

# Ocena przeżywalności zarodków kaczych i gęsich po iniekcji do jamy podzarodkowej komórek blastodermalnych dawców

MAREK BEDNARCZYK, PAWEŁ ŁAKOTA, BARTOSZ GRAJEWSKI

Oddział Badawczy Drobniarstwa Instytutu Zootechniki, Zakrzewo k. Poznania, ul. Poznańska 11, 62-069 Pałędzie

Bednarczyk M., Łakota P., Grajewski B.

## Evaluating survival chances of duck and goose embryos injected into the subgerminal cavity with blastodermal cells of donors

### Summary

Features of bird blastodermal cells (BCs) allow for their use in the preservation of poultry genotypes according to the *ex situ* method. In this method the donors' BCs were injected into the subgerminal cavity of recipient embryos at the same stage of development. Then the obtained sex chimeras were crossed to reconstruct the donors' BCs genotype. The requirement for the development of an effective method of reconstructing duck and goose biodiversity in conservation stocks is, among others, an adaptation of a procedure of chimera formation taking into account the specifics of embryo development in given species. The aim of this study was to evaluate the survivability of duck and goose recipient embryos infected with blastodermal cells of donors. Among 162 treated embryos, only 5 ducklings were obtained, which was 3.1%. In the case of geese the results were better and 6.7% injected BCs embryos were hatched. An analysis of mortality indicated a high level of embryo death in the first four days of incubation. During this period below 50% survived and on the following two days the number decreased to 29.0% (ducks) and 36.8% (geese). The improvement of survivability of waterfowl embryos, donors' BCs, should be ensured by the selection of adequate genotype donor/recipient BCs, as well as the estimation of number and volume of infected cells and depth of infection, which isn't necessarily the same in different poultry species.

**Keywords:** duck, goose, embryo, survival, blastodermal cell

Od kilkunastu lat rozwijają się badania nad wykorzystaniem komórek embrionalnych (komórek blastodermalnych – BCs lub pierwotnych komórek płciowych – PGCs) do manipulacji zarodkami ptaków (5, 12, 16, 17, 19, 24). Interesujące są zwłaszcza właściwości BCs, które mogą być stosunkowo łatwo pobierane we wczesnych fazach rozwoju embrionalnego, utrzymywane *in vitro* przez wiele dni, przechowywane po zamrożeniu, transfekowane i wykazywać ekspresję obcych genów *in vitro* i *in vivo*, przenoszone z zarodków dawców do zarodków biorców, ponadto brać udział w tworzeniu somatycznych tkanek i kolonizować gonady biorców (12). Istnieją dwa główne kierunki praktycznego wykorzystania poznanych właściwości BCs: do tworzenia ptaków transgenicznych lub bioreaktorów oraz w celu zachowania bioróżnorodności ptaków – dawców BCs. Podstawą realizacji każdego z wymienionych kierunków jest uzyskanie chimer, a więc organizmów posiadających tkanki o dwóch lub więcej genotypach. Metoda polega na iniekcji BCs dawców, pobranych w X stadium (wg 13) rozwoju embrionalnego do zarodków biorców, identyfikacji

chimer oraz odpowiednim ich krzyżowaniu w celu wykrycia chimer płciowych. Te ostatnie krzyżowane między sobą pozwalają na odtworzenie genotypu dawców BCs.

Wynikiem badań prowadzonych od kilku lat w Oddziale Badawczym Drobniarstwa Instytutu Zootechniki było opracowanie efektywnej metody tworzenia chimer kury (4, 5), pozwalającej na regularne uzyskiwanie znacznej ich liczby, mogących stanowić materiał wyjściowy do dalszych wielokierunkowych badań (3, 6, 9). Ponadto, udowodniono możliwość odtworzenia populacji zielononózki kuropatwianej, dawców komórek BCs, w wyniku krzyżowania chimer płciowych (10). Częstotliwość wylęgu piskląt zielononózki wśród potomstwa chimer była zgodna z oczekiwaną, obliczoną na podstawie oszacowanego (w %) chimerizmu gonad ich rodziców. Interesujące było udowodnienie w oparciu o badania polimorfizmu DNA, że jedna para chimer płciowych zdolna jest do reprodukcji potomstwa, z których każde będzie posiadało zróżnicowany genotyp, inny niż ten, który jest wypadkową ich biologicznych rodziców. Jest to możliwe

ponieważ każde z biologicznych rodziców – chimer płciowych, uzyskano po iniekcji komórek pochodzących od 20 dawców. Teoretycznie więc ich gonady zdolne są do produkcji gamet nosicieli 20 różnych genotypów dawców poddanych iniekcji komórek. Praktyczną implikacją tego faktu jest możliwość rekonstrukcji bioróżnorodności populacji dawców komórek w oparciu o kojarzenie zaledwie kilku chimer płciowych.

Interesujące i ekonomicznie uzasadnione byłoby wykorzystanie opisanej metody w odniesieniu do populacji kaczek i gęsi ze stad zachowawczych. Populacje te liczą obecnie 12 odrębnych grup genetycznych kaczek i 15 grup gęsi, a więc koszt utrzymania ich metodą *in situ* jest znaczny.

Opracowanie efektywnej metody utrzymywania i rekonstrukcji bioróżnorodności kaczek i gęsi ze stad zachowawczych z wykorzystaniem właściwości komórek blastodermalnych, wymagało będzie rozwiązania następujących zagadnień: adaptacji metody tworzenia chimer, z uwzględnieniem specyfiki rozwoju embrionalnego tych gatunków oraz optymalizacji warunków mrożenia komórek blastodermalnych kaczek i gęsi, z drugiej zaś strony opracowania charakterystyki molekularnej tych stad.

Celem badań było określenie przeżywalności zarodków biorców kaczek i gęsi, po iniekcji komórek blastodermalnych dawców.

### Materiał i metody

Badania prowadzono na zarodkach kaczek pekin z rodu hodowlanego P66 i kaczek orpington (0) oraz zarodkach gęsi kubańskich (K) i słowackich (S), utrzymywanych w Fermie Hodowlanej Drobiu Wodnego w Dworzyskach, Oddziału Badawczego Drobiarstwa Instytutu Zootechniki w Zakrzewie k. Poznania. Ptaki rodzicielskie utrzymywano i żywiono zgodnie z powszechnie obowiązującymi normami.

BCs pozyskiwano z tarczki zarodkowej jaj dawców będących w X stadium rozwoju zarodkowego (wg 13), posługując się metodą opisaną przez Etchesa i wsp. (12), po modyfikacjach własnych (5). Zawartość jaj przelewano na plastikowy separator do żółtek. Po oddzieleniu kuli żółtkowej od białka, na zlokalizowaną tarczkę zarodkową nakładano pierścień wycięty z bibuły. Po odcięciu błony witelinowej wokół krawędzi zewnętrznej pierścienia, tarczkę zarodkową zdejmowano i oczyszczano z resztek żółtka. Każdorazowo pozyskiwano w kolejnych powtórzeniach po 15-20 tarczki zarodkowych. Następnie komórki wymywało strumieniem PBS-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>, przenosząc je do probówek.

Uzyskaną zawiesinę, zanieczyszczoną żółtkiem i resztkami błony witelinowej przepuszczano przez filtr nylonowy o gęstości 30 µm. Przefiltrowane komórki zawieszano w 1 ml PBS-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup> +10% FBS, dodając 1 ml 0,25% trypsyny +0,04 % EDTA w PBS-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup>. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano przez 10 min. w temperaturze 37°C. Trawienie kończono wymieniając trypsynę na DMEM. W tym celu dodawano 5 ml PBS-Ca<sup>++</sup>-Mg<sup>++</sup> +10%

FSC z dodatkiem 20 µl gentamycyny, a następnie wirowano 5 min (200×g), po czym usuwano supernatant. Powyższą czynność powtarzano i wirowano komórki przez 3 min. (200×g). Następnie BCs przemywano i zawieszano w 1 ml medium hodowlanego DMEM z 10% dodatkiem FSC.

Rozproszone komórki blastodermalne wstrzykiwano przy pomocy mikromanipulatora do zarodków-biorców znajdujących się w tym samym wieku (nie inkubowane jajo). W tym celu, zgodnie z metodyką zaproponowaną wcześniej (5), wycinano w skorupie w tępych końcu jaja otwór i przy pomocy igły manipulacyjnej wykonywano mikroiniekcję komórek do jamy podzarodkowej biorcy używając mikroigieł Clark Electromedical Instruments (GC100T-10), otwór zalepiano plastrem. Jednorazowo podawano około 3-5 µl zawiesiny. Jaja leżono w aparacie laboratoryjnym Bio-Midi lub aparatach halowych Petersime, w temperaturze 37,8°C i podwyższonej do 63-67% wilgotności względnej powietrza. Wykonano 8 nakładów jak kaczych, każdy w dwóch powtórzeniach, dzięki czemu kaczkę pekin, podobnie jak orpington, były biorcą lub dawcą BCs. Podobną zasadę stosowano w odniesieniu do gęsi, leżonych także w 8 nakładach. Łącznie inkubowano 162 zarodki kacze i 193 zarodki gęsie.

### Wyniki i omówienie

Wyniki wylęgu zarodków kaczych i gęsi, poddanych iniekcji BCs przedstawiono w tab. 1 i 2. Spośród 162 użytych do badań zarodków kaczych uzyskano jedynie 5 kacząt, co stanowiło 3,1%. Nie stwierdzono istotnego wpływu genotypu dawca/biorca na uzyskane wyniki wylęgu. Większość (70,8-71,1%) zarodków kaczych zamierała do 6 doby lęgu oraz znaczny ich odsetek (średnio 25,3%) w okresie od 7 do 24 doby.

Lepsze wyniki uzyskano w przypadku zarodków gęsi, bowiem wylęgało się średnio 6,7% zarodków poddanych iniekcji BCs. Nieco lepszy wylęg (7,4%) uzyskano w przypadku iniekcji BCs gęsi słowackiej do zarodków gęsi kubańskiej, w porównaniu do kombinacji odwrotnej (K/S – 6,1%). Stwierdzone różnice

Tab. 1. Wyniki wylęgu zarodków kaczych, biorców komórek blastodermalnych

Dawca/ biorca	Liczba zarodków - biorców	Zarodki zmarłe (%) – doba lęgu			Wylęg (%)
		0-6	7-24	25-28	
P66 A01	90	71,1	25,6	0,0	3,3
A01 A66	72	70,8	25,0	1,4	2,8
Razem	162	71,0	25,3	0,6	3,1

Tab. 2. Wyniki wylęgu zarodków gęsi, biorców komórek blastodermalnych

Dawca/ biorca	Liczba zarodków - biorców	Zarodki zmarłe (%) – doba lęgu			Wylęg (%)
		0-6	7-25	26-31	
K S	98	64,3	14,3	15,3	6,1
S K	95	58,9	8,4	25,3	7,4
Razem	193	61,7	11,4	20,2	6,7

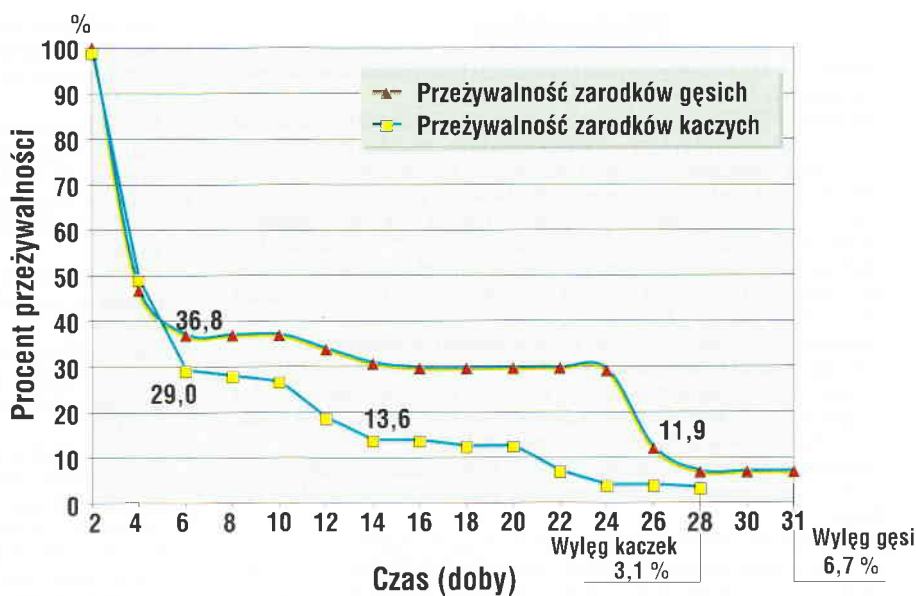


nie były istotne statystycznie, chociaż potwierdziły wcześniejsze ustalenia. Udowodniono bowiem, że gęsi kubańskie pochodzące od chińskiej gęsi łabędziowatej (*Anser cygnoides*), charakteryzują się znacznie większą wartością cech reprodukcyjnych, w tym wylęgowością piskląt, w porównaniu z gęsiami pochodzącymi od *Anser anser* (7, 21), do których należy gęś słowacka. Spostrzeżenia te potwierdzono także w badaniach nad hodowlą zarodków gęsi *in vitro* (8).

Drób wodny charakteryzują najczęściej niższe, w porównaniu z kurami wyniki wylęgu, wynoszące około 70-80% dla kaczek (1) oraz 70-75% dla gęsi (8). Uzyskane wyniki wylęgu zarodków po iniekcji BCs są znacznie niższe, są jednak porównywalne z uzyskiwanymi przez większość autorów, w odniesieniu do biorców BCs. Wprawdzie brak jest w dostępnym piśmiennictwie informacji dotyczących drobiu wodnego, jednak można je odnieść do badań, prowadzonych od kilku lat na kurach i przepiórkach. Spośród np. 408 poddanych iniekcji BCs zarodków, wylęgło się jedynie 2,8% piskląt, podczas gdy w grupie kontrolnej, od 61 do 92% piskląt (22). Wielu autorów także wskazuje na bardzo niską przeżywalność zarodków biorców BCs (15, 19, 20). Wysoka zamieralność poddanych iniekcji zarodków (5,0 do 7,3% przeżywało do wylęgu) obserwowana była przez Thoravala i wsp. (24).

Dokładne przyczyny niskich wyników wylęgu zarodków nie są znane. W dotychczasowych badaniach stwierdzono jednak, że przeżywalność zarodków biorców BCs drastycznie zmniejsza się w czasie pierwszych dni lęgu (18, 20). Podobne zjawisko obserwowano w badaniach własnych. Szczegółową analizę przeżywalności zarodków kaczek i gęsi, w kolejnych dobach lęgu przedstawiono na ryc. 1. Wobec braku statystycznie istotnego wpływu genotypu dawca/biorca na wyniki wylęgu, czynnika tego nie uwzględniono w analizie przeżywalności użytych do badań zarodków. Znaczna zamieralność charakteryzowała zarodki obu gatunków ptaków w pierwszych czterech dobach lęgu, ich przeżywalność wyniosła bowiem w tym okresie poniżej 50% i zmalała w kolejnych 2 dobach do 29,0 (kaczki) i 36,8% (gęsi). W tym ostatnim przypadku utrzymywała się na tym poziomie aż do 24 doby lęgu. Po czym nastąpiła jej znaczna redukcja do 11,9% w 26 dobie. Odmiennie, zarodki kaczki charakteryzowała niska przeżywalność także w 2 (13,6%), 3 (poniżej 10%) i 4 tygodniu lęgu, czego wynikiem był zaledwie 3,1% wylęg.

Można wymienić co najmniej kilka przypuszczalnych przyczyn podwyższonej zamieralności zarodków, biorców BCs: wykonanie otworu w skorupie, proce-



Ryc. 1. Przeżywalność zarodków kaczek i gęsi w kolejnych dobach lęgu

dura iniekcji związana z kontrolą ciśnienia wprowadzanego strumienia BCs i monitoring głębokości wkłuwanej pod epiblast mikroigły oraz nieodpowiednie tempo przewodnictwa pary wodnej poprzez skorupę i jej część zalepioną plastrem. Według Petite i wsp. (19), przyczyną istotnego obniżenia się przeżywalności wczesnych zarodków jest wykonanie otworu w skorupie jaja. Z drugiej strony (5, 14) nie stwierdzono wpływu otworu w skorupie jaja na przeżywalność zarodków.

Wpływem liczby komórek i objętości zawiesiny wprowadzanej do jamy podzarodkowej na skuteczność zabiegu zajmowało się wielu autorów. Zakładano, że stosunek liczby komórek zarodków biorców będących w X stadium rozwoju, do liczby komórek dawców może mieć istotny wpływ na przeżywalność biorców.

Ostatnie badania (5, 23) wskazują, że możliwa jest znaczna poprawa wylęgu (do około 40%) zarodków kurzych, biorców BCs, w wyniku stosunkowo prostych modyfikacji techniki wykonania mikroiniekcji. Ich zastosowanie w odniesieniu do zarodków drobiu wodnego nie przyniosło jednak spodziewanych efektów. Inną przyczyną może być odpowiedni dobór genotypu dawca/biorca BCs (5, 11). Przypuszcza się, że integracja komórek dawcy z komórkami biorcy, która jest niezbędnym warunkiem rozwoju chimery, uzależniona jest od wzajemnego dopasowania ich tempa rozwoju embrionalnego. Wiadomo, że istnieją genetyczne różnice w tempie rozwoju embrionalnego ptaków o różnym pochodzeniu, które mogą być nawet przedmiotem selekcji (2).

Te dane piśmiennictwa i wyniki badań własnych wskazują na możliwość dalszych badań w celu uzyskania lepszej wylęgowości zarodków drobiu wodnego, biorców BCs przez dobór odpowiedniego genotypu biorca/dawca BCs, ustalenie liczby i objętości poddanych iniekcji komórek oraz techniki iniekcji, które nie muszą być identyczne dla różnych gatunków drobiu.



## Piśmiennictwo

1. *Bednarczyk M.*: Wpływ pory roku i technologii lęgu na śmiertelność zarodków kaczych. *Medycyna Wet.* 1986, 42, 145-148.
2. *Bednarczyk M.*: Wpływ czynników genetycznych i środowiskowych na czas rozwoju embrionalnego i jego związek z cechami produkcyjnymi kaczek. *Zesz. Nauk. Drobiarstwa 1, Prace Habilitacyjne.* Poznań 1988.
3. *Bednarczyk M., Lakota P., Czekalski P.*: Production of germline chimeric chickens by transfer of blastoderm cells. *Proc 36. Current Problems of Breeding, Health and Production of Poultry Ceske Budejovice, 6<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> February 2001.*
4. *Bednarczyk M., Lakota P., Siwek M.*: Badania nad wykorzystaniem pierwotnych komórek płciowych i komórek blastodermalnych kury do produkcji chimer. *Zesz. Nauk. PTZ 1997, 31, 143-147.*
5. *Bednarczyk M., Lakota P., Siwek M.*: Improvement of hatchability of chicken eggs injected by blastoderm cells. *Poultry Sci.* 2000a, 79, 1823-1828.
6. *Bednarczyk M., Lakota P., Siwek M., Czekalski P.*: Ocena chimeryzmu kur w oparciu o różne kryteria. *LXV Zjazd Naukowy PTZ, Olsztyn, Zesz. Nauk. PTZ, Chów i Hodowla Drobiu 2000b, 49, 214-215.*
7. *Bednarczyk M., Mazanowski A., Sobek Z.*: Conservation et incubation des oeufs d'œies, Comparaison entre deux races, *Arch. Geflügelkd.* 1985, 49 (2), 46-49.
8. *Bednarczyk M., Rosiński A.*: Comparison of egg hatchability and in vitro survival of goose embryos of various origins. *Poult. Sci.* 1999, 78, 579-585.
9. *Bednarczyk M., Sochanik A., Lakota P., Siwek M.*: Ocena ekspresji genów Luc i GFP w komórkach blastodermalnych kury in vitro. *LXV Zjazd Naukowy PTZ, Olsztyn, Zesz. Nauk. PTZ, Chów i Hodowla Drobiu 2000c, 49, 216-217.*
10. *Bednarczyk M., Lakota P., Słomski R., Pławski A., Lipiński D., Siemieniako B., Lisowski M., Czekalski P., Grajewski B., Dłużniewska P.*: Reconstitution of a chicken breed by inter se mating of germline chimeric birds. *Poult. Sci.* 2002, 81, 1347-1353.
11. *Carscience R. S., Clark M. E., Verrinder Gibbins A. M., Etches R. J.*: Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 1993, 117, 669-675.
12. *Etches R. J., Clark M. J., Zajchowski L., Speksnijder G., Gibbins A. M. V., Kino K., Pain B., Samarut J.*: Manipulation of blastodermal cells. *Poult. Sci.* 1997, 76, 1075-1083.
13. *Eyal-Giladi H., Kochav S.*: 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, 321-337.
14. *Han J. Y., Shoffner R. N., Guise K. S.*: Microinjection and expression of marker gene in the early chicken embryo. *Korean J. Anim. Sci.* 1994, 36, 244-251.
15. *Maeda T., Yamakawa Y., Masuda K., Tewrada T.*: Distribution of blastodermal cells transferred to chick embryos for chimera production using windowed eggs. *Br. Poult. Sci.* 1997, 38, 241-244.
16. *Naito M., Watanabe W., Kinutani M., Nirasawa K., Oishi T.*: Production of quail-chick chimaeras by blastoderm cell transfer. *Br. Poult. Sci.* 1991, 32, 79-86.
17. *Ono T., Matsumoto T., Arisawa Y.*: Production of donor-derived offspring by transfer of primordial germ cells in Japanese quail. *Exp. Anim.* 1998, 47, 215-219.
18. *Ono T., Muto S., Mizutani M., Agata K., Mochii M., Kino K., Otsuka K., Ohta M., Yoshida M., Eguchi G.*: Production of quail chimera by transfer of early blastodermal cells and its use for transgenesis. *J. Poult. Sci.* 1994, 31, 119-129.
19. *Petitte J., Clark M. E., Liu G., Verrinder Gibbins A. M., Etches R. J.*: Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 1990, 108, 185-189.
20. *Pokorny P.*: Uzyskiwanie chimer kurzych w wyniku mikroiniekcji komórek blastodermalnych po ich uprzednim poddaniu kriokonserwacji. *Praca dokt. AR Wrocław 1999.*
21. *Smalec E.*: Zróżnicowanie gęsi rezerwy genetycznej pod względem cech użytkowych i polimorfizmu białek surowicy krwi. *Zesz. Nauk. Drobiarstwa 3, Prace Habilitacyjne Poznań 1993.*
22. *Speksnijder G., Liu G., Baugh L. R., Harvey A. J., Ivorie R.*: Novel windowing method yields a high number of somatic and germline transgenic chimeras in the chicken. *Plant & Animal Genom VI Conference, San Diego 1998.*
23. *Speksnijder G., Ivorie R.*: A modified method of shell windowing for production somatic and germline chimeras in fertilized chicken eggs. *Poult. Sci.* 2000, 79, 1430-1433.
24. *Thoraval P. L., Lasserre F., Coudert and G. Dambrine.*: Production of germline chimeras obtained from Brown and White Leghorns by transfer of early blastodermal cells. *Poult. Sci.* 1994, 73, 1897-1905.

Adres autora: prof. dr hab. Marek Bednarczyk, ul. Arystofanesa 50, 60-462 Poznań

## Sekcja Patologii Drobiu PTNW oraz Zakład Chorób Drobiu Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR we Wrocławiu

organizują konferencję naukową nt.

# Immunosupresja i immunomodulacja układu odpornościowego ptaków – możliwości immunoprofilaktyki

Sesja odbędzie się w dniach 19-20. 09. 2003 r. w hotelu „SANA” w Polanicy Zdroju

Zgłoszenia tematów referatów i doniesień do końca maja 2003 roku.

Zgłoszenia uczestnictwa przyjmuje: Komitet Organizacyjny Konferencji

Katedra Epizootiologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką, Pl. Grunwaldzki 45,  
50-366 Wrocław; tel./fax.: 071/3205-336 lub tel. 3205-328, 3205-332

E-mail: wielicz@ozi.ar.wroc.pl tomk@ozi.ar.wroc.pl

Bliższe informacje oraz formularze zgłoszenia prac oraz uczestnictwa w konferencji na stronie internetowej: [www.ar.wroc.pl](http://www.ar.wroc.pl) w dziale „Konferencje i seminaria”.

Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego  
Prof. dr hab. Alina Wieliczko