Owulacja i wczesny rozwój zarodka ptaka w warunkach *in vitro*

Bożenna Olszańska, Urszula Stępińska

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

W ciągu ostatnich 20 lat opracowanie metod hodowli *in vitro* oocytów i zarodków ssaków doprowadziło do niesłychanego rozwoju wiedzy o mechanizmach rozrodu tej grupy zwierząt. Wprowadzenie metod *in vitro* hodowli oocytów i zarodków umożliwiło też szybki rozwój nowej dziedziny – biotechnologii zarodka, która otwiera całkowicie nowe perspektywy w hodowli i genetyce zwierząt (klonowanie, transfer zarodków), farmakologii (żywe bioreaktory wytwarzające białka stosowane w terapiach chorób), medycynie (leczenie niepłodności, terapia genowa). Prawdopodobnie w niedługim czasie pojawi się szereg nowych możliwości zastosowania metod biotechnologii, które obecnie są jeszcze trudne do przewidzenia.

Na tle burzliwego rozwoju biotechnologii zarodków ssaków, opartej na metodach hodowli *in vitro*, zastanawiające jest wyraźne opóźnienie w opracowywaniu tego rodzaju metod dla zarodka ptaka. Ptaki stanowią dużą grupę zwierząt o znacznej liczebności biologicznej i ogromnym znaczeniu ekonomicznym, jako źródło taniej i zdrowej żywności. Ze względu na dużą produktywność, niewielkie koszty utrzymania oraz krótki okres dojrzewania stanowią interesujący model dla biotechnologii, jako zwierzęta transgeniczne. Zadziwiające jest, że tak mało dotychczas uczyniono w celu umożliwienia badania procesów ich rozrodu w warunkach *in vitro*.

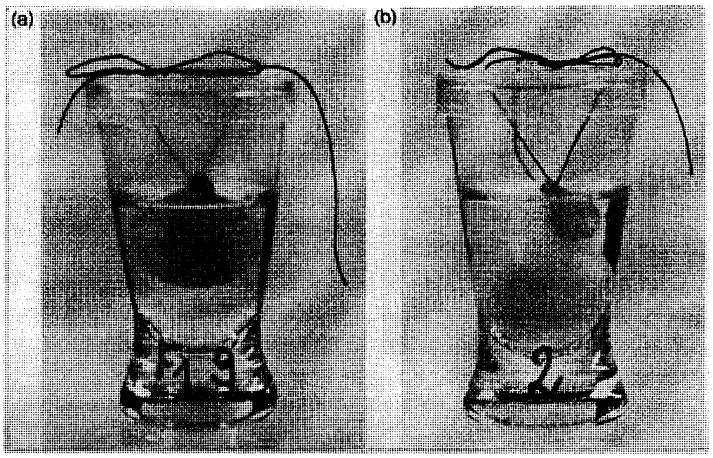
Podobnie jak u ssaków, poszczególne etapy rozrodu ptaka obejmują: oogenezę (1) → dojrzewanie oocytu (2) → owulację (3) → zapłodnienie (4) → rozwój zarodkowy (5, wczesny – a; późniejszy – b) → wyklucie (narodziny) nowego osobnika (6). U ssaków jest już możliwe przeprowadzenie etapów od 2 do 5a nie tylko dla każdego etapu oddzielnie, ale również w jednym cyklu, poczynając od oocytu znajdującego się jeszcze w pęcherzyku jajnikowym, aż do wczesnego stadium rozwoju embrionalnego – nie zagnieżdżonej blastocysty. Późniejszy, postimplantacyjny rozwój zarodka ssaka obecnie musi jeszcze przebiegać *in vivo* w organizmie samicy.

Jeśli chodzi o ptaki, to dopiero ostatnie 10 lat przyniosło pewien postęp w opanowaniu metod hodowli pozaustrojowej. Dużym osiągnięciem było opracowanie hodowli *in vitro* zarodka kury od 1-komórkowej zygoty, aż do wylęgu. Procedura polega na wyjęciu naturalnie zapłodnionego jaja z jajowodu samicy, a następnie hodowli zarodka w trzech kolejno zmienianych warunkach (szklany słoiczek, mała skorupka jajowa, duża skorupa jajowa) i przy trzech różnych składach pożywki. Jednak zastosowanie tej metody w połączeniu z nastrzykiwaniem obcego DNA do blastodysku nie przyniosło oczekiwanych rezultatów dla wytwarzania ptaków transgenicznych. Powszechną metodą otrzymywania transgenicznych ssaków jest wprowadzenie obcego DNA do jednego z przedjądrzy jednokomórkowego zarodka. U ptaków, ze względu na ogromną masę żółtka, przedjądrza nie są widoczne pod mikroskopem, a więc nastrzykiwanie odbywa się „na ślepo" do cytoplazmy w centrum blastodysku, gdzie prawdopodobieństwo lokalizacji przedjądrzy jest największe, ale pomimo to możliwość trafienia mikropipetką w przedjąrze jest minimalna. Należy też wziąć pod uwagę fakt, że u ptaków normą jest zapłodnienie polispermiczne, tzn. do oocytu i na teren blastodysku wnika wiele plemników, które ulegają następnie przekształceniu w przedjądrza, jednakże tylko jedno z nich, po połączeniu z przedjądrzem matczynym, będzie tworzyło jądro zygoty. A więc, jeśli nawet udałoby się jakąś metodą uwidocznić przedjądrza obecne w blastodysku, to nie wiadomo byłoby, które z nich ostatecznie wejdzie w skład jądra zygoty. W rezultacie takiego nastrzykiwania „na ślepo" obce DNA zostaje odłożone na terenie cytoplazmy, gdzie – jak wykazały nasze badania – znajdują się bardzo aktywne enzymy rozkładające DNA. Można się spodziewać, że otrzymanie tą drogą transgenicznych ptaków jest mało prawdopodobne, chociaż nie całkiem wykluczone – zależne od miejsca, gdzie obcy DNA będzie się znajdował.

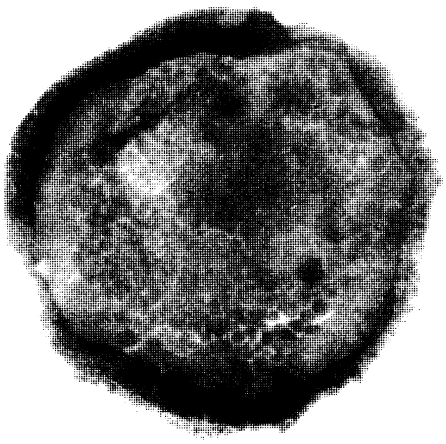
Budowa oocytu i owulacja *in vitro*

Żeńskie komórki płciowe – oocyty – ptaków wyróżniają się znacznymi rozmiarami wśród innych oocytów zwierzęcych. Oocyt ptaków jest zaopatrzony w ogromną ilość żółtka i otoczony delikatną błoną żółtkową, co utrudnia manipulowanie nim bez uszkodzenia. Na jednym biegunie kuli żółtkowej zgromadzona jest znaczna ilość cytoplazmy. Widać ją w postaci jasnej plamki o średnicy do 5 mm – jest to tzw. blastodysk, w środku którego, tuż pod błoną, znajduje się jądro oocytu. Na terenie blastodysku, po zapłodnieniu, powstanie w przyszłości zarodek. Jądro oocytu u ptaków jest wyjątkowo duże, może osiągać średnicę 0,35 mm, a więc jest dobrze widoczne pod binokularem, jako ciemniejszy pęcherzyk na tle żółtka, a nawet gołym okiem – w formie ciemnej kropeczki na jasnym tle blastodysku. Mniej więcej 4 godziny przed owulacją oocyt zaczyna przechodzić proces dojrzewania – błona jądra oocytu zanika i przestaje ono być widoczne pod binokularem, a jednocześnie rozpoczyna się pierwszy z podziałów dojrzewania, w wyniku których liczba chromosomów ulega zmniejszeniu o połowę. W momencie owulacji oocyt przestaje już być oocytem i staje się jajem, czyli zdolną do zapłodnienia komórką jajową.

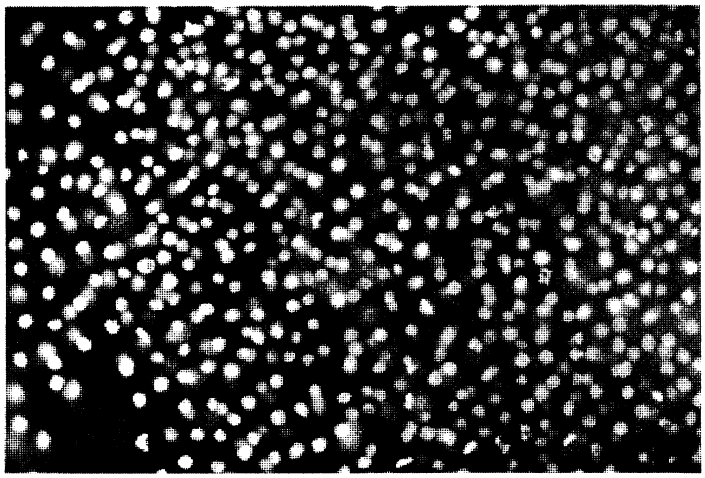
Po zakończeniu procesu dojrzewania następuje owulacja, zwykle 10-30 minut po zniesieniu poprzedniego jajka; pęche-



Rys. 1. Owulacja *in vitro* oocytów przepiórki japońskiej. Z lewej – oocyt w pęcherzyku jajnikowym zawieszony na nitce w pożywce; z prawej – oocyt po owulacji leży na dnie kieliszka



Rys. 2a. Zarodek przepiórki japońskiej otrzymany po zapłodnieniu *in vitro*, stadium IV (widać drobne komórki – blastomery – na całej powierzchni tarczki zarodkowej)

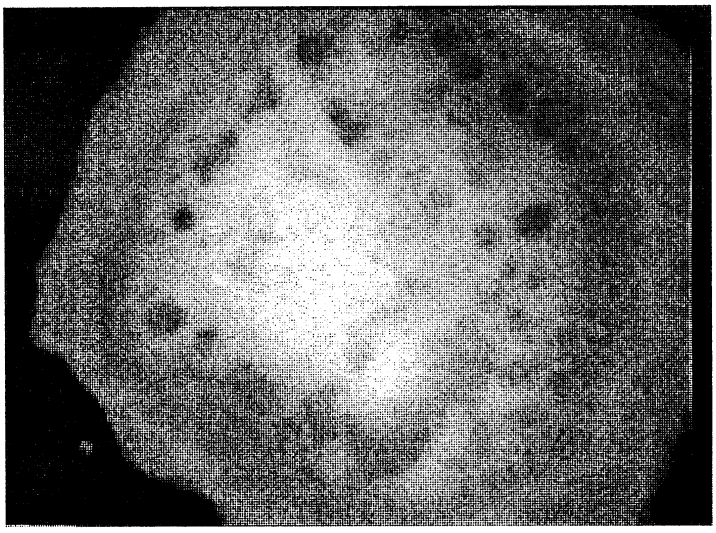


Rys. 2b. Jądra zarodka przepiórki po wybarwieniu barwnikiem fluorescencyjnym DAPI (widoczne pod mikroskopem)

rzyk jajnikowy pęka i jajo wypada do jamy ciała, gdzie jest natychmiast wychwycone przez początkową część jajowodu, czyli lejek (*infundibulum*). Proces ten został odtworzony w laboratorium Zakładu Embriologii Molekularnej IGiHZ w warunkach *in vitro* dla oocytów przepiórki japońskiej (rys. 1), co pozwala na wykorzystanie tej metody do badania mechanizmów owulacji i zapłodnienia.

Po ubiciu samicy w ściśle określonym czasie przed lub po zniesieniu jaja, największe przedowulacyjne oocyty wycina się z jajnika, zawiesza na nitce w kieliszku w pożywce i wstawia do inkubatora (ok. 41°C). Po pewnym czasie, zależnym od momentu ubicia samicy, pęcherzyk jajnikowy pęka i oocyt wypada na dno kieliszka z pożywką; może on być następnie użyty do szeregu doświadczeń, również do prób zapłodnienia *in vitro*.

W warunkach naturalnych, po owulacji, przy obecności plemników w jajowodzie, jajo zostaje zapłodnione w lejku. U ptaków jest to zapłodnienie polispermiczne, to znaczy, że do jaja wchodzi wiele (kilkadziesiąt, a nawet do kilkuset) plemników, w przeciwieństwie do ssaków, gdzie zapłodnienie jest zwykle monospermiczne i do jaja wnika tylko jeden plemnik. U ptaków plemniki mogą wnikać do jaja na całej jego powierzchni, tzn. również na terenie żółtka, choć oczywiście takie plemniki nie biorą udziału w procesie zapłodnienia



Rys. 3. Nie zapłodnione jajo przepiórki japońskiej – na terenie dawnego blastodysku można dostrzec liczne wakuolki, najczęściej położone peryferyjnie wokół grudki zbitej, białawej cytoplazmy

i prawdopodobnie ulegają degradacji. Po wniknięciu plemników do jaja w błonie żółtkowej pozostają dziurki, które można zobaczyć i policzyć pod binokularem, po delikatnym zdjęciu błony i jej oczyszczeniu z żółtka. Na tej podstawie można ocenić, ile plemników wniknęło do jaja i w jakiej okolicy. Najwięcej plemników wnika do jaja na terenie blastodysku, ale tylko jeden z nich będzie brał udział w wytworzeniu jądra zygoty. Pozostałe plemniki migrują ku peryferiom blastodysku, gdzie ulegają degeneracji i prawdopodobnie również degradacji. Dotychczas proces ten nie został dokładnie rozpoznany i właściwie nie było wiadomo, co tak naprawdę się dzieje z nadliczbowymi plemnikami, jakie są ich dalsze losy.

Dopiero w ostatnich trzech latach, w laboratorium IGiHZ w Jastrzębcu, wykryto w oocytach dużą aktywność dwóch enzymów rozkładających DNA: DNazy I i DNazy II. Wiele danych wskazuje na to, że enzymy te biorą udział w rozkładzie nadliczbowych plemników, które wniknęły do jaja na terenie żółtka, a także blastodysku. Zagadką pozostaje, dlaczego ten jeden jedyny plemnik, który bierze udział w utworzeniu jądra zygoty, nie ulega degeneracji tak jak inne. Czy jest to cecha tego specyficznego plemnika, czy też zależy to od jakichś czynników znajdujących się w jaju? Ten właśnie problem stanowi obecnie przedmiot badań i niewątpliwie jest to jedno z kluczowych, nierozpoznanych zagadnień w mechanizmie zapłodnienia u ptaków.

Zapłodnienie *in vitro*

Próby zapłodnienia *in vitro* oocytów ptaka były już przeprowadzane uprzednio przez innych badaczy, jednakże tylko na oocytach owulowanych naturalnie w organizmie samicy i wyjętych z jajowodu po jej ubiciu.

W tym przypadku zapładniane były oocyty owulowane *in vitro*, tak jak to opisano wcześniej. Na owulowane oocyty zanurzone w pożywce nakraplano zawiesinę plemników otrzymywanych od samców przyżyciowo, drogą masażu. Po kilkunastu minutach inkubacji w obecności plemników nadmiar ich odmywano, a oocyty pozostawiano na noc w inkubatorze w 40-41°C, gdyż taka temperatura panuje w jajowodzie samicy. Następnego dnia, po 18-22 godzinach inkubacji, sprawdzano pod binokularem stan zaawansowania rozwoju zarodka (rys. 2a) oraz obecność jąder w komórkach, poprzez wybarwienie barwnikiem fluorescencyjnym (rys. 2b). Początkowo blastomery są całkiem duże i dobrze widoczne, nawet przy małym powiększeniu, pod binokularem (rys. 2a). W miarę postępu-

jących podziałów komórki te stają się coraz mniejsze i w stadium VI przestają już być widoczne przy małym powiększeniu, które można osiągnąć w binokularze.

Stosując tę metodę, w wielu przypadkach (ok. 15%) udało się otrzymać normalne zarodki osiągające stadia IV-VI (wg klasyfikacji rozwoju wewnątrzmacicznego E. Giladi), zawierające jądra komórkowe. Pozostałe oocyty były albo nie zapłodnione (rys. 3), albo o nieprawidłowym obrazie bruzdkowania lub też miały błony uszkodzone nadmiarem plemników. W tym ostatnim przypadku w błonie oocytów występowały dziurki, przez które wyciekało żółtko. W szeregu przypadków (ok. 25%) można było obserwować także pewien abortywny rozwój partenogenetyczny, przy którym następowały wizualnie normalne podziały cytoplazmy, jednak bez towarzyszących podziałów jąder. W rezultacie pod binokularem widać było normalne blastomery odpowiadające stadiom III-IV, lecz po wybarwieniu nie stwierdzano w nich obecności jąder komórkowych.

W rezultacie naszych badań udało się połączyć etap 3 (owulacja oocytu) z etapem 4 (zapłodnienie) i etapem 5a (wczesny rozwój zarodkowy). Przy przedłużeniu okresu inkubacji prawdopodobnie można byłoby pokusić się o otrzymanie zarodków bardziej zaawansowanych w rozwoju. Następnym krokiem, który można by uczynić, jest hodowla tak otrzymanych zarodków w systemie *in vitro* opracowanym przez Margaret Perry (1988), pozwalającym na wylęg żywych piskląt w hodowli *in vitro*. Prawdopodobnie w niedalekiej przyszłości będzie to już możliwe, gdyż niektóre laboratoria i firmy biotechnologiczne pracują w tym kierunku. Opracowanie systemu pozwalającego na owulację *in vitro* oocytów, ich zapłodnienie i hodowlę zarodków umożliwi znaczny postęp w biotechnologii zarodka ptaka oraz dostarczy narzędzia do badania procesów rozrodu u drobiu.

DNA fingerprinting w genetycznej analizie populacji gęsi

Małgorzata Zawadzka, Kazimierz Jaszczak

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Wartość hodowlana zwierząt czy ich genotyp oceniane są powszechnie na podstawie pomiaru cech fenotypowych. Nie zawsze jednak cechy fenotypowe są dobrym wskaźnikiem wartości hodowlanej osobnika. Efektywność analizy genetycznej bazującej na fenotypie z natury nie jest wysoka w przypadku cech o niskiej odziedziczalności. Ponadto pomiary niektórych cech są trudne lub niemożliwe do wykonania, np. odporność na choroby czy cechy ograniczone płcią lub wiekiem. Dziedziczenie poligenowe, częściowa lub całkowita dominancja maskują także fenotypowy efekt ekspresji genów. Charakterystyka fenotypowa podlega przy tym w różnym stopniu modyfikacjom i interakcjom środowiskowym.

Opracowanie metod wykrywania naturalnie występującego polimorfizmu sekwencji DNA, z których część została wykorzystana jako markery genetyczne (wyróżniki cech), stworzyło ogromne możliwości oszacowania wartości hodowlanej osobnika na poziomie molekularnym. Markery genetyczne oparte na polimorfizmie sekwencji minisatelitarnych DNA stanowią obecnie bogate źródło informacji i mogą służyć między innymi do analizy struktury genetycznej populacji. Ich wykorzystanie ułatwia ustalenie, czy w danej populacji lub rasie występują charakterystyczne allele i z jaką częstością. Określenie podobieństwa między osobnikami w obrębie i między populacjami daje możliwość szacowania zmian zachodzących w populacjach podlegających naturalnej czy sztucznej selekcji, jak i dzielącego je dystansu genetycznego.

Wśród stosowanych systemów analizy DNA wyróżnia się metoda fingerprinting. Genomowy DNA wyizolowany z jąder komórkowych różnych tkanek poddawany jest trawieniu różnymi enzymami restrykcyjnymi. Fragmenty tak „pociętego" DNA poddaje się elektroforezie w żelu agarozowym. Rozdzielone fragmenty przenoszone są na filtr nitrocelulozowy lub nylonowy, wg metody Southerna, i hybrydyzowane z sondą molekularną. W wyniku hybrydyzacji otrzymuje się dla badanego osobnika wiele prążków, będących fizyczną reprezentacją sygnału pochodzącego od odpowiednio wyznakowanej sondy związanej z allelami wielu loci na wszystkich chromosomach. Liczba i położenie prążków we wzorze DNA fingerprinting są charakterystyczne dla każdego osobnika (z wyjątkiem bliźniąt jednojajowych oraz osobników wysoko zinbredowanych). Indywidualny wzór DNA fingerprinting jest równie niepowtarzalny, jak układ linii papilarnych człowieka. Stąd też wywodzi się nazwa tej metody testowania DNA. Prążki wchodzące w skład indywidualnego wzoru (allele minisatelitarne) są dziedziczone w prosty mendlowski sposób, po połowie od każdego z rodziców.

W Zakładzie Cytogenetyki Molekularnej IGiHZ PAN w Jastrzębcu technika DNA fingerprinting od kilku lat wykorzystywana jest w kontroli pochodzenia i weryfikacji rodowodowej, a przede wszystkim w analizie struktury genetycznej populacji, linii czy ras zwierząt gospodarskich i laboratoryjnych. Między innymi metoda DNA fingerprinting została wykorzystana do oceny zmienności genetycznej wewnątrz i między odmianami gęsi utrzymywanych w stadach zachowawczych, w porównaniu do populacji gęsi selekcjonowanych i dzikich. Polska należy do nielicznych krajów, gdzie zostało zachowane wiele lokalnych odmian i ras gęsi. Z biologicznego i hodowlanego punktu widzenia zachowanie tych unikalnych zasobów genetycznych jest bardzo ważne, gdyż są to odmiany przystosowane do miejscowych warunków środowiskowych i wykazujące często unikalne kombinacje alleli warunkujące wysoki poziom niektórych cech przydatnych w hodowli (odporność na choroby, mniejsze wymagania pokarmowe, niska zawartość tłuszczu w tuszce). Badaniami DNA fingerprinting objęto odmiany pochodzące od gęsi gęgawy *Anser anser*, tj. podkarpacka, suwalska, pomorska i kartuska, odmiana garbonosa