

MICHALINA DĘBOWSKA

SPERM AND PRIMORDIAL GERM CELLS AS A MODEL FOR INTERPRETATION OF TEST COMPETITION RESULTS

STRESZCZENIE

Zachowanie bioróżnorodności, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania życia całej planety, jest jednym z najistotniejszych problemów ekologów i biotechnologów ostatnich lat. Stosowano różne metody mające na celu zapobieganie utracie cennych zasobów biologicznych m. in. badania dystansu genetycznego pomiędzy różnymi rasami zwierząt czy wykorzystanie pierwotnych komórek płciowych (PGCs) do produkcji chimer płciowych i odnawiania zagrożonych wyginięciem ras zwierząt. Podejmowane są liczne próby poprawy wydajności tych metod.

Celem pracy było określenie wpływu podobieństwa genetycznego kur na wyniki testu kompetencji nasienia i testu kompetencji PGCs.

W pierwszym etapie badań określono dystans genetyczny pomiędzy 4 rasami kur: Transylvanian Naked Neck Black (TNB), Transylvanian Naked Neck White (TNW), Hungarian Speckled (HS) i Zielononóżka kuropatwiana (GP) oraz mieszańcem komercyjnym Tetra SL z wykorzystaniem 8 markerów mikrosatelitarnych rekomendowanych przez FAO/MoDAD Advisory Group (<http://www.fao.org/dad-is>) do badań polimorfizmu u kur. Ponadto wyznaczono także do dalszych badań osobniki łatwo identyfikowalne za pomocą tych markerów.

Następnie wykonano test kompetencji nasienia, który polegał na pobraniu nasienia od osobników ras TNB, TNW, HS i GP, ujednoczeniu koncentracji plemników i inseminacji kur Tetra SL mieszaniną plemników wszystkich ras. Kolejnym etapem było wykonanie testu kompetencji PGCs polegającego na izolacji PGCs z gonad 6-dniowych zarodków dawców (TNB, TNW, HS i GP) i iniekcji ich do krwiobiegu 3-dniowych zarodków biorców (Tetra SL).

W wyniku przeprowadzonych badań określono, że najmniejszy dystans genetyczny występuje pomiędzy populacjami TNB i Tetra SL ($F_{st}=0,1581$). Natomiast najwyższy dystans genetyczny występuje pomiędzy rasami TNB i TNW ($F_{st}=0,3495$). W wyniku testu kompetencji nasienia najwięcej kurcząt otrzymano po kogutach rasy TNB (45,36%), a najmniej po kogutach rasy GP (8,25%). Z kolei w wyniku testu kompetencji PGCs otrzymano najwięcej chimer płciowych posiadających cechy rasy TNB w swoim genotypie (87,10%), a najmniej posiadało cechy rasy GP (38,71%).

Wykazano wpływ dystansu genetycznego na wyniki testu kompetencji nasienia i testu kompetencji PGCs.

2. ROZSZERZONE STRESZCZENIE

10.1 WSTĘP I CEL PRACY

Bioróżnorodność jest to zróżnicowanie wszystkich organizmów żyjących na Ziemi. Obejmuje także różnorodność organizmów na poziomie genetycznym (Primack, 2006). Zróżnicowanie biologiczne jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania życia na całej planecie, stanowi bowiem fundamenty do zrównoważonego życia na Ziemi (Gajda i Smorąg, 2007). Obecnie według World Watch List for Domestic Animal Diversity 390 ras zwierząt (27%) jest zagrożonych wyginięciem. Przyczyną tego zjawiska są zmiany środowiskowe (głównie zwiększanie obszarów przeznaczonych

pod uprawę, a także budowę miast i dróg) oraz wprowadzanie do środowiska preferowanych przez człowieka gatunków (Gajda i Smorąg, 2007).

Naturalne zasoby, jakie posiada Polska, uznawane są za jedne z najbogatszych w Europie. Położenie naszego kraju w centrum kontynentu europejskiego powoduje zróżnicowanie warunków naturalnych i klimatycznych, co w konsekwencji spowodowało występowanie dużej różnorodności gatunków roślin i zwierząt. Kury stanowią najliczniejszą grupę wśród gatunków drobiu a ich mięso stanowi jeden z głównych elementów diety ludzi na całym świecie (Andres i wsp., 2008). Wieloletnia adaptacja i hodowla spowodowały, że istnieje dziś duża różnorodność ras kur (Blackburn, 2006). Jednak narastająca intensyfikacja i globalizacja produkcji drobiarskiej, unowocześnianie metod chowu oraz preferowanie ras o wysokiej wydajności, spowodowały, iż liczba rodzimych ras/odmian drobiu ulegała systematycznemu zmniejszaniu (Calik i Krawczyk, 2006), a ze względu na niską wydajność rodzime rasy i ich cechy mogą zostać utracone (Blackburn, 2006; Groeneveld i wsp., 2010).

Rodzime rasy kur zagrożone są wyginięciem z powodu ich niskiej wydajności. Jednak mięso i jaja pochodzące od tych zwierząt charakteryzują wysokie walory smakowe i dietetyczne. (Calik i Krawczyk, 2006; Krawczyk, 2009; Połtowicz i wsp., 2004; Krawczyk i wsp., 2012). Dodatkowo, w wyniku selekcji wiele ras towarowych utraciło szereg innych, równie ważnych cech, takich jak: niskie wymagania pod względem jakości paszy, zdrowotność, dobre wykorzystanie pasz gospodarskich, odporność na choroby i niekorzystne warunki środowiskowe, długowieczność, wysoka zdolność rozrodcza. Czy instynkt wysiadania i wodzenia piskląt (Kasznicza i wsp., 1987; Brodacki i wsp., 1993; Zgłobica i wsp., 1995; Cywa-Benko, 2002; Calik i Krawczyk, 2006; Krawczyk, 2009). W związku z tym istnieje potrzeba zdefiniowania istniejących populacji kur i opracowania programów naprawczych i ochronnych, tak aby zachować unikalne cechy jakościowe (Notter, 1999; Bruford i wsp., 2003; Toro i wsp., 2008; Groeneveld i wsp., 2010; Kaya i Yildiz, 2008).

Genetyczne zróżnicowanie cech będących przedmiotem zainteresowania hodowców zwierząt i genetyków stanowi podstawę dla przyszłych programów hodowlanych. Najnowsze osiągnięcia w technologii molekularnej dostarczyły nowych możliwości do oceny zmienności genetycznej na poziomie DNA (Kaya i Yildiz, 2008, Goeneveld i wsp., 2009). Wgląd w różnorodność ras kur na całym świecie uzyskano w wyniku badania zróżnicowania genetycznego, z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych w licznych badaniach (Wimmers i wsp., 2000; Berthouly i wsp., 2008; Chen i wsp., 2008). Markery genetyczne są dobrym narzędziem w badaniach nad różnorodnością genetyczną zwierząt gospodarskich. Spośród nich do najczęściej stosowanych należy polimorfizm mikrosatelitarny. Mikrosatelity to proste sekwencje powtórzeń mono-, di-, tri-, tetra- lub pentanukleotydowych jednostek szeroko rozproszone w genomach zwierząt (Tautz, 1989; Weber i Beckmann, 1992). Mikrosatelitarne loci zapewniają dużą powtarzalność i generowanie dużej liczby wykrywalnych alleli (Zhang i wsp., 2002b). Są cennym narzędziem do oceny różnorodności genetycznej i relacji zwierząt gospodarskich, w tym kur, ponieważ wykazują wysoki stopień polimorfizmu, łatwość identyfikacji i mają niskie wskaźniki mutacji (Zhang i wsp., 2002a; Tadano i wsp., 2007; Milligan i wsp., 1994; Zhang i wsp., 2002).

Naturalne zjawisko skutkujące poprawą zmienności genetycznej to konkurencja plemników. Dotyczy ona współzawodnictwa o to, który plemnik zapłodni komórkę jajową. Konkurencja plemników nie jest klasycznie rozumianą w sensie ekologicznym konkurencją, samo współzawodnictwo jednak występuje. W ujęciu biotechnologii rozrodu, testy badające mechanizmy konkurencji między plemnikami nazywane są testami kompetencji nasienia. W naturze, proces zwany konkurencją plemników lub testem kompetencji nasienia zachodzi, gdy samice kopulują z dwoma lub większą liczbą samców podczas pojedynczego cyklu reprodukcyjnego, a plemniki pochodzące od tych samców konkurują między sobą o zapłodnienie komórek jajowych jednej samicy (Rowe i Pruett-Jones, 2011; Parker, 1970).

Chociaż badania dotyczące mechanizmów testu kompetencji nasienia trwają od lat, nie zostało dotąd zbadane istnienie związku pomiędzy wynikami testu kompetencji nasienia a dystansem genetycznym pomiędzy biorącymi w nim udział ptakami. Badania dystansu genetycznego z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych przeprowadzono do tej pory u wielu gatunków zwierząt [konie (Achmann i wsp. 2004); świnie (Rodrigáñez i wsp. 2008); kozy (Siwek i Knol, 2010); niedźwiedź czarny (Paetkau i Strobeck, 1994); ryby (O'Connell i Wright, 1997); kury (Granevitze i wsp., 2007)]. Jak dotąd nie wykonano tego rodzaju badań w powiązaniu z sukcesem zapłodnienia u ptaków. Do tego typu doświadczeń najlepszy może okazać się test kompetencji nasienia. W przypadku testu kompetencji nasienia (o tej samej koncentracji) pochodzących od kilku osobników różnych ras kur, pozwoliłby odpowiedzieć na pytanie czy bliskość genetyczna daje plemnikom przewagę i łatwość w zapłodnieniu komórek jajowych. Ponadto należałoby zadać pytanie czy jeśli istnieje związek między dystansem genetycznym ptaków, a wynikami testu kompetencji nasienia, podobne wyniki uzyska się w odniesieniu do testu kompetencji pierwotnych komórek płciowych (PGCs), prekursorów gamet.

PGCs to komórki prekursorowe dla oocytów i plemników, które mogą być stosowane do produkcji chimer płciowych. PGCs ptaków posiadają niezwykle właściwości: izolowane z krwi lub gonad embrionów dawców i wprowadzone do naczyń krwionośnych embrionów biorców zachowują swoje funkcje biologiczne, a więc migrują do gonad biorcy, ulegają proliferacji i tworzą funkcjonalne gamety (Chojnacka-Puchta i wsp., 2012). Rycina 1 przedstawia PGCs w zarodkach kurzych na różnym etapie rozwoju.

Obecnie poszukuje się metod, które pozwoliłyby na odnowienie ras ptaków zagrożonych wyginięciem. Jedną z najskuteczniejszych metod, dającą coraz lepsze rezultaty jest tworzenie chimer płciowych z wykorzystaniem PGCs (Park i wsp., 2003; Chojnacka-Puchta i wsp., 2012). Istnieje możliwość wprowadzenia PGCs ptaków zagrożonych wyginięciem do zarodków odlegle spokrewnionych, na przykład rdzennych ras drobiu poprzez pierwotny, rozwijający się układ krążenia (Liu i wsp., 2012). Ratowanie populacji zagrożonych gatunków ptaków z wykorzystaniem chimer płciowych może zwiększyć różnorodność genetyczną (Naito i wsp., 2003) i zapewnić efektywne narzędzie do rozmnażania i ochrony zagrożonych gatunków ptaków, które nie mogą rozmnażać się w niewoli (Wernery i wsp., 2010).

Metody produkcji chimer płciowych charakteryzuje coraz większa skuteczność. Zastanawiające jest jednak co ma wpływ na efektywność tworzenia chimer płciowych i w jaki sposób można ją udoskonalić. Wydaje się prawdopodobne, że dystans genetyczny może oddziaływać na zdolność plemników do udziału w produkcji chimer płciowych. Istnieje także przypuszczenie, iż PGCs, które pochodzą od dawcy bliskiego pod względem genetycznym w stosunku do biorcy, mogą mieć przewagę i większą łatwość w migracji do gonad biorcy i tworzeniu funkcjonalnych gamet w porównaniu do komórek osobników, których dystans genetyczny względem biorcy jest znacznie większy.

Badania dystansu genetycznego od lat stosowane są jako technika służąca wspomaganie zachowania bioróżnorodności zwierząt. Natomiast testy kompetencji z wykorzystaniem badań dystansu genetycznego nie były dotąd stosowane (również w kontekście wspomaganie zachowania bioróżnorodności). Wyniki tych badań mogą pomóc w zrozumieniu mechanizmów tego typu zjawisk, a co za tym idzie w ulepszeniu metod zachowania bioróżnorodności takich jak zastosowanie produkcji chimer płciowych w odnawianiu ras zwierząt zagrożonych wyginięciem.

Głównym celem pracy było określenie związku pomiędzy podobieństwem genetycznym ptaków i wynikami testu kompetencji nasienia i PGCs. Wyznaczono także cele szczegółowe, które prowadziły do głównego celu niniejszej pracy:

1. wyznaczenie dystansu genetycznego pomiędzy badanymi rasami kur,
2. określenie wpływu dystansu genetycznego na wyniki testu kompetencji nasienia,

3. określenie wpływu dystansu genetycznego na wyniki testu kompetencji PGCs,
4. określenie związku pomiędzy wynikami testu kompetencji nasienia i testu kompetencji PGCs.

10.2 MATERIAŁ I METODY

Główne etapy przyjętej strategii badawczej to:

1. Określanie dystansu genetycznego pomiędzy populacjami
2. Test kompetencji nasienia
3. Test kompetencji pierwotnych komórek płciowych (PGCs)

Materiał badawczy stanowiły kury i koguty: Transylvanian Naked Neck Black (TNB), Transylvanian Naked Neck White (TNW), Hungarian Speckled (HS), Zielononóżka kuropatwiana (GP) i mieszańca towarowego Tetra SL. Ptaki trzymano w oddzielnych klatkach w systemie oświetleniowym 14L: 10D z dostępem do paszy (komercyjny pokarm dla drobiu) i do wody *ad libitum*.

W badaniu dystansu genetycznego materiał badawczy stanowiła krew pochodząca od 100 osobników ze wszystkich 4 ras i 1 mieszańca towarowego Tetra SL. Krew pobrano za pomocą sterylnej probówki (VACUTEST) zawierającej antykoagulant K2EDTA (1,8mg K2EDTA/ml krwi). Przy użyciu zestawu do oczyszczania DNA MasterPure™ for blood Version II (Epicentre) wyizolowano genomowe DNA z pobranej krwi (zgodnie z procedurami podanymi przez producenta). Jakość DNA określano za pomocą elektroforezy, stosując 1% żel agarozowy zawierający bromek etydyny (0,5 µg / ml). Elektroforezę przeprowadzono w 1 x buforze TBE przy napięciu prądu elektrycznego 70 V przez 60 minut. Żele wizualizowano w świetle UV i archiwizowano za pomocą programu ScionImage (Syngen Biotech). Do oznaczenia czystości i stężenia DNA zastosowano Spektrofotometr NanoDrop 2000, mierząc absorbancję przy 260 nm i 280 nm. Stosunek absorbancji A260 / A280 między 1,8-2,0 uważany jest za wskazanie braku zanieczyszczenia białkiem. Stężenie genomowego DNA w próbce określono w ng / µl.

Następnie przeprowadzono analizę za pomocą 8 markerów mikrosatelitarnych zalecanych przez FAO/MoDAD Advisory Group (<http://www.fao.org/dad-is>) do badania polimorfizmu u kurcząt (FAO, 1998). Wybrane markery scharakteryzowano w Tabeli 1. Primery R (reverse) znakowano barwnikami fluorescencyjnymi (6-FAM, VIC, NED). W celu amplifikacji alleli z wykorzystaniem 8 loci mikrosatelitarnych przeprowadzono reakcję PCR (polimerase chain reaction - reakcja łańcuchowa polimerazy) przy użyciu termocyklera PTC-225 Tetrad (MJ Research). Markery amplifikowano w pojedynczej reakcji PCR i w dwóch różnych typach reakcji "multiplex", w których kilka produktów można amplifikować jednocześnie. W pojedynczej reakcji amplifikowano locus ADL0136. W reakcji tripleksowej amplifikowano loci ADL0158, ADL0176, ADL0267. W reakcji quadripleksowej amplifikowano loci ADL0268, LEI0094, MCW0214 i MCW0248. Wyboru markerów mikrosatelitarnych dla różnych reakcji multipleksowych dokonano biorąc pod uwagę różne temperatury hybrydyzacji starterów i barwników, z którymi znakowano startery.

Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 10 µl (1 µl DNA + 9 µl mastermiks) w 0,2 ml probówkach Eppendorf. Wykorzystano termostabilną polimerazę AmpliTaq GOLD® 360 (Applied Biosystems). Skład mieszanin reakcyjnych do PCR przedstawiono w Tabeli 2. W reakcji PCR zastosowano dwa różne profile temperaturowo-czasowe, które różniły się jedynie temperaturą hybrydyzacji starterów stosowanych w reakcji (Tabela 3). Temperatury przyłączania starterów na etapie amplifikacji dla poszczególnych markerów mikrosatelitarnych przedstawiono w Tabeli 1.

Produkty reakcji PCR (0,5 µl), formamid (9,5 µl) i marker wielkości GeneScan™-350 ROX TM (0,5 µl) (Applied Biosystems) naniesiono na każde z 96 dołków płytki polipropylenowej

MicroSmp™ (Applied Biosystems). Produkty PCR denaturowano w 95 ° C przez 5 minut, a następnie stabilizowano przez natychmiastowe chłodzenie płytki w zimnym bloku przez 5 minut. W ten sposób otrzymano jednoniciowe fragmenty DNA wymagane do elektroforezy kapilarnej. Po schłodzeniu płytkę umieszczono w analizatorze genetycznym ABI Prism™ 100-Avant (Applied Biosystems), wykonano analizę genetyczną i rozdział elektroforetyczny powstałych produktów amplifikacji. Elektroforezę przeprowadzono w 4% żelu poliakrylamidowym - POP 4 (Applied Biosystems). Do zbierania wyników i analizy długości fragmentów wykorzystano oprogramowanie 3100-Avant ABI Prism Data Collection oraz Gene Mapper v.3.5 (Applied Biosystems). Długości alleli określono na podstawie standardu długości GeneScan™-350 ROX™, obejmującego długości: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350 nukleotydów.

Wśród alleli analizowanych z wykorzystaniem 8 loci mikrosatelitarnych zidentyfikowano allele prywatne i wspólne dla wszystkich badanych populacji. Prywatne allele to te, które występują tylko w jednej z badanych populacji (Szpiech i Rosenberg, 2011). Obecność tych alleli w potomstwie otrzymanym po teście kompetencji PGCs daje potwierdzenie chimeryzmu u tych osobników. Następnie zidentyfikowano allele prywatne w celu określenia:

1. ojcostwa (potomstwa otrzymanego po teście kompetencji nasienia),
2. obecności markerów charakterystycznych dla ras (potomstwa otrzymanego po teście kompetencji PGCs).

Allele wspólne to takie, które wystąpiły w co najmniej dwóch badanych populacjach.

Ponadto, w przeprowadzonych badaniach określono parametry statystyczne charakterystyczne dla analizy markerów mikrosatelitarnych. Dla każdej populacji wyznaczono: liczbę alleli, heterozygotyczność oczekiwaną, heterozygotyczność obserwowaną, współczynnik inbredu (inbreeding coefficient – Fis), szacunki Weir'a i Cockerham'a (1984), współczynnik korelacji genetycznej (Fst) (GenePop), PIC (Indeks stopnia polimorfizmu) (Microsatellite ToolKit), dystans genetyczny pomiędzy populacjami (DAS) i wyrysowano drzewo filogenetyczne (UPGMA) (POPULATIONS 1.2.32).

Analiza z użyciem panelu 8 markerów mikrosatelitarnych pozwoliła na wybór odpowiednich dawców i biorców nasienia i PGCs, a także określenie pochodzenia przyszłego potomstwa, zarówno w teście kompetencji nasienia, jak i w teście kompetencji PGCs.

W teście kompetencji nasienia materiałem badawczym było nasienie pobrane od 6 kogutów każdej z 4 ras: Transylvanian Naked Neck Black (TNB), Transylvanian Naked Neck White (TNW), Hungarian Speckled (HS), Zielononóżka kuropatwiana (GP), pobrane za pomocą masażu grzbietowo-brzusznego (Burrow i Quinn, 1937), a także zarodki mieszańca towarowego Tetra SL. Nasienie pobierano dwa razy w tygodniu przez 6,5 tygodnia.

Przed inseminacją, próbki nasienia od wybranych kogutów każdej rasy badano pod kątem koncentracji i stosunku komórek martwych do żywych (przez zabarwienie aniliną lub eozyną) w celu obliczenia liczby plemników różnych ras. Nasienie poddano dalszej analizie pod kątem takich parametrów, jak: objętość, koncentracja [za pomocą spektrofotometru - AccuCell (232) (IMV, Francja)], ruchliwość (z zastosowaniem subiektywnej oceny od 0 do 5 punktów) i nieprawidłowości morfologiczne. Na podstawie uzyskanych danych określono dokładne dawki nasienia dla każdej inseminacji, które zawsze zawierały taką samą liczbę plemników od kogutów różnych ras, a dawka do inseminacji jednej samicy wynosiła 300 milionów plemników.

Uzyskany materiał wykorzystano do inseminacji 12 wybranych kur Tetra SL. Jaja pozyskane z tej procedury zbierano od 2 dnia po pierwszej inseminacji do 2 dni po ostatniej inseminacji. Jaja umieszczano w inkubatorze raz w tygodniu i prześwietlono 7 dnia inkubacji. W celu izolacji DNA i identyfikacji ojcostwa przy użyciu markerów mikrosatelitarnych zebrano krew od uzyskanych kurcząt. Izolację DNA i analizę za pomocą markerów mikrosatelitarnych przeprowadzono w sposób

opisany wcześniej przy wyznaczaniu dystansu genetycznego między populacjami. Ogólny schemat testu kompetencji nasienia przedstawia Rycina 2.

W teście kompetencji PGCs materiał badawczy stanowiły 6-dniowe zarodki uzyskane od 6 kur każdej z ras: Transylvanian Naked Neck Black (TNB), Transylvanian Naked Neck White (TNW), Hungarian Speckled (HS), Zielononóżka kuropatwiana (GP) (dawcy PGCs) oraz 3-dniowe zarodki pochodzące od 12 kur Tetra SL (biorcy PGCs).

W tej części eksperymentu przeprowadzono dwa testy. Pierwszy z nich polegał na iniekcji PGCs każdej z ras osobno – iniekcja PGCs każdej z ras osobno. Drugi test obejmował iniekcję PGCs od osobników wszystkich ras razem – test kompetencji PGCs. W obu testach gonady zostały najpierw wyizolowane za pomocą mikronarzędzi z 6-dniowych zarodków dawców. Otrzymane od poszczególnych osobników gonady każdej rasy rozdrobiono mechanicznie, a następnie umieszczono w 0,5 ml roztworu PBS (- sól fizjologiczna buforowana fosforanem bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}) i inkubowano w temperaturze $37,8^{\circ}C$ z nasyceniem 5% CO_2 przez 1 godzinę. Dzięki temu zabiegowi, w wyniku różnicy ciśnień osmotycznych, PGCs zostały uwolnione z gonad do roztworu. Stężenie komórek ujednociono i przeznaczono do dalszych procedur. Do iniekcji PGCs osobno dla każdej z ras, PGCs pozostawiono w oddzielnych roztworach. W przypadku testu kompetencji PGCs, PGCs połączono do dalszych badań.

Następnie utworzono chimery płciowe przez iniekcję PGCs do krwioobiegu zarodków biorców (Tetra SL). Z niewylężonych piskląt wyizolowano gonady. W przypadku osobników, które się wykluły, po okresie dojrzwania od samców pobrane zostało nasienie, podczas gdy samice skrzyżowano z kogutem Terta SL, a z uzyskanych jaj zebrano blastodermę. W ten sposób zidentyfikowano materiał genetyczny znajdujący się w gonadach lub przenoszony na potomstwo, a zatem zidentyfikowano chimery płciowe.

Genomowe DNA wyizolowano z otrzymanych gonad (zoptymalizowany protokół z użyciem zestawu do oczyszczania DNA MasterPure™ for blood Version II; Epicentre), nasienia (zoptymalizowany protokół z użyciem zestawu do oczyszczania DNA MasterPure™ for blood Version II; Epicentre) i blastoderm (Sherlock AX, A&A Biotechnology). Pochodzenie PGCs w gonadach uzyskanych piskląt (chimerach płciowych) zidentyfikowano na podstawie panelu markerów mikrosatelitarnych. Analizę z użyciem markerów mikrosatelitarnych przeprowadzono w sposób opisany wcześniej przy wyznaczaniu dystansu genetycznego pomiędzy rasami. Ogólny schemat testu kompetencji PGCs przedstawia Rycina 3.

10.3 WYNIKI

Badane kurczęta ($n = 109$) oceniano pod kątem dystansu genetycznego za pomocą 8 markerów mikrosatelitarnych, w odniesieniu do populacji reprezentujących 4 różne rasy rodzime: Transylvanian Naked Neck Black (TNB, $n = 20$), Transylvanian Naked Neck White (TNW, $n = 20$), Hungarian Speckled (HS, $n = 17$), Zielononóżka kuropatwiana (GP, $n = 16$) i jednego mieszańca towarowego Tetra SL ($n = 36$).

W przypadku 8 loci mikrosatelitarnych całkowita liczba alleli wynosiła 54. Największą liczbę alleli (34) wykryto dla rasy HS. W przypadku pozostałych ras wykryto 27, 28 i 29 alleli - odpowiednio dla ras TNB i TNW oraz dla mieszańca towarowego Tetra SL i dla rasy GP. Liczba alleli na locus wahała się od 2 do 6. Wykryto tylko 2 allele dla ras TNB, HS i GP w locus ADL158, dla rasy TNB w locus ADL267, dla rasy TNW w loci LEI094 i MCW248, oraz dla ras TNB i TNW w locus MCW216. Aż 6 alleli zostało wykrytych dla rasy HS w loci ADL136 i ADL268 oraz dla rasy GP w locus ADL176 (Ryc. 4).

Allele prywatne i wspólne zidentyfikowano dla każdej badanej populacji i dla każdego markera mikrosatelitarnego (Tabela 5). Te dwa typy alleli zostały zidentyfikowane w celu ułatwienia

identyfikacji ojcostwa (test kompetencji nasienia) i udziału cech rasy w genotypie (test kompetencji PGCs) uzyskanego potomstwa. W przypadku loci ADL158 i ADL267 wykryto zaledwie 2 wspólne allele. Dla MCW216 znaleziono 3 wspólne allele i 4 dla MCW248. W przypadku ADL136, ADL268 i LEI094 zidentyfikowano 5 wspólnych allele. Aż 6 wspólnych allele zostało wykrytych dla locus ADL176.

W przypadku populacji rasy TNB i mieszańca towarowego Tetra SL zidentyfikowano 3 allele prywatne. 5 alleli prywatnych zostało potwierdzonych dla rasy TNW i HS. Aż 6 alleli prywatnych zostało zidentyfikowanych dla rasy GP. Nie obserwowano żadnych alleli prywatnych dla 2 loci, podczas gdy allele wspólne występowały we wszystkich badanych loci i populacjach. Obecność alleli specyficznych dla populacji (allele prywatne) wskazuje na jej dużą różnorodność genetyczną. Wartości PIC wahały się od 0,32 dla locus MCW216 do 0,58 dla locus ADL176, wskazując na wysoki stopień polimorfizmu w badanych markerach mikrosatelitarnych (Tabela 5).

Wartości korelacji genetycznej (F_{st}) pomiędzy wszystkimi 5 populacjami przedstawiono w Tabeli 6. Wartość F_{st} była najniższa pomiędzy mieszańcem towarowym Tetra SL a rasą TNB (0,1581) i najwyższa pomiędzy rasami TNB i TNW (0,3495), co wskazuje na średnią i wysoką zmienność genetyczną między tymi populacjami. Wysokie wartości F_{st} pomiędzy rdzennymi rasami GP i TNW oraz GP i HS (0,3364 i 0,3060) zostały potwierdzone w Tabeli 7, gdzie określono najwyższe wartości dystansu genetycznego (DAS) między tymi populacjami. Co więcej, szacunki dla mieszańca towarowego Tetra SL i rasy TNB pokazują, że populacje te są blisko spokrewnione w porównaniu z innymi populacjami. Wartości dystansu genetycznego między badanymi populacjami przedstawiono w postaci drzewa filogenetycznego (UPGMA) (Rycina 5).

Miary zmienności genetycznej w badanych populacjach zestawiono w Tabeli 8 i określono za pomocą heterozygotyczności oczekiwanej (H_e) i obserwowanej (H_o) i współczynnika inbredu (F_{is}) dla poszczególnych ras. Mieszańiec towarowy Tetra SL wykazał najwyższą heterozygotyczność oczekiwaną (0,21) i obserwowaną (0,23), podczas gdy najniższą heterozygotyczność oczekiwaną (0,08) i obserwowaną (0,06) stwierdzono rasy HS. Poziom heterozygotyczności odzwierciedlał współczynnik inbredu, który był najniższy w przypadku mieszańca towarowego Tetra SL (-0,05) i najwyższy dla rasy HS (0,27).

Na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnych do dalszych eksperymentów wybrano 36 osobników: po 6 kogutów każdej z ras TNB, TNW, HS i GP oraz 12 kur mieszańca towarowego Tetra SL. Osobniki te zastosowano zarówno w teście kompetencji nasienia jak i teście kompetencji PGCs.

W teście kompetencji nasienia, wybrane kury Tetra SL ($n = 12$) były inseminowane tą samą liczbą plemników pochodzących od kogutów każdej z czterech ras: TNB ($n = 6$), TNW ($n = 6$), HS ($n = 6$), GP ($n = 6$). W okresie inseminacji obliczono parametry oceny nasienia (Tabela 9), w tym: objętość nasienia, ruchliwość, koncentracja, udział żywych, normalnych, zmienionych i martwych komórek, dla 5 losowo wybranych kogutów wszystkich analizowanych populacji. Średnie wartości ruchliwości plemników mieściły się w zakresie od 4,00 dla rasy HS do 4,60 dla rasy TNB. Najlepsze wartości dla objętości i udziału żywych, normalnych plemników uzyskano dla rasy GP (odpowiednio 0,62 ml i 92,10%).

Wyniki kontroli jakości plemników dla każdej badanej populacji w całym okresie inseminacji (12 inseminacji) przedstawiono w Tabelach 10.1-10.4. Dla wskaźnika procentowego udziału normalnych plemników w nasieniu, wszystkie badane rasy wykazały wynik ponad 92,00%. Najwyższa średnia wartość żywych, normalnych plemników charakteryzowała rasę TNB (93,79%), podczas gdy najniższą liczbę żywych, normalnych plemników obliczono dla rasy HS (92,38%). Liczba żywych, zmienionych komórek (inny kształt i rozmiar głowy i ogona plemników, podwójna głowy lub ogon) wahała się od 4,54 dla rasy TNB do 5,46 dla rasy GP. Zarówno wartości komórek żywych, normalnych jak i zmienionych jest dowodem dobrej jakości inseminowanego nasienia.

Dawki inseminacyjne obliczano każdorazowo przed inseminacją, w celu zapewnienia identycznej liczby plemników oddanych z każdej z ras i każda kura inseminowana była liczbą 300 milionów plemników (Tabele 11.1-11.5). Oceniono główne parametry wylęgowe jaj po teście kompetencji nasienia (Tabela 12). Średnie zapłodnienie, określone w wyniku światlenia jaj wyniosło 65,45%. Wylęgowość wahała się od 18,75 do 52,63% i średnio wyniosła 44,09%.

W wyniku przeprowadzonego testu kompetencji nasienia uzyskano 97 piskląt. Tabele 13.1-13.6 przedstawiają wyniki analizy testu kompetencji nasienia. Najwięcej potomstwa otrzymano po kogutach rasy TNB - 44 pisklęta, co stanowiło prawie połowę wyprodukowanego potomstwa (45,36%). Tylko 8 kurcząt (8,25% potomstwa) pochodziło od kogutów rasy GP (Tabela 14).

Szczegółowa analiza testu kompetencji nasienia wykazała, że większość potomstwa pochodziło od 2 kogutów TNB: ID 9594 i 9296 - odpowiednio 17 i 13. Po 5 samcach: ID 9461 (TNB), 8443 (TNW), 15688 (GP), 15692 (GP) i 15695 (GP), nie uzyskano piskląt. Najwięcej kurcząt pochodziło od 3 kur Tetra SL: 20 po ID 15707, 18 po 15709 i 17 po 15710. Tylko 2 osobniki potomstwa pochodziły od 2 kur Tetra SL: ID 15706 i 15724 (Tabele 13.1-13.6).

Rodziców wybranych po analizie loci mikrosatelitarnych wykorzystano także do iniekcji PGCs każdej z ras osobno oraz w teście kompetencji PGCs. Tabela 15 przedstawia wyniki analizy iniekcji PGCs każdej z ras osobno. Najwięcej potomstwa pochodziło od kogutów rasy TNB (5 kurcząt). Nie uzyskano potomstwa po kogutach rasy HS.

Wyniki testu kompetencji PGCs przedstawiono w Tabelach 16.1-16.3. Spośród 61 osobników uzyskanych w tym doświadczeniu 39 zostało potwierdzonych jako chimery płciowe. Z tych ptaków u większości chimer zidentyfikowano markery mikrosatelitarne charakterystyczne dla rasy TNB, a najmniejsza liczba chimer miała markery mikrosatelitarne charakterystyczne dla rasy GP. U 27 chimer płciowych (87,10%) zidentyfikowano markery mikrosatelitarne charakterystyczne dla rasy TNB, i 12 (38,71%) chimer płciowych posiadało markery mikrosatelitarne charakterystyczne dla rasy GP (Tabela 17).

Analizowane DNA pochodzące od uzyskanego w teście kompetencji PGCs potomstwa otrzymano z 3 różnych źródeł: gonad, nasienia lub blastoderm. Najwięcej prób DNA (27) pochodziło z gonad, a 20 (74,07%) z tych osobników stanowiły chimery płciowe, co stanowiło 64,52% wszystkich chimer płciowych. 13 prób DNA pochodziło z blastoderm, a 10 z nich (76,92%) było chimerami płciowymi. Stanowiło to 32,26% wszystkich chimer płciowych. Najmniej prób DNA (5) pochodziło z nasienia i 1 z nich (20,00%) była chimera płciową, co stanowiło 3,23% wszystkich chimer płciowych (Tabela 18).

10.4 DYSKUSJA

W obrębie 8 badanych loci mikrosatelitarnych kur z ocenianych populacji wykryto 54 różne allele. Liczba ta wskazuje, że zastosowane w tym badaniu markery były wysoce informatywne. Największą liczbę alleli wykryto dla rasy HS (34). Średnia liczba alleli na populację w tej rasie wynosiła 4,25. Z drugiej strony najmniejszą liczbę alleli (27) i najniższą średnią liczbę alleli na populację (3,38) wykazano dla ras TNB i TNW. Bodzsar i wsp. (2009) przebadali 9 populacji węgierskich ras rodzimych, a spośród wszystkich badanych kurcząt, rasa HS również miała najwyższą średnią liczbę alleli na populację (4,2). Najniższy wynik średniej liczby alleli na populację wykazano również dla ras TNB i TNW i wynosił 2,9. Wyniki te wskazują, że rasa HS była najbardziej zróżnicowana ze wszystkich badanych populacji.

W badaniu 52 europejskich populacji kur, Hillel i wsp. (2003) przeanalizowali rasę GP i Transylvanian Naked Neck. W przypadku Transylvanian Naked Neck uzyskali średnią liczbę alleli na locus na poziomie 4,0, a dla rasy GP liczba ta wynosiła 3,5.

W niniejszych badaniach, ze wszystkich analizowanych loci, dla locus ADL136 wykryto najwyższą liczbę różnych alleli (10). Kaya i Yildiz (2008) analizowali tureckie rasy kur i uzyskali podobne wyniki. Spośród wszystkich analizowanych loci, locus ADL136 posiadał również największą liczbę alleli (12).

W badaniach własnych średnia liczba alleli we wszystkich loci mikrosatelitarnych wynosiła 6,75. Barker (1994) zalecił, aby w badaniach dystansu genetycznego stosowano markery mikrosatelitarne, które mają średnią liczbę alleli powyżej 4, co pozwala zredukować SE w szacunkach dystansu genetycznego. W niniejszym badaniu 3 z 8 loci miało średnią liczbę alleli wyższą niż 4. Wimmers i in. (2000) zasugerowali, że stosowanie mieszaniny wysoce i mniej zmiennych markerów mikrosatelitarnych powinno zmniejszyć ryzyko przeszacowania zmienności genetycznej, które może wystąpić, gdy stosowane są tylko wysoce zmienne markery. Dla 4 kolejnych markerów (ADL176, ADL268, LEI094 i ADL267), zidentyfikowano 8 i 9 różnych alleli. Wszystkie inne markery (ADL158, MCW216 i MCW248) miały co najmniej 3 różne wykryte allele. Wyniki te wskazują, że zastosowane markery są bardzo dobrym narzędziem do badania dystansu genetycznego.

W badanych populacjach analizowano liczbę alleli prywatnych i wspólnych (Tabela 5). Markery stosowane w tym badaniu mogą być uznane za bardzo znaczące dla identyfikacji dystansu genetycznego, bowiem zaobserwowano 21 alleli prywatnych w 5 analizowanych populacjach. Wykryto co najmniej 3 allele prywatne dla każdej populacji ptaków. Największą liczbę alleli prywatnych zidentyfikowano dla rasy GP (6) oraz ras TNW i HS i mieszańca towarowego Tetra SL (5). GP jest rodzimą rasą polską i wykryto u niej najwyższą liczbę alleli innych niż te występujące u węgierskich populacji kur, uzyskane wyniki były więc oczekiwane. Dla każdego locus zidentyfikowano co najmniej 2 allele wspólne. Ponadto zidentyfikowano aż 6 alleli wspólnych dla locus ADL176.

Hillel i wsp. (2003) odkryli 1 allel prywatny w rasie GP, który był obserwowany u ponad 10% osób tej populacji. W przypadku rasy Transylvanian Naked Neck nie znaleziono żadnych alleli prywatnych. W eksperymencie Siwek i wsp. (2010), 2 rasy kurcząt (White Leghorn i GP) analizowano za pomocą 9 markerów mikrosatelitarnych. W przypadku rasy GP zidentyfikowano 19 alleli prywatnych i 29 alleli wspólnych z rasą White Leghorn. Najwięcej alleli prywatnych zaobserwowano dla locus ADL176 (5).

W badaniach własnych obecność alleli prywatnych w analizowanych populacjach pokazuje, że populacje doświadczalne charakteryzowały się znaczną różnorodnością genetyczną. Potwierdza to fakt, że badany materiał ma odpowiednią strukturę genetyczną do przeprowadzenia podjętych badań.

Jak donosi Botstein i wsp. (1980), $PIC > 0,50$ oznacza locus wysoce informatywny, PIC pomiędzy 0,25 a 0,50 wskazuje na locus umiarkowanie informatywny, a gdy PIC jest mniejsze niż 0,25, wskazuje na locus słabo informatywny. 3 loci mikrosatelitarne użyte w niniejszym badaniu wykazały wysoki stopień polimorfizmu, a wartości PIC dla loci ADL176, ADL267 i ADL268 były wyższe niż 0,5, co wskazuje, że są to loci wysoce informatywne. W przypadku pozostałych markerów (ADL136, ADL158, LEI094, MCW216 i MCW248) wartości PIC wynosiły od 0,32 do 0,48. Wartości te reprezentują umiarkowanie informatywne loci.

Kaya i Yildiz (2008) badali 5 populacji 2 ras tureckich za pomocą 10 markerów mikrosatelitarnych. Uzyskana wartość PIC była najwyższa dla loci ADL176 i ADL136 (odpowiednio 0,835 i 0,830), a średnie wartości PIC uzyskano dla: ADL 157 (0,546), ADL267 (0,687) i ADL268 (0,5790). Wyniki te również wskazują, że wymienione loci są wysoce informatywne.

Wartości F_{st} w badaniach własnych wskazują natężenie przepływu genów między populacjami i ocenia genetyczną odległość między populacjami. Najniższa wartość oznacza najmniej oddalone pod względem genetycznym rasy. W tym badaniu reprezentowana była przez mieszańca towarowego Tetra SL i TNB (0,1581). Z drugiej strony, najwyższa wartość F_{st} oznacza najbardziej

różne pod względem genetycznym populacje. W tym badaniu reprezentowana była przez rasy TNB i TNW (0,3495) (Tabela 6). Wszystkie uzyskane wyniki można interpretować jako wysokie (0,15-0,25) i bardzo duże ($> 0,25$) zróżnicowanie genetyczne między analizowanymi populacjami.

Bodzsar i wsp. (2009) wykazali podobne wyniki w swoich badaniach. Dla współczynnika korelacji genetycznej (F_{st}) między rasami TNB, TNW i HS najwyższą wartość zaobserwowano między rasami TNB i TNW (0,194). F_{st} pomiędzy rasami TNB i HS wynosił 0,182, a między rasami TNW a HS - 0,136. Rycina 6 pokazuje drzewo filogenetyczne 27 populacji na podstawie odległości MEK uzyskane przez Bodzsar i wsp. (2009), rasy TNB, TNW i HS zostały oznaczone (Ryc. 5). W rezultacie można zauważyć, że TNB i TNW były bardziej oddalone od siebie niż od rasy HS. Gałąź rasy HS leży pomiędzy gałęziami ras TNB i TNW.

Jedną z najbardziej odmiennych populacji były rasy GP i TNW oraz GP i HS. Wyniki te znalazły potwierdzenie w wartościach dystansu genetycznego (DAS) w Tabeli 7, które były najwyższe dla tych par populacji. Wysokie wartości dystansu genetycznego (DAS) reprezentują najbardziej oddalone pod względem genetycznym rasy.

Drzewo filogenetyczne skonstruowano przy użyciu wartości dystansu genetycznego (DAS) z Tabeli 7 i metody UPGMA, co zostało zilustrowane na Rycinie 5. Wykazano wyraźne oddzielenie rasy GP od reszty populacji. Taki wynik był spodziewany, ponieważ GP jest polską rasą rodzimą, a reszta to populacje węgierskie.

W niniejszym badaniu oszacowano parametry zmienności genetycznej w analizowanych populacjach: heterozygotyczność oczekiwana (H_e) i obserwowana (H_o) i współczynnika inbredu (F_{is}) (Tabela 8). Wszystkie miary były statystycznie znacząco różne od "0". Dla heterozygotyczności oczekiwanej i obserwowanej najwyższe wartości wykazano dla mieszańca towarowego Tetra SL (odpowiednio 0,21 i 0,23), a najniższe dla rasy HS (odpowiednio 0,08 i 0,06). Oznacza to, że najwięcej heterozygot oznaczono w populacji Tetra SL, a najmniej w populacji HS. Niewielkie, nieistotne statystycznie różnice pomiędzy heterozygotycznością oczekiwaną i obserwowaną wskazują, że populacje miały wysoką zgodność z współczynnikiem równowagi Hardy'ego-Weinberga.

Bodzsar i wsp. (2009) zaobserwowali najwyższe wartości dla heterozygotyczności oczekiwanej i obserwowanej dla ras TNB, TNW i HS. Najwyższe wartości wykazano dla rasy HS (odpowiednio 0,55 i 0,54). W przypadku rasy TNB wartości te wynosiły 0,44 i 0,44, a dla rasy TNW odpowiednio 0,49 i 0,51. Siwek i wsp. (2010), w analizie loci mikrosatelitarnych dla rasy GP uzyskano wyniki dla heterozygotyczności obserwowanej 0,53. Najwyższe wartości dla heterozygotyczności oczekiwanej i obserwowanej dla rasy GP (odpowiednio 0,44 i 0,51) zaobserwowali również Granevitze i wsp. (2007), którzy przeanalizowali 65 populacji kurcząt z zastosowaniem 29 markerów mikrosatelitarnych. Różnice w otrzymanych wynikach badań własnych oraz innych badaczy mogą wynikać z zastosowania różnych loci mikrosatelitarnych.

Współczynnik inbredu charakteryzuje miarę chowu wsobnego z zastosowaniem współczynnika heterozygotyczności oczekiwanej i obserwowanej. Tylko dla mieszańca towarowego Tetra SL wartość F_{is} była mniejsza niż "0". Wynik ten był istotny statystycznie i oznacza, że w populacji występował nadmiar heterozygot, który może być wynikiem selekcji lub *efektu wąskiego gardła* (kolonizacja z małą liczbą osobników). W przypadku pozostałych populacji wartości F_{is} były większe niż "0". Wyniki te były istotne statystycznie co jest efektem chowu wsobnego, dryfu genetycznego (przypadkowego utrwalenia lub eliminacji części alleli i zmiany ich częstotliwości), obecności selekcji płciowej, sprzężenia loci, które są spowodowane nadmiarem homozygot w populacji. Tetra SL to mieszaniec towarowy utworzony przez krzyżowanie ras nieśnych, a pozostałe rasy są rodzime. W tym ujęciu można było oczekiwać takich wyników F_{is} dla badanych populacji.

W teście kompetencji nasienia podczas całego okresu inseminacji kontrolę jakości nasienia przeprowadzono dla wszystkich ras użytych w tym badaniu. Wyniki tej kontroli wykazały, że nasienie

kogutów z każdej rasy miało wysoki udział żywych, normalnych komórek. Średnia wartość wahała się od 92,38% dla rasy HSH do 93,79% dla rasy TNB (Tabela 10.1-10.4). Było to kolejnym potwierdzeniem bardzo dobrej jakości nasienia pochodzącego od kogutów ras użytych w tym doświadczeniu.

W Tabeli 12 przedstawiono wyniki wylęgu, które obejmowały 6 powtórzeń (nakładów). Całkowita liczba jaj nałożonych wynosiła 220, z czego kurczęta wylęzione stanowiły 44,09% (97 kurcząt). Przyczyną niskiej wylęgowości może być przestarzała i mniej skuteczna wylęgarnia laboratoryjna. Po teście kompetencji nasienia przeprowadzono analizę ojcostwadła trzymanego potomstwa. Uzyskano 44 pisklęta (45,36%) po kogutach rasy TNB, 14 (14,43%) - rasy TNW, 31 (31,95%) - rasy HS i 8 - rasy GP (8,25%) (Tabela 14).

Po przeprowadzeniu iniekcji PGCs każdej z ras osobno, najwięcej piskląt (5) uzyskano od rasy TNB, 2 pisklęta pochodziły od rasy TNW i 1 od rasy GP. Nie otrzymano piskląt od rasy HS. Wynik ten sugeruje, że najlepszą kombinacją biocy i dawcy PGCs dla kur mieszańca towarowego Tetra SL jako biocy jest rasa TNB jako dawca PGCs. 61 piskląt wylęgło się po teście kompetencji PGCs (Tabela 15). DNA pochodzące od tego potomstwa wyizolowano z 3 różnych źródeł: gonad, blastoderm, nasienia. 87,10% powstałych piskląt (27) posiadało allele prywatne pochodzące od rasy TNB, co stanowiło najwięcej ze wszystkich otrzymanych piskląt. Najniższa liczba potomstwa posiadała allele prywatne od rasy GP, co stanowiło 38,71% (12) wszystkich otrzymanych piskląt (Tabela 17). Wyniki testu kompetencji PGCs wskazują, że rasa może mieć wpływ na wyniki produkcji chimery płciowych. W tym przypadku najlepszą rasą do produkcji chimery z zarodkami mieszańca towarowego Tetra SL jest rasa TNB.

Siwek i in. (2010) potwierdzili, że markery mikrosatelitarne, a zwłaszcza allele prywatne są preferowaną metodą w tego rodzaju badaniach. Siwek i in. (2010) badali 5 różnych tkanek w celu rozpoznania chimer (gonady, mięsień piersiowy, mięsień udowy, serce i wątroba). W oparciu o analizę rozpoznawania tkanek jako "chimeryczne" najwyższy wskaźnik chimeryzmu zaobserwowano w gonadach. Z drugiej strony, w oparciu o analizę zliczania każdego allele prywatnego (liczba allele prywatnych w tkankach przekroczy liczbę tkanek uznawanych za "chimeryczne"), zaobserwowano drugi najwyższy wskaźnik chimeryzmu (po wątrobie) w gonadach. Wyniki te wskazują, że gonady są bardzo dobrym źródłem DNA stosowanym do rozpoznawania chimer w analizie markerów mikrosatelitarnych.

Porównanie dystansu genetycznego i testu kompetencji nasienia i PGCs podsumowano w Tabeli 19. Większość piskląt w teście kompetencji nasienia pozyskano od kogutów rasy TNB, a najwięcej piskląt pochodzących z testu kompetencji PGCs posiadało allele prywatne od rasy TNB. Najniższą liczbę piskląt w teście kompetencji nasienia uzyskano od kogutów rasy GP oraz najniższa liczba uzyskanych w teście kompetencji PGCs piskląt miała allele prywatne od rasy GP. Wyniki badań dystansu genetycznego jak i wyniki testów kompetencji pozwalają stwierdzić, że dystans genetyczny ma duży wpływ na wyniki zarówno testu kompetencji nasienia, jak i testu kompetencji PGCs.

10.5 WNIOSKI

1. Określono wpływ dystansu genetycznego na wyniki testu kompetencji nasienia. Im mniejszy dystans genetyczny pomiędzy kurami i kogutami pochodzącymi z populacji biorących udział w teście kompetencji nasienia, tym większy udział kurcząt otrzymanych od kogutów danej rasy. Rasa TNB była najmniej oddalona pod względem genetycznym od mieszańca towarowego Tetra SL ($F_{st}=0,158$) i w teście kompetencji nasienia koguty tej rasy dały najwięcej potomstwa (44 osobniki – 45,36%). Rasa GP była najbardziej oddalona pod względem genetycznym od mieszańca towarowego Tetra SL ($F_{st}=0,247$) i

w teście kompetencji nasienia koguty tej rasy dały najmniej potomstwa (8 osobników – 8,25%).

2. Określono wpływ dystansu genetycznego na wyniki testu kompetencji PGCs. Im mniejszy dystans genetyczny pomiędzy kurami i kogutami pochodzącymi z populacji biorących udział w teście kompetencji PGCs, tym większy udział chimer płciowych pochodzących od danej rasy. Rasa TNB była najmniej oddalona pod względem genetycznym od mieszańca towarowego Tetra SL ($F_{st}=0,158$) i w teście kompetencji PGCs otrzymano najwięcej chimer płciowych, u których zidentyfikowano markery charakterystyczne dla tej rasy (27 osobniki – 87%). Rasa GP była najbardziej oddalona pod względem genetycznym od mieszańca towarowego Tetra SL ($F_{st}=0,247$) i w teście kompetencji PGCs otrzymano najmniej chimer płciowych posiadających markery charakterystyczne dla tej rasy (12 osobników – 39%).
3. Stwierdzono podobieństwo wyników uzyskanych w teście kompetencji nasienia i teście kompetencji PGCs.