

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюетао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

УДК 575.636.597.034

ВПЛИВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕДУР ТРАНСГЕНОЗУ НА ВИЖИВАНІСТЬ ЕМБРІОНІВ СВІЙСЬКОЇ КАЧКИ

П. В. КОРОЛЬ, аспірант

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН

С. О. КОСТЕНКО, доктор біологічних наук, професор

Національний університет біоресурсів і природокористування

О.М. КОНОВАЛ, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК

М.С. ДОРОШЕНКО, аспірант

Національний університет біоресурсів і природокористування

Л. ЛУ, кандидат біологічних наук, професор

Інститут ветеринарії та зоотехнії Чжецзянської академії аграрних наук,

Ханчжоу, КНР

А. М. ЧЕПІГА, кандидат сільськогосподарських наук, біотехнолог

ПРАТ "ІНДАР", Київ

О. В. СИДОРЕНКО кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий
співробітник, завідувач відділу

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН,

П.П. ДЖУС, кандидат біологічних наук, завідувач лабораторії

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН,

Н. П. СВИРИДЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Т. В. ЛИТВИНЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Х. СЮЕТАО., кандидат ветеринарних наук, головний зоотехнік

Zhejiang Guowei Technology Co. LTD

С. БУ, кандидат біологічних наук, науковий співробітник

Інститут ветеринарії та зоотехнії Чжецзянської академії аграрних наук,

Ханчжоу, КНР

Л. Лі, головний менеджер

Zhejiang Guowei Technology Co. LTD

Є. Р. КОСТЮК, студент факультету тваринництва та водних біоресурсів

П. О. ФІЛПОВА, студентка факультету тваринництва та водних біоресурсів

Національний університет біоресурсів і природокористування України

М. В. ДРАГУЛЯН, кандидат біологічних наук, біотехнолог

Rinderunion Baden-Württemberg Genetik GmbH

E-mail: vbrj@ukr.net

<https://doi.org/dopovidi2021.04.006>

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

Анотація. Завдяки високому репродуктивному потенціалу, короткому інтервалу між поколіннями та ембріональному розвитку поза організмом матері, птиця характеризується унікальними можливостями для її використання у фундаментальних та прикладних біологічних дослідженнях. Створення трансгенної птиці ускладнюється будовою її непрозорої яйцеклітини з великим жовтком та унікальною репродуктивною системою цього класу. До цього часу методи створення гермінтативних химер качок стикаються з труднощами, пов'язаними зі структурою шкаралупи водоплавних птахів.

Тому метою роботи було встановлення дії чинників, які впливають на виживаність трансгенних ембріонів за використання різних методів введення ДНК-конструкції в геном качки.

Об'єктами дослідження були качки (*Anas platyrhynchos*) порід шанма (*Shan partridge*) та шаосінь (*Shaoxing*), що утримуються на фермі Zhejiang Guowei Technology Co. LTD, КНР. Дослідження проводили в лабораторії генетики птиці Чжецзянської Академії аграрних наук та на качиній фермі компанії Zhejiang Generation Biological Science and Technology Co., Ltd. (провінція Чжецзян, КНР).

Для аналізу виживаності використовували ембріони, отримані за використання різних методів введення ДНК трансгенної конструкції: 1) пряма ін'єкція плазмідної-ДНК у підембріональну порожнину; 2) трансфекція ДНК зі спермою; 3) ін'єкція трансфікованих бластомерів донорів в ембріони реципієнтів після дії бусульфану або ультрафіолету.

За весь період було досліджено понад 1100 яєць. Наявність трансгену перевіряли методом ПЛР. У результаті дії прямої ін'єкції ДНК трансгенної конструкції під ембріональну порожнину 300 ембріонів 35,7 % ембріонів не розвивалися після ін'єкції, 36,0 % зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії (9 день інкубації), 8 % загинули в період 10–15 днів, 17,3 % – 16–25 день. Усього після прямих ін'єкцій отримали 9 живих каченят (виживаність склала 3 %), серед яких 4 були трансгенними.

Після осіменіння качок трансфікованою спермою на інкубацію було закладено 292 яйця. Після першої овоскопії незаплідненими виявилися 51,4 % яєць; 0,7 % ембріонів зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії, 1,0 % загинули в період 10–15 днів, 17,8 % – 16–25 день, 6,2 % задихнулися під час виводу. Усього після використання трансфікованої сперми отримали 67 живих каченят (виживаність ембріонів від запліднених яєць склала 47,2 %). Поміж 31 дорослої тварини 19 були трансгенними.

Для стерилізації клітин реципієнта за використання бусульфану у концентрації 300 нг на яйце з подальшою ін'єкцією бластодермальних трансфікованих клітин донорів дослідили 200 ембріонів, серед яких не розвивалися після ін'єкції 61,0 % ембріонів, 17,0 % зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії, 12,5 % загинули в період 10–15 днів, 9,0 % – 16–25 день. Усього після ін'єкцій бусульфану у концентрації 300 нг на яйце отримали 1 живе каченя (виживаність склала 0,5 %).

За використання бусульфану в концентрації 150 нг на яйце дослідили 100 ембріонів, поміж яких не розвивалися після ін'єкції 68,0 % ембріонів, 11,0 %

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії, 5 % загинули в період 10–15 днів, 14,0 % – 16–25 день. Усього після ін'єкцій бусульфану у концентрації 150 нг на яйце отримали 2 живих каченят (виживаність склала 0,5 %).

Використання бусульфану в концентрації 75 нг на яйце випробували на 100 ембріонах, серед яких не розвивалися після ін'єкції 12,0 % ембріонів, 27,0% зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії, 14,0 % загинули в період 10–15 днів, 42,0 % – 16–25 день. Усього після ін'єкцій бусульфану у концентрації 75 нг на яйце отримали 5 живих каченят (виживаність склала 5 %).

Опромінення ультрафіолетом 200 ембріонів упродовж 1 години з подальшою ін'єкцією бластодермальних трансфікованих клітин донорів призвело до загибелі після ін'єкції 20 %, зупинились у розвитку 27,5 %, 7,5 % загинули в період 10–15 днів, 35,0 % – 16–25 день. Усього за використання ультрафіолетового опромінення отримали 20 живих каченят (виживаність склала 10 %). Після настання статевої зрілості лише 13 з 20 тварин дали потомків. Аналіз ДНК, виділеної з крові, пір'я, сперми, засвідчив, що з цих 13 репродуктивно здатних особин 7 були трансгенними химерами. Використання ультрафіолету дозволило зменшити вплив інфікованості яєць, яка обумовлена структурою шкаралупи водоплавної птиці.

Таким чином, самим безпечним для виживання ембріонів виявився метод осіменіння качок трансфікованою спермою, за використання якого вижили 47,2 % ембріонів.

Ключові слова *Anas platyrhynchos*, качка свійська, трансгеноз, виживаність ембріонів, трансфекція ДНК зі спермою, ін'єкції бластомерів, бусульфан, опромінення ультрафіолетом

Актуальність. Завдяки високому репродуктивному потенціалу, короткому інтервалу між поколіннями та ембріональному розвитку поза організмом матері, птиця надає унікальні можливості для її використання у фундаментальних та прикладних біологічних дослідженнях [1]. Методи клонування та трансгенезу стали рутинним інструментом для створення тваринних моделей розвитку [2, 3], хвороб [4], біореакторів та продуцентів цінних біологічно активних препаратів [5, 6], високопродуктивних об'єктів

аквакультури [7]. Створення трансгенної птиці ускладнюється будовою її непрозорої яйцеклітини з великим жовтком та унікальною репродуктивною системою цього класу. Пряме мікроін'єкційне введення ДНК в ооцит, яке часто використовують у ссавців [8], практично неможливе для птиці [9, 10], оскільки запліднення відбувається в інфудібулломі репродуктивного тракту і може бути поліспермічним [2]. Тому маніпуляції з зиготою виявилися складними для їх використання у процесі створення трансгенної птиці [9]. За останні

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюетао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

десятиліття були розроблені деякі альтернативні стратегії отримання трансгенної птиці за допомогою химерних тварин, створених через перенесення бластодермальних клітин [10, 11].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Первинні статеві клітини (PGC) успішно використовують для створення трансгенної птиці [11] та як інструмент для збереження генетичних ресурсів аборигенних порід [12-14]. Проте, виділення й культивування в пробірці культури PGC водоплавної птиці описується рідко, і на відміну від багатьох досліджень PGC курей, є лише кілька повідомлень про PGC водоплавної птиці [15, 16]. Тому техніка створення трансгенної качки практично не розроблена.

Сьогодні качка свійська (*Anas platyrhynchos Linnaeus, 1758*) є малодослідженим науковим (племінним) об'єктом у порівнянні з видом *Gallus gallus domesticus*, *Coturnix coturnix*, але одним з економічно найперспективніших видів птиці. Качка може виділяти багато білка в яйцепроводі, та може регулярно продукувати яйця упродовж 20–24 годинного циклу, що є дуже привабливим засобом для синтезу лікувальних засобів на білковій основі, оскільки стерильні яйця захищені твердою оболонкою. Бусульфани використовують для пригнічення проліферації клітин.

Ін'єкція бусульфани в підембріональну порожнину – один із методів, що збільшує кількість донорських клітин під час створення химер [17, 18].

Однак, до цього часу методи створення химер качок зустрічаються з труднощами, пов'язаними зі структурою шкаралупи водоплавних птахів [19]. Трансгенні тварини практично не поступаються своїм нетрансгенним аналогам за продуктивністю [20]. Вплив репродуктивного сезону на продуктивність сперматозоїдів зародкових химер селезнів вивчався нами раніше [21].

Тому метою роботи було встановлення чинників, які впливають на виживаність трансгенних ембріонів за використання різних методів введення ДНК-конструкції в геном качки.

Матеріали і методи дослідження. Усі експерименти з тваринами проводилися відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей".

Об'єктами дослідження були качка порід шанма (*Shan partridge*) та шаосінь (*Shaoxing*), що утримуються на качиній фермі Zhejiang Guowei Technology Co. LTD, КНР. Дослідження проводили в лабораторії генетики птиці Чжецзянської академії

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюетао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

аграрних наук та на качиній фермі компанії Zhejiang Generation Biological Science and Technology Co., Ltd. (провінція Чжецзян, КНР).

Для аналізу виживаності використовували ембріони, отримані за різних методів введення ДНК трансгенної конструкції, було досліджено понад 1100 яєць: 1) пряма ін'єкція ДНК конструкції в порожнину бластодермального диску (ПБДД) реципієнта на стадії X за Eyal-Giladi and Kochav, 1976 [22, 23]; 2) трансфекція сперматозоїдів з ДНК; 3) ін'єкція донорських бластодермальних клітин (ДБДК) в ембріони реципієнтів стерилізованих бусульфаном 4) ін'єкція трансфікованих донорських бластодермальних клітин (ТДБДК) реципієнтам стерилізованим ультрафіолетом (рис. 1).

Виділення бластодермальних клітин. Для отримання химер качок застосовували метод, описаний М.Т. залишилося.

Тагіровим [18]. Бластодиски виділяли зі щойно знесених запліднених яєць за допомогою кільця з фільтрувального паперу [24]. Отримані ембріони двічі відмивали від жовтка в PBS (170 mM NaCl; 3,4 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,2). Потім 10–12 ембріонів переносили в 1 мл PBS, що містив 0,25% трипсину та 0,04% етилендіаміну тетраацетату (EDTA), інкубували упродовж 10 хвилин за 37 °С, після чого піпетували піпеткою Пастера та центрифугували упродовж 10 с за 1500 об/хв. Осад ресуспендували в 1 мл живильного середовища RPMI 1640, що містило 10 % фетальної сироватки теляти. Суспензію клітин концентрували центрифугуванням упродовж 10 с за 1500 об/хв., потім видаляли 0,7 мл надосадової рідини, далі клітини ресуспендували знову в середовищі, що

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свиріденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

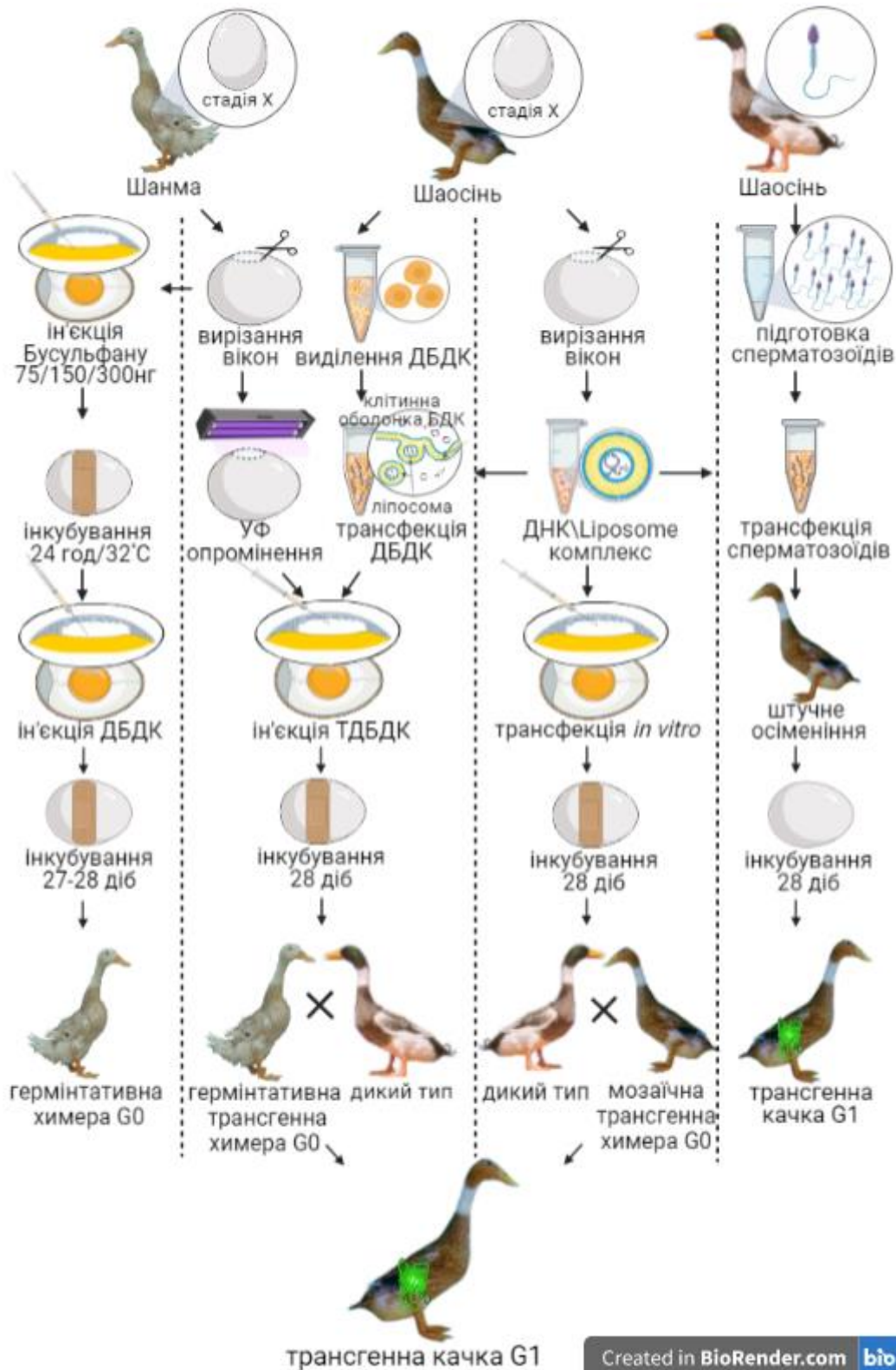


Рис.1. Застосовані методи введення ДНК трансгенної конструкції

Отримання химер. У якості реципієнтів використовували ембріони качок породи шанма, а донорів – ембріони качок породи

шаосінь, гомозиготні за алелем гена кольору оперення (дикий тип). Донорські клітини вводили в ПБДД реципієнтів мікропіпеткою

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

(зовнішній діаметр 50–70 мкм) через круглий отвір (вікно) діаметром 0,7 см в оболонці. В кожний ембріон вводили 3–4 мкл суспензії, яка містила 600–1000 донорських клітин. Отвір у яйці був покритий шматочком тонкої поліетиленової плівки, яка була приклеєна до шкаралупи білком, а потім зверху приріплена клейкою стрічкою. Бусульфам (SigmaAldrich, США) використовували як хімічний агент, що пригнічує поділ первинних статевих клітин (PGC) ембріонів-реципієнтів.

Підготовка ембріонів – реципієнтів. Між тупим і гострим кінцями яєць було зроблено отвір у яєчній шкаралупі (вікно) реципієнтів (породи шанма). (Це зменшило відстань між інжектором і голкою ембріона). Яйця реципієнтів інкубували упродовж 8–10 годин за температури 38 °С. Для стерилізації примордіальних статевих клітин реципієнта, яйця опромінювали під ультрафіолетовим (УФ) світлом, упродовж однієї години, за допомогою УФ боксу за кімнатної температури.

Приготування розчину бусульфаму. Бусульфам розчиняли безпосередньо перед використанням у 10 % диметилсульфоксиді (ДМСО), розведеному живильним середовищем RPMI 1640 – 3–5 мкл. Використовувані концентрації становили 300 нг/яйце, 150 нг/яйце та 75 нг/яйце.

Обробка бусульфамом. Після інкубації яєць-реципієнтів упродовж 8 годин у них були відкриті вікна. Бусульфам вводили в підшкірну порожнину ембріона за допомогою мікропіпетки (1,5–3 мкл). Після введення бусульфаму порожнину яйця заповнювали культуральним середовищем (RPMI-1640) з додаванням антибіотиків (ампіцилін, стрептоміцин), отвір закривали поліетиленовою плівкою та клейкою стрічкою. Яйця інкубували за пониженої температури (+32 °С) упродовж 24 годин, щоб продовжити тривалість дії бусульфаму на первинні статеві клітини.

Забір крові, пульпи пір'я та ембріонів. Пір'я з пульпою відбирали від кожної качки і поміщали в окремі пробірки, потім заморожували за – 20 °С і зберігали до виділення ДНК. Зразки крові (2 мл) качок відбирали з вени *cutanea ulnaris* у одноразові вакуумні збірні пробірки з ЕДТА. З кожного зразка крові виділяли геномну ДНК. Зразки ембріонів відбирали з яєць інкубованих упродовж 10 днів. До виділених ембріонів додавали 500 мкл розчину PBS, гомогенізували і піпетували, а потім 100 мкл гомогенату збирали в окремі пробірки і заморожували за – 20°С до екстракції ДНК.

Полімеразна ланцюгова реакція. Наявність трансгену у птиці перевіряли методом ПЛР. Для досліджень використали два

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

праймери, розташовані поза геном EGFP: прямий праймер (5'-GTGTACGGTGGGAGGTC-3') та зворотній (5'-AAATGTGGTATGGCTGATTATG-3'). Програма полімеразної ланцюгової реакції складалася з початкової стадії за 94°C упродовж 3 хв., потім реакції за 94°C упродовж 15 секунд (с), а потім відпалу за 55 °C

упродовж 15 с і синтезу за 72°C упродовж 30 с 35 циклів. На останній стадії продукт ПЛР подовжували за 72°C упродовж 3 хв. Продукт ПЛР мав розмір 903 п.н. і був секвенований для підтвердження правильної ампліфікації. Експерименти з ПЛР та секвенування були проведені компанією Genery Biotechnology Company (рисунок 2).

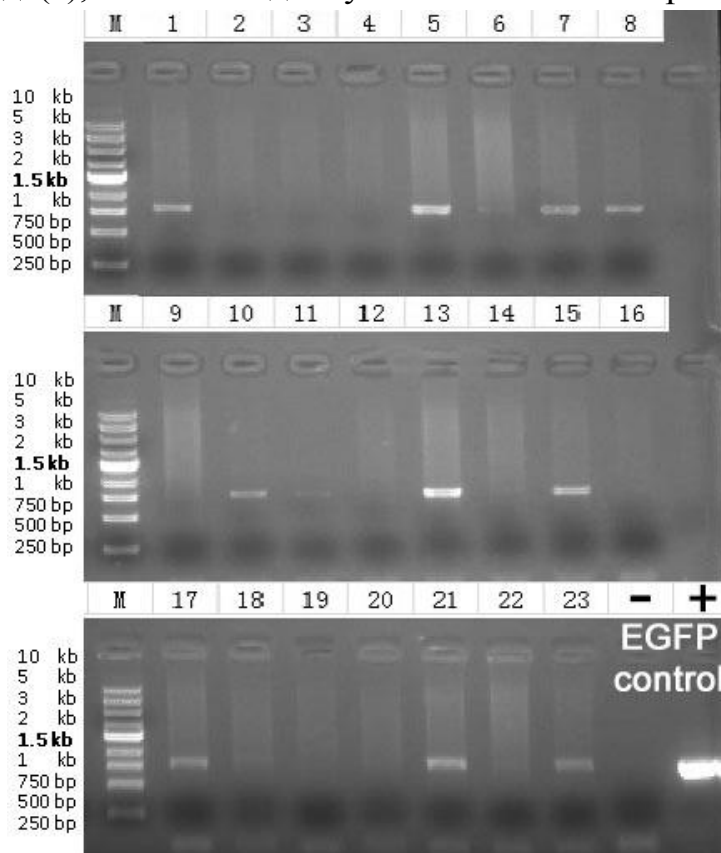


Рис. 2. Результати розділення продуктів ПЛР в поліакриламідному гелі.

Підготовка сперми до трансфекції. Час від відбору сперми від першого качура до початку її підготовки до трансфекції в лабораторії тривав 45 хв. Перед змішуванням сперми, від всіх качурів, були відібрані зразки для оцінки активності і концентрації сперматозоїдів.

Змішану сперму двократно осаджували центрифугуванням (1000g, 10хв.), з заміною надосадової рідини, середовищем OPTI-MEM (Invitrogen, США) після кожного осадження.

Трансгенна ДНК-конструкція. Інсерція гена EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein – посилений

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

зелений флуоресцентний білок), опосередкована гомологічною репарацією (HDR), була досягнута за допомогою чотирьох плазмід. Плазміда рХ330, яка містила ген Cas9. Дві плазміди рBR322, кодуєчі направляючі РНК: sgRNA1 та sgRNA2. Плазміда рBR322-HDR-EGFP була сконструйована так, щоб містити ліві і праві гомологічні послідовності, що кодують ген EGFP. Послідовність ДНК для конструювання HDR-EGFP-інсерції та направляючих 20-нуклеотидних sgRNA1 та sgRNA2 були взяті з послідовності «*A. platyrhynchos* Spindlin 1 (SPIN1), мРНК» (NCBI: XM_005016235.3).

Приготування суміші ДНК-ліпосомний комплекс-сперматозоїди для штучного осіменіння. Для трансфекції сперматозоїдів 300 мкл плазмідної ДНК (25 нг/мл кожного вектора) змішували з 1 мл середовища OPTI-MEM. Тим часом 300 мкл Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, США) змішували з 1 мл середовища OPTI-MEM. Після 5 хвилин інкубування за кімнатної температури, розчини об'єднували та інкубували ще 20 хвилин. Комплекс ДНК-Lipofectamine® 2000 додавали до підготовлених сперматозоїдів, перемішували та 1 годину, інкубували за кімнатної температури.

Штучне осіменіння. Кожній качці в яйцепровід, за допомогою

скляного шприца-катетера на глибину 2–4 см [25] вводили приблизно 500 млн активних сперматозоїдів. Після осіменіння качок трансфікованими сперматозоїдами яйця збирали і інкубували упродовж 28 днів, виділяли завмерлі ембріони та вирощували отриманих каченят.

Результати дослідження та їх обговорення. Варто зазначити, що в наших попередніх дослідженнях значна частина ембріонів качки загинула від інфекції. Це могло бути обумовленим інфікованістю качиних яєць, яку складно подолати використанням стандартної дезинфекції. Вирізання вікна в качиному яйці сприяє поширенню інфекції на ембріон, а умови інкубації є сприятливими для її розвитку. Перші спроби заповнення порожнини яйця після ін'єкцій донорським білком, а також покриття вікна донорською оболонкою призводили до зараження ембріонів усіх дослідних груп. Тому в цьому дослідженні донорський білок був замінений на культуральне середовище з додаванням антибіотиків, а донорська плівка на поліетілен. Іншим важливим чинником, який впливав на виживаність ембріонів був розмір вікна і його місце розташування у яйці. Зменшення розміру вікна і його розташування між гострим і тупим кінцем яйця підвищили ефективність

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

ін'єкцій за рахунок виживаності ембріонів.

Результати інкубування качиних яєць за використання різних методів введення ДНК конструкції розміщені в таблиці 1.

У результаті дії прямої ін'єкції ДНК трансгенної конструкції під ембріональну порожнину 300 ембріонів 35,7 % ембріонів не розвивалися після ін'єкції, 36 % зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії (9 день інкубації), 8% загинули в період 10–15 днів, 17,3 % – 16–25 день. Усього після прямих ін'єкцій отримали 9 живих каченят (виживаність склала 3 %), серед яких 4 були трансгенними.

Після штучного осіменіння (ШО) качок трансфікованою спермою на інкубацію було закладено 292 яйця. Після першої овоскопії незаплідненими виявилися 51,4 % яєць; 0,7 % ембріонів зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії, 1,0 % загинули в період 10–15 днів, 17,8 % – 16–25 день, 6,2 % задихнулися під час виводу. Усього після використання трансфікованої сперми отримали 67 живих каченят (виживаність ембріонів від запліднених яєць склала 47,2 %). Серед 31 дорослих тварин 19 були трансгенними [26].

1. Результати інкубування качиних яєць за різних методів трансгенезу

Метод	Трасфекція сперми + ШО		Ін'єкції в порожнину БДД (EGK-X)									
			Пряма ін'єкція		ТДБДК+УФ		ДБДК+Бусульфан					
							75 нг	150 нг	300 нг			
Одиниці виміру	шт	%	шт	%	шт	%	шт	шт	шт	%		
Закладено ембріонів	292	100	300	100	200	100	100	100	200	100		
Вилучено на овоскопії:												
1	не розвивались		150	51.4	107	35.7	40	20.0	12	68	122	61.0
	«кров'яні кільця»		2	0.7	108	36.0	55	27.5	27	11	34	17.0
2	«Завмерлі»		3	1.0	24	8.0	15	7.5	14	5	25	12.5
3			70	24.0	52	17.3	70	35.0	42	14	18	9.0
Вилупилось		67	47.2	9	3.0	20	10.0	5	2	1	0.5	
Трансгенних		19/31	61.3	4/9	44.4	7/13	53.8	-	-	-	-	

За використання бусульфану для стерилізації клітин реципієнта використали 3 дози препарату (75/150/300нг) за концентрації 300 нг на яйце з подальшою ін'єкцією ДБДК, дослідили 200 ембріонів, серед яких

61,0 % не розвивалися після ін'єкції, 17,0 % зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії, 12,5 % загинули в період 10–15 днів, 9,0 % – 16–25 день. Усього після ін'єкцій бусульфану у концентрації 300 нг на

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

яйце отримали 1 живе каченя (виживаність склала 0,5 %). За концентрації 150 нг на яйце дослідили 100 ембріонів, серед яких не розвивалися після ін'єкції 68,0 %, 11,0 % зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії, 5 % загинули в період 10–15 днів, та 14,0 % вилучили на 25 день інкубування. Усього після ін'єкцій бусульфану у концентрації 150 нг на яйце отримали 2 живих каченят (виживаність склала 0,5 %). За концентрації бусульфану 75 нг на яйце дослідили 100 ембріонів, серед яких не розвивалися після ін'єкції 12,0 %, 27,0 % зупинилися в розвитку на момент першої овоскопії, 14,0 % загинули в період 10–15 днів, 42,0 % – 16–25 день. Усього після ін'єкцій бусульфану у концентрації 75 нг на яйце отримали 5 живих каченят (виживаність склала 5 %).

Опромінення ультрафіолетом 200 ембріонів упродовж 1 години з подальшою ін'єкцією бластодермальних трансфікованих клітин донорів призвело до загибелі після ін'єкції 20 %, зупинились у розвитку 27,5 %, 7,5 % загинули в період 10–15 днів, 35,0 % – 16–25 день. Усього за використання ультрафіолетового опромінення отримали 20 живих каченят (виживаність склала 10 %). Після настання статевої зрілості лише 13 з 20 тварин дали нащадків. Аналіз ДНК, виділеної з крові, пір'я, сперми, засвідчив, що з цих 13

репродуктивно здатних особин 7 були трансгенними химерами. Використання ультрафіолету дало змогу зменшити вплив інфікованості яєць, яка зумовлена структурою шкаралупи водоплавної птиці.

Отже, самим безпечним для виживання ембріонів виявився метод осіменіння качок трансфікованою спермою, за використання якого вижили 47,2 % ембріонів.

Порівняння отриманих нами даних з результатами інших дослідників свідчать, що виводимість каченят у наших дослідженнях нижча, ніж курчат в аналогічних дослідженнях. Так, В. J. Jordan and S. V. Vogel (2014) показали високу виводимість (52,5 %) курчат після прямої ін'єкції в неінкубовані ембріони. Після інкубації отримано 42 курчат з 80 проін'єктованих ембріонів [27]. Penno, C. A., Kawabe, Y., (2010) вводили (1,5–4,0 мкл розчину) ретровірусного вектору в серце курячих ембріонів на стадії 15 НН. Загалом у серії з 4 експериментів залежно від титру вірусу в розчині, отримали 21 курча з 74 ембріонів у які проводили ін'єкцію, виводимість курчат була в межах 13–50 % і в середньому 28 % [28].

Scott, B. V., & Lois, C. (2005) отримали мозаїчних перепелів, шляхом зараження бластодисків неінкубованих яєць концентрованим лентивірусним вектором HsynGW. Вводили 3 мкл розчину вектору в

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

підембріональну порожнину, через вікно в шкаралупі розміром 4 на 4 мм. З 80 ембріонів в які провели ін'єкцію отримали 8 перепелів, виводимість становить 10 % [29].

Wang, Z.-B., Du, Z.-Q., (2019) вводили плазмідно-ліпосомний комплекс транспозону Tol2 в дорсальну аорту курячих ембріонів на стадіях 14–15 за Hamburger and Hamilton, 1951 (НН) [22], шляхом прорізування вікон на тупому кінці яйця. З 198 ін'єктованих ембріонів вилупилося 136 курчат, виводимість становила 68,7 %, цього результату дослідники досягли шляхом визначення впливу місця та розміру прорізу в шкаралупі. Так за розміщення прорізу з гострого кінця яйця з 30 проін'єктованих ембріонів отримали 16 курчат (53,3 %). За розміщення прорізу на тупому кінці яйця в залежності від діаметру прорізу шкаралупи, зовнішньої і внутрішньої мембрани підшкаралупної оболонки, виводимість становила 6,7 % (2/30) за розміру вікна відповідно 10, 10 і 20 мм, а за розміру прорізу в оболонках 10, 10 і 5 мм, виводимість становила 70 % (21/30) [30]. Lee, H. J., Yoon, J. W., (2019) з метою створення трансгенних курчат, через вікно

вирізане на гострому кінці яйця, введено понад 3000 PGC після трансфекції в спинну аорту зародку на стадії 14–17 НН. Автори інкубували яйця гострим кінцем вниз до вилуплення. У результаті інкубації 260 ембріонів, у які зробили ін'єкцію, отримали 8 курчат (виводимість склала 3,1 %) [31]. Нам вдалося підвищити виводимість каченят за рахунок розміщення вікна між гострим та тупим кінцями, що дало змогу зберегти повітряну камеру.

Висновки і перспективи. За використання різних біотехнологічних процедур введення трансгенної конструкції в геном качки самим безпечним для виживання ембріонів виявився метод осіменіння качок трансфікованою спермою, за використання якого вижили 47,2 % ембріонів. Ін'єкції ДНК конструкції під ембріональну порожнину призводили до зупинки в розвитку 35,7 % ембріонів, тоді як ін'єкції бластодермальних клітини після дії ультрафіолету – 20,0 %, та бусульфану – 12,0 % (75 нг на яйце), 68,0 % (150 нг на яйце), 61,0 % (300 нг на яйце). Інфікованість ембріонів була важливим чинником, за рахунок якого спостерігалась їх загибель після ін'єкцій.

developmental biology. *Developmental dynamics*. 2004. 229(3):414–421.

3. Tjørve, K. M., & Tjørve, E. Shapes and functions of bird-growth models: how to characterise chick postnatal growth. *Zoology*. 2010. 113(6):326–333.

Список використаних джерел

1. Kagami, H. Perspectives on avian stem cells for poultry breeding. *Animal Science Journal*. 2016. 87(9):1065–1075.
2. Mozdziak, P. E., & Petite, J. N. Status of transgenic chicken models for

- Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюетао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.
4. Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., & Cemazar, M. Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Frontiers in oncology*. 2018. 8:268.
 5. Pavlou, A., Reichert, J. Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol*. 2004. 22:1513–1519.
 6. Lillico, S. G., McGrew, M. J., Sherman, A., & Sang, H. M. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug discovery today*. 2005. 10(3):191–196.
 7. Devlin, R. H. CELLULAR, MOLECULAR, GENOMICS, AND BIOMEDICAL APPROACHES | Growth Hormone Overexpression in Transgenic Fish. *Encyclopedia of Fish Physiology*. 2011. 2016–2024.
 8. Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. Transgenic Animals. *Biotechnology*. 2016. 493–521.
 9. Gordon, J. W., Ruddle, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*. 1981. 214:1244–1246.
 10. Love, J, Gribbin, C, Mather, C, Sang, H. Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology*. 1994. 12:60–63.
 11. Perry, M. M. A complete culture system for the chick embryo. *Nature*. 1988. 331:70–72.
 12. Ginsburg M., Eyal-Giladi H. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development*. 1987. 101(2):209–219.
 13. Kagami, H., Tagami, T., Matsubara, Y., Harumi, T., Hanada, H., Maruyama, K., Sakurai, M., Kuwana, T., and Naito, M. The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Mol. Reprod. Dev*. 1997. 48(4):501–510.
 14. Kino, K. B., B. Pain, M. Leibo, M. Cochran, M. E. Clark, and R. J. Etches. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poultry Sci*. 1997. 76(5):753–760.
 15. Chen, Y.-C., Lin, S.-P., Chang, Y.-Y., Chang, W.-P., Wei, L.-Y., Liu, H.-C., ... Wu, S.-C. In vitro culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poultry Science*. 2019. 98:1820–1832.
 16. Sza'tn, N., Patakiné Va'rkonyi, E., Liptó'i, K., and Barna, J. Observations of embryonic cell manipulations in different poultry species. *Magyar Allatorvosok Lapja*. 2012. 8:475–478.
 17. Aige-Gil, V., & Simkiss, K. Sterilisation of avian embryos with busulphan. *Research in Veterinary Science*. 1991. 50:139–44.
 18. Тагіров, М. Получение химер герминтативной линии птиц. *Біотехнологія*. 2010. 3(2):82–88.
 19. Kaewmanee, T., Benjakul, S., & Visessanguan, W. Changes in chemical composition, physical properties and microstructure of duck egg as influenced by salting. *Food Chemistry*. 2009. 112(3):560–569.
 20. Korol, P. V., Kostenko, S. O., Konoval, O. M., Lu, L., & Li, L. Egg productivity of EGFP-transgenic ducks. *Animal science and food technology*. 2019. 10(3):20–26.
 21. Doroshenko, M. S., Чепіга, А. М., Kostenko, S. O., Korol, P. V., Konoval, O. N., Lu, L., Хуетао, Н., & Li, L. Вплив репродуктивного сезону на спермопродуктивність гермінтативних химер селезнів. *Розведення і генетика тварин*. 2018. 55:187–195.
 22. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn*. 1992. 195(4):231–272.
 23. Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev Biol*. 1976. 49(2):321–337.
 24. Lucas A. M., Jamroz C. *Atlas of Avian Hematology*. Washington. D. C: U. S. Department of Agriculture. 1961. 271p.
 25. Onishi N., Kato Y., Futamura K. Studies on the artificial insemination in ducks *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci*. 1955. 11:1–16.

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сютао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

26. Konoval O, Korol P, Tabaka P, Kostenko S, Lizhi L, Chepiha A, Doroshenko M, Drahulian M, Xingchen B, Xuetao H, Liumeng L. Generation of transgenic ducks by crispr/CAS9-mediated gene insertion combined with the sperm-mediated gene transfer (SMGT). *Biopolym. Cell.* 2019. 35(6):427-436.

27. Jordan, B. J., Vogel, S., Stark, M. R., & Beckstead, R. B. Expression of green fluorescent protein in the chicken using in vivo transfection of the piggyBac transposon. *Journal of Biotechnology.* 2014. 173:86–89.

28. Penno CA, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M. Production of recombinant human erythropoietin/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *Transgenic Res.* 2010. 19(2):187-195.

29. Scott BB, Lois C. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 102(45):16443-16447.

30. Wang ZB, Du ZQ, Na W, Jing JH, Li YM, Leng L, Luan P, Wu CY, Zhang K, Wang YX, Liu WL, Yuan H, Liu ZH, Mu YS, Meng QW, Wang N, Yang CX, Li H. Production of transgenic broilers by non-viral vectors via optimizing egg windowing and screening transgenic roosters. *Poult Sci.* 2019. 98(1):430-439.

31. Lee HJ, Yoon JW, Jung KM, Kim YM, Park JS, Lee KY, Park KJ, Hwang YS, Park YH, Rengaraj D, Han JY. Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development. *The FASEB Journal.* 2019. 33(7):8519-8529.

References

1. Kagami, H. (2016). Perspectives on avian stem cells for poultry breeding. *Animal Science Journal*, 87(9), 1065–1075. doi:10.1111/asj.12620

2. Mozdziak, P. E., & Petite, J. N. (2004). Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 229(3), 414–421. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10461>

3. Tjørve, K. M., & Tjørve, E. (2010). Shapes and functions of bird-growth models: how to characterise chick postnatal growth.

Zoology (Jena, Germany), 113(6), 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2010.05.003>

4. Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., & Cemazar, M. (2018). Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Frontiers in oncology*, 8, 268. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00268>

5. Pavlou, A., Reichert, J. (2004) Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol* 22, 1513–1519. <https://doi.org/10.1038/nbt1204-1513>

6. Lilloco, S. G., McGrew, M. J., Sherman, A., & Sang, H. M. (2005). Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug discovery today*, 10(3), 191–196. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03317-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03317-3)

7. Devlin, R. H. (2011). CELLULAR, MOLECULAR, GENOMICS, AND BIOMEDICAL APPROACHES | Growth Hormone Overexpression in Transgenic Fish. *Encyclopedia of Fish Physiology*, 2016–2024. doi:10.1016/b978-0-12-374553-8.00247-1

8. Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2016). Transgenic Animals. *Biotechnology*, 493–521. doi:10.1016/b978-0-12-385015-7.00016-8

9. Gordon, J. W., & Ruddle, F. H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science (New York, N.Y.)*, 214(4526), 1244–1246. <https://doi.org/10.1126/science.6272397>

10. Love, J., Gribbin, C., Mather, C., & Sang, H. (1994). Transgenic Birds by DNA Microinjection. *Nature Biotechnology*, 12(1), 60–63. doi:10.1038/nbt0194-60

11. Perry, M. M. (1988). A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, 331(6151), 70–72. doi:10.1038/331070a0

12. Ginsburg, M., & Eyal-Giladi, H. (1987). Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development (Cambridge, England)*, 101(2), 209–219

13. Kagami, H., Tagami, T., Matsubara, Y., Harumi, T., Hanada, H., Maruyama, K., ... Naito, M. (1997). The developmental origin of

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюетао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Molecular Reproduction and Development*, 48(4), 501–510. doi:10.1002/(sici)1098-2795(199712)48:4<501::aid-mrd11>3.0.co;2-w

14. Kino, K., Pain, B., Leibo, S., Cochran, M., Clark, M., & Etches, R. (1997). Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poultry Science*, 76(5), 753–760. doi:10.1093/ps/76.5.753

15. Chen, Y.-C., Lin, S.-P., Chang, Y.-Y., Chang, W.-P., Wei, L.-Y., Liu, H.-C., ... Wu, S.-C. (2018). In vitro culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poultry Science*. doi:10.3382/ps/pey515

16. Nikolettá, Sztán & Patakiné Várkonyi; E. Várkonyi, Eszter & Liptói, Krisztina & Barna, Judit. (2012). Observations of embryonic cell manipulations in different poultry species. *Magyar Allatorvosok Lapja*. 134, 475-478

17. Aige-Gil, V., & Simkiss, K. (1991). Sterilisation of avian embryos with busulphan. *Research in Veterinary Science*, 50(2), 139–144. doi:10.1016/0034-5288(91)90096-7

18. Tahyrov, M. T. (2010). Poluchenye khymer hermynatyvnoy lyny ptyts. *Biotechnologia Acta*, 3 (2), 82-87

19. Kaewmanee, T., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2009). Changes in chemical composition, physical properties and microstructure of duck egg as influenced by salting. *Food Chemistry*, 112(3), 560–569. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.011

20. Korol, P. V., Kostenko, S. O., Konoval, O. M., Lu, L., & Li, L. (2019). Egg productivity of EGFP-transgenic ducks. *Animal science and food technology*, 10(3), 20–26. doi:10.31548/animal2019.03.020

21. Doroshenko, M. S., Chepiha, A. M., Kostenko, S. O., Korol, P. V., Konoval, O. N., Lu, L., Xuetao, H., & Li, L. (2018). Influence of the reproductive season on the sperm production of the germline chimeras of drakes. *Animal Breeding and Genetics*, 55, 187-195. https://doi.org/10.31073/abg.55.26

22. Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 195(4), 231–272. https://doi.org/10.1002/aja.1001950404

23. Eyal-Giladi, H., & Kochav, S. (1976). From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Developmental Biology*, 49(2), 321–337. doi:10.1016/0012-1606(76)90178-0

24. Lucas A. M., Jamroz C. (1961). *Atlas of Avian Hematology*. Washington D.C. US Department of Agriculture, 271.

25. Onishi, N., Kato, Y., Futamura, K. (1955) Studies on the artificial insemination in ducks. *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci., Series G*. 11, 1–16.

26. Konoval O, Korol P, Tabaka P, Kostenko S, Lizhi L, Chepiha A, Doroshenko M, Drahulian M, Bu X., Huang X., Li. L. (2019). Generation of transgenic ducks by crispr/CAS9-mediated gene insertion combined with the sperm-mediated gene transfer (SMGT). *Biopolym. Cell*, 35(6), 427–436. https://doi.org/10.7124/bc.000A16.

27. Jordan, B. J., Vogel, S., Stark, M. R., & Beckstead, R. B. (2014). Expression of green fluorescent protein in the chicken using in vivo transfection of the piggyBac transposon. *Journal of Biotechnology*, 173, 86–89. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.01.016

28. Penno, C. A., Kawabe, Y., Ito, A., & Kamihira, M. (2009). Production of recombinant human erythropoietin/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *Transgenic Research*, 19(2), 187–195. doi:10.1007/s11248-009-9310-z

29. Scott, B. B., & Lois, C. (2005). Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), 16443–16447. doi:10.1073/pnas.0508437102

30. Wang, Z. B., Du, Z. Q., Na, W., Jing, J. H., Li, Y. M., Leng, L., Luan, P., Wu, C. Y., Zhang, K., Wang, Y. X., Liu, W. L., Yuan, H., Liu, Z. H., Mu, Y. S., Meng, Q. W., Wang, N., Yang, C. X., & Li, H. (2019). Production of transgenic broilers by non-viral vectors via

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюетао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

optimizing egg windowing and screening transgenic roosters. *Poultry science*, 98(1), 430–439. <https://doi.org/10.3382/ps/pey321>.

31. Lee, H. J., Yoon, J. W., Jung, K. M., Kim, Y. M., Park, J. S., Lee, K. Y., ... Han, J.

Y. (2019). Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development. *The FASEB Journal*, fj.201802671R. doi:10.1096/fj.201802671r

TRANSGENESIS BIOTECHNOLOGICAL PROCEDURES INFLUENCE ON DOMESTIC DUCK EMBRYOS SURVIVAL

P. V. Korol, S. O. Kostenko, O. M. Konoval, M. S. Doroshenko, L. Lu, A. M. Chepiha, O. M. Sydorenko, P. P. Dzhus, N. P. Svyrydenko, T. V. Lytvynenko, H. Xuetao, X. Bu, L. Li, E. R. Kostyuk, P. O. Filipova, M. V. Drahulian

Abstract. *Due to its high reproductive potential, short interval between generations and embryonic development outside the mother's body, the bird provides unique opportunities for its use in fundamental and applied biological research. The creation of a transgenic bird is complicated by the structure of its opaque egg cell with a large yolk and a unique reproductive system of this class. Direct microinjection of DNA into an oocyte, which is often used in mammals, is practically impossible for birds, since fertilization occurs in the infundibulum of the reproductive tract and can be polyspermic. Therefore, manipulations with the zygote turned out to be difficult for their use in creating a transgenic bird. Over the past decades, some alternative strategies have been developed for producing transgenic poultry using bizarre animals created by transferring blastodermal cells.*

However, to date, the efficiency of creating transgenic poultry in many cases remains very low, and the technique of using ducks to create transgenic poultry is practically not developed. Busulfan is used to suppress cell proliferation. Injection of busulfan into the periblastodermic cavity is one of the methods that increases the number of donor cells when creating chimeras. However, until now, methods of creating hermentative ducks chimeras face difficulties associated with the structure of the shell of waterfowl.

Therefore, the aim of the work was to establish the effect of factors influencing the survival of transgenic embryos when using various methods of introducing a DNA construct into the duck genome.

*The objects of the study were ducks (*Anas platyrhynchos*) of the Shan partridge duck and Shaoxing breeds kept at the duck farm of Zhuji Guowei Poultry Development Co., Ltd, China. The studies were carried out in the poultry genetics laboratory of the Zhejiang Academy of Agricultural Sciences and on the duck farm of Zhejiang Generation Biological Science and Technology Co., Ltd. (Zhejiang Province, PRC).*

For the analysis of survival, we used embryos obtained by using various methods of introducing the DNA (insertion of the EGFP gene, mediated by homologous repair (HDR)) 1) direct injection of the DNA construct into the sub-embryonic cavity; 2) transfection of DNA with sperm; 3) injection of transfected donor blastomeres into recipient embryos after exposure to busulfan or ultraviolet radiation.

Король П. В., Костенко С. О., Коновал О. М., Дорошенко М. С., Лу Л., Чепіга А. М., Сидоренко О. В., Джус П. П., Свириденко Н. П., Литвиненко Т. В., Сюстао Х., Бу С., Лі Л., Костюк Є. Р., Філіпова П. О., Драгулян М. В.

A total more than 1100 eggs were examined. As a result of the direct injection of a transgenic DNA construction (sub-embryonic cavity of 300 embryos, 35.7 % of embryos did not develop after injection, 36% stopped developing at the time of the first ovoscopy (day 9 of incubation), 8 % died within 10-15 days, 17, 3 % - 16-25 days. In total, after direct injections, 9 live ducklings were received (the survival rate was 3 %), of which 4 were transgenic.

After insemination of ducks transfected with sperm, 292 eggs were laid for incubation. After the first ovoscopy, 51.4 % of the eggs were unfertilized; 0.7 % of embryos stopped developing at the time of the first ovoscopy (9 day of incubation), 1.0 % died within 10-15 days, 17.8 % - 16-25 days, 6.2 % suffocated during hatching. In total, after using the transfected sperm, 67 live ducklings were obtained (the survival rate of embryos from fertilized eggs was 47.2%). Among 31 adult animals, 19 were transgenic.

To sterilize recipient cells for the use of busulfan at a concentration of 300 ng per egg, followed by injection of blastodermal transfected donor cells, 200 embryos were examined, among which 61.0 % of embryos developed after injection, 17.0 % stopped in development at the time of the first ovoscopy (day 9 of incubation), 12.5 % of those died in the period of 10-15 days, 9.0 % - 16-25 days. In total, after injections of busulfan at a concentration of 300 ng per egg, 1 live duckling was obtained (the survival rate was 0.5%).

Using busulfan at a concentration of 150 ng per egg, 100 embryos were examined, among which 68.0 % of embryos developed after injection, 11.0 % stopped developing at the time of the first ovoscopy (day 9 of incubation), 5 % died within 10-15 days, 14.0 % - 16-25 days. In total, after injections of busulfan at a concentration of 150 ng per egg, 2 live ducklings were obtained (the survival rate was 0.5 %).

Using busulfan at a concentration of 75 ng per egg, 100 embryos were examined, among which 12.0 % of embryos developed after injection, 27.0 % stopped developing at the time of the first ovoscopy (9 day of incubation), 14.0 % died in the period 10-15 days, 42.0 % - 16-25 days. In total, after injections of busulfan at a concentration of 75 ng per egg, 5 live ducklings were obtained (the survival rate was 5 %).

Ultraviolet irradiation of 200 embryos for 1 hour followed by injection of blastodermal transfected donor cells resulted in death after injection of 20%, stopped developing 27.5 % (9 days of incubation), 7.5% died within 10-15 days, 35.0 % - 16-25 days. A total of 20 live ducklings were obtained using ultraviolet radiation (survival rate was 10 %). Among 13 adult animals gave offspring, 7 were transgenic chimeras. The use of ultraviolet light has reduced the impact of egg infection due to the structure of waterfowl shells.

Thus, the safest for the survival of embryos was the method of insemination of ducks with transfected sperm, using which 47.2 % of embryos survived.

Key words: *Anas platyrhynchos, domestic duck, transgenesis, embryo survival, DNA transfection with semen, blastomere injections, busulfan, ultraviolet radiation*