

**การอนุรักษ์พันธุกรรมไก่พื้นเมืองโดยการแช่แข็ง Blastodermal Cells
และการสร้าง Germline Chimeras
Native Chicken Genetic Conservation by Blastodermal Cell Cryopreservation
and Germline Chimeras Creation**

บัญชา พงศ์พิศาลธรรม ปิยะอร พงศ์พิศาลธรรม และพยุงค์กดิ์ อินตะวิชา
Buncha Pongpisantham, Piyaorn Pongpisantham and Payungsak Intawicha
คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290
E-mail: bunchap@mju.ac.th

Abstract

Blastodermal cells of Thai native chicken (Pradoo Hangdam) were extracted from zero day old chick embryos by trypsinization technique. Blastodermal cell concentration was optimized for chimeric production before both fresh and frozen blastoderms were injected into 0 day old Rhode Island Red chick embryos. The injected eggs were incubated at 100°F for 21-22 days. The incubated eggs were candled regularly. The embryos that can fully developed and hatched were tested for chimerism later on.

The result of injecting Pradoo Hangdam blastodermal cells into Rhode embryos showed that the hatchabilities of recipient eggs receiving 5000 and 10000 fresh donor blastodermal cells were 3.04% (10/329) and 2.27% (3/127), respectively. Whereas the hatchabilities of recipients receiving 5000 frozen donor blastodermal cells was 2.72% (8/292). The hatched chicks expressed normal Rhode Island Red phenotype. However one chick (B537) was blinded on one eye. Some of chimeric chicks died at early age. Fifteen chimeric chicks survived until mature stage

Testing for germ line chimerism, six healthy survived chimeric chickens were tested by mating with Rhode Island Red chickens. The result showed that three chimeric chickens, B138, B417 and B471 produced some of offspring that have black Thai native chicken feather (1/100, 3/97 and 1/100 of chick tested, respectively).

Keywords: chimeric chicken, germline chimera, native chicken conservation

บทคัดย่อ

ทำการแยกเซลล์ตัวอ่อนของไก่ประดู่หางดำ (ไก่ตัวให้) จากไข่มีเชื้ออายุ 0 วัน ด้วยวิธี Typsinization และทดสอบความเข้มข้นของเซลล์ตัวอ่อนตัวให้ที่เหมาะสมเพื่อฉีดให้แก่ตัวอ่อนตัวรับในการผลิต chimeric chicken จากนั้นใช้เซลล์ตัวอ่อนของไก่ประดู่หางดำทั้งในรูปเซลล์สดและเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง ฉีดให้แก่ตัวอ่อนไก่ตัวรับ แล้วนำไข่ที่ได้รับการฉีดเข้าฟักที่อุณหภูมิ 100°F เป็นเวลา 21-22 วัน ตรวจการเจริญเป็นระยะ นำลูกไก่ที่รอดชีวิตและฟักเป็นตัวไปเลี้ยงต่อจนเข้าวัยเจริญพันธุ์ เพื่อตรวจสอบความเป็น germline chimerism

จากการทดลองฉีดเซลล์ตัวอ่อนของไก่ประดู่หางดำให้แก่ตัวอ่อนในไข่ของไก่พันธุ์โรด พบว่า อัตราการฟักออกของไข่ที่ได้รับการฉีดเซลล์สด จำนวน 5,000 เซลล์ เท่ากับ 3.04% (10/329) จากตัวอ่อนที่ได้รับการฉีดเซลล์จำนวน 10,000 เซลล์ เท่ากับ 2.27% (3/127) ส่วนการฉีดเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งและละลายแล้ว จำนวน 5,000 เซลล์ มีอัตราการฟักออกเท่ากับ 2.72% (8/292) ทั้งหมดมีลักษณะภายนอก (phenotype) ของไก่พันธุ์โรดปกติ ยกเว้นไก่หมายเลข B537 ตาบอด 1 ข้าง และ F123 หางเบี้ยว แต่บางตัวไม่แข็งแรง และตายไปในระยะแรกของการเลี้ยง เหลือไก่ที่มีชีวิตอยู่รอดพิสูจน์การเป็น germline chimerism ทั้งหมด 15 ตัว ไก่ทั้ง 15 ตัวนี้แสดงลักษณะ phenotype ของไก่ไข่

ในการพิสูจน์ความเป็น germline chimerism โดยนำไก่ chimera ซึ่งมีลักษณะของไก่พันธุ์ไข่ไปผสมกับไก่พันธุ์โรด ซึ่งเป็นพันธุ์ไข่เช่นเดียวกัน แล้วดูลักษณะของลูกที่เกิดว่ามีตัวที่มีลักษณะเป็นลูกผสมประดู่หางดำหรือไม่ มีไก่ 6 ตัว ที่โตพอและเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จนสามารถผสมกับไก่ไข่ได้ พบว่า ไก่ 3 ตัว เป็น germline chimera คือ B138, B417 และ B471 โดย B138 ให้ลูกไก่ชนดำ 1 ตัวจากลูกไก่ 100 ตัว B417 ให้ลูกไก่ชนดำ 3 ตัวจากลูกไก่ 97 ตัว B471 ให้

ลูกไก่ชนดำ 1 ตัว จากลูกไก่ 100 ตัว ไก่ที่เหลือตายก่อนผสม บางตัวติดโรคจากไก่อื่นและตายไป ทำให้ไม่ได้ผสมเพื่อทดสอบความเป็น germline chimera

คำสำคัญ: การอนุรักษ์พันธุกรรม ไก่พื้นเมือง

คำนำ

การอนุรักษ์พันธุกรรมไก่พื้นเมืองโดยการเลี้ยงฝูงไก่เป็นสิ่งที่ต้องลงทุนสูง และเสี่ยงต่อการสูญเสียดังโรคระบาด การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีแรกเริ่มมาเนิ่นนานแล้วและสามารถใช้ได้ แต่การแช่แข็งตัวสุจิจะเป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมเฉพาะจากเพศผู้เท่านั้น ส่วนการแช่แข็งตัวอ่อนในสัตว์ปีกยังเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ยากเนื่องจากโครงสร้างของไข่ไม่เอื้ออำนวยต่อการแช่แข็ง วิธีที่เป็นไปได้ก็วิธีหนึ่ง คือ การเก็บรักษาเซลล์ตัวอ่อน (blastoderm) โดยการแช่แข็ง ซึ่งจะเป็นการเก็บสารพันธุกรรมที่สมบูรณ์ คือ มีส่วนประกอบของจีโนมที่มาจากพ่อและแม่ เซลล์ตัวอ่อนไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาไว้เมื่อนำไปปลูกถ่ายให้แก่ไก่ตัวอ่อนพันธุ์อื่นๆ เพื่อให้เซลล์ตัวอ่อนแทรกกระจายไปในร่างกายลูกไก่ที่เกิดขึ้นเป็นไก่ chimera เมื่อลูกไก่ chimera เติบโตขึ้นจะทำการผสมกับไก่ที่เป็น chimera ด้วยกัน ลูกที่ได้บางส่วนก็จะเป็นไก่พื้นเมืองพันธุ์แท้ที่ต้องการสงวนไว้ได้

ในสัตว์ปีก การผลิต chimeric chicken มีหลักการที่สำคัญ คือ ย้ายเซลล์ของตัวอ่อนไก่ตัวให้จากจุดเจริญ (germinal disc) ไปยังตัวอ่อนบริเวณจุดเจริญของไข่มีเชื้อตัวรับ (recipient) ซึ่งอยู่ในระยะเดียวกัน ตัวอย่างเช่น การย้ายเซลล์จากไก่สีดำนพันธุ์ Barred Plymouth Rock ในระยะการพัฒนาที่เรียกว่า Stage x (Eyal-Giladi, 1984) เข้าไปยังไข่ของไก่สีขาวพันธุ์ White Leghorn เมื่อไข่ดังกล่าวฟักออกจะได้ลูกไก่ที่เป็น chimeric chicken ถ้าเป็นตัวผู้จะผลิตตัวสุจิได้สองชนิดทั้งที่มาจากตัวให้และตัวรับ เมื่อนำไปผสมกับไก่ตัวเมียพันธุ์

Barred Plymouth Rock จะให้ลูกที่มีสีขนได้สองชนิด ชนิดแรก คือ ลูกที่ได้จากตัวอสุจิที่ผลิตโดยเซลล์ตัวให้ที่ ย้ายเข้าไปในตัวรับพันธุ์ Barred Plymouth Rock ชนิดที่สอง คือ ลูกจากตัวอสุจิที่ผลิตโดยเซลล์ของตัวรับพันธุ์ White Leghorn (Etches *et al.*, 1996)

Petite *et al.* (1990) เป็นรายแรกที่แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เซลล์จากตัวอ่อนใหม่ ๆ ที่ยังไม่ผ่านการฟัก (chicken blastodermal cells) ในการผลิต germ line chimeras เขาทำการแยกเซลล์ตัวอ่อนไก่พันธุ์ Barred Rock ในระยะ stage x embryos แล้วนำไปฉีดเข้าช่องว่างใต้ตัวอ่อน (sub germinal cavity) ของไก่พันธุ์ White Leghorn ในระยะใกล้เคียงกัน ต่อมา Naito *et al.* (1992) ได้ใช้วิธีเดียวกันเพื่อผลิต quail-chicken chimeras และมีการใช้วิธีทาง histological เพื่อตรวจสอบการเกิด germline chimeras จากการผลิต quail-chicken chimeras (Watanabe *et al.*, 1992); Thoraval *et al.* (1994) และ Etches *et al.* (1996) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปฉีดยังไก่ตัวรับ ต่อมา มีการเพิ่มประสิทธิภาพการเกิด germline chimeras โดยการทำลายเซลล์บางส่วนของตัวอ่อนของตัวรับ ด้วยการฉายรังสีแกมมา (gamma ray) จากโคบอลต์ 60 (Cobalt-60) (Etches *et al.*, 1996; Kino *et al.*, 1997) และ Caesium-137 (Thoraval *et al.*, 1994)

จากผลสำเร็จในการพัฒนาวิธี chimerism ในไก่ ทำให้สามารถแช่แข็งเซลล์ตัวอ่อนไว้เพื่อผลิตเป็นไก่ ที่มีชีวิตได้ อันเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเก็บรักษา พันธุกรรมไก่พื้นเมือง Pain *et al.* (1996) ได้ชี้ให้เห็นว่า เซลล์ตัวอ่อนไก่ (chicken blastodermal cells) สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในห้องทดลองได้ และเซลล์ยังคงสภาพ ความเป็น multipotent avian embryonic stem (ES) cells ไว้ได้ นั่นคือ เซลล์พวกนี้สามารถที่จะแบ่งตัวต่อไปใน หลอดทดลองได้เป็นเนื้อเยื่อ 3 ชนิด ได้แก่ ectodermal, mesodermal และ endodermal lineages นอกจากนี้ Pain *et al.* (1996) ยังสามารถผลิตสัตว์ chimera ที่มีเซลล์ สืบพันธุ์ของสัตว์พันธุ์หรือชนิดอื่น (germ line chimeras) ได้สำเร็จ จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ 7 วัน มีรายงานการวิจัย ว่าเซลล์ตัวอ่อนที่เพาะเลี้ยงไว้สามารถนำไปผ่านขบวนการ

แช่แข็ง และละลายแข็งได้ถูกใช้ในการผลิต somatic และ germ line chimeras ได้ (Etches *et al.*, 1996; Kino *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งทำให้การเกิด somatic และ germ line chimeras ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้เซลล์ตัวอ่อนสด (stage x blastodermal cells) แทนที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (Etches *et al.*, 1996) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนจะทำให้ ความสามารถในการเกิด chimerism ลดลง ทั้งนี้ อาจเนื่องจากความสามารถในการกลายเป็นตัวอ่อน (potency) ของเซลล์ที่เลี้ยงไว้ลดลง เพราะมีการกลายของเซลล์แบบ แอบแฝง (inherent differentiation) หรืออาจเกิดจากสภาพ ในการเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เหมาะสม (suboptimal culture conditions)

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ไก่พื้นเมืองของไทย โดยศึกษา ถึงผลของการปิดช่องหน้าต่างแบบต่างๆ ต่อการฟัก ออกของไข่ ศึกษาปริมาณ ES cell ที่เหมาะสมในการ ฉีดให้แก่ตัวอ่อนตัวรับเพื่อให้เกิด germline chimera และทดสอบความเป็น germline chimera รวมทั้งผล ของการแช่แข็งเซลล์ตัวอ่อนในไก่

อุปกรณ์และวิธีการ

ไก่ตัวให้ (donor) หรือไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ผลิต ตัวอ่อนสำหรับนำไปแยกเซลล์ (ES cells) เป็นไก่พื้นเมือง ไทยพันธุ์ประดู่หางดำแท้ มีลักษณะสีขน (phenotype) สีดำ ทั้งตัว ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยกองบำรุงพันธุ์สัตว์ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ไก่ตัวรับ (recipient) หรือไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ผลิตตัวอ่อนสำหรับรับการฉีด ES cells ตัวเมียใช้ไก่พันธุ์ไข่ทางการค้าของบริษัทเครือ เจริญโภคภัณฑ์ ตัวผู้ใช้พันธุ์โรดไอแลนด์ ซึ่งทั้งเพศ ผู้และเพศเมียมีลักษณะขนสีน้ำตาลแดงทั้งตัว

ไก่เพศเมียที่ใช้เป็นตัวให้และตัวรับเลี้ยงในกรง ดับ ไก่เพศผู้ที่ใช้เป็นตัวให้และตัวรับเลี้ยงแบบปล่อยพื้น ขนาดสองตารางเมตรต่อสองตัว อาหารสำหรับเลี้ยง

พ่อแม่พันธุ์ทั้งสองชนิด ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับไก่พันธุ์ไข่ จากบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ เสริมวิตามินแร่ธาตุ และอาหารหยาด เช่น ข้าวเปลือก และหญ้าสด ไก่ทั้งหมดเลี้ยงในโรงเรือนเปิด อุณหภูมิแวดล้อมอยู่ในช่วง 15-35°C แม่ไก่ที่กำลังให้ไข่ได้รับแสง 15.25 ชั่วโมงต่อวัน และความมืด 8.75 ชั่วโมงต่อวัน

พ่อแม่พันธุ์ไก่ใช้วิธีผสมพันธุ์แบบธรรมชาติ แม่ไก่แต่ละตัวจะได้รับการผสมทุกๆ 4 วัน คัดเลือกไข่ฟองที่สะอาด ขนาดรูปร่างปกติเพื่อนำไปศึกษา ไข่ไก่ที่เก็บได้จะบันทึกหมายเลขพ่อแม่และวันที่ออกไข่บนเปลือกไข่

การแยกเซลล์ตัวอ่อนจากไข่ตัวให้

การแยกเซลล์ตัวอ่อนในไข่ที่เพิ่งวางไข่จากแม่ไก่ และในไข่ที่ผ่านการฟักมาแล้ว 1-2 วัน ทำตามขั้นตอนของ *Petitte et al.* (1990) คือ เาะไข่ใส่ petridish ตูดไข่ขาวออกให้หมดด้วยกระบองฉีดยา วางกระดาษกรอง (Wattman) ที่ตัดเป็นวงแหวน ลงบนจุดเจริญของตัวอ่อน (blastodisc) ในไข่แดง ใช้ปากคีบคีบกระดาษกรองพร้อมจุดเจริญมาวางลงบน petridish ที่มีหยดของ phosphate buffer saline (PBS) เชีย blastodermal cell ให้หลุดจากกระดาษกรอง ตัดให้เนื้อเยื่อเซลล์ตัวอ่อนให้แยกจากกัน ล้างเซลล์ด้วย PBS ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm 3 นาที ณ อุณหภูมิห้อง จนกว่าไข่แดงจะหมดไป จากนั้นย่อยด้วย trypsin 0.025% (W/V) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เซลล์ตัวอ่อนหลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง และ 10% FCS-DMEM 1 ครั้ง แต่ละครั้งใช้การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ตูดของเหลวส่วนบนทิ้งไป และเติม 10% FCS-DMEM 100 µl ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี trypan blue exclusion นั่นคือ เซลล์มีชีวิตไม่ติดสี trypan blue แต่เซลล์ตายจะติดสี นับจำนวนเซลล์ และตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลของการเปิดช่องหน้าต่างต่อการฟักออกของไข่

การทดลองนี้ศึกษาวิธีการเปิดช่องบนเปลือกไข่ตัวรับเพื่อให้ตัวอ่อนมีการฟักออกสูงที่สุด โดยใช้ไข่ที่มีเชื้อจากแม่พันธุ์ จำนวน 368 ฟอง ใช้แผนการทดลองแบบ CRD แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) เปิดเปลือกไข่แล้วปิดด้วย surgical tape 1 ชั้น (window I) 2) เปิดเปลือกไข่แล้วปิดด้วย surgical tape 2 ชั้น (window II) และ 3) เปิดเปลือกไข่แล้วเติม 10% FCS-DMEM จนเต็มฟองไข่ หลังจากนั้นปิดหน้าต่างด้วย surgical tape 1 ชั้น (window III)

ทำความสะอาดไข่มีเชื้อที่เพิ่งวางไข่จากแม่ไก่ตัวรับด้วย 70% ethanol นำไข่วางในแนวนอน ทำเครื่องหมายสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 0.75x0.75 ซม. ตรงด้านบนเปลือกไข่ เจาะช่องบนเปลือกไข่ด้วยมีดผ่าตัด แล้วเปิดเปลือกไข่ออกในสภาวะปราศจากเชื้อ ปิดช่องบนเปลือกไข่ด้วย surgical tape จดบันทึกข้อมูลแล้วนำไข่เข้าตู้ฟักที่มีอากาศไหลเวียนที่อุณหภูมิ 37.7°C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 50% กลับไข่ทุกๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 19 วัน ย้ายไข่ไปตู้เกิดที่อุณหภูมิ 37°C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 85% จนกระทั่งลูกไก่ฟักออก ทำการส่องไข่เพื่อย้ายไข่ไม่มีเชื้อ และไข่ที่ตัวอ่อนตายออกจากตู้ฟัก ในวันที่ 10 และ 18 เพื่อนำมาตรวจดูการพัฒนาของตัวอ่อน

การศึกษาปริมาณ ES cell ที่เหมาะสมในการฉีดเพื่อให้เกิด germline chimera

การทดลองนี้ศึกษาจำนวนเซลล์ตัวอ่อนที่เหมาะสมในการฉีดเข้าไปยังจุดเจริญของตัวรับ และทำให้เกิด germline chimera โดยใช้ไข่มีเชื้อจากแม่ตัวรับจำนวน 1,278 ฟอง ออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design ใช้การวิเคราะห์แบบ Analysis of Variance (ANOVA) แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 2 ซ้ำ (Table 2) คือ 1) กลุ่มควบคุมไม่เจาะช่องบนเปลือก 2) กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างแต่ไม่ฉีดเซลล์

3) กลุ่มฉีดเซลล์จากตัวให้จำนวน 5,000 เซลล์ 4) กลุ่มฉีดเซลล์จากตัวให้จำนวน 10,000 เซลล์ 5) กลุ่มฉีดเซลล์จากตัวให้จำนวน 15,000 เซลล์ 6) กลุ่มฉีดเซลล์จากตัวให้จำนวน 20,000 เซลล์ 7) กลุ่มฉีดเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน 5,000 เซลล์ ทำการแยก Embryonic cells จากไข่ตัวให้ ระยะ Stage x และปรับความเข้มข้นของเซลล์ที่ด้วย FCS-DMEM medium ให้ได้ตามต้องการในปริมาตรขนาด 3 μ l ก่อนนำไปฉีด

ทำการเปิดช่องหน้าต่างบนเปลือกไข่ตัวรับ (window) บริเวณกลางฟองขนาด 0.75x0.75 ซม. ใช้เข็มฉีดเซลล์ตามจำนวนที่ต้องการใน medium ปริมาณ 3 μ l เข้าสู่ subgerminal cavity ของตัวอ่อนตัวรับ แล้วปิดช่องหน้าต่างด้วย surgical tape ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไข่เข้าตู้ฟัก ตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อนที่ตายหลังเข้าตู้ฟักในวันที่ 10 และ 18 ทำการบันทึกข้อมูลไข่ฟักและลูกไก่ที่ฟักออก โดยบันทึกลักษณะสีขน นำไก่ที่ฟักออกไปเลี้ยงจนโตพอที่จะผสมกับไก่ไข่เพื่อตรวจการเป็น germline chimera

การแช่แข็งเซลล์ตัวอ่อน

เติม 20% (v/v) DMSO ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 0.05 มล ลงในสารละลายเซลล์ blastoderm 0.05 มล อย่างช้าๆ จนความเข้มข้นสุดท้ายของสารแช่แข็งเท่ากับ 10% (v/v) บรรจุสารละลายที่มีเซลล์ข้างต้น ลงในหลอดฟาง ปริมาตร 0.1 มล. โดยมีปริมาณเซลล์ 200,000 เซลล์ต่อหลอด นำหลอดฟางไปทำการแช่แข็งโดยแช่ในกล่องโฟมที่เย็น จากนั้นนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C เมื่อจะใช้เซลล์ก็นำมาละลายแข็ง โดยแช่หลอดเซลล์แช่แข็งในน้ำอุณหภูมิ 20°C ประมาณ 10 วินาที ทำการล้าง DMSO ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายข้างบนทิ้ง นำส่วนเซลล์ที่เหลือกันหลอดไปละลายใหม่ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์อีก 3 รอบ นำสารละลายเซลล์มาปรับความเข้มข้นตามต้องการ เพื่อเตรียมฉีดเซลล์ให้ตัวอ่อนไก่ตัวรับ

ผลการทดลอง

ผลของการเปิดช่องหน้าต่างต่อการฟักออกของไข่

จากผลการทดลอง (Table 1) ในกลุ่มการทดลอง 3 กลุ่ม คือ 1) เปิดเปลือกไข่แล้วปิดด้วย surgical tape 1 ชั้น (window I) 2) เปิดเปลือกไข่แล้วปิดด้วย surgical tape 2 ชั้น (window II) และ 3) เปิดเปลือกไข่แล้วเติม 10% FCS-DMEM จนเต็มฟองไข่ หลังจากนั้นปิดหน้าต่างด้วย surgical tape 1 ชั้น (window III) นั้น การปิดหน้าต่าง แบบที่ 3 ให้เปอร์เซ็นต์ การฟักออกสูงถึง 52.90% เป็นเปอร์เซ็นต์การฟักออกดีที่สุด และแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายของตัวอ่อนต่อตัวอ่อนทั้งหมดในแต่ละช่วง และในทุกกลุ่มทดลองพบว่า มีความแตกต่างกันเล็กน้อยโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อดูการตายของตัวอ่อนในแต่ละวัน พบว่ามีการตายสูงในช่วงวันที่ 7, 12 และ 18 โดยการเปิดหน้าต่างแบบที่ 3 มีการตายต่ำกว่าแบบที่ 1 และ 2 ตลอดมาในทุกวันของการพัฒนาการยกเว้นในวันที่ 18 และ 20 ซึ่งอัตราการของตัวอ่อนที่เปิดหน้าต่างโดยวิธีที่ 3 มีอัตราสูงกว่าวิธีที่ 1 และ 2 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุที่การตายของตัวอ่อนที่ปิดช่องหน้าต่างโดยวิธีที่ 3 ซึ่งมีการเติม medium ลงในไข่ก่อนทำการปิดช่องหน้าต่างต่ำกว่าวิธีอื่นๆ อาจเนื่องมาจากการที่ในสภาวะปกติไข่จะมีเปลือกไข่ และเยื่อหุ้มไข่ขาวที่ทำหน้าที่ป้องกันไข่ และป้องกันการสูญเสียจากฟองไข่ แต่การเปิดช่องบนเปลือกไข่ทำให้เกิดการฉีกขาดของเยื่อดังกล่าว จึงเกิดการสูญเสียของตัวอ่อน เมื่อทำการเติม medium ลงในฟองไข่ช่วยลดปัญหานี้ลงตัวอ่อนจึงมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น วันที่ 7 ของการพัฒนาการน่าจะเป็นช่วงที่ตัวอ่อนได้รับผลกระทบของการเปิดและปิดช่องหน้าต่างสูงที่สุด โดยจากผลการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม มีการตายในวันนี้สูงที่สุด อย่างไรก็ตามการปิดช่องหน้าต่างแบบที่ 3 ลดการตายของตัวอ่อนในวันนี้น้อยมาก

Table 1 Mortality and hatchability of chicken embryo at different incubation date. window I = window closed with 1 layer of surgical tape ; window II = window closed with 2 layers of surgical; window III = window filled with 10% FCS-DMEM and closed with 3 layers of surgical tape

Treatment	Total (n)	Mortality						Hatchability	
		Day 0-10		Day 11-19		Day 20-22		Number hatched	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Window I	68	31	45.59 ^{ab}	19	27.94 ^{cd}	2	2.94 ^f	16	23.53 ^{cde}
Window II	162	44	27.16 ^{cde}	59	36.42 ^{bc}	18	11.11 ^{ef}	41	25.31 ^{cde}
Window III	138	19	13.77 ^{def}	36	26.09 ^{cde}	10	7.25 ^f	73	52.90 ^a

abcdef Different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

การศึกษาปริมาณ ES cell ที่เหมาะสมในการฉีดเพื่อให้เกิด germline chimera

จากการทดลองฉีดเซลล์ตัวอ่อนไก่ตัวให้เข้าในตัวอ่อนไก่ตัวรับเพื่อผลิต chimeric chicken ในการทดลองนี้ มีกลุ่มควบคุมสภาวะของการฟักโดยใช้ไข่ปกติที่ไม่ได้เจาะช่องหน้าต่าง พบว่า กลุ่มควบคุมนี้มีอัตราการฟักออก เท่ากับ 97.55% แสดงถึงสภาวะการฟักที่เหมาะสม ในขณะที่เดียวกันไข่ไข่ตัวรับเจาะช่องหน้าต่างแต่ไม่ได้รับการฉีดเซลล์เพื่อควบคุมสภาวะการเจาะช่องหน้าต่าง พบว่า กลุ่มนี้มีอัตราการฟักออก เท่ากับ 50% ซึ่งจัดว่าอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ ผลการฉีดเซลล์ในระดับต่างๆ เข้าในตัวอ่อนของไข่ในตัวรับของกลุ่มทดลอง พบว่า การฉีดเซลล์ขนาด 5,000 และ 10,000 เซลล์ ในไข่ 329 และ 127 ฟอง ได้ไก่ที่ฟักออกเป็นตัว เท่ากับ 10 ตัว และ 3 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการฟักออก เท่ากับ 3.04 และ 2.36% ตามลำดับ ไม่มีไก่ที่ฟักออกจากการฉีดเซลล์ขนาด 15,000 และ 20,000 เลย และการฉีดเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งมีไก่ฟักออก 8 ตัว คิดเป็น 2.74% (Table 2) พบว่า เปอร์เซ็นต์

การฟักออก ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ฉีดเซลล์ อัตราการฟักออกในกลุ่มที่ทำการเปิดช่องหน้าต่าง แต่ไม่ได้ฉีดเซลล์จะต่างจากกลุ่มที่ทำการฉีดเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (Table 2) แสดงว่า การฉีดเซลล์ขนาด 5,000-20,000 เซลล์เข้าไปยัง subgerminal cavity มีผลกระทบต่อตัวอ่อนทั้งสิ้น อย่างไรก็ตาม พบว่า ตัวอ่อนไก่ส่วนใหญ่ตายในระยะแรกของการฟัก ไม่ว่าฉีดเซลล์ขนาดใดก็ตาม แต่เมื่อคำนวณอัตราการตายของแต่ละช่วงของการฟักจากจำนวนที่เหลือในแต่ละช่วง พบว่า ไก่ที่ได้รับการฉีดเซลล์สดทุกขนาด มีอัตราการตายสูงในทุกระยะของการฟัก ส่วนไก่ที่ได้รับการฉีดด้วยเซลล์แช่แข็ง พบว่า อัตราการตายสูงที่สุดอยู่ในระยะ 0-10 วัน ของการฟัก และสูงกว่าระยะอื่นในกลุ่มเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Table 3) แม้จะมีอัตราการตายสูงมากในช่วงแรกแต่ตัวอ่อนที่รอดมา พบว่า อัตราการตายจะลดลงมาก และอัตราการฟักออกของ ตัวอ่อนเท่ากับไก่ที่ได้รับการฉีดเซลล์ 5,000 เซลล์ และ 10,000 เซลล์

Table 2 Mortality and hatchability of chicken embryo injected with donor embryonic cells (fresh or frozen) at different incubation date

Embryonic cells injected	total (chick)	Mortality						Hatchability	
		Day 0-10		Day 11-19		Day 20-22		Number hatched	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
5,000 cells	329	216	65.65 ^{cd}	92	27.96 ^g	11	3.34 ^{jk}	10	3.04 ^k
10,000 cells	127	89	70.08 ^c	31	24.41 ^{gh}	4	3.15 ^{jk}	3	2.36 ^k
15,000 cells	76	47	61.84 ^d	28	36.84 ^f	1	1.32 ^k	0	0.00 ^k
20,000 cells	104	79	75.96 ^b	22	21.15 ^{hi}	3	2.88 ^{jk}	0	0.00 ^k
frozen cells	292	272	93.15 ^a	12	4.11 ^{jk}	0	0.00 ^k	8	2.74 ^{jk}
Window, 0 cells	146	26	17.81 ⁱ	36	24.66 ^{gh}	11	7.53 ^j	73	50.00 ^e
control	204	0	0.00	3	1.47	2	0.98	199	97.55

abdefghijk Different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

การตายของตัวอ่อนสูงในช่วงต่างๆ ของการฟัก อาจเนื่องมาจากเซลล์ใน blastoderm ของตัวรับถูกรบกวนการจัดเรียงตัว ในระยะแรกของการพัฒนาการของตัวอ่อน และผลจากการเปิดช่องหน้าต่างร่วมกัน เนื่องจากกลุ่มที่เปิดหน้าต่างอย่างเดียวยังไม่ได้ฉีดเซลล์มีการตายถึง 17.40% และไม่พบมีตัวอ่อนตายในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เปิดหน้าต่างเลย (Table 3) ส่วนการฉีดด้วยเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง 5,000 เซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มฉีดด้วยเซลล์สด 5,000 เซลล์ พบว่า มีอัตราการตายสูงตลอด 0-22 วัน แต่ฉีดเซลล์แช่แข็ง อัตราการตายสูงในช่วง 0-10 วัน และเมื่อดูรายละเอียดในการตายในแต่ละวัน พบว่า ตายในวันที่ 2 ของการฟักสูงกว่าช่วงอื่นในทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งการตายของตัวอ่อนในช่วงนี้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มต่างๆ อาจเนื่องมาจากผลของการแช่แข็งเซลล์เมื่อประเมินการตายของตัวอ่อนในแต่ละวัน พบว่า ในแทบทุกกลุ่มทดลองมีการตายของตัวอ่อนค่อนข้างสูง ในช่วงวันที่ 1-2, 7, 12, 16, 18 และวันที่ 20 ของการฟัก ซึ่งไม่พบลักษณะนี้ในกลุ่มควบคุม (Table 3) และ

ผลคล้ายกับการตายของตัวอ่อนในการทดลองปิดหน้าต่างแบบต่างๆ การที่อัตราการตายในแต่ละวันสูงในช่วงดังกล่าว อาจเป็นไปได้ว่าเป็นผลมาจากการเปิดหน้าต่างบนเปลือกไข่ และการรบกวนการพัฒนาการของตัวอ่อนจากการฉีดเซลล์ และเป็นช่วงที่ตัวอ่อนมีการพัฒนาที่สำคัญ มีความอ่อนไหว ไวต่อการกระตุ้น และการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมต่างๆ

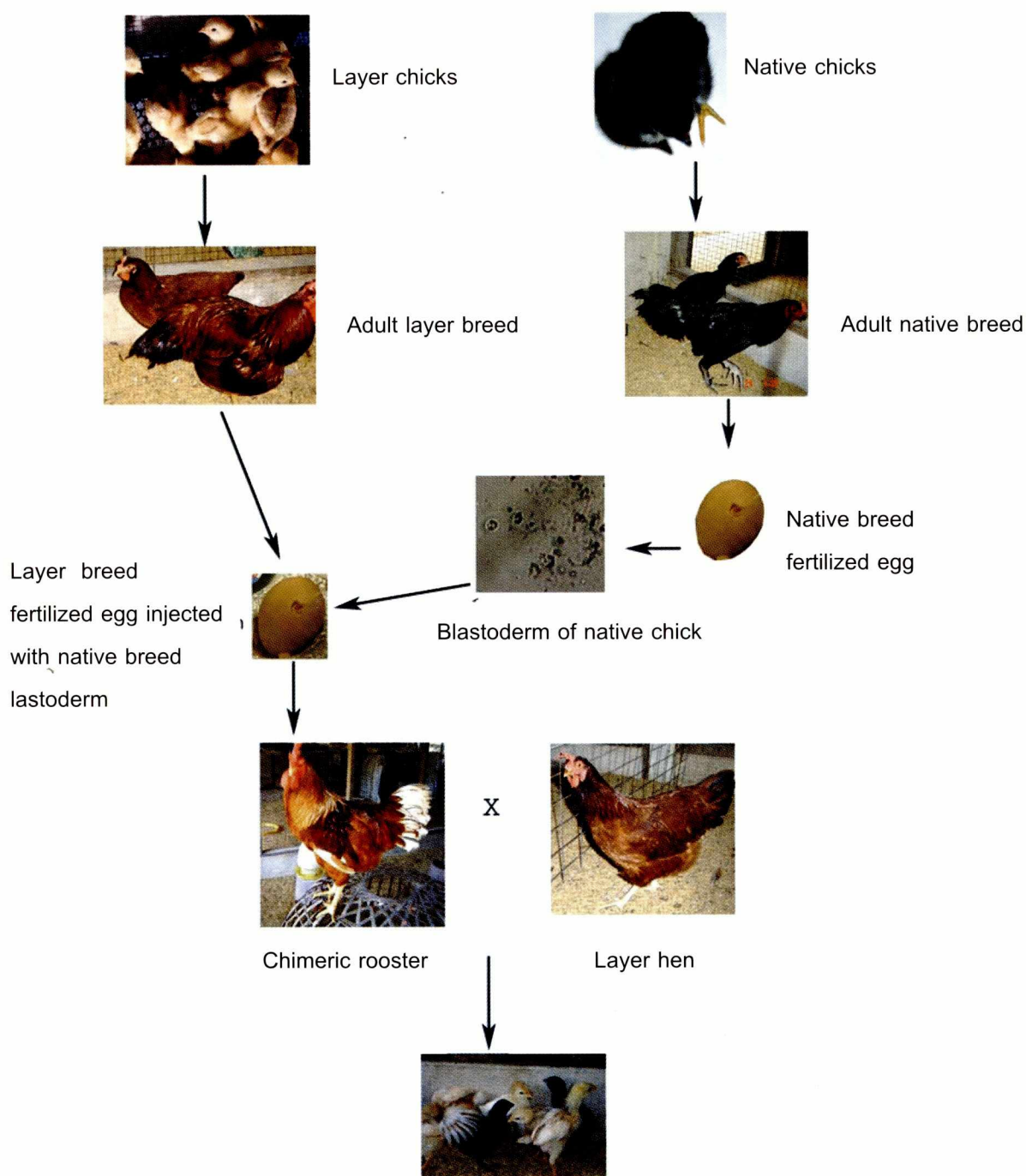
การเกิด chimeric chicken และการพิสูจน์ความเป็น germline chimera

จากการฉีดเซลล์ตัวอ่อนของไก่พันธุ์ประดู่หางดำ ให้แก่ตัวอ่อนไก่ตัวรับพันธุ์ไข่ในปริมาณต่างๆ กัน จำนวน 1,278 ฟอง พบว่า มีตัวอ่อนที่ฟักออกมาทั้งหมด 21 ตัว ไก่ chimera ที่เกิดจากการฉีดเซลล์เข้าในตัวอ่อนของไก่พันธุ์โรด พบว่า ไก่แสดงลักษณะขนของไก่ตัวรับ (พันธุ์โรด) เป็นส่วนใหญ่ มีลักษณะดังรายละเอียดใน Table 3 พบว่า ไก่ 6 ตัว ไม่แข็งแรงและตายตั้งแต่น้อยถึง 6 ตัว ไม่แข็งแรงและตายก่อนผสม ขณะที่ 3 ตัวที่โตขึ้นมาตายเพราะติดเชื้อ ไก่ 6 ตัวที่โตจนเจริญพันธุ์

สามารถผสมได้ และไก่ 3 ตัว ที่เป็น germline chimera ให้ลูกที่มีขนดำ

ไก่ที่ได้ทั้ง 21 ตัว มี 3 ตัว ที่เกิดจากการฉีดเซลล์ ขนาด 10,000 เซลล์ ที่เหลือเกิดจากการฉีดเซลล์ 5,000 เซลล์ และไก่ทั้ง 3 ตัว ที่เกิดจากการฉีดเซลล์ 10,000 เซลล์ ไม่แข็งแรงและตายก่อนที่จะสามารถนำไปผสมได้ เป็นไปได้ว่าการฉีดเซลล์ในขนาดที่สูงน่าจะมีโอกาสเพิ่มการเกิด germline chimera แต่ทำให้อัตราการฟัก ออกต่างจากกลุ่มที่ฉีดเซลล์ต่ำกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญ ทางสถิติ และ chimera ที่เกิดมาอาจมีลักษณะที่ ผิดปกติกว่าที่ฉีดด้วยเซลล์ขนาดต่ำ ส่วนไก่ที่เกิดจาก การฉีดเซลล์สด 5,000 เซลล์ จำนวน 10 ตัว มี 5 ตัว ที่โตจนสามารถนำไปผสมกับไก่พันธุ์ไข่เพื่อทดสอบ การเป็น germline chimera พบว่ามีไก่ถึง 3 ตัว คือ B138, B417 และ B471 เป็น germline chimera สามารถ ให้ลูกที่มีลักษณะขนแบบไก่ดำไทย นับเป็นสัดส่วนที่

สูงพอควร (3 ใน 5 ตัว) ส่วนไก่ที่ได้รับการฉีดเซลล์แช่ แข็ง 5,000 เซลล์ พบว่ามีเพียง 1 ตัว คือ F123 ที่โตจน สามารถผสมได้ และพบว่าไม่ให้ลูกที่มีลักษณะของไก่ ไทย อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าไก่ที่นำไปทดสอบ ความเป็น germline chimera และยังไม่ให้ลูกที่เป็นไก่ ดำ อาจเนื่องมาจากการที่มีสัดส่วน germ cell ของไก่ ไทยที่อยู่ในไก่ตัวรับที่ผ่านการฉีดเซลล์นั้นน้อยจนทำ ให้อสุจิที่สร้างขึ้นมามีสัดส่วนของอสุจิที่มาจาก germ cell ของไก่พื้นเมืองน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับของ ไก่ตัวรับเอง จึงทำให้ตรวจสอบไม่พบ จะเห็นได้ว่าไก่ ที่เกิดจากการฉีดเซลล์นั้นมีแนวโน้มว่าอาจไม่ค่อย แข็งแรงนัก มีเพียง 6 ตัว จาก 21 ตัว ที่โตและแข็งแรง พอจนถึงวัยเจริญพันธุ์ ดังนั้นการเลี้ยงไก่ chimera ที่ ได้จะต้องเพิ่มความระมัดระวังเป็นพิเศษ มีสภาวะ แวดล้อมที่ดี แยกพื้นที่การเลี้ยง และการดูแลให้วัคซีน เพื่อป้องกันการติดโรคจากไก่ตัวอื่น



Some black chickens were produced.

Figure 1 Test for germline chimera by crossing chimeric rooster (layer phenotype) with brown layer hen, some of their chicks demonstrated native breed phenotype (ie dominant phenotype).

Table 3 Characteristic of chimeric chicken and testing for germline chimera

Chimeric parent ID	Sex	No of cells received	Characteristic of chimeric parent	Characteristic of offspring of chimerick chicken
B138	male	5,000	layer breed (brown) with white wing and tail feathers	one black chick (from 100 chicks)
B351	female	10,000	weak and died	-
B359	female	10,000	weak and died	-
B362	-	10,000	weak and died early	-
B373	-	5,000	weak, runt and died early	-
B380	male	5,000	layer breed (brown) with white wing and tail feathers	no black chick (from 100 chicks)
B417	male	5,000	layer breed (brown) with white wing and tail feathers	three black chick (from 97 chicks)
B455	-	5,000	early death	-
B471	male	5,000	normal	one black chick (from 100 chicks)
B519	female	5,000	weak and died early	-
B537	male	5,000	blind (one eye)	no black chick (from 100 chicks)
B586	female	5,000	stunt and died	-
B592	-	5,000	weak and died early	-
F73	-	5,000 (frozen)	weak and died early	-
F83	-	5,000 (frozen)	weak and died early	-
F121	female	5,000 (frozen)	normal but died of infection	-
F122	?	5,000 (frozen)	normal but died of infection	-
F123	male	5,000 (frozen)	crooked tail	no black chick (from 100 chicks)
F280	?	5,000 (frozen)	normal but died of infection	-
F292	male	5,000 (frozen)	stunt and died	-
F296	female	5,000 (frozen)	weak and died	-

ผลการฉีดเซลล์แช่แข็ง

ผลการแช่แข็งเซลล์ตัวอ่อน พบว่า อัตราการรอดของเซลล์เท่ากับ 90-98% และเก็บเซลล์ได้นาน 2 เดือน แต่อย่างไร ยังมีไข่ 8 ตัว (2.7%) ที่เกิดจากการฉีดเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งด้วย แต่พบว่า ไข่ 7 ตัวใน 8 ตัว ตายก่อนผสม แต่มีไข่ 1 ตัวคือ F123 ที่โตพบที่จะผสมได้ (Table 2

และ Table 3) เมื่อผสมแล้วไม่พบว่าให้ลูกที่มีลักษณะขนดำ ตัวอ่อนที่ได้รับการฉีดเซลล์แช่แข็งพบการตายสูงมากในระยะแรกของการฟัก โดยตายสูงถึง 93.15% ต่างจากช่วงอื่นของการฟักในกลุ่มนี้ อย่างมีนัยสำคัญ (Table 2) แต่อย่างไรก็ตามการตายในระยะต่อมาลดลงมาก และพบว่า อัตราการฟักออกไม่ต่างจากกลุ่มที่ฉีดด้วยเซลล์สด ดังนั้น ความ

เป็นไปได้ของการเก็บรักษาเซลล์ตัวอ่อนสายพันธุ์ที่ต้องการโดยวิธีแช่แข็ง และผลิต germine chimera น่าจะเป็นวิธีที่ได้ แม้กว่า F123 พบว่า ไม่ให้ลูกที่มีลักษณะต่างจากการทดสอบในลูก 100 ตัว แต่หากทำการทดสอบกับลูกนำมากกว่านี้อาจพบลูกที่มีลักษณะน่าตำได้

สรุปผลการทดลอง

วิธีการเปิด-ปิดช่องบนเปลือกไข่เป็นขั้นตอนที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟักออกของตัวอ่อน การเปิดช่องหน้าต่างบนเปลือกไข่มีหลายวิธีที่ใช้กัน แต่ละวิธีมีผลต่อการฟักออกของไข่ จากการทดลองพบว่า อัตราการฟักออกของไข่ที่เปิดช่องหน้าต่างโดยไม่ฉีดเซลล์ อยู่ในระดับสูง และการฉีดเซลล์ 5,000-10,000 เซลล์สามารถฟักออกได้ในระดับ 2-3-3% ไข่ที่เปิดพอที่จะทดสอบ germine chimera มีถึง 6 ตัว และ 3 ใน 6 ตัว มีความเป็น germine chimera นับว่าอยู่ในระดับที่สามารถนำมาใช้เพื่อรักษาพันธุ์กรรมของไก่พื้นเมืองได้ วิธีการเก็บรักษาพันธุ์กรรมของไก่พื้นเมืองโดยการแช่แข็ง blastodermal cell นั้นมีความเป็นไปได้ ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ของไก่พื้นเมืองไว้ได้นานขึ้น และยังเป็นวิธีที่ประหยัดต้นทุนในการเก็บรักษาพันธุ์กรรมไก่ เพราะไม่ต้องการเปลี่ยนในการเลี้ยงฟักไก่มีชีวิต ทั้งโรงเรือน แร่งงาน และค่าอาหาร ถ้าสามารถผลิต germine chimera ได้ทั้งเพศผู้ และเพศเมียที่สมบูรณ์ก็จะสามารถนำมาผสมกันเองเพื่อผลิตสายพันธุ์ไทยแท้ที่ต้องการสงวนรักษาไว้ได้ ถึงแม้อัตราการรอดของไก่ที่ได้รับการฉีดเซลล์ยังต่ำ และลูกที่เกิดขึ้นมาบางส่วนไม่แข็งแรง แต่ตัวที่รอดชีวิตและเติบโตจนสมบูรณ์พันธุ์พบว่า มีโอกาสให้ลูกที่มีลักษณะของไก่พื้นเมืองได้มาก และลูกที่เกิดจากการผสมพันธุ์ไก่ chimera ก็มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง การนำวิธีนี้มาใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมไก่พื้นเมืองในอนาคตน่าจะเป็นไปได้ ทั้งนี้ในทางปฏิบัติขึ้นอยู่กับ 1) วิธีการที่ใช้จะสามารถผลิตไก่ chimera ที่มีลักษณะปกติตามจำนวนที่ต้องการได้

ยากง่ายเพียงใด 2) คุณสมบัติของฟองสัตว์ และ 3) เป็นเทคนิคที่มีอยู่และมีวัสดุอุปกรณ์พร้อมสามารถนำมาใช้ได้ ในทางอุดมคติควรมีสถานที่ในการเก็บรักษาเซลล์ตัวอ่อนไว้มากกว่า 1 แห่ง เพื่อป้องกันความเสียหายที่เกิดจากภัยธรรมชาติ ไฟไหม้ กระแสไฟฟ้าตัด หรืออื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2545-2546 ขอขอบคุณผู้ร่วมงานทุกๆ ท่าน เจ้าหน้าที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ให้การช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณฟาร์มสัตว์ปีก มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ในการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยภาคสนาม ขอขอบคุณคุณชวลิต ศิริบูรณ์ คุณกิตติ วิรุณพันธ์ ในการจัดการข้อมูล ขอขอบคุณกองบำรุงพันธุ์สัตว์ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ไก่ประดู่หางดำ

เอกสารอ้างอิง

- Badnarczyk, M., P. Lakota and M. Siwek. 2000. Improvement of hatchability of chicken eggs injected by blastodermal cells. **Poult. Sci.** 79: 1823-1828.
- Etches, R.J., M.E. Clark, A. Toner, G. Liu and A.M. Gibbins. 1996. Contributions to somatic and germine lineages of chicken blastodermal cells maintained in culture. **Mol. Reprod. Dev.** 45: 291-298.

- Eyal-Giladi, H. 1984. The gradual establishment of cell commitments during the early stages of chick development. **Cell Differ.** 14(4): 245-255.
- Kino, K., B. Pain, S.P. Leibo, M. Cochran, M.E. Clark and R.J. Etches. 1997. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. **Poult. Sci.** 76: 753-760.
- Li, Z.D., H. Deng, C.H. Liu, Y.H. Song, J. Shao, N. Wang and H. Wei. 2002. Production of duck-chicken chimeras by transferring early blastodermal cells. **Poult. Sci.** 81: 1360-1364.
- Naito M, A. Tajima, Y. Yasuda and T. Kuwana. 1994. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. **Mol Reprod Dev.** 39: 153-161.
- Naito, M., K. Nirasawa and T. Oeshi. 1992. Preservation of quail blastodermal cells in liquid nitrogen. **Br. Poult. Sci.** 33: 449-453.
- Pain, B., M.E. Clark, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut and R.J. Etches. 1996. Long term culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic capabilities. **Development.** 122: 2339-2348.
- Petitte, J.N., M.E. Clark, G. Liu, A.M. Verrinder Gibbons and R.J. Etches. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. **Development.** 108: 185-189.
- Thoraval, P., F. Lasserre, F. Coudert and G. Dambrine. 1994. Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and White Leghorns by transfer of early blastodermal cells. **Poult. Sci.** 73: 1897-1905.
- Watanabe, M., M. Kinutani, M. Naito, O. Ochi and Y. Takashima. 1992. Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. **Development.** 114: 331-338.