

**UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNO – PRZYRODNICZY
IM JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH
W BYDGOSZCZY
WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I GENETYKI ZWIERZĄT**

Praca doktorska

pt.:

Wpływ chimeryzmu płciowego na cechy reprodukcyjne ptaków

mgr inż. Maria Agnieszka Wiechetek

Promotor: prof. dr hab. Marek Bednarczyk.

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju,
grant PBS 3/A8/30/2015

Bydgoszcz 2019

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju
grant PBS 3/A8/30/2015

Panu Promotorowi
Prof. dr. hab. Markowi Bednarczykowi
za wsparcie merytoryczne i wszelką pomoc
w realizacji niniejszej pracy doktorskiej
bardzo dziękuję

Pani prof. dr hab. Ewie Łukaszewicz
za okazaną wszechstronną pomoc i wsparcie
podczas realizacji niniejszej pracy
składam serdeczne podziękowania

Szczególnie dziękuję dr inż. Annie Jerysz
za nieocenioną ogromną pomoc i wsparcie
w trakcie realizacji badań

Pragnę podziękować także całemu zespołowi
z Katedry Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
za życzliwość i pomoc

Szczególne podziękowania należą się mojemu
mężowi Łukaszowi Wiechetek i dzieciom
którzy służyli mi ogromnym wsparciem przez
cały okres pracy nad niniejszą dysertacją

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	11
1.1.	Wprowadzenie	11
1.1.1.	Sposoby identyfikacji chimer ptasich	12
1.1.2.	Cel tworzenia chimer ptasich	15
1.1.3.	Sposoby wytwarzania chimer ptaków.....	18
1.1.4.	Wpływ chimeryzmu na cechy reprodukcyjne ptaków	23
2.	CEL PRACY	25
2.1	Hipoteza.....	25
3.	MATERIAŁY I METODY	26
3.1.	Materiał doświadczalny	26
3.2.	Inkubacja jaj.....	26
3.2.1.	Izolacja PGCs z gonad 6-dniowych zarodków dawców ...	26
3.2.2.	Iniekcja PGCs do 3,5- dniowych zarodków biorców.....	26
3.3.	Lęgi	27
3.4.	Wychów ptaków	27
3.4.1.	Koguty.....	28
3.4.2.	Kury	31
4.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja.....	32
4.1.	Koguty.....	32
4.2.	Kury	39
5.	WNIOSKI KOŃCOWE	43
6.	STRESZCZENIE.....	44
7.	SUMMARY	45
8.	BIBLIOGRAFIA	46
9.	ANEKSY	57

9.1.	Ryciny	57
9.1.1.	Koguty.....	57
9.1.2.	Kury	62
9.2.	Tabele.....	65
9.2.1.	Koguty.....	65
9.2.2.	Kury	71
9.3.	Fotografie.....	78

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Współczesna biologia definiuje chimerę jako organizm posiadający tkanki o dwóch lub więcej genotypach, często rezultat mutacji, przeszczepu lub wprowadzenia do zarodka będącego w bardzo wczesnym stadium rozwoju pluripotencjalnych komórek pochodzących od różnych genetycznie osobników [Abercrombie i in., 1992 oraz Jaszczak i in., 1999; Petite i in., 2004; Rui i in., 2004]. Chimery posiadają przynajmniej dwie populacje genetycznie odmiennych komórek, wywodzących się z dwóch różnych zygot [Abercrombie i in., 1992]. Powstają one naturalnie, np. w wyniku połączenia dwóch zygot. Z taką sytuacją możemy spotkać u ssaków we wczesnym rozwoju zarodkowym. W przypadku połączenia się dwóch zygot organizm zawiera w niektórych tkankach lub w całym narządach różne komplety chromosomów.

Pierwsze chimery ptaków uzyskano w 1970 roku [Marzullo, 1970], natomiast intensywne badania nad chimerami ptaków prowadzone są od lat pięćdziesiątych XX wieku [Petite i in., 1990]. Odkryto możliwości zastosowania komórek blastodermalnych kury (BCs) do produkcji nie tylko chimer fenotypowych, ale także chimer płciowych. Jest to realne, ponieważ BCs pochodzące od dwudziestoczterogodzinnych zarodków zachowują właściwości pluripotentne/totipotentne, a jednocześnie zawierają pewną liczbę prekursorów pierwotnych komórek płciowych (PGCs), które dają początek linii komórek rozrodczych [Ginsburg 1997].

Jednocześnie jednak sfera badań nad ptasimi chimerami została ograniczona do zaledwie kilku zagadnień, obejmujących przede wszystkim: efektywność produkcji chimer [Kino i in., 1997; Łakota, 2001], wykorzystanie różnych typów komórek do ich tworzenia [Naito i in., 1994a], a także ustalenia, jakie są optymalne warunki hodowli komórek *in vitro* oraz ich modyfikacja genetyczna [Etches, i in., 1997; Aritomi i in., 2000].

Produkcja transgenicznych kur polega na wprowadzeniu nowych genów do komórek, które dadzą początek komórkom płciowym. Skutkuje to wytworzeniem kur (kogutów) wykazujących obecność transgeny w komórkach gonad. Dopiero po skrzyżowaniu chimer można uzyskać potomstwo wykazujące obecność transgeny we wszystkich komórkach ciała. Odpowiednie zmodyfikowanie i ukierunkowanie komórek dających początek linii płciowej jest niezbędne do powodzenia eksperymentu [Mozdziak i Petite, 2004].

Chimeryzm może dotyczyć zarówno komórek somatycznych, jak i płciowych. Osobniki zidentyfikowane jako chimery płciowe mają zdolność przekazywania swemu potomstwu cech podczas manipulacji genetycznych. Chimery ptasie tworzy się dzięki wykorzystaniu dwóch rodzajów komórek

zarodkowych: pierwotnych komórek płciowych PGC i komórek blastodermalnych BCs. Ptasie pierwotne komórki rozrodcze (PGC, ang. Primordial germ cell) są pochodzenia pozagonadnego i muszą odbyć kilkietapową podróż, aby osiągnąć gonadę. Przeniesienie komórek blastodermalnych i pierwotnych komórek rozrodczych doprowadziło do otrzymania ptasich chimer w linii rozrodczej. PGCs są jedynymi komórkami zdolnymi do przekazania informacji zapisanej w materiale genetycznym z pokolenia na pokolenie. Wykazano, że PGCs mogą tworzyć funkcjonalne komórki płciowe w zarodku biorcy [San, 2009]. Wykorzystano to w produkcji ptaków transgenicznych, a te z kolei tworzy się dzięki istnieniu ptasich chimer płciowych za pośrednictwem chimer płciowych.

1.1.1. Sposoby identyfikacji chimer ptasich

Istnieje wiele sposobów identyfikacji chimer. Pierwszym wskaźnikiem, na podstawie którego oceniono występowanie chimeryzmu lub jego brak, była barwa upierzenia ptaków. Ma to przede wszystkim związek z możliwością jednoznacznej i natychmiastowej oceny chimeryzmu wśród jednodniowych piskląt [Bednarczyk i in., 2000c; Carsience i in., 1993; Petite i in., 1990; Thoraval i in., 1994]. W tym celu dobierano odpowiednie genotypy dawcy i biorcy komórek, różniące się zestawem genów w jednym locus (II ii), odpowiedzialnym za ekspresję dominującej białej barwy upierzenia. Biorcą komórek najczęściej były kury rasy White leghorn (dominująca para genów II), natomiast dawcą komórek różne rasy kur o ciemnym upierzeniu (recesywną parą genów ii [Bednarczyk i in., 2000b]. W ten sposób pojawienie się wśród wylęzonych osobników piskląt o ciemnym upierzeniu wskazuje na zróżnicowanie się egzogennych komórek BCs do melanocytów biorców. W badaniach tych siedem spośród dziesięciu ocenionych kogutów chimer charakteryzował chimeryzm fenotypowy, określony na podstawie ciemnych plam upierzenia. Należy jednak podkreślić, że marker ten świadczy jedynie o wbudowaniu się komórek dawców do melanocytów biorców. Naito i in., [1995] i Thoraval i in., [1994] uważają, że niektóre genotypy są bardziej predysponowane do tworzenia chimer niż inne. Jako biorców wykorzystywano ptaki charakteryzujące się dominującą białą barwą upierzenia, uwarunkowaną inhibitorem melaniny (II). Najczęściej były nimi zarodki rasy White Leghorn. Natomiast dawcy to ptaki będące nosicielami recesywnego genu ii, których przedstawicielami są kury takich ras jak: Rhode Island Red, Barred Plymouth Rock, Minorca, Transylvanian Black, Naked Neck oraz Hungarian Yellow, zielononóżka kuropatwiana. Na zależność pomiędzy genotypem dawcy a procentem otrzymanych chimer kurzych wskazują także inni autorzy [Carsience i in., 1993; Petite i in., 1993; Ono i in., 1995]. Odpowiedni dobór dawców i biorców ma znacznie nie tylko na efektywność w tworzeniu chimer, wynikającą z większej predyspozycji danych ras [Naito i in., 1995 i Thoraval

i in., 1994], ale jest także czynnikiem pozwalającym na określenie w prosty sposób wystąpienia chimeryzmu.

W większości przypadków chimeryzm identyfikowano w oparciu o jedną cechę, tj. częściową lub całkowitą zmianę upierzenia biocy. Natomiast obserwacje [Etches i in., 1993] wykazały, że np. korelacja pomiędzy stopniem chimeryzacji komórek somatycznych a komórek pnia nie istnieje lub, jeśli jednak zaistnieje, to jest znikoma. Jeśli ta opinia potwierdziłaby się, wskazywałoby to, że identyfikacja chimeryzmu jedynie na podstawie barwy upierzenia nie jest właściwa. Tylko chimeryzmy płciowe krzyżowane między sobą mają szansę przekazać trwale następnym generacjom nowe cechy [Tajima, 2002; Mozdziak i Petite, 2004], lub znaleźć zastosowanie w konserwacji genotypów metodą *ex situ* [Kino i in., 1997, Bednarczyk i in., 2002]. Eliminacja wylężonych piskląt pozbawionych barwnego upierzenia jest bezpodstawna. W podobny sposób można określić chimeryzm na podstawie szybkości opierzenia się piskląt, koloru nóg, rodzaju grzebienia lub barwie skorupy znoszonych przez odchowane chimeryzmy jaj.

Warto podkreślić, że postęp naukowy, jaki dokonał się w zakresie znajomości genomu kury [Sławińska i Siwek 2010], pozwolił na rozwój zaawansowanych narzędzi do analiz molekularnych. W badaniach Sławińskiej i Siwek [2010] wskazano, że ptaki które osiągnęły dojrzałość płciową, poddano krzyżowaniu wstępnemu, według następującego schematu: samiec chimera fenotypowa x samica zielononóżka kuropatwiana; samica chimera fenotypowa x samiec zielononóżka kuropatwiana. Pojawienie się zielononózek wśród piskląt wylężonych w wyniku tego krzyżowania było dowodem na chimeryzm płciowy jednego z rodziców.

Obecnie, oprócz w/w sposobów identyfikacji chimeryzmu, stosuje się techniki cytologiczne i molekularne. Jedną z nich jest identyfikacja żeńskiego chromosomu w komórkach kogutów. Zawierający 101 mln pz chromosomu wielkością zbliżonych do chromosomu czwartego jest znacznie większy od swego męskiego analogu - chromosomu Z o wielkości zbliżonej do najmniejszego z makrosomów (chromosom 8). Te różnice pozwalają na identyfikację cytologiczną wspomnianych chromosomów. Dodatkowo różnice w zidentyfikowanych, powtarzalnych sekwencjach DNA zlokalizowanych na obu chromosomach, pozwalają, dzięki użyciu molekularnych metod, na identyfikację płci [Ogawa i in., 1998].

W stosunkowo nielicznych pracach oceniono chimeryzm ptaków w oparciu o różnice morfologiczne komórek [Le Dourian, 1973] lub chromosomów [Simkiss i in., 1996; Trefil i in., 1999; Kagami i in., 2002], markery uwarunkowane jedną parą alleli lub związane z polimorfizmem DNA [Thorval i in., 1994; Łakota, 2001; Bednarczyk i in., 2002; Sano i in., 2004]. Zawartą w chromosomie W charakterystyczną, rozproszoną sekwencję powtórzoną EcoRI, liczącą 1211 pz identyfikowano metodą amplifikacji DNA

w reakcji PCR określonego fragmentu DNA liczącego 447 pz [Simkiss i in., 1996], na matrycy DNA izolowanego z krwi kogutów chimer, z wykorzystaniem specyficznych starterów. DNA izolowane z krwi kur i kogutów stanowiło odpowiednią pozytywną i negatywną grupę kontrolną.

Metodą pozwalającą wykryć pochodzenie tkanki jest analiza swoistych prążków na żelach agarowych, po wytrawieniu DNA enzymami restrykcyjnymi [Petitte i in., 1993]. Jest to metoda pozwalająca na ocenę chimeryzmu na poziomie molekularnym po amplifikacji genomowego DNA charakterystycznego dla dawcy. Zwiększenie ilości pozyskiwanych w celach badawczych komórek uzyskano dzięki modyfikacji techniki ich wirowania [Łakota, 2001]. Ponadto, aby zwiększyć efektywność wylęgu chimer, określono optymalną objętość wprowadzonej zawiesiny oraz ilość zawartych w niej egzogennych komórek.

Większość cech produkcyjnych zwierząt to cechy kodowane poligenicznie przez dużą liczbę genów addytywnych o niskim efekcie. W związku z tym identyfikacja podłoża genetycznego tych cech najczęściej obejmuje detekcję regionów chromosomalnych zwanych loci cech ilościowych (ang. QTL - Quantitative Trait Loci). W tym celu wykorzystuje się trójpokoleniowe populacje eksperymentalne, w których analizuje się dziedziczenie markerów genetycznych i rozkład cech fenotypowych [Sławińska, 2013].

Markery genetyczne są oparte na hybrydyzacji lub selektywnej amplifikacji enzymatycznej kwasów nukleinowych. Wybiera się je w celu wygenerowania wzorów charakterystycznych dla danego organizmu, takich jak polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) oraz w celu uzyskania pojedynczych nukleotydów (SNP). Aanalizy mikro- i minisatelit, a także innych markerów, oparte są na zmodyfikowanej reakcji łańcuchowej polimerazy – PCR (RAPD, AFLP, SSR).

Obecnie najczęściej stosowane są mikrosatelitarne sekwencje DNA, czyli krótkie, grupowo powtarzające się dwu-, trzy- lub czterokrotnie nukleotydowe elementy. Właściwości mikrosatelitów decydują o ich przydatności do mapowania genotypów, są bowiem łatwo wykrywalne, a ich wskazanie jest jednoznaczne. Są jednocześnie wysoko polimorficzne, bywają też obficie i równomiernie rozproszone w genotypie.

Konstruując specjalne wektory plazmidowe zakłada się, że zostaną one wykorzystane do transkrypcji komórek, dzięki którym będzie możliwe umieszczenie genów pod kontrolą promotora genu owalbuminy kurzej, który, z założenia, odznacza się specyficznością tkankową. Wektor ten wykorzystuje się po włączeniu genów reporterowych (genu lucyferazy i GFP-green fluorescence protein) do sprawdzania regulatorowych właściwości promotora genu owalbuminy w badaniach *in vitro*. Do opisanych wektorów plazmidowych

włączone zostały także geny ludzkiego hormonu wzrostu i interferonu $\alpha 2a$, które będą wykorzystane do tworzenia ptaków bioreaktorów, produkujących w białku swoich jaj białka ludzkie o charakterze leczniczym.

Badania molekularne z wykorzystaniem genotypu Zielononóżki kuropatwianej zostały również prowadzone na modelu chimer ptasich, uzyskanych wskutek wprowadzenia komórek blastodermalnych dawcy (Zk) do zarodka biorcy (Leghorn) [Siwek i in., 2010]. Dzięki wykorzystaniu dwóch odległych genetycznie ras kurcząt możliwa była identyfikacja chimer przy pomocy markerów mikrosatelitarnych. Chimeryzm był analizowany w gonadach, mięśniu udowym, wątrobie, mięśni piersiowym oraz sercu. Na podstawie częstotliwości występowania alleli charakterystycznych dla danej rasy, określono średni poziom chimeryzmu na ok. 50%.

Inne podejście metodyczne związane jest z wykorzystaniem bioróżnorodności i porównaniem polimorfizmu DNA w grupach kur [Bednarczyk i in., 1991] skrajnie różniących się pod względem produkcji jaj.

W badaniach Ashwell i in., [1999] wykorzystano model umożliwiający identyfikację genów warunkujących wzrost kur White plymouth rock, różniących się około 8-krotnie masą ciała w wyniku selekcji przeciwstawnej prowadzonej od 41 pokoleń. Pozwoliło to na identyfikację metodą PCR na podstawie polimorfizmu losowo wybranych fragmentów RNA (RAP-PCR) ponad 50 różnych genów wyrażających zróżnicowaną ekspresję. Geny te następnie izolowano, klonowano i sekwencjonowano.

Detekcja chimeryzmu jest możliwa już na poziomie zarodków w oparciu o identyfikację cytochemiczną. Chimery powstałe po iniekcji BCs przepiórki do zarodka kury można rozpoznać na podstawie charakterystycznej różnicy w wybarwieniu chromatyny jąder interfazowych, a wykorzystuje się tutaj metodę Feulgena z modyfikacją Rosenbecka [Le Dourian, 1973].

Siwek i in., [2013] w badaniach przeprowadzili analizę pochodzenia, pokrewieństwa genetycznego oraz struktury genetycznej populacji zielononóżki kuropatwianej. Badania te były prowadzone na podstawie sekwencji nukleotydowej DNA mitochondrialnego (pętla D) oraz markerów molekularnych SNP (ang. Single nucleotide polymorphism) zawartych w DNA genomowym, genotypowanych przy użyciu cało genowej technologii SNP-chip.

1.1.2. Cel tworzenia chimer ptasich

Głównym celem badań nad chimerami i ptakami transgenicznymi jest stworzenie zarodka składającego się z komórek posiadających i wykazujących ekspresję transgenu oraz komórek zapewniających prawidłowy rozwój zarodka [Ishii i in., 2004]. Prowadzone badania tworzenia transgenicznych zwierząt rozwijają się w dwóch kierunkach: wydajnej manipulacji jak największej liczby

różnych typów komórek z zachowaniem ich wysokiej przeżywalności oraz modyfikacji określonych egzogenów bez ingerencji w pozostałe geny zwierząt [Han, 2009].

Modyfikując genetycznie kurze PGCs, możemy opracować nowe metody do produkcji ludzkich białek terapeutycznych [Park i Han, 2012a], a także wpływając na efektywność produkcji drobiarskiej.

Produkcja chimer ptaków z wykorzystaniem dwóch rodzajów komórek zarodkowych pozwala na prowadzenie badań w kilku ważnych dla biotechnologii aspektach. Po pierwsze, umożliwia analizę pochodzenia komórek w poszczególnych tkankach [Fraser i in., 1993] oraz badanie systemu immunologicznego, nerwowego i erytropoezy. Po drugie, pozwala na analizę wpływu mikrośrodowiska na komórki i ich wzajemnego oddziaływania, a także ich migracji w organizmie [Pardanand i in., 1987]. Poza tym praca nad zastosowaniem PGC i BCs daje możliwości studiów nad wczesnymi anomaliami rozwojowymi zarodków [Sokół-Misiak i in., 1995] oraz nad tym, jak wpływa na genotypy przechowywanie ich metodą kriokonserwacji [Naito i in., 1992].

Dzięki eksperymentom z wykorzystaniem dwóch typów komórek rozrodczych wzrasta wiedza na temat samego mechanizmu transformacji genetycznej [Simkiss, 1991; Naito i in., 1994a]. Istotne jest także to, iż metoda przyczynia się do produkcji aktywnych biologicznie peptydów i białek (zwierzęta transgeniczne jako żywe bioreaktory).

Powodem, dla którego ptaki stała się obiektem badań biotechnologicznych, jest swobodny dostęp do zarodków oraz łatwość przeprowadzenia na nich zabiegów mikrochirurgicznych [Ishii i in. 2004]. W badaniach transgenicznych drób jest pożądanym materiałem badawczym do produkcji bioterapeutyków [Rashidi i Sottile, 2009]. Te skomplikowane w produkcji i w efekcie kosztowne leki są podstawą wielu terapii m.in. w leczeniu chorób nowotworowych stwardnienia rozsianego, wirusowego zapalenia wątroby typu C, chorób autoimmunologicznych oraz wielu innych.

Oprócz ptaków wykorzystanych do produkcji bioterapeutyków stosuje się w tych procesach także ssaki, np.: krowy, owce, kozy, a nawet króliki [Sang, 2003]. W porównaniu do transgenicznych ssaków, ptasie bioreaktory posiadają takie zalety jak krótki cykl rozrodczy, mały odstęp między pokoleniami, dużą wydajność nieśną i łatwy do prowadzenia odchów [Li i Lu, 2010]. Ponadto istotna jest obecność inhibitorów proteazy w jajach [Rapp i in., 2003], wzór glikozylacji protein zbliżonych do ludzkiego oraz możliwość wytwarzania w jajowodzie i deponowaniu w jajach toksycznych dla ssaków białek [Lillico i in., 2007]. Również pozycja filogenetyczna i zawarta struktura genomu kurcząt sprawiają, iż ptaki są łatwiejszym obiektem badań niż ssaki [Han, 2009]. Zalety te sprawiają, że koszty wytwarzania bioterapeutyku w jajach są znacznie mniejsze

od tego produkowanego w gruczole mlecznym. Wysoka zawartość albumin w jajach sprawia, że ilość wygenerowanego białka terapeutycznego może sięgać nawet kilkuset miligramów [Ivarie, 2006]. Dzięki zastosowaniu bioreaktorów kurzych otrzymano m. in. ludzką erytropoetynę [Koo i in., 2010], interferon alfa 2b [Rapp i in., 2003], interferon beta 1a [Lillico i in., 2007], przeciwciała monoklonalne [Kamihira i in., 2005], a także czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. G-CSF) [Kwon i in., 2008], parathormon [Lee i in., 2007], itd.

Manipulacje genetyczne u ptaków mogą być wykorzystane w celu zwiększenia ilości i poprawy jakości produktów drobiarskich, takich jak mięso i jaja. Ingerencje genetyczne w szlaki biosyntezy doprowadzić mogą do zmian w wykorzystaniu paszy, tempie wzrostu, w składzie i masie ciała [Cyriac i in., 2012]. Na przykład wywołanie wzmożonej ekspresji czynników wzrostowych skutkować będzie szybszym tempem wzrostu ptaków. Z kolei ograniczenie ekspresji miostatyny może doprowadzić do wzmożonego wzrostu mięśni przy spadku zawartości tłuszczu oraz wpłynąć na lepszą jakość mięsa [Sang, 2003]. Ważnym celem w pracach nad produkcją chimer jest określenie przeżywalności manipulowanych zarodków. Pozwoliłoby to na precyzyjne przeprowadzenie zabiegów laboratoryjnych, co z kolei zwiększyłoby efektywność działań, przy jednoczesnym zmniejszeniu kosztów. Dotychczas nie określono dokładnie czynników zakłócających ich rozwój. Przyjmuje się jednak, według obecnego stanu wiedzy, że najpoważniejszym jest wykonanie otworu manipulacyjnego w skorupie [Petitte i in., 1990], co z jednej strony naraża na kontakt treść jaja ze środowiskiem zewnętrznym, a z drugiej strony może prowadzić do zaburzenia w wymianie wodnej i gazowej. Jaja do manipulacji przechowuje się przez kilka dni w temperaturze zera fizjologicznego, żeby nie doszło do rozwoju zarodka, a jednocześnie, aby tarczka zarodkowa umiejscowiła się tuż pod komorą powietrzną. Określenie miejsca występowania komory i wykonanie nad nią otworu manipulacyjnego pozwala na jak najmniejszą ingerencję w jajo igły manipulacyjnej [Varkonyi i in., 1997; Łakota, 2001].

Obecnie po tego typu zabiegach uzyskuje się ok. 40% wyląg piskląt [Bednarczyk i in., 2000b; Speksnijder i Ivarie, 2000, Łakota, 2001]. Tak znaczny procent wylęgu, w porównaniu z kilkunastoprocentowymi wynikami uzyskiwanymi we wczesnych pracach [Petitte i in., 1990; Naito i in., 1991; Thoraval i in., 1994; Ono i in., 1995; Reedy i in., 1995; Maeda i in., 1997; Varkonyi i in., 1997; Pokorny, 1999; Soh i in., 2002] był możliwy dzięki doborze odpowiedniego genotypu dawcy komórek, zastosowaniu techniki wykonywania otworu manipulacyjnego w tępych końcach jaj oraz ustaleniu warunków izolacji i iniekcji komórek zarodkowych.

Modyfikacje genetyczne mogą także znaleźć zastosowanie w ograniczeniu negatywnego wpływu produkcji drobiarskiej na stan środowiska. Transgeniczne dodanie fitazy do puli enzymów trawiennych kur

może rozwiązać problem zanieczyszczenia środowiska fosforem, dzięki przyczynienia się do rozkładu tego pierwiastka w organizmie zwierzęcia [Sang, 2003].

1.1.3.Sposoby wytwarzania chimer ptaków

Jednym z pierwszych badaczy, który zwrócił uwagę na PGCs, był Waldeyer. W roku 1870 roku wskazał on na ich rolę w różnicowaniu płci. Komórki macierzyste PGCs zlokalizowane są w obrębie pola jasnego tarczki zarodkowej w dziesiątym stadium rozwoju zarodkowego i przechodzą do hypoblastu pomiędzy jedenastym a trzynastym stadium [Urven i in., 1988]. PGCs zostały zaobserwowane w blastomerze w dziesiątym stadium rozwoju, w czasie owulacji przed inkubacją [Ginnsburg i in., 1986]. Zarodek w stadium smugi pierwotnej (czwarte stadium wg Hamburgera Hamiltona) zawiera PGCs na powierzchni półksiężyca płciowego, tzw. germinal crescent [Eyal-Giladi i in., 1981]. Komórki są tam równomiernie rozrzucone w szczytowych partiach zarodka. Około dwunastego stadium, gdy rozpoczyna się praca serca, wraz ze strumieniem krążącej krwi, następuje przeniesienie PGCs do sieci naczyń. W dwunastym stadium pewna ilość komórek opuszcza aortę, penetrując jej ściany i migrując do gonad. Zjawisko to sugeruje zdolność PGCs do niezależnego ruchu [Wentworth i in., 1989]. Pomiędzy piętnastym i trzydziстым stadium rozwoju zarodkowego część komórek pozostaje w gonadach, a pozostałe krążą w sieci naczyń krwionośnych. Po tym czasie znacząca ich ilość pozostaje w gonadach aż do momentu rozpoczęcia spermatogenezy i oogenezy [Kagami i in., 1995].

Innym sposobem otrzymania pierwotnych komórek płciowych jest ich uzyskanie z serca lub naczyń krwionośnych między jedenastym a szesnastym stadium rozwoju [Yasuda i in., 1992; Tajima i in., 1993; Naito i in., 1994b; Ono i in., 1998]. Jest także możliwość izolowania PGCs bezpośrednio z gonad zarodków, piskląt, a nawet osobników dorosłych [Han i in., 2002].

Większość badaczy wskazuje na wpływ obecności białek powierzchniowych na lokalizację PGCs. Czynniki chemotaksyczne komórek na krawędzi zarodka oddziałują z glikozoaminoglikanami, co rezultacie powoduje koncentrację PGCs w gonadach [Wentworth i in., 1989]. Identyfikacja PGCs kurzych jest możliwa na podstawie obecności w cytoplazmie do trzydziestego stadium rozwoju ziarenek glikogenu, wybarwiających się w reakcji Schiffa (metodą PAS) na kolor karmazynowy [Yasuda i in., 1992]. W przypadku przepiórek nie można ich wykryć za pomocą tej reakcji [Pardanaud i in., 1987]. Wielkość komórek określa się na 12 - 18 μm z dużym (9 μm), dośrodkowo usytuowanym jądrem. Analizy za pomocą mikroskopu elektronowego pozwoliły zaobserwować na powierzchni PGCs system filopodialny, a w cytoplazmie - retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego.

Izolację PGCs można prowadzić ze smugi pierwotnej pomiędzy piątym a dziesiątym stadium, zanim rozpocznie się ich migracja [Wentworth i in., 1989], następnie między jedenastym a szesnastym stadium rozwoju, bezpośrednio z serca lub naczyń krwionośnych [Yasuda i in., 1992; Tajima i in., 1993; Naito i in., 1994b; Ono i in., 1998]. W przypadku izolacji ze smugi pierwotnej mamy do czynienia z większą koncentracją PGCs (150-250), lecz ich oczyszczenie z resztek epiblastu, hypoblastu i żółtka jest bardzo utrudnione [Vick i in., 1993].

Mikroiniekcji PGCs dokonuje się bezpośrednio do naczyń krwionośnych zarodka biorcy wraz z pęcherzykiem powietrza zapobiegającym krwotokowi [Naito i in., 1995]. W każdym przypadku wprowadzenia PGCs do krwionośnego zarodków biorców dokonuje się pomiędzy 48 a 72 godziną inkubacji, zakładając, że będą one wbudowane do gonad, co w konsekwencji pozwoli uzyskać zmodyfikowane osobniki z obcymi komórkami płciowymi, zdeterminowanymi do wytworzenia linii płciowej. Ilość PGCs iniekowanych do naczyń krwionośnych biorców waha się od 100 do 1000 [Tajima i in., 1993, Naito i in., 1994b; Ono i in., 1995; 1998]. W celu podwyższenia wydajności w otrzymywaniu chimer płciowych po transferze PGCs, stosowano sterylizację zarodka biorcy za pomocą promieni UV i bisulfanu jako środka chemicznego hamującego rozwój PGCs [Wentworth i in., 1989; Vick i in., 1993; Bresler i in., 1994]. Vick i in., [1993] podaje, że po zastosowaniu 50µm bisulfanu do sterylizacji zarodków biorców i poddanie ich iniekcji PGCs, procent wylęgu waha się od 25 do 50%. Jednocześnie od prawie połowy otrzymanych ptaków uzyskano potomstwo manifestujące cechy dawcy.

Wykorzystanie komórek blastodermalnych (BCs) do otrzymania chimer nie jest techniką tak skomplikowaną, jak procedura posłużenia się PGCs. Potraktowanie BCs jako „narzędzia” do tworzenia chimer może być metodą z wyboru. BCs w dziesiątym stadium rozwoju zarodkowego wg Eyal-Giladi i Kochav [1976] ulokowane są w epiblaście zarodka [Etches i in., 1997; Kagami i in., 1995].

Dzięki wprowadzeniu do jamy podzarodkowej blastodermi biorcy totipotencyjnych komórek BCs dawcy, chimeryzm może dotyczyć zarówno tkanek somatycznych, jak i gonad [Fraser i in., 1993; Etches i in., 1997]. Zastosowanie obu typów komórek do tworzenia chimer wymaga wykonania otworu manipulacyjnego w skorupie jaja, przez który komórki wprowadza się do zarodka biorcy.

Czynnikiem, który decyduje o ilości otrzymywanych chimer oraz wpływa na liczbę iniekowanych komórek, jest objętość ich zawiesiny [Naito i in., 1994b]. W badaniach Petite i in., [1990]; Watanabe i in., [1992]; Carsience i in., [1993]; Thoraval i in., [1994]; Maeda i in., [1997], objętość iniekowanej zawiesiny komórek wynosiła 1,0 - 2,0 µl.

Współcześnie stosuje się różne sposoby, które pozwalają na wyhodowanie ptasich chimer. Pierwszy z nich polega na wprowadzeniu blastodermi jednego zarodka rozproszonych komórki blastodermalne (BCs) pochodzących od drugiego zarodka. Komórki BCs wbudowują się samoistnie do różnych tkanek.

W innej metodzie do zarodka wprowadza się pierwotne komórki płciowe (PGCs), wyizolowane z innego zarodka. Stają się one prekursorami komórek płciowych. Powstaje osobnik-chimera o fenotypie biorcy, a produkuje plemniki lub jaja zawierające cech dawcy, tzn. produkuje zupełnie inne komórki niż on i jego potomstwo. Ptaki takie noszą nazwę ptaków płciowych.

Kolejny sposób polega na wprowadzeniu do układu krwionośnego jednego zarodka (w 2 - 3 dniu inkubacji) PGCs wyizolowane z układu krwionośnego innego zarodka.

Wybór metody za pomocą której chcemy uzyskać chimerę, zależy od przeznaczenia na ptaki transgeniczne (żywe bioreaktory) albo w celu tworzenia rezerw genetycznych metodami biotechnologii.

Komórki blastodermalne wykorzystywane do manipulacji w celu tworzenia chimer charakteryzują się określonymi właściwościami:

- jajo kurze zostaje zapłodnione w momencie zniesienia, a więc najpóźniej po upływie około 24 godzin; w tym stadium jest to zarodek liczący kilkadziesiąt tysięcy Bcs,
- komórki te tworzą tarczkę zarodkową (blastoderma) oddzielną od masy żółtkowej w części centralnej jamą pod zarodkową, dzięki czemu blastula może być łatwo izolowana przy użyciu krążka z bibuły z otaczającego ją żółtka,
- komórki tworzące tarczkę zarodkową mogą zostać rozproszone w 0,25% roztworze trypsyny lub mechanicznie przez kilkukrotne pipetowanie; po tych zabiegach są zdolne do dalszego rozwoju.
- komórki blastodermalne zachowują właściwości totipotentne, czyli w momencie zniesienia jaj ich funkcje nie zostały jeszcze w pełni zróżnicowane; jednocześnie wśród komórek izolowanych z tarczki zarodkowej znajdują się nieodróżnicowane morfologicznie PGCs (lub ich prekursorzy),
- komórki blastodermalne charakteryzuje znaczna przeżywalność dzięki przetrzymaniu ich *in vitro* (w temp. 10 - 15°C co najmniej tydzień) lub po zamrożeniu w ciekłym azocie.

Do BCs możliwe jest wprowadzenie komórek w warunkach *in vitro* w wyniku lipofekcji. Metoda ta oparta jest na nośnikach niewirusowych oraz na lipidach kationowych, spontanicznie tworzących kompleks (lipopleksy)

z ujemnie naładowanymi kwasami nukleinowymi. Może być również wykorzystana elektroporacja - nowoczesna metoda wspomagająca przenikanie makrocząsteczek z przestrzeni międzykomórkowej do wnętrza komórki. Technika ta wykorzystuje tworzenie się kanałów w błonach komórkowych pod wpływem pola elektromagnetycznego egzogenego DNA, które następnie ulega w nich rekombinacji i ekspresji.

Skomplikowaną czynnością jest iniekcja, której dokonuje się przez niewielki otwór w skorupie biorcy. Czynność polega na prowadzeniu mikroskopijnej kropli zawiesiny, gdzie znajduje się od 100 do 1000 blastodermalnych komórek dawcy. Aby tego dokonać, należy posiadać precyzyjne narzędzia tj. mikromanipulator, stereomikroskop, mikropipety oraz urządzenia do ich ostrzenia i wyginania pod odpowiednim kątem. Po zabiegu otwór zalepia się plastrem.

Transfer genu za pośrednictwem wirusów (wektory retro i lentiwirusowe) to najbardziej wydajna metoda, która wykorzystuje naturalne zdolności wirusa do łączenia własnego materiału genetycznego z DNA gospodarza. Do najkorzystniejszych technik produkcji transgenicznych kur należy transfer egzogenów za pomocą wirusów [Mozdziak i Petite, 2004; Nishijima i Lijima, 2013]. Wykazano, iż sto procent wyklutych piskląt poddanych transfekcji tą metodą wykazało obecność i ekspresję introdukowanego genu [Koo i in., 2004; Koo i in., 2006; Lee i in., 2007; Kwon i in., 2008].

Mikroiniekcja DNA, czyli wprowadzenie obcego DNA do przedjądrza świeżo zapłodnionego jaja, ma znikome zastosowanie ze względu na długotrwałość zabiegu i jego niską wydajność.

Transfer genu za pośrednictwem macierzystych komórek embrionalnych, pierwotnych komórek płciowych i komórek blastodermalnych wymaga uprzedniego pozyskania komórek ESCs, PGCs oraz Bcs. Komórki te są utrzymywane w zabezpieczających je przed różnicowaniem się warunkach. Następnie ma miejsce wprowadzenie egzogenu przez lipofekcję, elektroporację lub nukleofekcję, a zmodyfikowane komórki wymagają powtórnego wprowadzenia do zarodka. Uważa się, iż najbezpieczniejszą, skuteczną i najbardziej obiecującą metodą jest uzyskanie kurcząt transgenicznych poprzez transfer do zarodków biorców PGCs genetycznie modyfikowanych za pomocą elektroporacji lub lipofekcji. Dużą zaletą PGCs jest to, iż mogą one być hodowane i modyfikowane w warunkach *in vitro* [Kuwana i in., 1996]. Integrację i ekspresję transgeny można skontrolować przed wprowadzeniem do genomu zarodka biorcy [Mozdziak i Petite, 2004].

Transfer jądrowy, czyli transfer jądra do enukleowanej komórki, ma niewielką wydajność i znaczne ograniczenie metody w przypadku drobiu, ze

względu na obecność żółtka i utrudnionego dostępu do jednokomórkowego zarodka.

Wykorzystanie sztucznych chromosomów pozwala na przenoszenie bardzo dużych fragmentów materiału genetycznego, ale ma niewielkie zastosowanie przy tworzeniu transgenicznych kurcząt.

Transfer genu za pośrednictwem jąder (egzogenne DNA wraz z lipofektantem) polega na iniekowaniu go bezpośrednio do jąder, gdzie łączy się on z DNA. Powstałe w ten sposób plemniki są następnie wykorzystywane do sztucznej inseminacji. Metoda ma niewielką efektywność w wytwarzaniu transgenicznych kurcząt.

W transferze genu za pośrednictwem nasienia wykorzystuje się jego zdolności do wiązania i internalizowania obcego DNA oraz do przenoszenia go do oocyty podczas sztucznego zapłodnienia. Plemniki poddawane są transfekcji metodą elektroporacji, lipofekcji oraz REMI.

Pierwotne komórki płciowe są wykorzystane przy tworzeniu transgenicznych ptaków. Ich modyfikacja genetyczna przebiega z wykorzystaniem wirusów [Shin i in., 2008; Kim i in., 2010; Motonu i in., 2010] i przy pomocy technik niewirusowych [Naito i in., 1998; Van de Lavoie i in., 2006; Macdonald i in., 2012; Parki i Han, 2012a; Glover i in., 2013; Tyack i in., 2013; Jordan i in., 2014; Chojnacka-Puchta i in., 2015].

Sterylizacja jaj, które zostaną wykorzystane do produkcji chimer, przebiega w określonych warunkach. Jaja wykorzystane do badania podzielono na dwie grupy i utrzymywano w temperaturze pokojowej przez 2 - 3 dni w celu ustabilizowania się pozycji tarczki zarodkowej. W takich warunkach znajdowały się do chwili rozpoczęcia eksperymentu. Następnie jaja osadzono w odpowiedniej pozycji. Dla grupy I, gdzie cytostatyk iniekowany do jamy podzarodkowej – tępym końcem do góry. Dla grupy II, w której cytostatyk podawano do kuli żółtkowej – w pozycji horyzontalnej. Odpowiednie ułożenie miało na celu przemieszczanie się i ustabilizowanie tarczki zarodkowej. Po upływie określonego czasu jaja oczyszczono i zdezynfekowano. Pierwszą grupę nawiercano w tępym końcu w celu uwidocznienia tarczki zarodkowej. Drugą grupę jaj nakłuto przy pomocy igły (0,9 x 40 mm).

Do kolejnego etapu badania przygotowano rozcieńczalnika treosulfanu – środka niezbędnego do przeprowadzenia dalszej części zabiegu. Treosulfan rozpuszczono w 10 ml roztworu Aqua pro injectione, tworząc substancję o stężeniu 100 mg / ml. Potem substancję tę rozcieńczono 50, 100, 200 i 400 razy w oleju sezamowym, tworząc w ten sposób emulsję. Uzyskano 4 grupy rozcieńczeń, w których stężenie treosulfanu wynosiło odpowiednio: 2, 1, 0,5 i 0,25 mg / ml. W grupie kontrolnej zastosowano Aqua pro injectione 100-krotne rozcieńczony olejem sezamowym. Wysterylizowane jaja poddano inkubacji przez 6 dni w temperaturze 37,8C i przy wilgotności 62 - 65%.

W trzecim dniu wykonano kontrolę zarodków, w wyniku której odrzucono zamarłe zarodki, w celu zabezpieczenia pozostałych zarodków przed kontaminacją. Inkubację kontynuowano do 6 doby rozwoju zarodka.

Badaniach Petite i in., [1990] wykazały przydatność komórek blastodermalnych do produkcji chimer płciowych. Chimeryzm płciowy może być także wykorzystywany do odtwarzania populacji ptaków i w celu zachowania bioróżnorodności [Kino i in., 1997].

Opracowanie efektywnej metody produkcji płciowych chimer kury oraz opracowanie niezawodnych metod ich identyfikacji, pozwoliło na uzyskanie licznej, unikalnej populacji tych ptaków, mogących stanowić podstawę rozwoju różnorodnych, często potencjalnych do tej pory kierunków badawczych. Ciekawe wydają się zwłaszcza interakcje pomiędzy komórkami o różnym genotypie oraz ich wpływ na wskaźniki fizjologiczne i cechy użytkowe ptaków. Niezmiernie interesująca jest rola i oddziaływanie żeńskich (nosicieli chromosomu W) i męskich (nosicieli chromosomu Z) pierwotnych komórek płciowych, identyfikowanych w gametach ptaków chimer – niezależnie od ich płci [Kagami i in., 1997; Naito i in., 2000].

1.1.4. Wpływ chimeryzmu na cechy reprodukcyjne ptaków

Płeć męska jest homozygotyczna, warunkowana przez dwa takie same chromosomy ZZ, płeć żeńska jest natomiast heterozygotyczna, czyli warunkowana przez dwa różne chromosomy ZW. Chimery powstały w wyniku iniekcji do zarodka biorcy (o określonej płci: ZZ lub ZW) komórek blastodermalnych, pochodzących od około 20 losowo dobranych zarodków dawców. Jest więc oczywiste, że iniekowano komórki obu genotypów płciowych (ZZ i ZW). W wypadku biorcy – samicy trudno jest stwierdzić, bez użycia specjalnych metod znakowania komórek, które z chromosomów są pochodzenia endodermalnego lub egzogenego. Odmienna sytuacja ma natomiast miejsce w odniesieniu do biorcy-samca, ponieważ jest bezsporne, że w każdym przypadku chromosom W jest wyłącznie pochodzenia egzogenego. Modyfikując genetycznie kurze PGCs, możemy wpłynąć na efektywność produkcji drobiarskiej albo wskazać narzędzia do produkcji ludzkich białek terapeutycznych [Park i Han, 2012a].

Interesujące są zwłaszcza interakcje pomiędzy komórkami o różnym genotypie i ich wpływ na cechy użytkowe ptaków. Podobnie wygląda kwestia z rolą i oddziaływaniem żeńskich (nosicieli chromosomu W) i męskich (nosicieli chromosomu Z) PGCs identyfikowanych w gonadach ptaków chimer, niezależnie od płci [Kagami i in., 1997]. Ma to szczególne znaczenie w kontekście prowadzonych w kraju [Bednarczyk i in., 2000c] badań nad tworzeniem ptaków bioreaktorów o zmodyfikowanym składzie białka jaja, umożliwiającym produkcję cennych, ludzkich białek leczniczych.

Tylko chimery płciowe krzyżowane między sobą mają szanse przekazać trwale następnym generacjom nowe cechy [Tajima, 2002; Mozdziak i Petite, 2004] lub znaleźć zastosowanie w konserwacji genotypów metodą *ex situ* [Kino i in., 1997; Bednarczyk i in., 2002].

Wśród innych elementów charakteryzujących cechy reprodukcyjne chimer znaleziono informacje dotyczące bezpłodności niektórych z nich [Thoraval i in., 1994; Bednarczyk i in., 2002] oraz obecność plemników nosicieli żeńskiego chromosomu W zawartego w nasieniu kogutów-chimer płciowych [Simkiss i in., 1996; Trefil i in., 2000; Łakota, 2001], a także „maskulinizację” kur chimer [Tagami i in., 1997] lub nadprodukcję kurek przez chimery płciowe [Trefil i in., 2000].

Z biologicznego punktu widzenia interesująca jest natomiast możliwość interakcji pomiędzy różnymi genotypami komórek dawców i biorców w organizmie chimery. Tym bardziej, że udowodniono możliwość różnicowania się PGCs w gonadach biorców [Kagami i in., 1997] nawet odmiennej płci i produkcję funkcjonalnych gamet tą drogą. Opracowanie efektywnej, powtarzalnej metody produkcji genotypowych i płciowych chimer kur [Bednarczyk i in., 2000b] oraz opracowanie niezawodnych metod ich identyfikacji [Bednarczyk i in., 2002] pozwoliło na uzyskanie licznej grupy tych ptaków mogących stanowić podstawę rozwoju różnorodnych, dotąd nie stosowanych na szerszą skalę technik, np. sterowanie wykształcania się płci u ptaków.

W badaniach [Czekalski i Bednarczyk, 2006] stwierdza się, że u dwóch kogutów wykazano obecność żeńskiego chromosomu W we krwi, można więc przypuszczać, że część zaburzeń funkcji płciowych i produkcji gamet może mieć związek z proliferacją i integracją komórek dawców o żeńskim genotypie (WZ) w organizmie kogutów - biorców komórek. Z drugiej strony interesujące jest, że wśród siedmiu kogutów chimer zdolnych do produkcji nasienia zidentyfikowano trzy osobniki o bardzo wysokiej liczbie plemników, przy czym dwa miały największą liczbę plemników w porównaniu z pozostałymi badanymi. Stwierdzona nadprodukcja plemników w nasieniu chimer może być efektem wzajemnej i korzystnej interakcji dawcy oraz biorcy o męskim genotypie (ZZ).

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wpływu chimeryzmu płciowego PGCs izolowanych z gonad zarodków dawców i wprowadzonych do zarodków pełniących funkcję biorców na wybrane cechy reprodukcyjne ptaków.

2.1 Hipoteza

Przyjęta przeze mnie hipoteza badawcza zakłada, że chimeryzm płciowy, wywołany iniekcją egzogennych pierwotnych komórek płciowych, wpływa na wybrane cechy reprodukcyjne ptaków.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał doświadczalny

Materiał badawczy stanowiły kury i koguty chimery, które powstały po iniekcji pierwotnych komórek płciowych z gonad zielononóżki kuropatwianej (Zn) od 6 dniowych zarodków do 3,5 dniowych zarodków White Leghorn (WI). Kury chimery stanowiły 14 osobników (Zielononóżka kuropatwiana/White Leghorn) i 7 osobników kontrolnych (White Leghorn), a kogutów chimer było 19 (Zielononóżka kuropatwiana/White Leghorn) i 11 osobników kontrolnych (White Leghorn).

3.2. Inkubacja jaj

Jaja dawców komórek PGCs (Zielononóżka kuropatwiana) inkubowano przez 6 dni, a jaja biorców (White leghorn) przez 3,5 dnia w temperaturze 37,8°C i przy wilgotności 62 - 65%. Po osiągnięciu przez zarodki odpowiedniego stadium rozwoju 28 - 29 wg H&H (dawcy) oraz 15 - 19 H&H (biorce) przeznaczono je, odpowiednio do izolacji lub iniekcji PGCs.

3.2.1. Izolacja PGCs z gonad 6-dniowych zarodków dawców

Gonady pozyskane w sterylnych warunkach od 6 - dniowych zarodków kurzych wyizolowano ze śródnercza przy pomocy mikronarzędzi (igły 0,3 x 8mm, nożyczki) w polu obserwacji mikroskopu stereoskopowego. Następnie oddzielono gonady i umieszczono je w probówce w 100 µl roztworu PBS (ang. Phosphate Buffered Saline) sól fizjologiczna buforowana fosforanem pozbawionego jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} określanym dalej jako PBS[-] z antybiotykiem Pen-Strep 100:1 (ang. Penicillin Streptomycin). Kolejne procedury odbywały się w komorze z laminarnym przepływem powietrza, gdzie materiał biologiczny był utrzymywany na bloku grzewczym w temperaturze 37,8°C. W celu uwolnienia PGCs gonady zostały nadtrawione przez 1 minutę 0,25% roztworem trypsyny-EDTA (37°C), tak jak miało to miejsce we wcześniejszym etapie. Trawienie zatrzymano poprzez dodanie 10% FBS, a roztwór trypsyny-EDTA usunięto przez odwirowanie (2500 rpm; 5 min). Komórki inkubowano przez kolejną godzinę w objętości 0,5 ml PBS[-], w 37,8°C i 5% nasyceniu CO_2 .

3.2.2. Iniekcja PGCs do 3,5- dniowych zarodków biorców

Zdezynfekowane jaja pochodzące od 3,5 - dniowych biorców White Leghorn (WI) nawiercono w tęym końcu (\emptyset otworu – 1 cm) przy użyciu turbiny protetycznej z tarczą diamentową. Otwór wykonano w tęym końcu jaja po wcześniejszym świetleniu i zlokalizowaniu komory powietrznej. Jaja ze

zlokalizowaną komorą powietrzną w innym miejscu niż tępy koniec były eliminowane, Komórki PGCs zwirowano (2500 rpm; 5 min) i zawieszono w 100 µl świeżego medium OPTI-MEM® I. Do zawiesiny dodano 10 µl FBS i 2 µl antybiotyku Pen-Strep. Przy pomocy zestawu do mikromanipulacji wprowadzono 1 - 2 µl zawiesiny zawierającą ok. 1200 komórek do krwiobiegu zarodków (aorta grzbietowa). Otwór iniekcyjny zaklejono parafilmem i jaja inkubowano w temperaturze 37,8°C i 62 - 65% wilgotności do wylęgu chimer.

3.3. Lęgi

Lęgi prowadzono w Katedrze Biotechnologii i Genetyki Zwierząt w Bydgoszczy w aparatach typu BIOS, w temperaturze 38°C i wilgotności względnej 50%, przy wyłączonym mechanizmie przechyłu, aby zapobiec wylewaniu się treści jaj. Liczba jaj nałożonych oraz wyniki wylęgu podano w tabeli 1.

3.4. Wychów ptaków

Do wychowu pozostawiono pisklęta wyłącznie zdrowe, prawidłowo rozwinięte, charakteryzujące się gęstym puchem, błyszczącymi oczami, dużą ruchliwością. Pielęgnowanie kurcząt w czasie wychowu polegało na stałym kontrolowaniu oraz zagwarantowaniu odpowiedniej temperatury, wilgotności i stanu ściółki w wychowalni, utrzymaniu w stanie czystym całego wyposażenia, dostarczeniu świeżej paszy i wody oraz zapewnieniu ptakom spokoju i delikatnej obsługi. Ponadto kurczęta codziennie obserwowano, zwracano uwagę na ich stan zdrowia oraz prowadząc doraźne brakowanie sztuk chorych i gorzej wyrosniętych.

Ptaki oznaczono numerami skrzydłowymi i wychowywano oraz utrzymywano w identycznych warunkach środowiskowych w tym samym kurniku doświadczalnym Zakładu Hodowli Drobiu we Wrocławiu.

Wylęzione pisklęta wychowywano do osiągnięcia dojrzałości płciowej (na głębokiej ściółce o grubości warstwy 5 - 10cm i długości siczki ze słomy 8-12 cm). Przed umieszczeniem piskląt w wychowalni pomieszczenie ogrzano do temperatury pokojowej / 32 - 28°C / (w 2 tyg. 28 - 26, 3 tyg 26 - 24, 4 tyg. 24 - 22,5 tyg. 22 - 20,6 tyg. 20 - 18.) Wilgotność względna dla drobiu wynosiła 60-70%. Intensywna przemiana materii cechująca młode ptaki wymaga dostarczenia znacznych ilości świeżego powietrza. W związku z tym urządzenia wentylacyjne nawiewne i wywiewne zapewniały w przeliczeniu na 1 kg masy ciała ptaka w ciągu 1 godziny wymianę powietrza w ilości 1,8 - 3,6 m³ w zimie oraz 4,5 - 8,0 m³ w lecie. Ruch powietrza w pomieszczeniach był stosunkowo wolny, ponieważ szybkość jego przepływu powyżej 0,6 m / sek. w lecie oraz 0,3 m / sek. w zimie odczuwalny jest przez ptaki jako przeciąg. Powietrze

w wchowałni musi być świeże, dlatego też zawartość CO₂ nie przekraczała 0,2 - 0,3%, NH₃ - 0,0026% i H₂S - 0,001%.

Światło wpływa korzystnie na wzrost i rozwój ptaków dzięki swoim właściwościom pobudzenia czynności wydzielniczych przysadki mózgowej, przy czym rolę tę spełnia zarówno światło naturalnej tj. dzienne i oświetlenie sztuczne. Ptaki wychowywane były w tradycyjnych pomieszczeniach z oknami, gdzie było stosowane oświetlenie naturalne, a stosunek powierzchni okien /szyb/ do powierzchni podłogi wynosił w wchowałni piskląt 1:6 - 8, zaś w wchowałni młodzieży 1:8.

Młode ptaki powinny mieć zapewnioną możliwość ruchu w pomieszczeniu. Na 1m² powierzchni podłogi przypadało do 12 kurcząt do 8 tygodni i 6 - 8 sztuk do wieku 20 - 22 tygodni.

Z zachowaniem warunków środowiskowych typowych dla młodych kur i kogutów ptaki żywiono ad libitum sypką, standardową, pełnoporcjową mieszanką paszową, a od 19 tygodnia dla ptaków reprodukcyjnych dostosowaną do potrzeb kur i kogutów.

3.4.1.Koguty

- **Pobór nasienia i ocena koncentracji plemników**

Nasienie kogutów pobierano przez jeden tydzień (ptaki były w 34 tygodniu życia) metodą masażu grzbietowo - brzuszego [Burrows i Quinn, 1937]. Pomocnik pobierającego nasienie chwytą koguta i umieszcza pod prawą pachą, głową do tyłu, równocześnie obydwoma dłońmi przytrzymuje nogi ptaka. Uchwycenie ptaka powinno odbywać się w sposób energiczny, ale jednocześnie łagodny. Pobierający nasienie masuje lewą dłonią grzbiet ptaka od części za skrzydłami okolicy lędźwiowej w kierunku ogona. mocnymi, szybkimi ruchami. Każdy kolejny masaż kończy się wykonaniem łagodnego nacisku bocznych okolic kloaki i lekkim podniesieniu nasady ogona przy pomocy wskazującego palca i kciuka. Równocześnie prawą dłonią masuje podbrzusze i boczne okolice kloaki. Jako odruch na masowanie następuje unoszenie i opadanie ogona oraz napinanie nóg. Wówczas pobierający nasienie wykonuje następujące czynności: brzegiem lewej dłoni odchyła ogon ptaka ku grzbietowi a kciukiem i wskazującym palcem ręki prawej rozdziela pióra otaczające kloakę i delikatnie uciska ją z obydwóch stron. Nasienie zostaje wyciśnięte, z narządu będącego w tym momencie w stanie wzwodu. Pomocnik zbiera je do próbówki, umieszczając ją w okolicy kloaki ptaka. Podjęto przy tym środki ostrożności, aby uniknąć zanieczyszczenia próbek fekaliami, które mogłyby mieć szkodliwy wpływ na plemniki [Lake, 1954]. Pobrany od kogutów ejakulat został przeniesiony do laboratorium w czasie 3 minut. Następnie nasienie oceniono makroskopowo i mikroskopowo. Zabieg

pobierania nasienia wykonywały zawsze te same osoby, o tej samej porze dnia oraz według stałego schematu postępowania.

- **Makroskopowa ocena ejakulatu kogutów**

Wygląd ejakulatu charakteryzowano pod względem barwy, konsystencji i ewentualnych domieszek fekaliów. Podczas oceny nasienia stwierdzono kolor biały, żółty oraz u niektórych osobników wodnisty. Oznaczono następnie rodzaje konsystencji: wodnistą, mleczną i śmietankową. Objętość nasienia mierzono przy użyciu pipety μl , zaraz po pobraniu, przez 8 dni.

Morfologie plemników badano w rozmazach nigrozyny - eozyny (300 plemników / szkiełko) i oceniono przy powiększeniu 1250 x pod mikroskopem (Nikon Eclipse E100). Szkiełka podstawowe przed badaniem podgrzano na stoliku do 40°C . Zapobiegano w ten sposób uszkodzeniu nasienia wskutek zbyt dużej różnicy temperatur [Jaśkowski 1966]. W każdym preparacie, przy użyciu olejku immersyjnego nałożonego na obiektyw, określono 300 plemników, różnicując je na następujące formy morfologiczne: 1 - plemniki żywe prawidłowo ukształtowane, tj. bez jakichkolwiek deformacji, w których główka przechodziła łagodnie w wstawkę, 2 - plemniki o rozdętych główkach, 3 - plemniki z załamanymi szyjkami, 4 - plemniki ze zmianami w wstawkach, 5- spermatydy formy niedojrzałe, 6 - inne, 7 - plemniki martwe wybarwione na różowo oraz 0 - tym symbolem określono ogólną zawartość plemników żywych [Gwara i in., 2004]. Rozmazy z nasienia przygotowano w czasie nie dłuższym niż 20 minut od pobrania próbek. Wyniki wyrażono w procentach (300 komórek 100%).

- **Oznaczanie ruchliwości i gęstości nasienia SCA (Sperm Class Analyzer)**

Ruchliwość plemników analizowano przy wykorzystaniu Sperm Class Analyzer (SCA[®] -system, Version 5.1, Microptic, Barcelona, Spain), z wykorzystaniem mikroskopu (Nikon Eclipse E200), z obiektywem fazy ujemnej x 10, kamerą Basler (scA 780 – 54 fc, Ahrensburg, Germany), ciepłym stolikiem i komputerem do analizy i zapisywania danych.

Przed analizą ruchliwości plemników, nasienie rozcieńczono w stosunku 1:10 w roztworze fizjologicznym (Natrium Chloratum 0.75%) o temperaturze 25°C . Z ependorfki pobrano po $0,1\text{ cm}^3$ nasienia, umieszczając je w dwóch nowych ependorfach z $2\mu\text{l}$ PBS. Po dokładnym wymieszaniu pobrano $0,1\text{ cm}^3$ nasienia i dodano do drugiej ependorfki oraz wymieszano. Następnie pobrano $1\mu\text{l}$ rozcieńczonego nasienia, umieszczając je w komorze analitycznej Leja 4 (Leja Products B.V., Holland) o grubości $20,0\mu\text{m}$. Komory leja przed badaniem podgrzano na stoliku do temperatury 38°C , zapobiegając w ten sposób uszkodzeniu nasienia przed zbyt dużą różnicą temperatur. Do

zliczania użyto oprogramowania MultiScan po wcześniejszym zarchiwizowaniu obrazu z mikroskopu na twardym dysku komputera. Parametry ruchliwości stosowane w tym badaniu obejmowały: procent ruchliwych plemników, prędkość krzywoliniową (VCL - curvilinear velocity), prędkość liniowa (VSL straight-line velocity), prędkość ścieżki (VAP - path velocity), liniowość (LIN linearity) i amplitudę bocznego przesunięcia głowy (ALH amplitude of lateral head displacement). Zbadane zostało nasienie od 30 kogutów. Poboru nasienia dokonano przez osiem dni, od tych samych osobników, będących w 34 tygodniu życia.

- **Żywotność nasienia**

Nasienie rozcieńczono do około 30×10^6 plemników / ml. Próbkę przygotowano w dwóch egzemplarzach. Proces przebiegał następująco:

- a. rozmrożono SYBR 14.
- b. dodano 0,5 ml rozcieńzonego nasienia dla każdej próbki, która ma być zmierzona w 1,5 ml próbkach wirówkowych ependorfach.
- c. Pipetą 2,5 μ l Sybr i 5 μ l PI (Propidium iodide) do każdej próbki.
- d. Odwrócono próbki do wymieszania i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut.
- e. 20 μ l rozcieńzonego nasienia każdej próby przeniesiono do 1,5 ml próbki.

Dodano potem 10 μ l Sybr i 20 μ l Pi do każdej próby, następnie poddano mieszaniną i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

Po 15 minutach pobrano 5 - 10 μ l wybarwionego nasienia i naniesiono je na szkiełko podstawowe, które przykryto szkiełkiem nakrywkowym i sprawdzono pod mikroskopem fluorescencyjnym przy użyciu zestawu filtrów. Plemniki martwe były zabarwione na czerwono, natomiast żywe zielono. Zrobiono zdjęcia, następnie obliczono ilość plemników żywych i martwych. Przeżywalność obliczono ze wzoru: % przeżywalności = ilość zielonych plemników (zielone plemniki + czerwone plemniki) x 100.

- **Pobór jąder i przydatków głowowych**

Wszystkie samce zostały poddane ubojowi, a zaraz po nim pobrano jądra, grzebienie i dzwonki. Przed pomiarem przydatków głowowych grzebienie i dzwonki były ostrożnie spłaszczone na stole. Grubość grzebienia zmierzono w najgrubszym punkcie. Wszystkie jądra, grzebienie i dzwonki zmierzono z dokładnością do 0,1 cm za pomocą suwmiarki. Wyniki poddano analizie statystycznej.

3.4.2.Kury

- **Pozyskiwanie komórek blastodermalnych (BCs)**

Jaja zniesione przez kury chimery przechowywane były przez 3 dni w temperaturze zbliżonej do zera fizjologicznego. Zgodnie z metodą opisaną przez Etchesa i in., [1993] z późniejszą modyfikacją [Łakota, 2001], BCs pozyskano z tarczki zarodkowej jaj. Zawartość jaj przelano na plastikowy separator do żółtek. Po oddzieleniu kuli żółtkowej od białka, na zlokalizowaną tarczkę nakładano pierścień wycięty z bibuły. Po odcięciu błony wietlinowej wokół krawędzi zewnętrznej pierścienia, tarczkę zarodkową zdejmowano i oczyszczano z resztek żółtka. Następnie komórki wmywano strumieniem 1 ml PBS $-Ca^{++}-Mg^{++}$ przenosząc je do probówek i wirowano 5 - 6 min. Po wirowaniu pobrano 0,5 ml komórek i dodano 0,5 ml PBS, ponownie wirowano przez 3 minuty / 3000 obrotów rpm. Po wirowaniu dodano 1 ml 0,25% trypsyny i mieszano. Następnie kroplę roztworu umieszczono pod mikroskopem świetlnym i w powiększeniu 400 krotnym liczono komórki blastodermalne.

- **Liczenie somitów**

Jaja poddano inkubacji przez 72 godziny, następnie przerwano inkubację i liczono somity, obserwując pod mikroskopem świetlnym w powiększeniu x 16.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

4.1. Koguty

Ograniczona ilość lub brak publikacji dotyczących wpływu chimeryzmu na cechy produkcyjne, a zwłaszcza reprodukcyjne oraz parametry fizjologiczne chimer, sprawia, iż wyniki badań własnych odnoszone będą często do piśmiennictwa traktującego omawianą problematykę w aspekcie ogólnym.

Koguty z grupy kontrolnej i chimery osiągnęły dojrzałość płciową w podobnym okresie, odpowiednio w 123,4 i 127,4 dniu życia. Podkreślenia wymaga fakt braku zależności pomiędzy dojrzałością płciową, a objętością nasienia u chimer $r=-0,307$. Jednakże ujemne statystycznie istotne wartości współczynnika korelacji dla dojrzałości płciowej a objętości nasienia uzyskano w grupie kontroli $r=-0,792$, które zestawiono w Tabeli 5 i 6.

Nasienie pozyskiwano przez 8 dni od 30 kogutów, u których stosowano masaż grzbieto-brzuszy opisany przez Burrows i Quinn [1937]. Wszystkie z 240 ejakulatów zostały uzyskane po około 250 masażach wykonywanych w okresie tygodnia. Kolor nasienia oscylował od bladokremowego do białego, a objętość nasienia wahała się u chimer od 10 μl do 900 μl , natomiast w grupie kontrolnej White Leghorn wynosiła od 40 μl do 970 μl . Średnia objętość nasienia (Tabela 1) uzyskiwanego od samców grupy kontrolnej (0,428 mL) była istotnie większa ($P<0,005$) od wartości otrzymanej w grupie chimer (0,338 mL).

Mohan i in., [2011] oraz Shanmugam i in., [2016] stwierdzili większe objętości ejakulatu kogutów White Leghorn, niż te uzyskane w badaniach własnych. Wskazują także na wpływ rasy i linii ptaków na wartość badanej cechy. Według Łukaszewicz i in., [2018] objętość nasienia chimer była wyższa /oceniono jedynie 8 osobników/ i wyniosła 0,518ml, koncentracja plemników $298,51 \times 10^6/\text{ml}$, w tym 77,5% plemników żywych.

W badaniach własnych koncentracja plemników w każdym z ejakulatów oscylowała u chimer od 0 do 10539,89 szt. / μl , natomiast w kontroli od 499,77 szt. / μl do 12244,48 szt. / μl . Koncentracja plemników w nasieniu grupy kontrolnej (4519,7 szt. / μl) była istotnie wyższa ($P<0,005$) w porównaniu z grupą chimer (3658,3 szt. / μl). W nasieniu grupy kontrolnej stwierdzono istotnie wyższą ($P<0,005$) zawartość ogólnej liczby plemników żywych w porównaniu do grupy chimer; wartości te stanowiły odpowiednio 97,6% i 94,6%.

Wartości korelacji koncentracji plemników [szt. / μl] u chimer przedstawiono w Tabeli 5. Była ona najniższa pomiędzy dojrzałością płciową $r=-0,470$ i najwyższa pomiędzy koncentracją plemników [szt. / μl] i szerokością lewych dzwonek $r=0,680$. Statystycznie dodatnią korelację obserwowano

pomiędzy koncentracją plemników a odsetkiem prawidłowych plemników $r=0,701$, odsetkiem martwych a objętością nasienia $r=0,540$, odsetkiem martwych plemników a koncentracją plemników $r=0,670$ oraz odsetkiem plemników prawidłowych a średnią amplitudą linearności ruchu główki $r=0,519$.

Natomiast Czekalski i Bednarczyk [2006] wykazali, że chimeryzm płciowy może wpływać na zdolność reprodukcyjną chimer, jednak uzyskane wyniki nie były jednoznaczne. Niektóre koguty chimery produkowały nasienie o niskiej zawartości plemników, a część z nich nie produkowała żadnych plemników, podczas gdy inne charakteryzowały się liczbą komórek istotnie wyższą w porównaniu do ptaków z grupy kontrolnej. Cytowani autorzy badali jednak chimery uzyskane z wykorzystaniem komórek blastodermalnych, które Petite i in., [1990]; Kagami [2016] wykazują właściwości totipotentne, a więc można je zidentyfikować w wielu tkankach wywodzących się z wszystkich trzech listków zarodkowych: ektodermy, entodermy i mezodermy [Siwek i in., 2010].

Kagami i in., [1997] dowiedli również, że u kogutów chimer pierwotne komórki zarodkowe, po przeniesieniu do biocy płci żeńskiej, mogą różnicować się w funkcjonalne komórki jajowe. Natomiast żeńskie komórki rozrodcze, przenoszone do męskich bioców, mogą różnicować się w funkcjonalne plemniki. Chociaż PGCs mogą różnicować się w funkcjonalne gamety w gonadach biocy również w gonadach przeciwnych, ich wydajność jest niska [Naito i in., 1999].

Istnieje swoista konkurencja pomiędzy populacjami PGCs egzogennymi i endogennymi, co prowadzi do produkcji dwóch rodzajów komórek płciowych: pochodzących od dawcy/dawców i tych od biocy. Tak więc proporcja gamet egzogennych jest określona przez stosunek komórek gospodarza do komórek wprowadzonych do krwioobrotu i migrujących do gonad zarodka biocy. Na tę liczbę może wpłynąć zdolność komórki rozrodczej do mitozy, a zdolność ta zmienia się w zależności od rasy kurczaka [Nakamura, 2016].

Morfologiczna ocena plemników w nasieniu świeżym wykazywała średnio u kogutów z grupy kontrolnej 89,9% a u chimer 82,8% plemników żywych. U 72,60% badanych z grupy kontrolnej i 60,10% chimer wykazano plemniki o prawidłowej budowie. Natomiast 17,3 zdeformowanych plemników wykryto u grupy kontrolnej, a u chimer 22,7%. Stężenie plemników i odsetek normalnych plemników żywych były niższe niż stwierdzono w innych badaniach Mohan i in., [2011], Shanmugam i in., [2013]. Wyniki te mogą wskazywać, że chimeryzm nie miał wpływu na jakość nasienia kogutów. Jednak kluczowe znaczenie ma morfologiczna budowa plemnika [Keel i in., 2002; Oral i in., 2002, Maree i in., 2010, Singh i in., 2011, Lasiene i in., 2013]. Plemnik morfologicznie nieprawidłowy może mieć widoczne nieprawidłowości

w obrębie główki, wstawki bądź witki. Zdarza się, że plemniki mają więcej niż jeden defekt, co sprawia, że taka komórka nie posiada odpowiednich możliwości do pokonania drogi do oocytu i w efekcie nie ma zdolności zapładniającej [Tasdemir i in., 2002].

Wyniki oceny obrazu morfologicznego plemników zawartych w nasieniu bezpośrednio po pobraniu przedstawiono w Tabeli 2. Wykazano istotny wpływ chimeryzmu na badane parametry. Procent plemników prawidłowych wynosił $72,60 \pm 18,00$ i $60,10 \pm 27,90$, odpowiednio w grupie kontrolnej i grupie chimer, a różnice pomiędzy grupami były statystycznie istotne ($P < 0,01$). Przeciwnie, w badaniach przeprowadzonych przez Czekalskiego i Bednarczyka [2006] stwierdzono, że chimeryzm nie wpływa na jakość nasienia kogutów.

W badaniach własnych odsetek plemników prawidłowych był w obu grupach niższy niż stwierdzony w innych badaniach Mohan i in., [2011], Shanmugam i in., [2013]. Wyniki te mogą wskazywać, że nie tylko chimeryzm, ale także inne czynniki mogły mieć wpływ na jakość nasienia kogutów.

Plemników zdeformowanych wykazano 17,3% w grupie kontrolnej i 22,7% wśród chimer. W trakcie niniejszych badań, analizując wady i uszkodzenia gamet, zauważono, że najliczniej reprezentowane są plemniki z anomalią główki w postaci lokalnych rozdęć lub powiększenia tej części komórki. Wśród wszystkich plemników o nieprawidłowej budowie największy odsetek stanowiły plemniki akrosomalne (rozdęte główki), a następnie plemniki z załamaną szyjką (Tabela 2 oraz Rycina 1). Jednak jedynie w odniesieniu do odsetka plemników splełanych stwierdzono istotne różnice ($P < 0,05$) pomiędzy grupami: kontrola – $1,20 \pm 2,10$, chimery – $0,80 \pm 0,90$. Ze względu na nieparametryczny rozkład wyników, rezultaty obu grup porównano testem Manna-Whitney'a.

W Tabeli 5 i 6 przedstawiono wartości współczynnika korelacji, gdzie u chimer oraz w grupie kontrolnej stwierdzono istotną statystycznie niską zależność $r = -0,457$ między odsetkiem rozdętych plemników a masą prawego jądra. Natomiast korelacja wysoka przy znacznej zależności $r = 0,785$ między spermatydami a odsetkiem plemników akrosomalnych nie wykazała żadnych istotnych zależności pomiędzy odsetkiem prawidłowych plemników a ruchem postępowym $r = 0,266$, odsetkiem rozdętych a szerokością lewego jądra $r = 0,420$ oraz odsetkiem martwych a dojrzałością płciową $r = -0,378$.

Lake i in., [1966] zwracają uwagę na wstawki i akrosomy, które odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu plemników, ruchliwości oraz zdolności do penetracji osłonki przejrzystej. Jednakże pojawienie się w nasieniu gamet uszkodzonych lub zdeformowanych niekoniecznie jest efektem nieprawidłowości w przebiegu spermatogenezy lub transporcie drogami wyprowadzającymi nasienie. Clarke i in., [1984] podają, że

zmiany w ciśnieniu osmotycznym środowiska plemników przyczyniają się do występowania uszkodzeń komórek rozrodczych. Nawet niewielkie zmiany osmolarności medium, w którym zawieszono plemniki, mogą doprowadzić do wzrostu odsetka nieprawidłowych komórek. Ponadto zauważono, że temperatura towarzysząca pobieraniu i badaniu nasienia wpływa na kształt i budowę ocenianych komórek [Chalah i in., 1998]. Badacze ci, pracując z nasieniem kogutów i indyków, obserwowali znaczny wzrost liczby plemników zakrzywionych, gdy temperatura spadała poniżej 15°C. W przypadku, gdy wszelkie manipulacje z nasieniem odbywały się w temperaturze 41°C, następował wzrost odsetka plemników z uszkodzoną wtką. Ponadto zauważono, że nasienie pozyskane od kogutów cechuje się większą liczbą plemników nieprawidłowych niż nasienie indyków pobierane w tych samych warunkach środowiskowych. Clarke i in., [1984] sugerują, że płodność nie zależy od liczby plemników z defektami morfologicznymi, jeśli nie przekracza ona 20% całej populacji gamet w nasieniu kogutów czy indyków. Morales i in., [1988] udowodnili, że przy określeniu zdolności zapładniającej osobnika plemniki wykazujące prawidłowy ruch, ale mające np. defekty główki nie są zdolne do zapłodnienia.

W przypadku oceny morfologii zastosowano klasyfikację wad opierającą się na badaniach Łukaszewicz [2001], która zaproponowała przejrzysty podział nieprawidłowości budowy plemnika ptasiego. Podział ten dodatkowo poszerzono o zmiany dotyczące akrosomu. Bajpai [1963] zaproponował rozbudowany i szczegółowy system klasyfikacji plemników, który opierał się na dokładnym analizowaniu zmian w budowie poszczególnych odcinków gamety (wady główki, wstawki i wtki). Jednakże ze względu na rzadkie występowanie niektórych opisanych przez niego nieprawidłowości, wydaje się zasadne klasyfikowanie ich do grupy „inne wady”. Inni badacze Ansah i in., [1985] oraz Woodard i in., [1975] morfologię plemnika oceniali bardziej ogólnikowo, dzieląc je na komórki o prawidłowej i nieprawidłowej budowie. Natomiast Clarke i in., [1984] uwzględniali tylko uszkodzenia akrosomu oraz mitochondriów. W badaniach Bilgili i in., [1985] u kogutów ras ciężkich ejakulaty cechowały się wyższym odsetkiem gamet o nieprawidłowej budowie, w szczególności dotyczyło to częstszego występowania plemników zakrzywionych oraz uszkodzonych na wysokości wstawki. Obserwowano także wzrost komórek powiększonych i zniekształconych, gdy do wybarwienia tła użyto nigrozyny. W tym przypadku zastosowanie nigrozyny przyczyniło się do częstszego pojawienia się wad główki. Szumowski i in., [1976], zastosowali podobne barwienie, lecz zanotowali znacznie mniejszy odsetek wad, jednak autorzy ci nie podali informacji o stężeniu użytych barwników, w tym nigrozyny.

Komputerowa metoda analizy plemników charakteryzuje się możliwością uzyskania obiektywnego wyniku, że znacznie większą precyzją w porównaniu z podstawowym badaniem nasienia. Pozwala to na szczegółową

ocenę zdolności plemnika do ruchu i jego morfologię, dzięki wyodrębnieniu danych z kilku obliczonych parametrów, które dokładnie i szybko pozwalają scharakteryzować ruchy plemników [Klimowicz i in., 2008]. Metoda jest powszechnie stosowana do oceny nasienia ssaków, w tym człowieka [Yániz i in., 2015], rzadziej nasienia ptaków [García-Herreros 2016; Santiago-Moreno i in., 2016]. Zgodnie z moją wiedzą, dane dotyczące badania morfometrii nasienia i jego związku z ruchliwością plemników u chimer nie są dostępne. Analiza SCA (sperm class analyzer) wskazała, że procent ruchliwych plemników waha się u chimer od 0% do 100%, a u ptaków z grupy kontrolnej od 27,78% do 100%. Wynika z tego, że u dwóch kogutów chimer, oznakowanych numerami 1047 i 1051, stwierdzono brak ruchliwości plemników. Analizę rozpoczęto od zbadania rozkładu zmiennych ilościowych. W tym celu wyliczono podstawowe statystyki opisowe oraz wykonano test Shapiro-Wilka, który wskazuje na zgodność rozkładów z krzywą Gaussa. Efekty przeprowadzonych wyliczeń prezentują Tabela 3. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że rozkład mierzonych zmiennych w większości przypadków nie odbiega istotnie statystycznie od rozkładu normalnego. Spośród badanych parametrów (Tabela 3) jedynie wartości indeksu liniowości (LIN), indeksu prostoliniowości (STR) i średnia amplituda linearności ruchu główki (ALH) różniły się istotnie pomiędzy grupami, odpowiednio przy $P < 0,023$, $P < 0,003$ i $P < 0,006$. Komentując wyniki badań własnych można stwierdzić, że parametry dotyczące ruchliwości plemników były zbliżone do wartości uzyskiwanych przez innych autorów.

Natomiast wartości korelacji chimer były na najwyższym i statystycznie istotnym poziomie. Kształtowały się znaczne zależności średniej wartości prędkości nasienia chimer pomiędzy VAP (średnia wartość nasienia) a procentem nasienia $r = 0,640$, VAP (średnia wartość nasienia) -VSL (prędkość linearna) $r = 0,982$ i WOB (indeks oscylacji)-STR (indeks prostoliniowości) $r = 0,982$. W pozostałych przypadkach wartości współczynnika korelacji przybierały różnoimienne znaki, co nie pozwala na ogólne wnioskowanie o charakterze tych zależności. Jednakże ruch postępowy okazał się być dodatnio skorelowany z VCL (krzywą prędkości) $r = 0,844$, chociaż wartość tej korelacji nie była na najwyższym poziomie, a w przypadku kontroli była nieco niższa i wynosiła $r = 0,806$. Na podobnym poziomie oszacowano zależność między ruchem postępowym a WOB (indeksem oscylacji). W tym przypadku nieco niższą wartością współczynnika $r = 0,762$ charakteryzowała się chimera w porównaniu z kontrolą $r = 0,873$. Zauważono korelację umiarkowaną zależności istotnej u chimer i wskazującej na wzrost objętości nasienia i wzrost ALH (średnia amplituda linearności ruchu główki) $r = 0,533$.

Statystycznie dodatnią korelację obserwowano pomiędzy ruchem postępowym i procentem koncentracji nasienia $r = 0,612$. W analizie CASA cechy ruchliwości plemników wskazywały wzrost parametrów prędkości (VAP,

VCL i VSL) oraz STR i LIN chimer w stosunku do kontroli. VAP (średnia wartość prędkości) a ruch postępowy $r=0,888$, VCL (krzywa prędkości) a ruch postępowy $r=0,844$, VSL (prędkość linearna) a ruch postępowy $r=0,892$ oraz STR (indeks prostoliniowości) $r=0,666$ i LIN (indeks liniowości) $r=0,764$.

Narząd rozrodczy samców ptaków składa się z parzystych jąder. Jądra leżą w grzbietowej części jamy brzusznej, wzdłuż lędźwi, obok przedniego płuca nerek, mają kształt fasolowaty lub owalny, zabarwienie cieliste. Wielkość jąder zależy od wieku, rasy oraz stanu fizjologicznego ptaka [Arciszewska i in., 1980]. Wyniki oceny pomiarów jąder i przydatków głowowych bezpośrednio po uboju przedstawiono w Tabeli 4. Wyniki badań nie wykazywały różnic istotnie statystycznych. Średni udział oraz błąd standardowy dla długości prawego jądra wynosił $45,6\pm 5,5$ dla chimer i $46,3\pm 4,4$ dla kontroli. Porównując długość lewego jądra, w której wartości są następujące: $43,7\pm 4,6$ dla chimer i $23,8\pm 2,4$ dla kontroli, szerokość prawego jądra oscylowała między $24,2\pm 3,1$ u chimer i $25,2\pm 3,2$ u kontroli. Natomiast szerokość lewego jądra wynosiła $23,6\pm 2,9$ u chimer i $23,8\pm 2,4$ u kontroli. Masa prawego jądra wynosiła $11,4\pm 3,2$ u chimer i $12,2\pm 2,7$ u kontroli. Masa lewego jądra wynosiła $10,9\pm 3,1$ u chimer i $10,8\pm 1,5$ u kontroli.

Innym czynnikiem analizowanym niekiedy w kontekście oceny cech reprodukcyjnych kogutów jest asymetria parametrów jąder i obustronnych drugorzędowych cech płciowych. Navara i in., [2012] oraz Siudzińska i Łukaszewicz [2008], nie stwierdzili żadnej różnicy w jądrach i cechach nasienia u chimer linii płciowej męskiej. Dowodzi to również temu, że cechy chimer płciowych związane z rozmnażaniem są porównywalne z tymi uzyskanymi bez manipulacji embrionalnej.

W świecie ptaków powszechną cechą samców jest charakteryzowanie się dobrze widocznymi, kolorowymi przydatkami, które wskazują na ich stan zdrowia i zdolności do rozmnażania się [Zuk i in., 1995; Zuk i in., 1990]. Zdaniem niektórych badaczy zmienna asymetria wpływa na rozmiar przydatków głowowych kogutów [Moller, 1990; Moller i Pomiankowski, 1993].

Grzebień jest silnie unaczynionym, znajdującym się na górnej części głowy wytworem naskórka. To drugorzędna cecha płciowa, a jego rozwój związany jest z dojrzewaniem ptaka. Koguty mają grzebień większy od grzebienia kury. Nasilenie barwy grzebienia związane jest z intensywnością działania hormonów wydzielanych przez gruczoły rozrodcze. Wielkość i kształt grzebienia są charakterystyczne dla typu i rasy. U rasy Leghorn i Zielononóżki kuroopatwianej występuje pojedynczy (blaszkowaty) prosty płatek wycięty w 5 do 7 zębów [Arciszewska i in. 1980]. Średni udział i błąd standardowy dla długości grzebienia wynosi $125,5\pm 11$ u chimer i $129,1\pm 9,4$ u kontroli. Szerokość grzebienia wynosiła $65,1\pm 6,6$ u chimer i $67,2\pm 7,9$ u kontroli. Z zestawień zaprezentowanych w Tabelach 5 i 6, dotyczących korelacji widać, że

długość grzebienia jest znacząco związana z objętością nasienia u kogutów chimer $r=0,506$.

Wyniki uzyskane w wielu badaniach nie potwierdzają jednak, czy taki związek istnieje. W badaniach Łukaszewicz i in., [2018] wykazano istotną korelację między mierzonymi cechami, a były to: żywotność plemników, szerokość grzebienia i długość chrząstki grzebienia $r=0,77$, $p=0,03$ oraz koncentracja plemników $r=-0,71$, $p=0,046$. Badacze stwierdzili, że ich wyniki wskazują na korelację między wielkością nasady grzebienia a odsetkiem żywych plemników. Wyniki sformułowane przez Łukaszewicz są analogiczne z wynikami przedstawionymi przez Prieto i in., [2011], który nie zauważył żadnego związku między szerokością grzebienia a jakością nasienia. W pracy Pizzara i in., [2004] również czytamy, że nie ma związku między grzebieniem, a jakością nasienia. Cytowani autorzy oraz Łukaszewicz i in., [2018], Navarai i in., [2012] nie stwierdzili związku między stężeniem plemników, a szerokością grzebienia. Natomiast McGary i in., [2002] opisali dodatnią korelację między powierzchnią grzebienia a masą jąder.

Z kolei Bilcik i Estevez [2005] wykazali, że wygląd grzebienia kogutów może być również związany z charakterem nasienia ptaków. Stwierdzili, że szerokość grzebienia jest skorelowana z ruchliwością plemników. McGary i in., [2002] wykazali związek pomiędzy grzebieniem, płodnością i przenikaniem plemników przez warstwę prewitalinową oraz korelację pomiędzy powierzchnią grzebienia, a masą jąder i płodnością osobników.

Dzwonki są to parzyste, silnie unaczynione płaty skórne, znajdujące się poniżej dzioba. Rozwój ich jest równoległy z rozwojem grzebienia. Podobnie jak grzebień stanowią one drugorzędne cechy płciowe u samców, u kogutów są większe niż u kur. Dzwonki nieprawidłowo wykształcone lub niejednakowej wielkości stanowią przy selekcji kogutów podstawę do obniżenia oceny lub dyskwalifikacji samca jako reproduktora [Arciszewska i in., 1980]. Średni udział oraz błąd standardowy dla długości dzwonka prawego wynosi $61,5 \pm 6,8$ u chimer i $64,7 \pm 7,1$ w kontroli. Natomiast długość dzwonka lewego $59,2 \pm 8,1$ u chimer i $62,3 \pm 6,9$ w kontroli. Przy szerokości dzwonka prawego średni udział i błąd standardowy wynosił $48,8 \pm 6,4$ w przypadku chimer i $50,3 \pm 5,7$ w przypadku kontroli. Natomiast szerokość dzwonka lewego wynosiła $48,2 \pm 6,1$ u chimer i $50,4 \pm 4,8$ w kontroli.

Z wyników dotyczących korelacji, a przedstawionych w Tabeli 5 i 6, widać, na podstawie wybranych cech kogutów, istotne różnice. Szerokość dzwonka lewego znacząco związana jest z długością dzwonka prawego w grupie chimer $r=0,869$ i grupie kontrolnej $r=0,848$. Natomiast długość prawego dzwonka związana jest z szerokością jądra lewego $r=0,363$ w grupie chimer i kontroli. Dla tej cechy w obu grupach zaobserwowano brak znaczącej istotności.

Wyniki badań u Łukaszewicz i in., [2018] nie wykazały żadnego związku pomiędzy przydatkami głowy i rozmiarem jąder oraz korelacji między masą ciała, a masą jądra u chimer, co pozostaje w sprzeczności z wynikami Pitchera i in., [2005] oraz Moller i Pomiankowskiego [1993]. Moller i Erritzoe [1988], stwierdzili dodatni związek między dzwonkami i rozmiarem jąder u wróbli. W badaniach własnych nie znaleziono istotnego związku długości prawego dzwonka z szerokością jądra lewego, $r=0,363$.

4.2. Kury

W przypadku kur badano wpływ chimeryzmu na następujące cechy: masa ciała, wiek osiągnięcia dojrzałości płciowej, masa jaj, ilość somitów w 72 godz. inkubacji zarodka, zapłodnienie jaj, zamieralność zarodków oraz wylęgowość piskląt. Wyniki przedstawiono w Tabelach 7 do 12 oraz na Rycinach 6 do 8. Średnia masa ciała badanych kur była podobna i wyniosła 1,2 kg. Chimery osiągnęły dojrzałość płciową średnio w 137,8 dniu życia, wcześniej (o 6,8 dnia) nastąpiło to w przypadku kur z grupy kontrolnej, jednak różnica nie została potwierdzona statystycznie (Tabela 7). Jednakże, jak przedstawiono na Rycinie 6, wykresy przedstawiające czas osiągnięcia dojrzałości płciowej dla każdej z grup nie zachodzą na siebie. Oznacza to, że wszystkie kury z grupy kontrolnej znosiły jaja już w momencie, gdy pierwsza z chimer rozpoczęła nieśność. Kury osiągające później dojrzałość płciową charakteryzowały się mniejszą podatnością na zapłodnienie ($r = -0,541$) oraz wyższą zamieralnością ich zarodków w 1 stadium inkubacji ($r = 0,571$). Ciekawe, iż dotyczyło to jedynie chimer (Tabela 10 i 11).

Średnia masa jaja była zbliżona i wyniosła 54,4 i 55,1 odpowiednio do chimer i grupy kontrolnej (Tabela 7). W obu grupach była wysoko skorelowana z wiekiem kur ($r = 0,842$ kontrola i $r = 0,9062$ chimery). Znany jest wpływ genotypu, wiek kur oraz czynników żywieniowych wpływających na masę jaj, jak również udział poszczególnych komponentów [Bednarczyk, 1991]. Zważywszy, że chimery powstały w wyniku integracji komórek obu ras: kur White Leghorn i Zielononóżki, można było spodziewać się, że masa jaja będzie w mniejszym lub większym stopniu zbliżona do masy jaja dawcy lub biorcy, w zależności od udziału w organizmie chimery poszczególnych genotypów komórek.

W Tabeli 8 i 9 podano wyniki testu krzyżowania wstecznego koguta Zielononóżki z kurą chimera i White Leghorn (kontrola). Procent jaj zapłodnionych wyniósł w obu grupach, odpowiednio 87,7 i 93,3 oraz zarodków zamartych, odpowiednio 38,3 i 26,7. Różnice te nie znalazły potwierdzenia statystycznego, jednak skutkowały wyższym, na granicy istotności ($p \leq 0,07$) wylęgiem z jaj nałożonych w grupie kontrolnej (66,7%) w porównaniu do

grupy chimer (49,4%). Dane te wskazują, że chociaż kury chimery produkują jaja, to nie wszystkie są zdolne do wydania potomstwa.

W Tabeli 9 przedstawiono wartości procentowe, średnie odchylenia standardowego oraz mediany w grupie chimer, a także w grupie kontrolnej w zakresie zamarłych zarodków oraz zarodków zamarłych w I, II oraz III stadium. Istotną różnicę ($p \leq 0.03$) stwierdzono w stosunku do zarodków zamarłych w III stadium. W obu grupach procent zarodków zamarły był istotnie ujemnie skorelowany z zapłodnieniem jaj (Tabela 10 i 11).

W większości publikowanych do tej pory prac wskazano na znaczne zmniejszenie wylęgowości piskląt w wyniku iniekcji komórek zarodkowych dawców do zarodków biorców. Otrzymano kilkunastoprocentową przeżywalność manipulowanych zarodków [Petitte i in., 1990, Naito i in., 1994b, Thoraval i in., 1994, Ono i in., 1995, Reedy i in., 1995, Maeda i in., 1997, Varkonyi i in., 1997, Pokorny, 1999, Soh i in., 2002]. Większe wskaźniki wylęgu chimer uzyskali: Bednarczyk i in., [2000b], Speksnijder i Ivarie [2000], Łakota [2001]. W badaniach Czekalskiego [2004] metoda tworzenia chimer polegająca na iniekcji komórek blastodermalnych dawców przez otwór w skorupie wykonany nad komorą powietrzną spowodowała uzyskanie wysokich (40,3%) wyników wylęgu manipulowanych zarodków [Bednarczyk i in. 2000b, Łakota, 2001]. Jak wynika z danych własnych prezentowanych w Tabeli 9, uzyskany wynik zbliżony jest do większości doniesień z tego zakresu, w poprzednich pracach informowano jednak o wylęgu zaledwie kilkunastu piskląt.

Przyczyny determinujące wylęgowość iniekowanych zarodków nie są znane. Najczęściej wymienia się jednak: wykonanie otworu w skorupie, ingerencję w rozwijającą się tarczkę zarodkową, zaburzenia w wymianie gazowej jaja w związku z zalepieniem jednego jego końca [Petitt i in., 1990, Maeda i in., 1997]. Ważny jest również wpływ środowiska zewnętrznego, głównie podczas wykonywania manipulacji na jajach [Kagami i in., 1995, Trefil i in., 1999]. Kagami i in., [1997] wykazali, że genetycznie męskie lub żeńskie PGC mogą się różnicować w funkcjonalne komórki jajowe lub plemniki. Obserwowano jednakże względną niepłodność niektórych chimerycznych samców [Thoraval i in., 1994] i samic [Bednarczyk i in., 2002].

Na uwagę zasługuje fakt pojawienia wysokiego odsetka zamarłych zarodków, zwłaszcza w III stadium rozwoju, co zaobserwowano w badaniach własnych. Interesujące jest porównanie cech związanych z embriogenezą: liczby komórek blastodermalnych w momencie zniesienia jaja i liczby somitów po 72 godzinach inkubacji zarodków. Oba wskaźniki sugerują wolniejszy rozwój embrionalny zarodków chimer w porównaniu do zarodków z grupy kontrolnej. Stwierdzono bowiem u chimer 42 946, a w kontroli 41 691 komórek blastodermalnych oraz odpowiednio 17,8 i 17,4 średnią liczbą somitów.

Różnice jednak nie znalazły potwierdzenia statystycznego, można więc mówić jedynie o tendencji.

Według Hamidu i in., [2011] liczba żywych BC może być dobrym wskaźnikiem wczesnego rozwoju ptaków. Badania własne wskazują, że możliwe było obserwowanie efektów chimeryzmu we wczesnym rozwoju ptaków [etap X według Eyal-Giladi i Kochav 1976] lub w stadium 72 godzinnego zarodka.

Liczba somitów była istotnie dodatnio skorelowana z masą ciała ($r=0,553$) i wiekiem kur ($r=0,585$), ciekawe jednak, że prawidłowość tę stwierdzono jedynie w odniesieniu do kur z grupy kontrolnej.

PODSUMOWANIE

W badaniu własnych wykorzystano do tworzenia chimer pierwotne komórki płciowe. Komórki te przeniesione do krwiobiegu zarodka kurzego migrują do linii germinalnych przyszłych gonad embrionów biorców i różnicują się w gamety [Chojnacka-Puchta i in., 2015]. Komórki blastodermalne stosowane w wcześniejszych badaniach [Czekalski i Bednarczyk, 2006] zostały wyizolowane z zarodków dawców i przeniesione na biorców. Wykazano, że mogą one oddziaływać na inne tkanki somatyczne oraz mogą przyczynić się nie tylko do wytworzenia się linii płciowej, ale także różnicować się na kilka komórek somatycznych [Siwek i in., 2010] wpływających na wielorakie funkcje rozrodcze komórek chimera [Sechman i in., 2006].

Badaniami własnymi objęto 43 cechy, które oceniono w grupie chimer (CH) oraz ptaków kontrolnych (WI). Informacje umieszczone w Tabeli 12 stanowią syntetyczne podsumowanie badań własnych, dotyczących wpływu chimeryzmu na cechy ptaków. Zasadny jest następujący tok rozumowania: biorca jest zarodkiem posiadającym komórki o cechach, których założenia genetyczne zostały już w pełni zdeterminowane. Wszystkie charakterystyki porównujące ptaki pochodzące z manipulowanych zarodków z ptakami White leghorn pochodzącymi z zarodków nie poddanych manipulacji nie powinny wykazywać różnic statystycznie istotnych. Tymczasem, porównując 43 cechy, stwierdzono w 9 przypadkach statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami CH i WI. Jest to niezbity dowód nie tylko faktu obecności komórek egzogennych w organizmie biorca. Taki wynik świadczy ponadto, że niewielka ich pula – ok. 1200 szt., wprowadzona do zarodka liczącego od 40 000 do 60 000 komórek, zdolna jest do proliferacji, skutecznej inkorporacji w gonadach, a przede wszystkim może wywoływać istotne zmiany mono- jak i poligenicznie uwarunkowanych różnorodnych właściwości fizjologicznych i produkcyjnych cech organizmu.

Analiza zebranych danych nie pozwala na wyjaśnienie w pełni mechanizmów wzajemnego oddziaływania komórek egzo- i endogennych w organizmie chimery oraz ich wpływu na komórki rozrodcze. Wskazuje jednak, że chimery płciowe pomimo ograniczenia pewnych funkcji rozrodczych zdolne są do wydania potomstwa. Dzięki temu stanowią przydatny materiał badawczy umożliwiający badanie rozwoju embrionalnego [Tagami i Kagami, 1998], śledzenie interakcji komórkowych [Weeke-Klimp i in., 2010], lub jak wskazują najnowsze badania, ewentualnych efektów epigenetycznych [Kress in., 2016]. Ich właściwości umożliwiają także rekonstrukcję zagrożonych gatunków ptaków [Bednarczyk i in., 2002; Wernery i in., 2010] oraz tworzenie ptaków transgenicznych [Chojnacka-Puchta i in., 2015; Bednarczyk i in., 2018].

5. WNIOSKI KOŃCOWE

1. Uzyskano chimery płciowe, w wyniku iniekcji pierwotnych komórek płciowych kur Zielononóżka kuropatwiana (Zk) do zarodków biorców White leghorn (WL).
2. Porównując 43 cechy, stwierdzono w 9 przypadkach statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą chimer i grupą kontrolną (WL).
3. W przypadku kur badano wpływ chimeryzmu na następujące cechy: masa ciała, wiek osiągnięcia dojrzałości płciowej, masa jaj, ilość somitów w 72 godz. inkubacji zarodka, zapłodnienie jaj, zamieralność zarodków oraz wylęgowość piskląt. Istotną różnicę ($p \leq 0.03$) stwierdzono jedynie w stosunku do zarodków zamarych w III stadium.
4. Ponadto, uzyskane dane te wskazują, że chociaż kury chimery produkują jaja, to nie wszystkie są zdolne do wydania potomstwa.
5. W przypadku kogutów stwierdzono niższą u chimer ($p \leq 0.05$), w porównaniu z grupą kontrolną objętość nasienia, koncentrację plemników, procent plemników ruchliwych, procent plemników prawidłowo ukształtowanych oraz wyższy odsetek plemników splełanych. Dalsze różnice z zastosowaniem komputerowej analizy plemników dotyczyły: indeksu liniowości (LIN), indeksu prostoliniowości (STR) i średniej amplitudy linearności ruchu główki.
6. Analiza zebranych danych nie pozwala na wyjaśnienie w pełni mechanizmów wzajemnego oddziaływania komórek egzo- i endogennych w organizmie chimery.

6. STRESZCZENIE

Wpływ chimeryzmu płciowego na cechy reprodukcyjne ptaków

Chimery płciowe stanowią jedno z najlepszych narzędzi do badania rozwoju zarodkowego ptaków, a także produkcji ptaków transgenicznych i/lub do odtworzenia gatunków zagrożonych. Wytwarzanie chimer płciowych polega na wprowadzeniu egzogennych pierwotnych komórek płciowych (PGCs) dawcy do zarodka biorcy i ich inkorporacja w tkankach gonad.

Badania miały na celu ocenę wpływu chimeryzmu płciowego na cechy reprodukcyjne kury. Chimery uzyskano w wyniku oczyszczenia PGCs izolowanych z gonad 5,5-dniowych zarodków dawcy Zielononóżki kuropatwianej i ich iniekcji do naczyń krwionośnych 3-dniowych zarodków biorcy Withe leghorn. Badaniami objęto 34 chimery płciowe - grupa CH /19 kogutów i 14 kurach/ i 18 ptaków kontrolnych - grupa WL (bez manipulacji), odchowanych i utrzymywanych w tych samych warunkach środowiskowych, oceniając 43 cechy reprodukcyjne.

Do statystycznej oceny wyników zastosowano dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA), a następnie test Duncana. Chimeryzm istotnie ($p \leq 0,01$) wpłynął na 9 badanych cech. W większości przypadków dotyczyło to cech kogutów. Objętość nasienia, koncentracja plemników i odsetek żywych normalnych plemników (odpowiednio 0,338 mL; 3658 szt / μ l i 94,6%) były niższe u chimer, w porównaniu z grupą kontrolną (0,427 mL; 4520 szt. / μ l; i 97,6%). Wpływ ten dotyczył także niektórych parametrów kinetycznych plemników, analizowanych przy użyciu systemu komputerowej analizy plemników (CASA). Zwłaszcza współczynnika liniowości (LIN), indeksu prostoliniowości (STR) i średniej amplitudy bocznego przesunięcia (ALH). W przypadku kur tylko odsetek zarodków zmarłych w III stadium był istotnie wyższy ($p \leq 0,03$) w grupie CH (25,8), w porównaniu z grupą WL (16,7). Zidentyfikowano ponadto jedną kurę i dwa sterylne koguty.

Przeprowadzone badania nie wyjaśniają w pełni mechanizmów wzajemnego oddziaływania komórek egzo- i endogennych u chimer, ale mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych prac w tej dziedzinie.

7. SUMMARY

Influence of germ line chimerism on chicken reproductive traits

Germline chimeras are one of the best tools for studying bird embryo development, as well as the transgenic bird's production or endangered species. The production of germline chimeras involves the incorporation of exogenous primordial germ cells (PGCs) into the gonadal tissue of the recipient embryo.

The experiment described here was designed to study the effect of germ line chimerism on reproductive traits of chicken. Chimeras were created from purified PGCs isolated from gonads of 5.5-day old donor Green-legged Partridge-like embryos and injected into blood vessels of 3-day old recipient White leghorn embryos. In 34 germ line chimeras – CH group /19 cocks and hens 14/, identified by PCR method, and in 18 control birds – WL group (not manipulated), raised and housed in the same environmental conditions, 43 reproductive traits were investigated.

For statistical evaluation of the results, two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple-range test was applied. Chimerism significantly ($p \leq .01$) affected 9 of the studied traits. In most cases they concerned the male traits. Sperm volume, sperm concentration, and percentage of live normal spermatozoa (0.338 mL; 3658 / μ L; and 94.6%, respectively) were lower in chimeras, compared to the control group (0.427 mL; 4520 / μ L; and 97.6%). This impact affected also some kinematic parameters of motile spermatozoa, analysed using a computer-assisted sperm motility analysis (CASA) system. Especially, linearity coefficient (LIN), straightness coefficient (STR), and mean amplitude of lateral head displacement (ALH). In case of hens, only the percent of late dead embryos was significantly higher ($p \leq 0.03$) in CH group (25.8), compared to WL group (16.7). In addition, one hen and two sterile cocks were identified.

This study does not fully explain the mechanisms of interaction between exogenous and endogenous cells in chimeras, but they can be a starting point for further work in this field.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Abercrombie M., Hickman M., Johnson M.L., Thain M. 1992: Dictionary of Biology. Penguin Books Ltd, London.
- [2] Ansah G.A., Segura J.C., Buckland R.B., 1985: Semen production, sperm quality, and their heritabilities as influenced by selection for fertility of frozen-thawed semen in the chicken. *Poultry Sci.* 64, 1801-1803.
- [3] Arciszewska i in., 1980: Przewodnik do ćwiczeń z hodowli i technologii produkcji drobiu. Wydawnictwo Uczelniane Akademii Rolniczej we Wrocławiu., 207, 10-12.
- [4] Aritomi S., Fujihara N., Asian J., Androl., 2000: Production of chicken chimeras by fusing blastodermal cells with electroporation. *Dec;* 2:271-275.
- [5] Ashwell C., James C.R., McMurtry J.P., Denbow D.M., Siegel P.B., 1999: Plant and Animal Genome VII Conference, P71, San Diego.
- [6] Bajpai P.K., 1963: The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. *Poultry Sci.* 42, 462-465.
- [7] Bednarczyk M., 1991: Wpływ czynników dziedzicznych oraz warunków środowiskowych chowu kur na jakość jaj. W "Technologia jaj". Wydawnictwo Naukowo Technologiczne, Warszawa.
- [8] Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M., 2000b: Improvement of hatchability of chicken eggs injected by blastoderm cells. *Poultry Sci.*, 79, 1823-1828.
- [9] Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M., Czekański P., 2000c: Ocena chimeryzmu kur w oparciu o różne kryteria. *Zeszyty Naukowe PTZ. Chów i Hodowla Drobiu*, 49, 214-215.
- [10] Bednarczyk M., Łakota P., Słomski R., Pławski A., Lipiński D., Siemieniako D., Lisowski M., Czekański P., Grajewski B., Dłużniewska P., 2002: Reconstitution of a chicken breed by inter se mating of germline chimeric birds. *Poultry Sci.*, 81, 1347-1353.
- [11] Bilcik B., Estevez I., 2005: Impact of male – male competition and morphological traits on mating strategies and reproductive success in broiler breeders. *Applied Animal Behaviour Science*, 92, 307-323.
- [12] Bilgili S.F., Renden J.A., Sexton K.J., 1985: The influence of staining techniques and examiners on evaluation of the morphology of fowl spermatozoa. *Poultry Sci*, 64, 2358-2361.
- [13] Bresler M., Behnam L., Luke G., Simkiss K., 1994: Manipulations of germ cell populations in the gonad of the fowl. *Brit. Poultry Sci.*, 35, 241-247.
- [14] Burrows, W.A., Quinn J.P., 1937: The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Sci.* 16:19-24.
- [15] Carsience R.S., Clark M.E., Gibbins V.A.M., Etches R.J., 1993: Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development*, 117, 669-675.
- [16] Chalah T., Brillard J.P., 1998: Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-4/PL). *Theriogenology*, 50, 487-493.

- [17] Chojnacka-Puchta L., Sawicka D., Łakota P., Płucienniczak G., Bednarczyk M., Płucienniczak A., 2015: Obtaining chicken primordial germ cells used for gene transfer: in vitro results. *J. Appl. Genet.*, Article in Press.
- [18] Clarke R.N., Bakst M.R., Ottinger M.A., 1984: Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. *Poultry Sci*, 63, 801-805.
- [19] Cyriac S., Churchil R.R., Gibin G., 2012: Transgenic chicken: methods and applications. *J.Indian Vet. Associ*, 10(2), 67-71.
- [20] Czekalski P., 2004: Effect of chimerism on reproductive characteristics and physiological indicators in hen. PhD Thesis, National Institute of Animal Production, Poznań (in Polish).
- [21] Czekalski P., Bednarczyk M., 2006: Wpływ chimeryzmu na wybrane cechy reprodukcyjne kogutów, 62(1), 85-88.
- [22] Etches R.J., Carsience R.S., Clark M.E., Fraser R.A., Toner A., Verrinder Gibbins A.M., 1993: Chimeric chickens and their use in manipulation of the chicken genome. *Poultry Sci.*, 72, 882-889.
- [23] Etches R.J., Clark M.E., Zajchowski L.G., Specksnijder A.M.V., Gibbins K., Kino B., Pain, Samarut J., 1997: Manipulation of blastodermal cells. *Poultry Sci.*, 76, 1075-1083.
- [24] Eyal-Giladi H., Ginnsburg M., Farbarov A., 1981: Avian primordial germ cells are epiblastic origin. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 65, 139-147.
- [25] Eyal-Giladi H., Kochav S., 1976: From cleavage to primitive streak for mation-complementary normal table and a new look at 1st stages of development of chick.1. General morphology *Developmental Biology*, 49, 321-337.
- [26] Fraser R.A., Carsience R.A., Clark M., Etches R.J., Verrinder Gibbins A.M., 1993: Efficient incorporation of transfected blastodermal cells into chimeric chicken embryos. *Int. J. Develop. Biol.*, 37, 381-385.
- [27] García-Herreros M., 2016: Sperm subpopulations in avian species: a comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and sperm subpopulations in avian species: a comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and Guinea fowl (*Numida meleagris*). *Asian J Androl*, 18, 889–894.
- [28] Ginnsburg M., Eyal-Giladi H., 1986: Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 95, 53-71.
- [29] Ginsburg M., 1997: Primordial germ cel development in avians. *Poultry Sci.*, 76, 91-95.
- [30] Glover J.D., Taylor L., Sherman A., Zeiger-Poli C., Sang H.M., McGrew M.J., 2013: A novel piggyback transposon inducible expression system identifies a role for akt signaling in primordial Germ cell migration. *PLoS ONE*, 8(11),77222.

- [31] Gwara T., Walczak M., Łukaszewicz E., Chełmońska B., 2004: Effect of light source on characteristics of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) semen. XXII World's Poultry Congress, Istambuł, Turcja.
- [32] Hamidu J.A., Uddin Z.Li.M., Fassenko G.M., Guan L.L., Barreda D.R., 2011: Broiler egg storage induces cell death and influences embryo quality. *Poult. Sci*, 90, 1749-1757.
- [33] Han J.Y., 2009: Germ cells and transgenesis in chickens. *Comp. Immunol. Micro*, 32, 61-80.
- [34] Han J.Y., Park T.S., Hong Y.H., Jeong D.K., Kim J.N., Kim K.D., Lim J.M., 2002: Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained *in vitro* for an extended period. *Theriogenology*, 58, 1531-1539.
- [35] Ishii Y., Reese D.E., Mikawa T., 2004: Somatic Transgenesis using retroviral vectors in the chicken embryo. *Dev. Dynam*, 229, 630-642.
- [36] Ivarie R., 2006: Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotech*, 24, 99-101.
- [37] Jaśkowski L., 1966: *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol*, 67, 119.
- [38] Jaszczak K., Parada R., Guskiewicz A., 1999: Cytogenetic study of some tissues and age-related changes in cell proportions in a goat-sheep chimera. *Cyt. Cell Gen.*, 84, 55-57.
- [39] 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 piggyback transposon. *J. Biotech.*, 173, 86-89.
- [40] Kagami H., 2016: Perspectives on avian stem cells for poultry breeding. *Animal Science J.*, 87, 1065-1075.
- [41] Kagami H., Clark M.E., Verrinder Gibbins A.M.V., Etches R.J., 1995: Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 379-388.
- [42] Kagami H., Iwata J., Yasuda J., Ono T., 2002: Strain preference in donor and recipient for production of W-bearing sperm in mixed-sex germline chimeric chickens. *Compar Bioch Physiol. Part A: Mol Integ Physiol*, 131 (2), 287-292.
- [43] Kagami H., Tagami T., Matsubara Y., Harumi T., Hanada H., Maruyama K., Naito M., 1997: 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. *Molecular Reproduction and Development*, 48, 501-510.
- [44] Kamihira S., Sugahara K., Tsuruda K., Minami S., Uemura A., Akamatsu N., Nagai H., Murata K., 2005: Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells, 27 (4), 235-241.
- [45] Keel B.A., Stembridge T.W., Pineda G., Serafy N.T. 2002: Lack of standardization in performance of the semen analysis among laboratories in the United States. *Fertil. Steril.*, 78, 603-608.

- [46] Kim J.N., Park T.S., Park S.H., Park K.J., Kim T.M., Lee S.K., Lim J.M., Han J.Y., 2010: Migration and proliferation of intact and genetically modified primordial germ cells and the generation of a transgenic chicken. *Biol. Reprod.*, 82, 257-262.
- [47] Kino K.B., Pain B., Leibo M., Cochrans M., Clark M.E., Etches R.J., 1997: Production of chicken chimeras from injection of frozen – thawed blastodermal cells. *Poultry Sci.*, 76: 753-760.
- [48] Klimowicz M.D, Niżański W., Batkowski F., Savic M.A.: The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS), *Theriogenology* 2008, 70, 77-82.
- [49] Koo B.C., Kow M.S., Choi, B.R., Kim J.H., Cho S.K., Sohn S.H., Cho E.J., Lee H.T., Chang W., Jeon I., Park J.K., Park J.B., Kim T., 2006: Production of germline transgenic chicken expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J.*, 20, 2251-2260.
- [50] Koo B.C., Kown M.S., Choi, B.R., Lee H.T., Choi H.J., Kim J., Kim N., Jeon I., Chang W., Kim T., 2004: Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken. *Mol. Reprod. Dev.*, 68, 429-434.
- [51] Koo B.C., Kwon M.S., Lee H., Kim M., Kim D., Roh J.Y., Park Y., Cui X., Kim N., Byun S.J., Kim T., 2010: Terracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res.*, 19, 437-447.
- [52] Kress C., Montillet G., Jean C., Fuet A., Pain B. 2016: Chicken embryonic stem cells and primordial germ cells display different heterochromatic histone marks than their mammalian counterparts. *Epigenet. Chromatin* 9, e5.
- [53] Kuwana T., Hashimoto K., Nakanishi A., Yasuda Y., Tajima A., Naito M., 1996: Long-term culture of avian embryonic cells in vitro. *Int. J. Dev.Biol.*, 40(5), 1061-1064.
- [54] Kwon M.S., Koo B.C., Choi B.R., Park Y., Lee Y.M., Suh H.S., Park Y.S., Lee H.T., Kim J., Roh J.Y., Kim T., 2008: Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte- colony stimulating factor. *Mol.Reprod. Dev.*, 75, 1120-1126.
- [55] Lake P.E., 1966: A cytochemical examination of the spermatozoon of the domestic fowl. *Res. Vet. Sci.*, 7, 121-127.
- [56] Lake. P.E., 1954: The relationship between morphology and function in fowl spermatozoa. *World`s Poultry Congr.*, Edinburg, Scotland, 79-85.
- [57] Lasiene K., Gedrimas V., Vitkus A., Glinskyte S., Lasys V., Valanciute A., Sienkiewicz W. 2013: Evaluation of morphological criteria of sperm quality before in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Pol. J. Vet. Sci.*, 16, 4, 773-785.
- [58] Le Dourian N.M., 1973: A biological cell labelling technique and its use in experimental embryology. *Develop. Biology.*, 30, 217-222.

- [59] Lee S.H., Gupta M.K., Han S.Y., Uhm S.J., Kim T., Lee H.T., 2007: Development of transgenic chickens expressing human parathormone under the control of a ubiquitous promotor by using a retrowirus vector system I. *Poult. Sci.*, 86, 2221-2227.
- [60] Li J., Lu L., 2010: Recent progress on technologies and applications of transgenic poultry. *Afr. J. Biotech.*, 9(24), 3481-3488.
- [61] Lillico S.G., Sherman A., McGrew M.J., Robertson C.D., Smith J., Haslam C., et al, 2007: Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104; 1771-1776.
- [62] Łakota P., 2001: Czynniki wpływające na przeżywalność i stopień chimeryzacji embrionów kurzych po iniekcji komórek blastodermalnych i pierwotnych komórek płciowych. Dysertacja doktorska, OBD IŻ Zakrzewo k. Poznania.
- [63] Łukaszewicz E., 2001: Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. *Theriogenology*, 55, 1819-1829.
- [64] Łukaszewicz E., Lason M., Kowalczyk A., Bednarczyk M., 2018: Secondary sexual traits and semen characteristic of chicken germline chimeras. *Reproduction in Domestic Animals*, 1-5.
- [65] Macdonald J., Taylor L., Sherman A., Kawakami K., Takahashi Y., Sang H.M., McGrew M.J., 2012: Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyback and To12 transposons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 109, E1466-E1472.
- [66] Maeda T., Yamakawa Y., Masuda K., Terada T., 1997: Distribution of blastodermal cells transferred to chick embryos for chimera production using windowed eggs. *Br. Poultry Sci.*, 38, 241-244.
- [67] Maree L., du Plessis S.S., Menkveld R., Van der Horst G. 2010: Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Hum. Reprod.*, (Oxford, England), 25, 1369-1382.
- [68] Marzullo G., 1970: Production of chick chimaeras. *Nature, Lond*, 225, 72-73.
- [69] McGary S., Estevez I., Bakst M.R.&, Pollock D.L., 2002: Phenotypic traits as reliable indicators of fertility in male broiler breeders. *Poultry Science*. 81, 102-111.
- [70] Mohan J., Singh R.P., Sastry K.V.H., Moudgal R.P., Biswas A., Shit N., 2011: Influence of chicken native breeds on some physical and biochemical characteristics and short-term storage of semen. *British Poultry Science*, 52, 395-400.
- [71] Moller A.P.&, Erritzoe J., 1988: Badge, body and testes size in House Sparrows *Passer domesticus*. *Ornis Scandinavica*, 19, 72-73.
- [72] Moller A.P.&, Pomiankowski A., 1993: Why have birds got multiple sexual ornaments. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32, 167-176.
- [73] Moller A.P., 1990: Fluctuating asymmetry in male sexual ornaments may reliably reveal male quality. *Animal Behaviour*, 40, 1185-1187.

- [74] Morales P., Overstreet J.W., Katz D.F. 1988: Changes in human sperm motion during capacitation in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 83, 119-128.
- [75] Motono M., Yamada Y., Hattori Y., Nakagawa R., Nishijima K., Iijima S., 2010: Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *J. Biosci. Bioeng.*, 109(4), 315-321.
- [76] Mozdziak P.E., Petite J.N., 2004: Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev Dyn*, 229(3), 414- 21.
- [77] Naito M., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Kagami H., Sakurai M., Kuwana T., 2000: Differentiation of primordial germ cells isolated from embryonic blood into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimeric chickens. *Brit. Poultry Sci.*, 41, Supplement, 29-30.
- [78] Naito M., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Kagami H., Sakurai M., Kuwana T., 1999: Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, 291-298.
- [79] Naito M., Nirasawa K., Oishi T., 1992: Preservation of quail blastoderm cells in liquid nitrogen. *Br Poult Sci*, 33(2), 449-53.
- [80] Naito M., Sakurai M., Kuwana T., 1998: Expression of exogenous DNA in the gonads of chimaeric chicken embryos produced by transfer of primordial germ cell transfected in vitro and subsequent fate of the introduced DNA *J. Reprod. Fert.*, 113(1), 137-43.
- [81] Naito M., Sasaki E., Ohtaki M., Sakurai M., 1994a: Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection into the germinal disc of fertilized ovum. *Mol. Reprod. Dev.*, 37, 167-171.
- [82] Naito M., Tajima A., Yasuda Y., Kuwana T. 1994b: Production of germline chimeric chickens with high transmissions rate of donor-derived gametes, procedure by transfer of primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 39, 153-161.
- [83] Naito M., Tajima A., Yasuda Y., Samurai M., Kuwana T., 1995: Manipulation and preservation of chick primordial germ cells. *Proc. 11 Intre. Symposium „Current problems in avian genetics”, Balice*, 6-9.
- [84] Naito M., Watanabe W., Kinutani M., Nirasawa K., Oishi T., 1991: Production of quailchick chimaeras by blastoderm cel transfer. *Brit. Poultry Sci.* 32 79-86.
- [85] Nakamura Y., 2016: Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Development*, 62, 431-437.
- [86] Navara K.J., Anderson E.M.&., Edwards M.L., 2012: Comb size and color relate to sperm quality: A test of the phenotype-linked fertility hypothesis. *Behavioral Ecology*, 23, 1036-1041.
- [87] Nishijima K., Lijima S., 2013: Transgenic chickens. *Develop. Growth Differ*, 55, 207-216.

- [88] Ogawa A., Murata K., and Mizuno S., 1998: The location of Z- and W- linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:4415-4418.
- [89] Ono T., Mastsumoto T., Arisawa Y., 1998: Production of donor-derived offspring by transfer of primordial germ cells in Japanese quail. *Exp. Anim.*, 47, 215-219.
- [90] Ono T., Muto S., Matsumoto T., Yoshida M., 1995: Production of quail chimeras by transfer of early blastodermal cells: Plumage chimeras and a germline chimera without plumage mixture. *J. Poultry Sci.* 32(4), 252-256.
- [91] Oral E., Yetis O., Elibol F., Senol H., Irez T., Aksu F.M. 2002: Assessment of human sperm morphology by strict criteria: comparison of wet preparation versus stained with the modified Diff-Quik method. *Arch. Androl.*, 48, 307-314.
- [92] Pardanand L., Buck C., Dieterlen-Lievre F., 1987: Early germ cell segregation and distribution in quail blastodisc. *Cell Differ.*, 22, 47-60.
- [93] Park T.S., Han J.Y., 2012a: Genetic modification of chicken germ cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1271, 104-109.
- [94] Petite J., Clark M.E., Liu G., Verrinder Gibbins A.M., Etches R.J., 1990: Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*, 108, 185-189.
- [95] Petite J., Liu G., Yang Z., 2004: Avian pluripotent stem cells. *Mechanisms Dev.*, 121, 1159-1168.
- [96] Petite J.N., Brazolot C.L., Clark M.E., Liu G., Gibbins A.M.V., Etches R.J., 1993: Accessing the genome of the chicken using germline Chimeras. Pages 81-101 in: *Manipulation of the Avian Genome*. R.J. Etches and A.M. Verrinder Gibbins, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [97] Pitcher T.E., Dunn P.O. &, Whittingham L.A., 2005: Sperm competition and the evolution of testes size in birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 557-567.
- [98] Pizzari T., Jensen P., Cornwallis C.K., 2004: A novel test of the phenotype-linked fertility hypothesis reveals independent components of fertility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271, 51-58.
- [99] Pokorný P., 1999: Uzyskiwanie chimer kurzych w wyniku mikroiniekcji komórek blastodermalnych po ich uprzednim poddaniu kriokonserwacji. Praca doktorska, AR Wrocław.
- [100] Prieto M.T., Campo J.L., Santiago-Moreno J., 2011: Relationship among fluctuating asymmetry, morphological traits, and sperm quality in layers. *Poultry Science*, 90, 2845-2854.
- [101] Rapp J.C., Harvey A.J., Speksnijder G.L., Hu W., Ivarie R., 2003: Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res*, 12, 569-575.

- [102] Rashidi H., Sottile V., 2009: The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. *BioEssays* 31, 459-465.
- [103] Reedy S.E., Leibo S.P, Clark M.E., and Etches R.J., 1995: Beyond freezing. *Proceedings of the First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*, Poultry Science Association, Savoy, IL, 251-261.
- [104] Rui R., Shim H., Moyer A.L., Anderson D.L., Penedo C.T., Rowe J.D., Bon Durant R.H., Anderson G.B., 2004: Attempts to enhance production of porcine chimeras from germ cells and preimplantation embryos. *Theriogenology*, 61, 1225-1235.
- [105] San H.M., 2009: Genetic modification of the chicken: new technologies with potential applications in poultry production. *Genetic modification and poultry production. Biology of breeding poultry*, Hocking P.M. (red.). CAB International.
- [106] Sang H., 2003: Genetically modified livestock and poultry and their potential effects on human health and nutrition. *Trends Food Sci. Tech*, 14, 253-263.
- [107] Sano A., Harumi T., Hanzawa S., Kawashima T., Nakamichi H., 2004: New screening test for male germline chimeric chickens using SNP (single nucleotide polymorphism) detection primers. *Proceedings of World's Poultry Congress, G5 Istanbul*.
- [108] Santiago-Moreno J., Esteso M.C., Villaverde-Morcillo S. Toledano-Diaz A., Castaño C., Velázquez R., Lopez-Sebastian A., López Goya A., Gimeno Martínez J., 2016: Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian J Andro* 18, 882–888.
- [109] Sechman A., Łakota P., Wojtysiak D., Hrabia A., Mika M., Lisowski M., Bednarczyk M., 2006: Sex steroids level in blood plasma and ovarian follicles of the chicken. *Journal of Veterinary Medicine A*, 53, 501-508.
- [110] Shanmugam M., Kannaki T.R.&, Vinoth A., 2016: Comparison of semen variables, sperm DNA damage and sperm membrane proteins in two male layer breeder lines. *Animal Reproduction Science*, 172, 131-136.
- [111] Shanmugam M., Rajkumar U., Reddy M.R.&, Rao S.V.R., 2013: Semen quality in white leghorn chicken selected for egg production traits. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37, 747-749.
- [112] Shin S.S., Kim T.M., Kim S.Y., Kim T.W., Seo H.W., Lee S.K., Kwon S.C., Lee G.S., Kim H., Lim J.M., Han J.Y., 2008: Generation of transgenic quail through germ cell-mediated germline transmission.
- [113] Simkiss K., 1991: Primordial germ cells and scope for genetic manipulation using embryos. In Tullet S.G. (ed) *Avian incubation*, London, 125-138.

- [114] Simkiss K., Luke G., Behnam J., 1996: Female chromosomes in cockerel ejaculates. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 263:1245-1249.
- [115] Singh S., Sharma S., Jain M., Chauhan R. 2011: Importance of Papanicolaou Staining for Sperm Morphologic Analysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 136, 247-251.
- [116] Siudzińska A.&., Łukaszewicz E., 2008: Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *Journal of Applied Poultry Research*, 17, 101-108.
- [117] Siwek M., Sławińska A., Łakota P., Grajewski B., Wawrzyńska M., Wiśniewska E., Bednarczyk M., 2010: Identification of the rate of chimerism of different tissues with microsatellite markers in chicken chimeras. *Folia Biologica (Kraków)*, 58, 257-263.
- [118] Siwek M., Wragg D., Sławińska A., Malek M., Hanotte O., Mwacharo J.M., 2013: Insights into the genetic history of Green-legged Partridge-like fowl: mtDNA and genome wide SNP analysis. *Anim Genet*, 44, 522-32.
- [119] Sławińska A., Siwek M., 2010: Kura (*gallus gallus*) najnowsze osiągnięcia z zakresu genomiki. *BioTechnologia*, 90, 36-46.
- [120] Sławińska A., Siwek M., 2013: Meta-and combined-QTL analysis of different experiments on immune traits in chickens *J.Appl Genet*, 54, 483-487.
- [121] Soh T., Inoue Y., Xi Y-M., Kato Y., Hattori M-A., 2002: Utilization of central disk of blastoderm and germinal crescent region of production of interspecific germline chimera between chicken and quail. *Asian J. Androl*, 4, 83-86.
- [122] Sokół-Misiak W., Rogulska T., 1995: Early developmental anomalies in chicken embryos without and after introduction of LacZ gene driven by tissue unspecific and specific regulatory sequences. *Proc. 11 Inter. Symposium „Current problems in avian genetics”*, Balice, 46-47.
- [123] Speksnijder G., Ivarie R., 2000: A modified method of shell windowing for producing somatic or germline chimeras in fertilized chicken eggs. *Poultry Sci*, 79, 1430-1433.
- [124] Szumowski P., Theret M., Denis B., 1976: Semen and artificial insemination of pigeons. 8th Inter Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem, Poland. Kraków, 1086-1089.
- [125] Tagami T., Kagami H., 1998: Developmental origin of avian primordial germ cells and its unique differentiation in the gonads of mixed-sex chimeras. *Molecular Reproduction and Development*, 50, 370-376.
- [126] Tagami T., Matsubara Y., Hanada H., Naito M., 1997: Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Dev Growth Differ*, 39(3), 267-71.
- [127] Tajima A. 2002: Production of germ-line chimeras and their application in domestic chicken. *Av Poult Biol Rev*, 13 (1), 15-30.

- [128] Tajima A., Naito A.M., Yasuda Y.&., Kuwana T., 1993: Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology*, 40, 509-519.
- [129] Tasdemir I., Tasdemir M., Tavukcuoglu S., Kahraman S., Biberoglu K. 2002: Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum. Reprod.*, 12, 1214-1217.
- [130] Thoraval P., Lasserre L., Coudert F., Dambrine G., 1994: Production of germline chimeras obtained from Brown and White Leghorns by transfer of early blastodermal cells. *Poultry Sci*, 73, 1897-1905.
- [131] Trefil P., Bruno M., Kotrbova A., 2000: The fate of female blastodermal donor cells in chimeric cockerels. XXI World's Poultry Congress, Montreal, Abstracts & Proceedings W11.08.
- [132] Trefil P., Bruno M., Miskus T., Thoroval P., 1999: Sexing of chicken feather follicle, blastodermal and blood cells. *Folia Biol. (Praha)*, 45, 253-256.
- [133] Tyack S.G., Jenkins K.A., O Neil T.E., Wise T.G., Morris K.R., Bruce M.P., McLeod S., Wade A.J., McKay J., Moore R.J., Schat K.A., Lowenthal J.W., Doran T.J., 2013: A new method for.
- [134] Urven L.E., Erickson C.A., Abbott U.K., McCarrey J.R., 1988: Analyses of germline development in the chick embryo using an antimouse EC cell antibody. *Development*, 103, 299-304.
- [135] Van de Lavoie M.C., Diamond J.H., Leighton P.A., Mather-Love C., Heyer B.S., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L.T., Gessaro T.M., Swanberg S.E., Delany M.E., Etches R.J., 2006: Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 441, 766-769.
- [136] Varkonyi E., Hidas A., Szalay I., 1997: Manipulacje komórkami embrionalnymi drobiu. *Zeszyty Naukowe PTZ*, 31, 240-241.
- [137] Vick L., Luke G., Simkiss K., 1993: Germ line chimeras can produce both strains of fowl with high efficiency after partial sterilization. *J. Reprod. Fert*, 98, 637-641.
- [138] Watanabe M., Kinutami M., Naito m., Ochi O., Takaschima Y., 1992: Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development*, 114, 331-338.
- [139] Weeke-Klimp A., Bax NA., Bellu AR., Winter EM., Vrolijk J., Plantinga J., Maas S., Brinker M., Mahtab EA., Gittenberger-de Groot AC., van Luyn MJ., Harmsen MC., Lie-Venema H. 2010: Epicardium-derived cells enhance proliferation, cellular maturation and alignment of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 49(4): 606-616.
- [140] Wentworth B.C., Tsai H., Hallett J.H., Gonzales D.S., Rajcic-Spasojewic G., 1989: Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. *Poultry Sci.*, 68, 999-1010.
- [141] Wernery U., Liu C., Baskar V., Guerineche Z., Khazanehdari K. A., Saleem S., Kinne J., Wernery R., Griffin D. K., Chang I. K. 2010: Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable

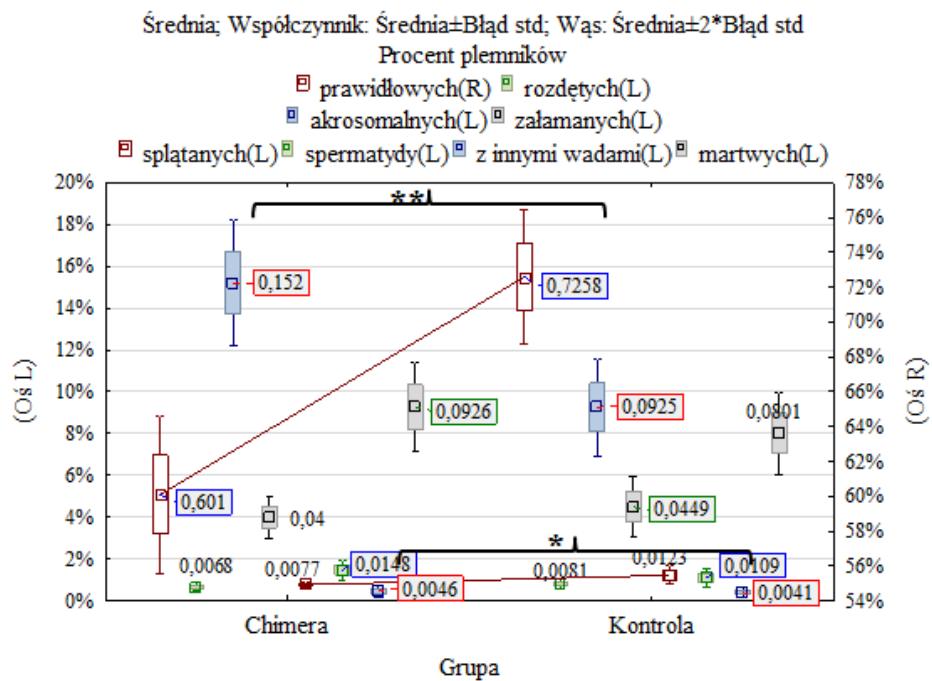
- pure-line Houbara bustard offspring: potential for repopulating an endangered species. PLoS ONE 5, 15824.
- [142] Woodard A.E., Ogasawara R.L., Snyder R.L., Stinnett V., 1975: Effect of forced molting on quantity and quality of semen in turkey breeder males as influenced by diet. Poultry Sci, 54, 2094-2101.
- [143] Yániz J.L., Soler C., Santolaria P., 2015: Computer assisted sperm morphometry in mammals a review. Anim Reprod Sci., 156, 1-12.
- [144] Yasuda Y., Tajima A., Fujimoto T., Kuwana T., 1992: A method to obtain avian germ-line chimeras using isolated primordial germ cells. Journal Reprod. Fert., 96, 521-528.
- [145] Zuk M., Johnsen T.S., Maclarty T., 1995: Endocrine-immune interactions, ornaments and mate choice in red jungle fowl. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 260, 205-210.
- [146] Zuk M., Thornhill R., Ligon J.D., Johnson K., Austad S., Ligon S.H.&., Costin C., 1990: The role of male ornaments and courtship behavior in female mate choice of red jungle fowl. The American Naturalist, 136, 459-473.

9. ANEKSY

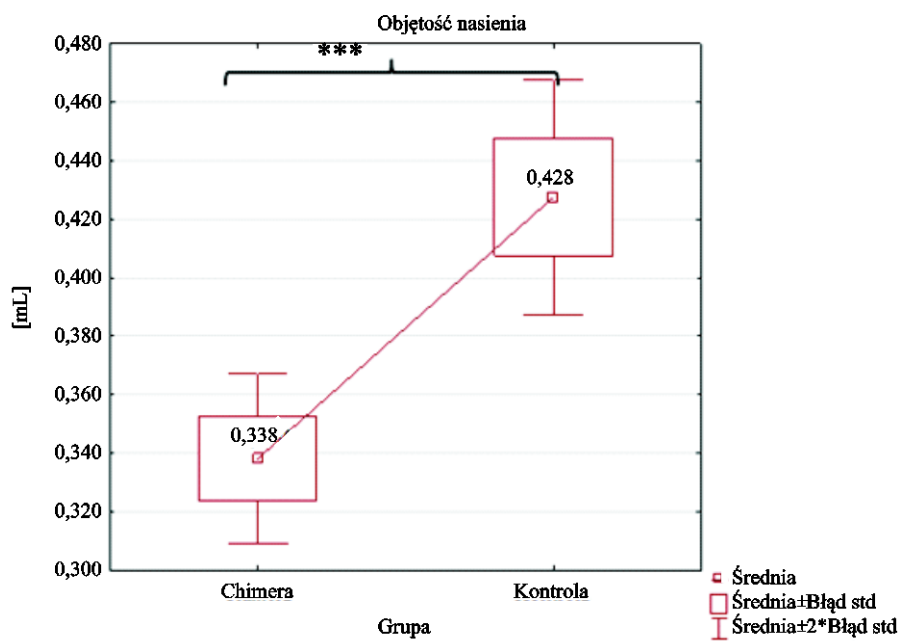
9.1. Ryciny

9.1.1. Koguty

Ryc. 1. Wpływ chimeryzmu na procent plemników normalnych ($\bar{x} \pm SD$) oraz plemników wadliwych ($\bar{x} \pm SD$).

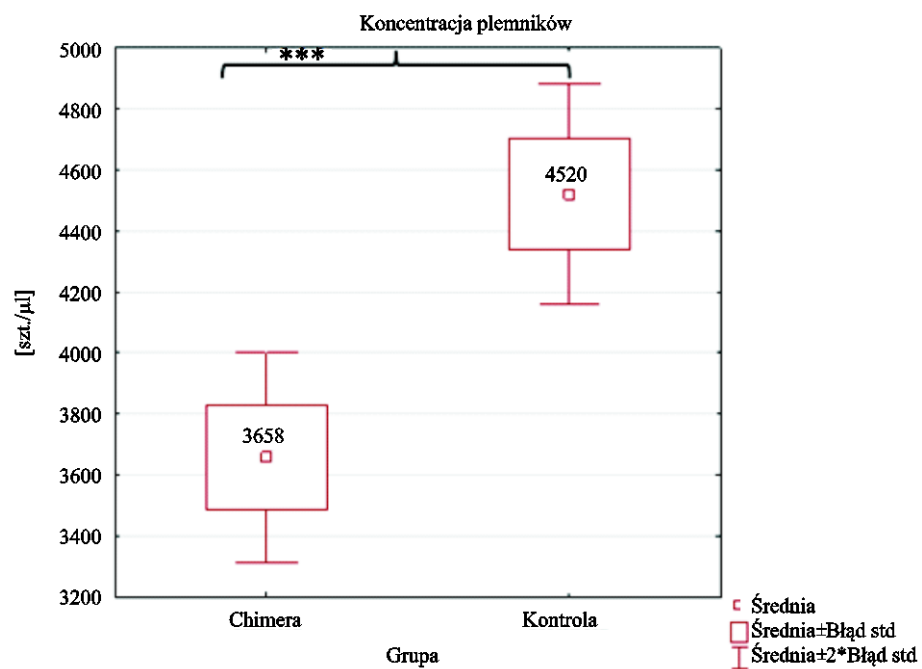


Ryc. 2. Wpływ chimeryzmu na objętość nasienia kogutów



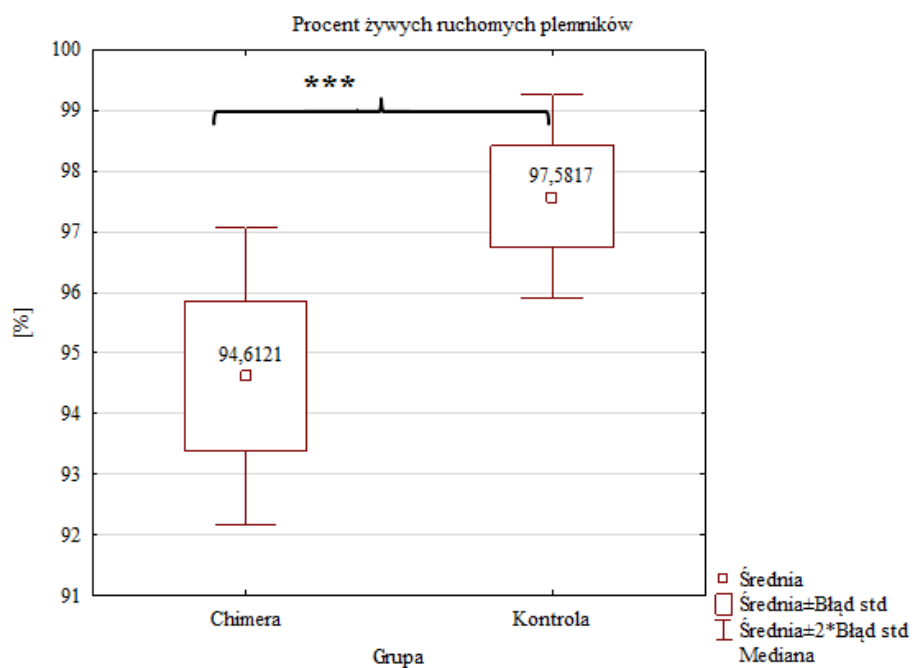
Średnie różnią się istotnie*** $P < 0,005$

Ryc. 3. Wpływ chimeryzmu na koncentrację plemników kogotów



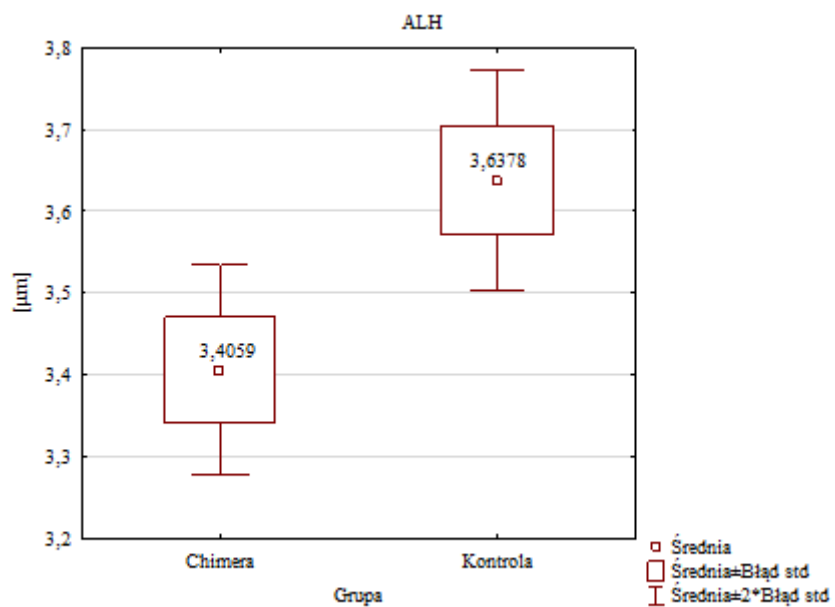
Średnie różnią się istotnie*** $P < 0,001$

Ryc. 4. Wpływ chimeryzmu na procent żywych ruchomych plemników



Średnie różnią się istotnie***P<0,005

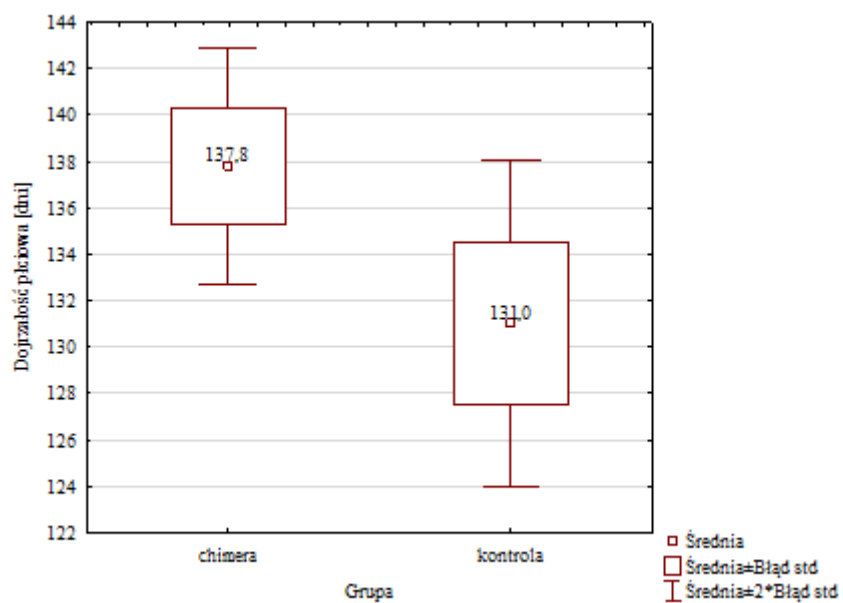
Ryc. 5. Wpływ chimeryzmu na objętość ALH (amplituda linearności ruchu główki)



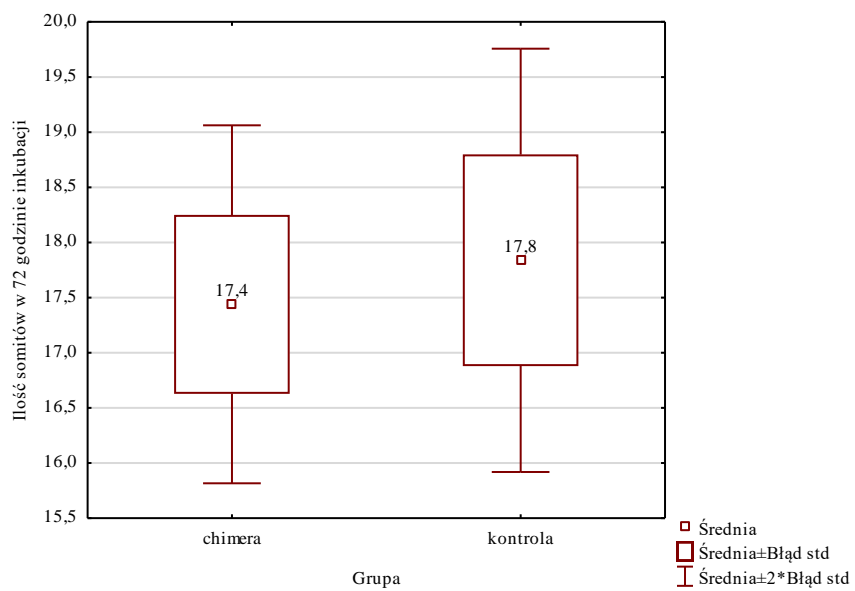
Średnia różni się istotnie** $P < 0,01$

9.1.2. Kury

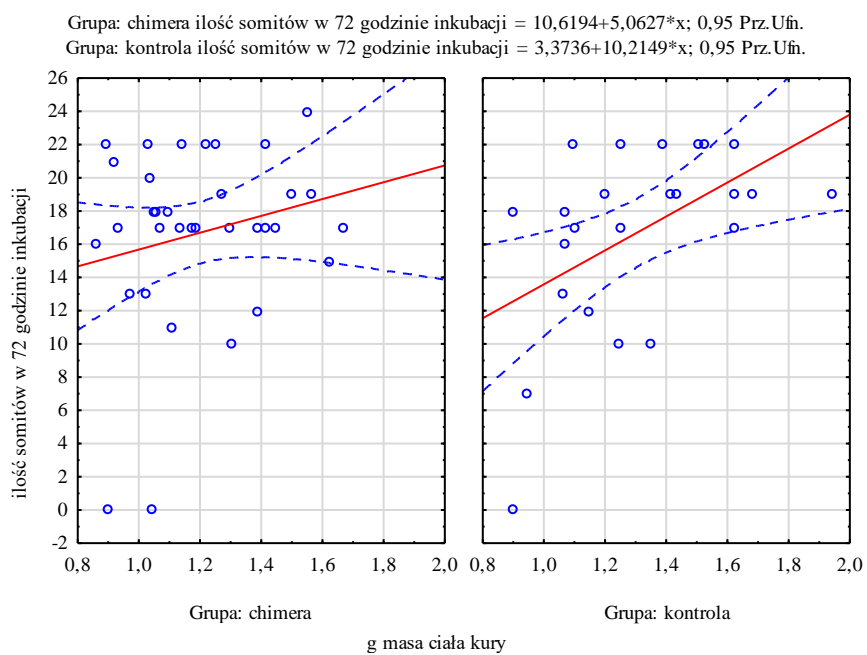
Ryc. 6. Wpływ chimeryzmu na dojrzałość płciową kur



Ryc. 7 Wpływ chimeryzmu na liczbę somitów w 72 godzinie inkubacji



Ryc. 8. Liczba somitów w 72 godzinie inkubacji, w zależności od masy ciała nioski



9.2. Tabele

9.2.1. Koguty

Tabela 1. Wpływ chimeryzmu na dojrzałość płciową kogutów i podstawowe parametry nasienia

Cecha	Chimera			Kontrola			Wynik testu	Wartość P
	\bar{x}	SD	Me	\bar{x}	SD	Me		
Dojrzałość płciowa /dni/	127,4	13,7	120,0	123,4	13,3	118,0	0,586	0,558
Objętość nasienia /mL/	0,338	0,179	0,325	0,428	0,188	0,450	-3,615	0,000
Koncentracja plemników szt. / μ l	3658	2121	3480	4520	1696	4547	-3,624	0,000
Żywych normalnych plemników %	94,6	15,1	98,6	97,6	7,9	99,1	-2,885	0,004

Tabela 2. Wpływ chimeryzmu na procent plemników o różnej morfologii

Procent plemników	Chimera	Kontrola	Wynik testu	Wartość p
-------------------	---------	----------	-------------	-----------

	\bar{x}	SD	Me	\bar{x}	SD	Me		
Prawidłowych	60,10%	27,90%	68,20%	72,60%	18,00%	78,50%	-3,023	0,003
Rozdętych	0,70%	1,10%	0,30%	0,80%	1,10%	0,30%	-1,084	0,278
Akrosomalnych	15,20%	18,60%	5,80%	9,30%	10,90%	5,80%	1,189	0,235
Załamanych	4,00%	6,20%	1,20%	4,50%	6,90%	1,70%	-0,865	0,387
Splątanych	0,80%	0,90%	0,70%	1,20%	2,10%	0,70%	-2,090	0,037
Spermatydy	1,50%	2,90%	0,30%	1,10%	1,90%	0,30%	0,300	0,764
Plemników z innymi wadami	0,50%	1,80%	0,00%	0,40%	1,00%	0,00%	-0,231	0,817
Martwych	9,30%	13,20%	3,70%	8,00%	9,20%	5,00%	-1,004	0,315

Tabela 3. Wpływ chimeryzmu na ruchliwość plemników SCA (sperm class analyzer)

Cecha	Chimera			Kontrola			Wynik testu	Wartość p
	\bar{x}	SD	Me	\bar{x}	SD	Me		
VCL	94,9	32,5	96,4	99,1	31,2	94,3	-0,588	0,556
VSL			53,4	53,6	21,8	50,0	0,486	0,627
	72,6	29,2	70,4	73,8	27,6	69,0	-0,178	0,858

VAP								
LIN	55,8	14,3	56,4	52,6	8,9	52,4	2,280	0,023
STR	73,6	13,2	75,6	71,6	6,3	71,1	3,015	0,003
WOB	73,4	13,3	74,6	72,9	7,1	73,3	1,471	0,141
ALH	3,4	0,8	3,5	3,6	0,6	3,6	-2,743	0,006
BSH	8,0	1,7	8,4	8,1	1,1	8,2	1,593	0,111

VCL (krzywa prędkości), VSL (prędkość linearna), VAP (średnia wartość), LIN (indeks liniowości), STR (indeks prostoliniowości), WOB (indeks oscylacji) ALH (Średnia amplituda linearności ruchu główki), BSH (Częstotliwość krzyżowania torów ruchu plemników)

Tabela 4. Wpływ chimeryzmu na wielkość jąder i przydatki głowowe

Parametry	Chimera	Kontrola	Wartość p
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Dojrzałość płciowa		123,4 ± 13,3	0,558
Długość prawego jądra	45,6 ± 5,5	46,3 ± 4,4	0,746

Parametry	Chimera	Kontrola	Wartość p
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Szerokość prawego jądra	24,2 \pm 3,1	25,2 \pm 3,2	0,371
Długość lewego jądra	43,7 \pm 4,6	44,0 \pm 4,3	0,931
Szerokość lewego jądra	23,6 \pm 2,9	23,8 \pm 2,4	0,860
Masa prawego jądra	11,4 \pm 3,2	12,2 \pm 2,7	0,492
Masa lewego jądra	10,9 \pm 3,1	10,8 \pm 1,5	0,464
Długość grzebienia	125,5 \pm 11,0	129,1 \pm 9,4	0,376
Szerokość grzebienia	65,1 \pm 6,6	67,2 \pm 7,9	0,435
Długość dzwonka prawego	61,5 \pm 6,8	64,7 \pm 7,1	0,229
Szerokość dzwonka prawego	48,8 \pm 6,4	50,3 \pm 5,7	0,529
Długość dzwonka lewego	59,2 \pm 8,1	62,3 \pm 6,9	0,293
Szerokość dzwonka lewego	48,2 \pm 6,1	50,4 \pm 4,8	0,325

Tabela 5. Współczynniki korelacji wybranych cech kogutów w grupie chimer

	Objętość nasienia [ml]	Dojrzalosc plciowa	Długość prawego jądra	Szerokość prawego jądra	Długość lewego jądra	Szerokość lewego jądra	Masa prawego jądra	Masa lewego jądra	Długość grzebienia	Szerokość grzebienia	Długość prawego dzwonka	Szerokość prawego dzwonka	Długość lewego dzwonka	Szerokość lewego dzwonka	Koncentracja plemników [ul]	% plemników	Ruch postępowy plemników	VCL (krzywa prędkości)	VSL (średnia wartość)	VAP (średnia wartość)	LN (indeks liniowości)	STR (indeks prostoliniowości)	WOB (indeks oscylacji)	ALH (średnia amplituda linarności nasza głowki)	BSH (częstotliwość krzyżowania torów ruchu plemników)	Odsetek prawidłowych plemników	Odsetek rozdartych plemników	Odsetek akrosomalnych plemników	Odsetek załamanych plemników	Odsetek spleganych plemników	Odsetek spermatozoidów plemników	Odsetek plemników z innymi wadami					
Objętość nasienia [ml]																																					
Dojrzalosc plciowa	-0,307																																				
Długość prawego jądra	-0,030	-0,158																																			
Szerokość prawego jądra	-0,236	-0,358	0,320																																		
Długość lewego jądra	0,212	-0,155	0,717	0,247																																	
Szerokość lewego jądra	0,069	-0,520	0,409	0,409	0,668																																
Masa prawego jądra	-0,237	0,112	0,118	0,402	0,134	-0,073																															
Masa lewego jądra	-0,063	0,379	-0,205	0,063	0,078	-0,201	0,766																														
Długość grzebienia	0,506	-0,303	0,033	-0,067	0,334	0,279	0,062	0,216																													
Szerokość grzebienia	0,470	-0,153	0,170	-0,055	0,566	0,233	0,045	0,333	0,779																												
Długość prawego dzwonka	0,505	-0,324	-0,064	-0,056	0,260	0,339	-0,182	-0,130	0,587	0,534																											
Szerokość prawego dzwonka	0,534	-0,310	-0,061	-0,204	0,231	0,100	-0,060	-0,101	0,673	0,539	0,843																										
Długość lewego dzwonka	0,444	-0,272	0,026	0,008	0,342	0,327	0,099	0,139	0,689	0,588	0,912	0,805																									
Szerokość lewego dzwonka	0,643	-0,481	0,078	-0,073	0,443	0,393	-0,129	-0,076	0,613	0,618	0,868	0,813	0,843																								
Koncentracja plemników [ul]	0,904	-0,470	-0,103	-0,218	0,060	0,052	-0,191	-0,129	0,562	0,433	0,618	0,658	0,512	0,680																							
% plemników	0,426	-0,455	-0,045	0,295	-0,098	0,080	0,083	0,019	0,590	0,205	0,177	0,238	0,236	0,238	0,501																						
Ruch postępowy plemników	-0,117	-0,395	0,113	0,379	-0,244	-0,049	0,014	-0,135	0,083	-0,145	-0,307	-0,255	-0,208	-0,298	-0,058	0,612																					
VCL (krzywa prędkości)	0,148	-0,318	0,184	0,255	-0,081	-0,012	0,124	0,023	0,379	0,062	0,008	0,041	0,170	-0,024	0,232	0,720	0,844																				
VSL (średnia linarności)	-0,195	-0,181	0,182	0,340	-0,137	-0,031	0,165	0,052	0,194	-0,096	-0,207	-0,189	-0,023	-0,260	-0,123	0,575	0,892	0,930																			
VAP (średnia wartość)	-0,029	-0,258	0,186	0,296	-0,122	-0,029	0,139	0,026	0,276	-0,028	-0,104	-0,079	0,069	-0,155	0,051	0,640	0,888	0,981	0,982																		
LN (indeks liniowości)	-0,299	-0,145	0,047	0,427	-0,197	0,007	0,230	0,071	0,150	-0,186	-0,323	-0,268	-0,192	-0,313	-0,242	0,687	0,764	0,665	0,794	0,728																	
STR (indeks prostoliniowości)	-0,058	-0,262	0,006	0,378	-0,149	0,091	0,181	0,040	0,319	-0,083	-0,145	-0,089	-0,036	-0,084	0,006	0,838	0,666	0,643	0,682	0,652	0,948																
WOB (indeks oscylacji)	-0,036	-0,290	0,006	0,371	-0,201	0,032	0,168	0,020	0,328	-0,082	-0,137	-0,073	-0,029	-0,115	0,049	0,862	0,762	0,750	0,776	0,760	0,955	0,982															
ALH (średnia amplituda linarności ruchów głowki)	0,533	-0,445	0,057	0,102	-0,020	0,111	0,045	-0,034	0,622	0,197	0,369	0,406	0,466	0,405	0,648	0,866	0,490	0,794	0,578	0,683	0,457	0,628	0,675														
BSH (częstotliwość krzyżowania torów ruchu plemników)	0,190	-0,205	-0,119	0,153	-0,192	0,118	0,022	0,028	0,543	0,031	0,212	0,167	0,328	0,167	0,262	0,831	0,488	0,676	0,619	0,637	0,675	0,798	0,802	0,825													
Odsetek prawidłowych plemników	0,689	-0,714	0,241	0,164	0,200	0,149	-0,130	-0,353	0,276	0,206	0,280	0,429	0,204	0,534	0,701	0,535	0,266	0,284	0,040	0,163	0,033	0,206	0,233	0,519	0,142												
Odsetek rozdartych plemników	0,134	-0,422	0,161	0,045	0,277	0,420	-0,457	-0,305	0,237	0,303	-0,047	-0,074	-0,131	0,137	0,083	0,245	0,331	0,128	0,130	0,120	0,140	0,185	0,162	0,115	0,145	0,282											
Odsetek akrosomalnych plemników	-0,011	-0,478	0,120	0,479	0,081	0,378	0,091	-0,190	-0,169	-0,247	-0,173	-0,205	-0,157	-0,035	-0,021	0,140	0,116	-0,084	-0,088	-0,093	0,086	0,152	0,107	0,024	0,033	0,239	0,257										
Odsetek załamanych plemników	0,169	-0,530	-0,150	0,191	0,141	0,566	-0,438	-0,336	0,165	0,092	0,268	0,092	0,194	0,295	0,145	0,215	0,292	0,191	0,154	0,171	0,088	0,158	0,140	0,221	0,208	0,228	0,608	0,237									
Odsetek spleganych plemników	0,339	-0,553	0,221	0,144	0,136	0,382	-0,225	-0,261	0,034	-0,015	-0,160	-0,238	-0,240	0,021	0,369	0,314	0,307	0,249	0,134	0,192	0,042	0,126	0,151	0,323	0,143	0,450	0,607	0,510	0,314								
Odsetek spermatozoidów plemników	0,037	-0,228	0,124	0,545	-0,078	0,048	0,179	-0,036	-0,219	-0,286	-0,240	-0,285	-0,134	-0,149	-0,051	0,181	0,218	0,096	0,093	0,094	0,101	0,125	0,122	0,117	0,141	0,194	0,003	0,785	0,009	0,349							
Odsetek plemników z innymi wadami	0,409	-0,191	-0,273	-0,084	-0,021	0,191	-0,505	-0,297	0,235	0,185	0,339	0,226	0,187	0,323	0,383	0,191	-0,082	-0,070	-0,211	-0,158	-0,203	-0,025	-0,079	0,207	0,189	0,192	0,439	0,140	0,651	0,182	0,044						
Odsetek martwych plemników	0,540	-0,378	-0,257	-0,027	-0,156	-0,040	-0,197	-0,368	0,114	-0,062	0,434	0,528	0,217	0,396	0,670	0,302	-0,074	0,029	-0,202	-0,088	-0,158	0,016	0,031	0,345	0,056	0,609	-0,140	-0,002	0,231	0,055	-0,109	0,455					

Ta strona będzie składaną wklejką!

9.2.2.Kury

Tabela 7. Wpływ chimeryzmu na wybrane cechy kur

Procent	Chimera			Kontrola			Wynik testu	Wartość p
	\bar{x}	SD	Me	\bar{x}	SD	Me		
Masa ciała /g/	1,3	0,3	1,245	1,3	0,3	1,25	-0,280	0,780
Wiek osiągnięcia dojrzałości płciowej /dni/	137,8	9,5	139	131,0	9,3	126	1,237	0,216
Masa jaja /g/	54,4	5,9	53,15	55,1	6,3	54,6	-0,972	0,331
liczba somitów /szt./	17,4	5,2	18	17,8	5,3	19	-0,826	0,409

71

Tabela 8. Wpływ chimeryzmu na wyniki lęgu

Grupa	Nalóżor	one jaja	Zamarłe zarodki	Wylężone pisklęta
-------	---------	----------	-----------------	-------------------

Chimera	N	81	71	31	40
	%	100	87,7	38,3	49,4
Kontrola	N	45	42	12	30
	%	100	93,3	26,7	66,7
Wartość p		0,500	0,392	0,237	0,074

Tabela 9. Wpływ chimeryzmu u kur na zmarłe zarodki w I, II, III stadium

Grupa			Zmarłe I stadium zarodki	Zmarłe II stadium zarodki	Zmarłe III stadium zarodki
Chimera	N	31	23	2	6
	%	38,3%	74,2%	6,5%	19,4%

Kontrola	N	12	10	2	0
	%	26,7%	83,3%	16,7%	0%
Wartość p		0,2371	0,2833	0,3747	0,03

Tabela 10. Współczynniki korelacji wybranych cech kur w grupie chimer

Zmienna	Tydzień życia	Masa ciała kury [g]	Dojrzałość płciowa [dni]	Masa jaja [g]	Ilość somitów w 72 godzinie inkubacji	Ilość jaj inkubowanych w 72 h	Zapłodnione jaja	Zamarte zarodki	Ilość zamartych jaj w 1 stadium	Ilość zamartych jaj w 2 stadium	Ilość zamartych jaj w 3 stadium	Rozlane jaja
Tydzień życia												
Masa ciała kury [g]	0,908											
Dojrzałość płciowa [dni]		-0,361										
Masa jaja [g]	0,092	0,183	0,055									
Ilość somitów w 72 godzinie inkubacji	0,108	0,118	0,127	-0,031								
Ilość jaj inkubowanych w 72 h		0,324	-0,268	0,604	0,1							
Zapłodnione jaja		0,196	-0,541	-0,033	0,047	0,465						
Zamarte zarodki		-0,11	0,481	0,436	0,284	0,294	-0,616					
Ilość zamartych jaj w 1 stadium		-0,084	0,571	0,346	0,24	0,126	-0,572	0,894				
Ilość zamartych jaj w 2 stadium		-0,152	-0,153	-0,101	0,408	-0,156	0	-0,052	-0,261			
Ilość zamartych jaj w 3 stadium		-0,013	0,252	0,393	-0,11	0,279	-0,458	0,458	0,131	0,09		
Rozlane jaja		0,122	-0,26	0,663	-0,008	0,452	-0,013	0,252	-0,008	0,09	0,48	
Komórki blastodermalne	-0,133	-0,072	0,115	0,181	0,063	0,134	-0,092	0,243	0,19	0,103	0,163	0,078

Tabela 11. Współczynniki korelacji wybranych cech kur w grupie kontrolnej

Zmienna	Tydzień życia	Masa ciała kury [g]	Dojrzałość płciowa [dni]	Masa jaja [g]	Ilość somitów w 72 godzinie inkubacji	Ilość jaj inkubowanych w 72h	Zapłodnione jaja	Zamarłe zarodki	Ilość zamarłych jaj w 1 stadium	Ilość zamarłych jaj w 2 stadium	Ilość zamarłych jaj w 3 stadium	Rozlane jaja
Tydzień życia												
Masa ciała kury [g]	0,842											
Dojrzałość płciowa [dni]		-127										
Masa jaja [g]	0,273	0,482	-0,685									
Ilość somitów w 72 godzinie inkubacji	0,585	0,553	-0,573	0,203								
Ilość jaj inkubowanych w 72 h		-0,448	0,253	-0,231	-0,37							
Zapłodnione jaja		0,355	-0,037	0,074	0,224	0,12						
Zamarłe zarodki		-0,472	-0,123	0,056	-0,047	0,344	-0,796					
Ilość zamarłych jaj w 1 stadium		-0,472	-0,123	0,056	-0,047	0,344	-0,796	1				
Ilość zamarłych jaj w 2 stadium		-0,515	0,618	-0,612	-0,618	0,441	-0,635	0,642				
Ilość zamarłych jaj w 3 stadium												
Rozlane jaja		0,319	-0,16	0,316	-0,479	0,171	0,164	-0,249	-0,249	-0,258		
Komórki blastodermalne	-0,067	-0,035	0,482	0,114	-0,052	-0,496	-0,571	0,135	0,135	0,525	-0,325	

Tabela 12. Wartości cech chimer w porównaniu do grupy kontrolnej

Lp.	Cecha	Grupa			
		Chimera		Kontrola	
		♂	♀	♂	♀
1	Objętość nasienia	✓		↗	
2	Koncentracja plemników	✓		↗	
3	% plemników ruchliwych	✓		↗	
4	Dojrzałość płciowa	0		0	
5	STR (indeks prostoliniowości)	↗		✓	
6	WOB (indeks oscylacji)	0		0	
7	LIN (indeks liniowości)	↗		✓	
8	VAP (średnia wartość)	0		0	
9	VSL (prędkość linearna)	0		0	
10	VCL (krzywa prędkości)	0		0	
11	ALH (amplituda linearności ruchu główki)	✓		↗	
12	BSH (Częstotliwość krzyżowania ruchu plemników)	0		0	
13	Prawidłowe plemniki	✓		↗	
14	Rozdęte plemniki	0		0	
15	Akrosomalne plemniki	0		0	
16	Załamane plemniki	0		0	
17	Splątane plemniki	✓		↗	
18	Spermatydy	0		0	
19	Plemniki z innymi wadami	0		0	
20	Martwe plemniki	0		0	
21	Długość jądra prawego	0		0	

cd. tabeli 12

22	Szerokość jądra prawego	0		0	
23	Długość jądra lewego	0		0	
24	Szerokość jądra lewego	0		0	
25	Masa jądra prawego	0		0	
26	Masa jądra lewego	0		0	
27	Długość grzebienia	0		0	
28	Szerokość grzebienia	0		0	
29	Długość dzwonka prawego	0		0	
30	Szerokość dzwonka prawego	0		0	
31	Długość dzwonka lewego	0		0	
32	Szerokość dzwonka lewego	0		0	
33	Masa ciała kury		0		0
34	Wiek dojrzałości płciowej		0		0
35	Masa jaj		0		0
36	Zapłodnienie		0		0
37	Zamarłe zarodki		0		0
38	Zamarłe zarodki w I stadium		0		0
39	Zamarłe zarodki w II stadium		0		0
40	Zamarłe zarodki w III stadium		↗		✓
41	Wyląg z jaj nałożonych		0		0
42	Liczba komórek blastodermalnych w 24 godz. Inkubacji		0		0
43	Liczba somitów w 72 godz. Inkubacji		0		0

Objaśnienia: ✓wartość cechy chimery statystycznie istotnie mniejsze, ↗- wartość cechy chimery statystycznie istotnie większa, 0-brak wpływu

9.3. Fotografie



Fot. 1. Zdjęcie wychów kurek chimera i kontroli



Fot. 2. Zdjęcie wychów kogutów chimer i kontroli



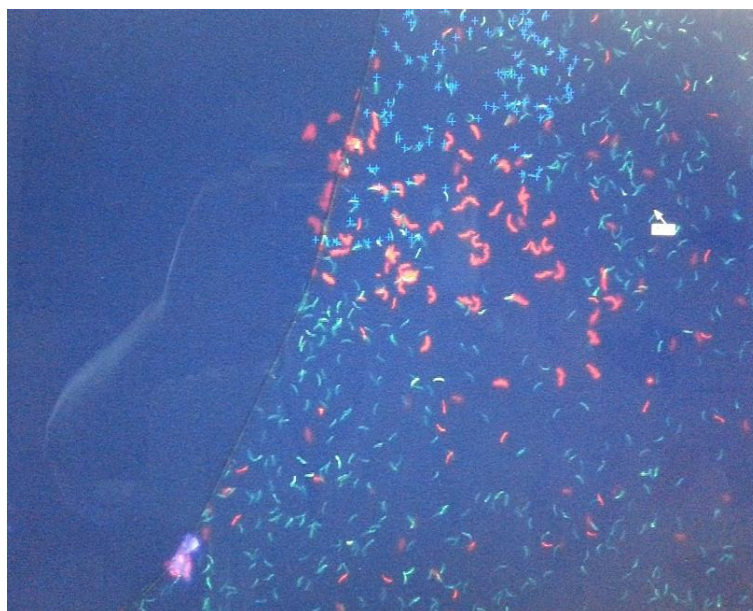
Fot. 3. Zdjęcie utrzymania kur chimer i kontroli



Fot. 4. Zdjęcie kurki chimera



Fot. 5. Zdjęcie utrzymania kogutów chimer i kontroli



Fot. 6. Zdjęcie nasienia kogutów pod mikroskopem



Fot. 7. Zdjęcie zarodka somity



Fot. 8. Zdjęcia kogutów kontroli; nr 3005, 3027



Fot. 9. Zdjęcia kogutów chimer; nr 2022, 1058, 1051



Fot. 10. Zdjęcia grzebienia, dzwonek jąderek kogutów chimer



Fot. 11. Zdjęcia grzebienia, dzwonek, jąderek kogutów chimer



Fot. 12. Zdjęcia grzebienia, dzwonek, jąder kogutów kontroli



Fot. 13. Zdjęcia grzebienia, dzwonek, jąder kogutów kontroli

