С, затем переводили в стандартные условия инкубации до вывода.

влиянию кратковременного снижения температуры во время инкубации на выводимость яиц (табл. 1).

Вскрытие яиц в варианте 3 на 4-е сут инкубации показало, что эмбрионы развиваются с отставанием: в опыте — 17-я стадия развития (соответствует 53–64 ч инкубации), в контроле — 21-я стадия (84 ч).

На основе полученных данных в дальнейших исследованиях для обработки яиц бусульфаном была принята схема, согласно которой яйца-реципиенты прогревали в инкубаторе при 37,8 °С на протяжении 10 ч, что соответствует промежуточной стадии формирования первичной полоски, после чего в каждое яйцо вводили рассчитанное количество бусульфана. Бусульфан вводили микропипеткой в подзародышевую полость эмбриона в объеме 3–5 мкл жидкости. Яйца-реципиенты инкубировали с бусульфаном не менее 24 ч (время активности бусульфана при 33 °С).

Бусульфан растворяли в диметилформамиде. Будучи сильным растворителем, диметилформамид оказывает губительное действие на живые ткани, поэтому конечную его концентрацию доводили до 10% разбавлением питательной средой ДМЕМ.

Результаты опыта по влиянию разных концентраций бусульфана на эмбриональное развитие представлены в табл. 2.

Кроме концентраций, приведенных в таблице, были апробированы и другие: 50, 70 и 100 мкг бусульфана на яйцо. Бусульфан растворяли в диметилформамиде или диметилсульфоксиде, который затем разбавляли подсолнечным маслом в соотношении 1:1. Ни один из этих вариантов не дал приемлемых положительных результатов.

Таблица 2. Влияние разных концентраций бусульфана на развитие эмбрионов

Количество бусульфана на яйцо (нг/яйцо)	Количество яиц (шт.)	Перевод на вывод (количество/%)	Выводимость яиц (количество/%)
100	11	8 (72,7)	3 (27,2)
200	15	13 (86,6)	7 (46,6)
300	15	11 (73,3)	8 (53,3)
480	15	7 (46,6)	6 (40,0)
0 (контроль)	18	18 (100)	18 (100)

Как следует из представленных данных, выводимость яиц в группах, где инъектировали 100 и 200 нг бусульфана, ниже, чем при более высоких концентрациях. Возможно, это связано с тем, что сама процедура вскрытия яиц оказывает значительное повреждающее влияние на эмбриональное развитие, что было отмечено нами ранее [18].

В группах, где инъектировали 200, 300 и 400 нг бусульфана на одно яйцо, у полученных цыплят в суточном возрасте определяли массу гонад (табл. 3).

Таблица 3. Влияние бусульфана на массу гонад

Вариант	Количество (шт.)	Масса (мг)
Контроль (самки)	8	10,25 ± 0,52
Опыт (самки)	8	8,56 ± 0,77
Контроль (самцы)	9	9 ± 0,91
Опыт (самцы)	11	6,36 ± 0,32*

Примечание. * — $P < 0,05$

В дальнейших исследованиях для получения химер использовали предварительную обработку зародышей бусульфаном в концентрации 300 нг/яйцо (табл. 4).

Фенотипический химеризм у оперированных особей (5 голов) проявлялся лишь

после инъекции бластодермальных клеток. У двух взрослых кур из пяти донорское оперение практически полностью вытеснило родительское во время постнатального периода. Кроме цвета оперения химеризм выявляли также по окраске скорлупы яиц (рис. 1).

Для анализа химеризма по линии зародышевых клеток химерных цыплят выращивали до половозрелого возраста. Химерных петухов использовали для получения спермы и осеменения кур породы род-айленд красный, а молодки были осеменены спермой, полученной от петухов породы род-айленд красный. По результатам анализирующих скрещиваний были установлены процент химеризма по линии зародышевых клеток (процент химерных по линии половых клеток особей от общего количества выращенных до половозрелого возраста цыплят) и эффективность использования бластодермы в качестве источника первичных зародышевых клеток (соотношение донорского и реципиентного типов среди потомков химерных особей) (табл. 5). В случаях использования культивированных ПЗК из крови и из гонад в половозрелом возрасте анализировали по 5 курочек и по 2 петушка. В анализирующих скрещиваниях был получен 61 цыпленок. Все эти цыплята оказались гибридами (*Ii*), что свидетельствовало об отсутствии

Таблица 4. Получение химер кур после инъекции донорских клеток

Источник ПЗК	Количество инкубированных яиц (шт.)	Выводимость яиц (количество/%)	Фенотипический химеризм (шт./%)	% химеризма по окраске оперения
Бластодерма	38	11 (28,9)	5 (45,5)	5–100
Гонады	81	13 (16,0)	0	–
Кровь	27	9 (33,3)	0	–

Таблица 5. Результаты анализирующего скрещивания

Пол птицы	♀					♂	
№ птицы	1	2	3	4	5	1	2
Количество потомков	46	24	24	32	20	41	3
Количество генотипов <i>ii</i>	28	1	1	14	0	10	0
Количество генотипов <i>Ii</i>	18	23	23	18	20	31	3
Доля половых химер, %	60,87	4,16	4,16	43,75	0,00	24,39	0

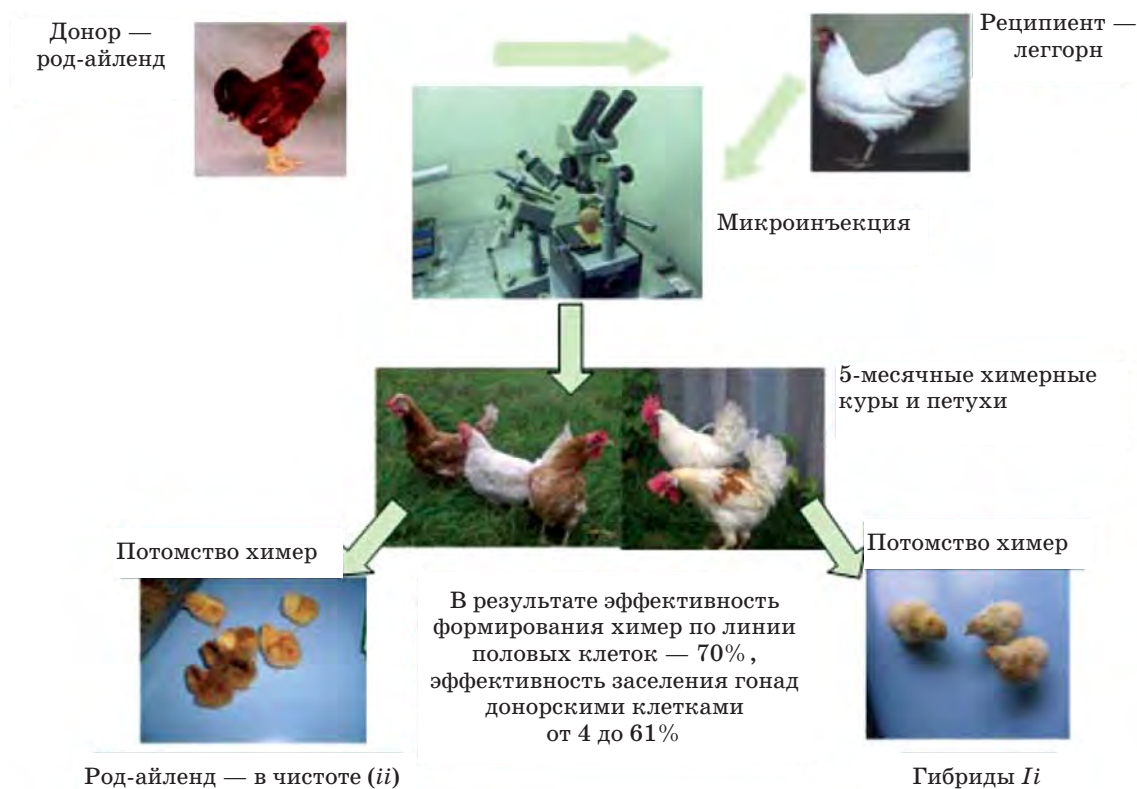


Рис. 1. Получение химер половой линии птиц

включения инъецированных клеток в половую линию клеток реципиентов.

Как свидетельствуют представленные в таблице данные, при инъецировании бластодермальных клеток процент химеризма по линии половых клеток составил 71,42% (5 из 7), а выраженность этого признака у различных особей варьировала от 4 до 61%. В то же время результаты применения культивированных клеток крови и гонад показали, что при использованных условиях культивирования эти типы клеток теряют свойство интеграции в линию половых клеток.

При планировании экспериментов исходили из необходимости проведения процедуры микроинъекции донорских клеток в подзародышевую полость, а не в кровяное русло. Поэтому в первом эксперименте выяснили, что на ранних стадиях развития (48-часовые эмбрионы) возможно снижение температуры инкубации до 33 °C в течение 35 ч без значительного снижения выводимости инкубируемых яиц — 77,5%. Контроль за развитием эмбрионов показал, что зародыши при таких условиях отстают в своем развитии на 24 ч. Это время можно использовать для химического воздействия на зародыш с целью подавления развития собственных ПЗК. Поскольку многие иссле-

дователи, работавшие с бусульфамом, отмечали его тератогенный эффект [19], мы исходили из необходимости применения его минимальной концентрации. Такая концентрация может иметь эффект только в случае доставки химического агента в непосредственной близости от зародыша. Бусульфам инъецировали проколом центральной области бластодермы в подзародышевую полость. Минимальное количество подзародышевой жидкости на промежуточной стадии формирования первичной полоски должно было обеспечивать оптимальные условия для проявления алкилирующего эффекта бусульфана. Анализ влияния различных концентраций бусульфана на выводимость инкубируемых яиц показал сравнительно высокие результаты выводимости яиц (более 50%) при концентрации 300 нг/яйцо, используемой и в дальнейших экспериментах.

В более ранних исследованиях нами было установлено, что при культивировании клеток крови (55 ч инкубации) в питательной среде, кондиционированной с клетками гонад, выделенных из 6-суточных эмбрионов, определенная популяция клеток садится на подложку культивирования и пролиферирует. Эта популяция клеток окрашивается при Шифф-реакции в малиново-красный

цвет, что характерно для первичных зародышевых клеток птиц на данной стадии развития. Поэтому наряду с бластодермальными клетками были испытаны культивированные клетки крови и гонад на способность формирования химер зародышевой линии. Как свидетельствуют приведенные в табл. 5 данные, только при использовании бластодермальных клеток, выделенных из свежеснесенных яиц, были получены половые химеры. Из 11 бластодермальных химер до половозрелого возраста выжили 7 особей: 5 курочек и 2 петушка. Следует отметить, что у петуха № 2 сперма была значительно худшего качества, чем у первого, и вначале состояла только из плазмы. Из 37 яиц, полученных от курочек породы род-айленд красный, осемененных этим петухом (возраст петуха превышал 7 мес), оплодотворенными оказались всего 3. Вылупившиеся цыплята были гибридами (*Ii*), что свидетельствовало о том, что, несмотря на явно выраженную стерильность гонад, донорские первичные зародышевые клетки не заселили гонады эмбриона-реципиента.

Разработанный метод получения химер герминативной линии включает следующие этапы:

1. Прединкубация яиц-реципиентов 8–10 ч при 37,8 °C (промежуточная стадия формирования первичной полоски).

2. Химическая обработка яиц-реципиентов алкилирующим агентом бусульфана (вводится в подзародышевую полость в концентрации 300 нг/яйцо).

3. Инкубация яиц не менее 24 ч при 30–32 °C — время действия бусульфана, на протяжении которого он теряет свою активность.

4. Инъекция донорских клеток в подзародышевую полость и инкубация до вывода при стандартных условиях инкубации.

Этот метод можно также использовать для разработки режимов замораживания генетических ресурсов птиц и биотехнологических подходов улучшения продуктивных качеств и устойчивости птицы к инфекционным заболеваниям.

Таким образом, разработана схема использования бусульфана в качестве агента для подавления пролиферации первичных зародышевых клеток в экспериментах по получению герминативных химер птиц.

Выводимость яиц после инъекции бусульфана находится в пределах 53%, а после инъекции чужеродных клеток — на уровне 30%.

Разработанный метод позволяет получение химер герминативной линии птиц на уровне 70%, а выраженность данного признака у отдельных особей варьирует в пределах от 4 до 61%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Park T. S., Jeong D. K., Kim J. N. et al. Improved Germline Transmission in Chicken Chimeras Produced by Transplantation of Gonadal Primordial Germ Cells into Recipient Embryos // *Biol. Reproduct.* — 2003. — N 68. — P. 1657–1662.
2. Naito M. Development of avian embryo manipulation techniques and their application to germ cell manipulation // *Anim. Sci. J.* — 2003. — N 74. — P. 157–168.
3. Li B. C., Chen G. H., Qin J. et al. Suitable Stages for Isolation and Culture PGCs from Chicken Embryos // *Poultry Sci.* — 2005. — N 4 (11). — P. 885–890.
4. Reynaud G. Reproductive capacity and offspring of chickens submitted to a transfer of primordial germ cells during embryonic life // *Roux's Arch. Develop. Biol.* — 1976. — N 179. — P. 85–110.
5. Thoraval P., Lasserre F., Coudert F., Dambrine G. Somatic and germ-line chicken chimaeras obtained from Brown and White Leghorns by transfer of early blastodermal cells // *Poultry Sci.* — 1994. — N 73. — P. 1897–1905.
6. Mims M. F., McKinnel R. G. Laser irradiation of the chick embryo germinal crescent // *J. Embryol. Experim. Morphol.* — 1971. — N 26. — P. 31–36.
7. Mozdziak P. E., Wysocki R., Angerman-Stewart J. et al. Production of Chick Germ-line Chimeras from Fluorescence-Activated Cell-Sorted Gonocytes // *Poultry Sci.* — 2006. — N 85. — P. 1764–1768.
8. McCarry J. R., Abbott U. K. Functional differentiation of chick gonads following depletion of primordial germ cells // *J. Embryol. Experim. Morphol.* — 1982. — N 68. — P. 161–174.
9. Vick L., Luke G., Simkiss K. Germ-line chimaeras can produce both strains of fowl with high efficiency after partial sterilization // *J. Reproduct. Fertil.* — 1993. — N 98 (2). — P. 637–641.
10. Brinster R. L. The effect of cells transferred into mouse blastocyst on subsequent development // *J. Experim. Med.* — 1974. — N 140. — P. 1049–1056.
11. Ogawa T., Dobrinski I., Brinster R. L. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat // *Tis. Cell.* — 1999. — N 31. — P. 461–472.

12. Reynaud G. The effect of busulfan on the germ cell line of the quail embryo // Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. — 1981. — N 70. — P. 251–258.
13. Hallett J. S., Wentworth B. C. The effects of busulfan on gonadal differentiation and development in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) // Poultry Sci. — 1991. — N 70 (7). — P. 1619–1620.
14. Furuta H., Fujihara N. Proliferation of exogenously injected primordial germ cells (PGCs) into busulfan-treated chicken embryos // Asian J. Androl. — 1999. — N 1 (4). — P. 187–190.
15. Vick L., Luke G., Simkiss K. Germ-line chimaeras can produce both strains of fowl with high efficiency after partial sterilization // J. Reproduct. Fertil. — 1993. — N 98 (2). — P. 637–41.
16. Lucas A. M., Jamroz C. Atlas of Avian Hematology. / Washington. D. C: U. S. Department of Agriculture, 1961.
17. Hamburger V., Hamilton H. L. A series of normal stages in development of the chick // J. Morphol. — 1951. — N 88. — P. 49–92.
18. Тагіров М. Т., Терещенко О. В., Артеменко О. Б., Білецька Г. В. Вдосконалення методу реабілітації оперованих яєць // Укр. конференція молодих учених та аспірантів з питань птахівництва: Тези доп. — Харків, 1992. — С. 4.
19. Swartz W. J. Response of early chick embryos to busulfan // Teratology. — 1980. — N 21. — P. 1–8.

ОТРИМАННЯ ХИМЕР ГЕРМІНАТИВНОЇ ЛІНІЇ ПТАХІВ

М. Т. Тагіров

Інститут птахівництва УААН, Борки,
Зміївський район, Харківська область

E-mail: tagirov-m@yandex.ru

Для одержання химер гермінативної лінії птахів використовували клітини курей, виділені з трьох джерел: бластодерми, ембріональної крові та гонад. Бластодермальні клітини виділяли зі свіжознесених яєць, клітини крові та гонад — із зародків 13–14-ї та 28-ї стадій розвитку відповідно й культивували протягом 15 діб. Уперше як агент, що пригнічує розвиток первинних зародкових клітин, застосовували бусульфан для одержання бластодермальних химер птахів. Тільки в разі використання клітин із бластодерми отримали статеві химери. Розроблений метод дозволяє одержувати химери зародкової лінії птахів на рівні 70%, а вираженість даної ознаки варіює в межах від 4 до 61%.

Ключові слова: птах, бластодермальні клітини, первинні зародкові клітини, химери, бусульфан.

PRODUCTION OF AVIAN GERM LINE CHIMERAS

M. T. Tagirov

Poultry Research Institute of the Ukraine
Academy of Agrarian Sciences, Borki,
Zmiev District of Kharkiv Region

E-mail: tagirov-m@yandex.ru

Three types of the cells for production of avian germ line chimeras: blastodermal, blood and gonad cells were used. Blastodermal cells were isolated from freshly-laid eggs, blood and gonad cells — from embryos of 13-14 and 28 stages of development respectively and were cultured for 15 days. For the first time busulfan as an agent suppressing proliferation of host primordial germ cells was used for production of avian chimeras at blastoderm stage. Only in the case of blastoderm cells using germ line chimeras were obtained. The method allows germ line chimeras production at the level of 70% and expressiveness of the property varies from 4 to 61%.

Key words: bird, blastodermal cells, primordial germ cells, chimeras, busulfan.