

體細胞 融合에 의한 닭의 遺傳因子究明에 관한 研究

鄭 鎰 鉉

農村振興廳 畜産試驗場

(1989. 3. 9 接受)

Identification of Gene Locus by the Somatic Cell Hybridization in Chicken

I. C. Cheong

Livestock Experiment Station, R.D.A.

(Received March 9, 1989)

SUMMARY

This experiment was conducted to improve the performance of chickens by the precise separation and analysis of chromosomes which are integrated genetic materials, and by the use of gene manipulation techniques. Following are the main results obtained.

1. When the chromosomes were separated through the leucocyte culture and analyzed by Giemsa banding techniques (especially by the method in which 20 layers of banding patterns could be found in chromosome #1), the normal patterns of chromosomes #1-9 and sex chromosomes, and the location of constitutive heterochromatin without any gene activities in all chromosomes were discovered.
2. To utilize the primordial germ cells (PGC) as the genetic vector which is one of the most important gene manipulation techniques, PGC's from triploid were transplanted to normal host embryos. Since the donor PGC's(3n) were found in the gonads of growing host embryos gene manipulation in poultry using PGC's seemed to be possible.

I. 緒 論

家畜의 生産能力 增進에 관한 遺傳育種學 研究는 1960年代이래 단순한 交配方法과 確率 統計에 근거한 選拔에서 1970年代에 들어서 遺傳物質의 本질인 染色體를 細胞遺傳學段階로 발전하여 1980年代에서는 遺傳因子 즉 DNA의 構成을 究明하고 이를 인위적으로 조작하는 分子遺傳學, 遺傳工學 段階에서 研

究가 進행되어지고 있다. 그러나 家畜을 위시한 高 登動物들은 유전물질의 구성이 복잡하고 기능이 다양하기 때문에 유전적인 기본 기전을 구명하고 이들을 인위적인 조작(manipulation)을 통하여 생산능력 증진에 성공적인 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 세대간격이 짧고 材料의 利用이 간편한 닭을 利用한 研究는 다른 家畜에 비하여 상당히 앞서 있으며 닭의 細胞遺傳學에 관한 최근 研究結果를 살펴 보면

Bitgood 등(1981, 1982)이 정상적인 닭의 染色體에서 染色體 서로간에 遺傳物質이 轉位(translocation)된 사실을 밝혔고 Pollack과 Fechheimer(1981)가 유전자의 작용이 거의 없는 染色體內的 단백질인 heterochromatin의 位置와 頻度を C-banding 방법으로 染色體別로 조사하였다.

Shoffner(1981)는 DNA와 non-histon protein의 상호작용에서 나타나는 G-banding 방법으로 Z性 染色體의 卵殼色에 관여하는 protoporphyrin(Pr) 유전자와 1번 染色體의 short arm에 blue agg(o)의 유전자가 위치하는 座位(Locus)를 밝혔는데 이와같이 banding 방법에 의한 遺傳物質의 규명은 물론 染色體의 marker와 능력간의 관계가 서서히 밝혀지고 있는 단계이다. 더욱 정확한 遺傳因자의 위치를 구명 조작하는 分子遺傳學의 研究에서 體細胞融合(Somatic cell hybridization)기술이 이용되어 Kao(1973)가 Adenine enzyme이 없는 Chinese Hamster 細胞와 정상 닭의 細胞間 融合에서 닭의 染色體 7번은 Adenine Synthesis A(Ade-A) 유전자 그리고 染色體 8번은 Adenine Synthesis B(Ade-B)의 유전자를 가지고 있음을 밝혔고 Kit 등(1974)과 Leung 등(1975)은 Thymidine Kinase에 관한 유전자가 닭의 Microchromosome 중 하나에 위치하고 있음을 보고 하였으며 Hughes 등(1979)은 Globin gene α^A , α^D , β 그리고 ρ 가 2개의 染色體에 그리고 3種類의 Estrogen inducible gene이 3개의 染色體에 위치한다는 개략적인 결과를 밝혔다. 위와같이 밝혀진 遺傳因자를 조작하는 연구로서 Perucho 등(1980)은 Restriction enzyme 과 Plasmid(pBR322)를 利用하여 닭에서 Thymidine Kinase gene을 분리하였고 Shoffner와 Guise(1984)는 genetic vector로서 primordial germ cell(PGC)을 이용할 수 있음을 밝혔으며 McKnight 등(1983)은 닭의 Transferrin 유전자를 생쥐의 受精卵 雄性前核(Male pronucleus)에 주입시켜서 30%의 후대에서 닭의 DNA sequence를 발견하였다고 보고하였다. 또한 Schuman 등(1984)은 retro virus를 vector로 하여 닭의 受精卵에 遺傳物質을 주입해서 4%의 후대에서 移植된 genetic marker를 발견하였다. 이러한 다양한 研究結果들에서 染色體分析, 遺傳子의 位置 究明 그리고 遺傳子의 移植 등 3段階가 家畜改良의 집약된 過程로 알 수 있으며 어느 단계에서든지 能力改良의 근원을 究明할 수 있는 가능성은 무한하다고 판단된다.

따라서 本 研究은 精確한 染色體 分析으로 특정 유전자의 위치를 精確히 究明하고 유전자 이식 방법인 PGC system의 실용 가능성을 밝혀 닭의 能力改良을 꾀하고자 한 것이다.

II. 材料 및 方法

1. 染色體 分析(Chromosome analysis)

Otis(1984)의 분리방법으로 닭의 染色體를 분리한 후 染色體 分析을 위한 Giemsa banding은 Wang(1980)의 方法에 따라서 그리고 constitutive heterochromatin을 染色하는 C-banding을 Summer(1972)의 方法을 수정하여 실시하였다.

가. 白血球 培養(Leucocyte culture)

10cc의 heparinized 혈액을 채취한 후 10분간 500rpm의 원심분리로 백혈구를 분리하고 Table 1에 제시한 배양액에 37.5℃에서 71시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.05% Colchicine 0.05cc를 添加 후 30분~1시간 배양하여 1,000RPM/10분의 원심분리로 배양액을 제거하고 5cc의 0.75M KCl 용액으로 伸長 處理한다. 이때 신장액은 한 방울씩 서서히 添加시켜야 되고 20분동안 37.5℃에서 靜치시킨 후 1,000rpm/10분의 원심분리로 제거한다. 그리고 Methanol과 acetic acid(3:1)의 혼합용액인 固定液을 한방울씩 서서히 5cc 添加한 후 1,000rpm/10분의 원심분리로 용액을 제거하고 1cc의 정액을 다시 添加하여 slide에 도말시킨다.

Table 1. Ingredients of complete culture medium

	Chemicals	Volume, cc
Media	McCoy 5A	100
	Glutamin	1.0
	Antibiotic-antimycotic	1.0
Mitogen	Pokeweed	1.0
	Calf serum	10

나. Giemsa banding

3~7일간 건조시킨 slide를 실온(20~25℃)에서 pH 7.0의 0.25% Trypsin(1:250) 용액에 1~2분 30초 처리한 후 0.9% NaCl 용액에 1회 그

리고 멸균 증류수에 2회 씻은 다음 건조시킨다. 그리고 5% Giemsa 용액에 4~6분동안染色을 한다. 이때 Trypsin 處理時間과 Giemsa 染色時間은 slide의 狀態와 染色體分離 技術에 따라서 차이가 있으므로 최초에는 동일 Slide중 1~2개를 통해서 적정시간을 판단해야 한다.

다. C-banding

3~7일간 건조시킨 slide를 0.2N HCl 용액에 1시간동안 실온에서 처리한 후 HCl 용액을 깨끗이 씻어내고 41℃에 미리 준비된 5% Ba(OH)₂ 용액에 2분간 침적시킨다. Ba(OH)₂를 흐르는 수도물에서 완전히 씻어내고 0.05N HCl 용액에서 30분간 다시 Ba(OH)₂를 제거시킨 다음 60℃에 준비된 2X SSC 용액(0.3M NaCl + 0.03M Na citrate)에 1시간동안 處理한다. 이후 2X SSC 용액을 멸균 증류수로 2회 씻어서 제거하여 slide를 乾燥시키고 5% Giemsa 染色液에 1~1.5시간동안 染色시킨다.

2. 體細胞融合(Somatic cell hybridization)

Davidson 등(1976)이 제시한 方法을 수정하여 아래와 같이 실시하였다. 10일간 37.5℃에서 배양된 胚芽로부터 얻은 닭의 fibroblast와 Thymidine kinase의 作用이 없는 mouse cell (TK⁻)을 Dulbeccos Modified Eagle's Medium(DMEM)으로 만든 complete medium에 배양시켜서 전체 細胞가 80% 이상 culture flask에 달라 붙었을때 Trypsinization으로 cell을 culture flask의 表面에서 분리시킨다. 이때 혈구계산판으로 細胞의 용적을 제한하여 donor cell인 닭 細胞 10⁶ 그리고 host인 TK⁻ mouse cell 10⁵을 plastic tissue culture disk에 包含시킨다. 그 후 10cc의 complete medium으로 37.5℃에서 24시간 배양하고 medium을 제거한 후 3cc의 50% polyethylen glycol (PEG)을 添加하여 1분간 정치한다. 그리고 즉시 PEG를 제거하고 serum이 없는 DMEM 용액으로 細胞를 2회 씻어낸다. 다시 5cc의 complete medium을 添加시켜서 24시간 배양한 후 Trypsinization으로 細胞를 分離하여 5개의 culture disk에 1cc씩 細胞가 담긴 용액을 分離한다. 각 culture disk에 5cc의 30% HAT medium을 添加시키고 그 후 3~4일마다 HAT medium을 갈아준다.

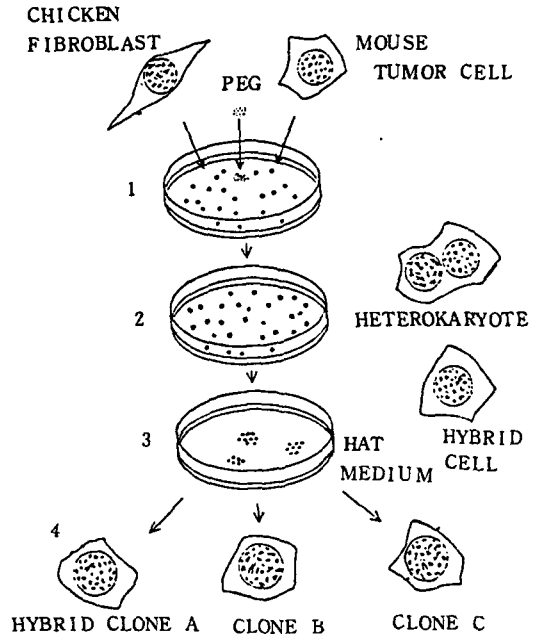


Figure 1. Feature of somatic cell hybridization

○ HAT medium ; Hypothathine (1×10^{-4} M), Aminopterin (4×10^{-7} M), Thymidine (1.6×10^{-3} M) 용액과 complete medium을 3 : 97로 희석.

3. 遺傳子操作의 vector로서 PGC system

Primordial germ cell을 이용한 遺傳子 傳達體(vector)의 研究는 Shuman (1981)의 方法을 보완하여 다음과 같이 실시되었다.

가. PGC의 分離

Genetic marker를 가지는 3배체 RIR(3n) × WL (2n)에서 3배體의 受精卵를 얻어서 24~30시간 37.5℃에서 배양 후 배아를 분리한다. 분리된 胚芽의 germinal crescent에서 PGC를 함유하는 somatic cell을 분리한 후 37.5℃에서 4시간 배양하면 somatic cell은 culture flask의 表面에 달라붙고 PGC는 배양액에 잔류하고 있어 쉽게 PGC만을 분리할 수 있다.

나. PGC의 移植

정상적인 染色體像을 가진 host 개체를 近交係數가 제일 낮은 New Hampshire에서 受精卵를 채취하여 28~30시간 배양한 후 수정란의 暵단부에서 1/4

경도 아래부분에 5 × 5 mm의 난각을 파각시킨다. Stereomicroscope에서 germinal crescent를 확인하여 micropipette으로 5 ml의 donor PGC를 서서히 주입시킨다. 이후 즉시 파각된 부분을 밀봉한다.

다. Host embryo에서 donor의 genetic marker 확인

8~10 동안 donor PGC가 移植된 host受精卵을 배양한 후 파각하여 성장중인 배아로부터 性腺(gonad)을 分離한다. 분리된 성선은 0.45% sodium citrate 용액에서 10분간 정치시킨 후 50% acetic acid에 고정시켜서 chromosome slide를 만든다.

III. 結果 및 考察

1. 染色體 分析

遺傳物質의 總合體인 染色體의 分離 및 分析은 遺傳學 研究의 가장 기본적인 단계임은 물론 遺傳物質을 인위적으로 다룰 수 있는 기초적인 段階이다. 정상적인 닭의 染色體像은 Fig. 2에 표시된 바와 같이 38雙(2n) 76개의 常染色體와 性染色體1雙(♀ ZW♂ ZZ)으로 합 78개이며 Fig. 3에서 크기의 순서로 나열한 核型(Karyotype)은 染色體 1~5번까지는 Macrochromosome, 6~10번까지를 Intermediate chromosome, 점의 狀態로 나타나는 15~37번은 Microchromosome 으로 분류된다.

앞에서 제시된 染色體像은 細胞分裂 과정에서 Prometaphase의 것이며 이들을 形態로 區分할 때 染色

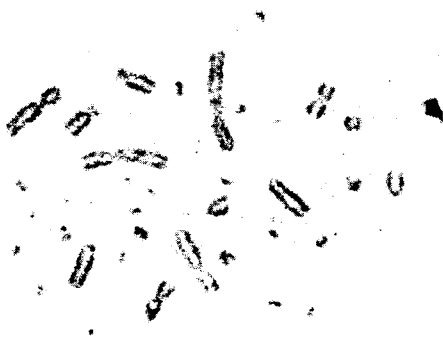


Figure 2. Chromosome spread of normal female chicken

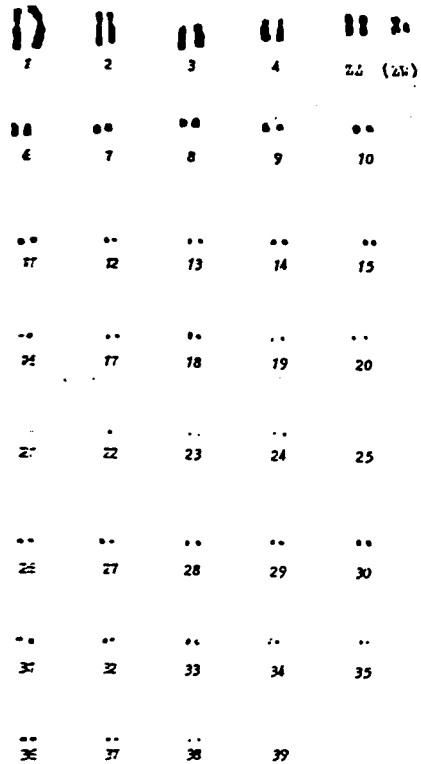


Figure 3. Karyotype of chromosomes of the male and female chicken chromosome

體番號 1, 2, 8, 性染色體 Z, W는 Metacentric, 4, 7 번은 Sub-Metacentric 그리고 그밖의 것은 acrocentric 染色體이다. 더욱 정확한 染色體 分析에서 染色體內 遺傳物質의 作用을 나타내는 banding pattern의 결과 정상적인 개체의 G-banding 染色體像은 Fig. 4에, C-banding 染色體像은 Fig. 5에 제시되었다. C-banding에서 1번 染色體의, 경우 거의 20層 이상의 점을 band를 나타내었고 性染色體 Z에서도 7層 이상의 band를 보이고 있었다. 이러한 G-banding으로 個體間의 遺傳的 差異를 究明하기 위해서는 染色體를 더욱 길게 그리고 더 많은 band層을 만들어 더욱 정확한 분석으로 가능하게 되는 것이다.

染色體內의 constitutive heterochromatin의 위치를 나타내는 C-banding에서 특히 Z의 long arm, W, 그리고 6번의 centromere에는 100% heterochromatin을 발견할 수가 있고 1, 2, 3, 4번의 ce-



Figure 4. G-banded chromosomes of male chicken

ntromere 그리고 1, 2번 short arm과 long arm의 끝부분에서 높은 頻度の 검은 band를 관찰할 수가 있었으며 점의 狀態로 나타나는 micro chromosome에서는 70% 이상이 C-band를 보이고 있다.

이러한 G-와 C-banding은 일반적인 DNA와 protein의 相互作用에서 여러 pattern으로 나타난 것이 일반적인 band의 원리였으나 (Comings 등, 1973; Summer와 Evans, 1973) G-band는 DNA내의 Adenine과 Thymine base가 많은 hydrophobic site에 주로 있는 hydrophilic histone의 喪失로서 band가 나타나는 것으로 발표되었고 (Curtis 등, 1982), C-band는 repetitious DNA의 denaturation과 renaturation 과정에서 遺傳子 作用이 거의 없는 het-



Figure 5. C-banded Chromosomes of female Chicken

erochromatin 부분에 染色되는 것이지만 生化學的인 機全은 더 이상 정확히 밝혀지지 않고 있다 (Pollock과 Fechheimer, 1981).

이와 같은 方法으로 Bitgood 등 (1981, 1982), Shoffner (1980) 그리고 Stock과 Bunch (1982) 등은 染色體의 translocation, deletion, inversion 등의 遺傳的 特徵을 G-banding 技術로서 밝혔고 Wooster 등 (1977), Pollock과 Fechheimer (1981), 그리고 Stock과 Bunch (1982) 등은 C-banding의 結果에서 性染色體 W는 전체가 검게 나타나고 6번 染色體의 centromere, Z 染色體의 long arm 끝부분에 100%의 heterochromatin이 存在함을 밝혔다.

또한 Shoffner (1981)는 G-banding 양상과 表現 型과의 關係에서 1번 染色體의 Short arm 2번째 dark band에 blue egg (o) gene이 存在하고 Z 染色體의 long arm에 protoporphyrin (Pr) 遺傳子의 위치를 밝혔으며 Yeo와 Shoffner (1985)는 近親度가 높은 서로 다른 系統間의 C-banding 差異를 밝혔다.

이러한 染色體 分析 方法으로 banding pattern과 能力과의 關係, 育種 方法에 따른 遺傳物質의 變化 그리고 特定 個體의 進化 變遷 究明 등 폭넓은 利用으로 家畜의 能力改良은 가능하다고 판단된다.

2. 遺傳子 移植의 vector로서 PGC system

Primordial germ cell (PGC) system을 哺乳動物의 受精卵 移植과 같이 家禽에서 유전자 조작에 필수적인 技術로서 donor의 PGC cell을 體外에서 용이하게 유전자 조작을 수행한 후 host embryo에 移植시

킬 수 있는 genetic vector로서 이용이 가능한 방법이다.

가. PGC의分離

胚芽의 內胚葉層에 存在하는 PGC는 Peridic acid-schiff (PAS)의 染色으로 분홍색으로 染色되고 또 Fig. 6에서와 같이 일반 體細胞 크기 때문에 形態에서도 쉽게 판별되어진다.

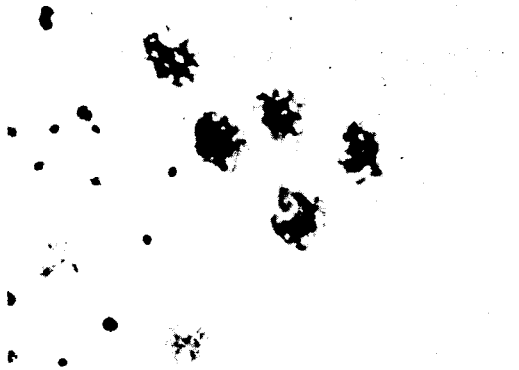


Figure 6. Primodial germ cell from germinal crescent at 26 hrs embryo (Smalls are somatic cells)

本 研究에 使用된 Donor embryo를 쉽게 判別될 수 있는 genetic marker를 가진 2번 染色體가 喪失(deletion)된 3倍體(3n)의 embryo로 3배체인 RIR과 정상 2배체인 W.L에서 생산된 수정란을 이용하였다.

PGC分離는 Fig. 7에서와 같이 24~30시간 동

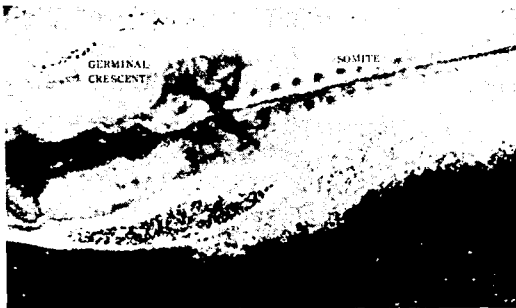


Figure 7. 10 somite embryo of 30 hrs fertilized egg

안 37.5℃에서 배양된 8~10 somite의 embryo를 Steremicroscope 하에서 germinal crescent를 분리하여 4시간 동안 complete medium에 배양 후 culture flask에 달라붙지 않은 細胞로서 채취하며 채취된 PGC는 Ca⁺⁺과 Na Citrate를 제한 1ml Ringer's solution에 보관된다.

나. PGC 移植

PGC 移植에 使用된 host embryo는 近親度가 비교적 낮은 New Hampshire의 정상적인 受精卵이었으며 28~30시간 37.5℃에서 배양 후 5×5mm를 파악하여 stereomicroscope에서 host embryo의 germinal crescent를 관찰하였다. 여기서 관찰된 host embryo의 germinal crescent를 고정시켜 놓고 미리 준비된 5μl의 donor PGC를 Fig. 8에서와 같이 지름이 30μm인 micropipette를 利用하여 서서히 주입시킨다. 이때 주입기술은 pipette에서 PGC를 주입시키는 동안 PGC용액이 卵黃液 밖으로 유출되지 않도록 해야한다.

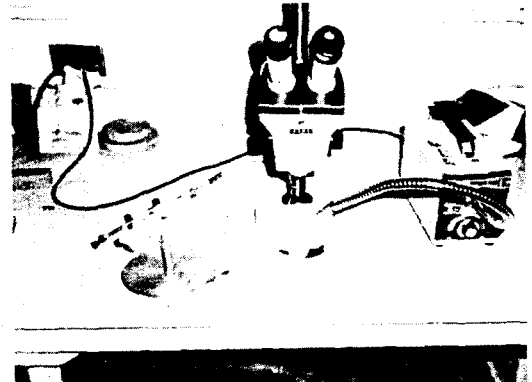


Figure 8. Microinjection of donor PGC to donor embryo under stereomicroscope.

Donor PGC를 주입한 후 즉시 UV. lamp 아래에서 마려된 parafilm으로 1차 파악된 부분을 봉하고 다시 2차로 parafin과 bees was (3:1)의 混合液을 녹아서 봉한다. 이와 같이 移植이 끝난 수정란은 일반 부화과정에서 발육을 계속 진행시킨다.

다. 移植된 donor PGC의 確認

PGC 移植이 끝난 수정란을 8~11일 발육시킨후

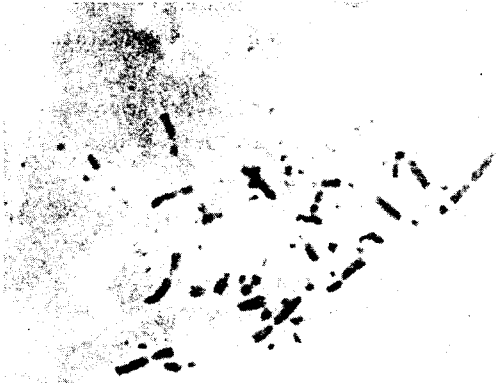


Figure 9. Transplanted chromosome spread of triploid PGC from host embryo

즉 PGC의 세포분열이 진행되는 시기에 파각하여 성장중인 병아리의 성腺(gonad)을 분리하여 squash 방법으로 染色體를 관찰할 수 있다. 이때 donor PGC가 host embryo에 移植되어서 성장하여 정상적인 host PGC의 染色體와 donor PGC marker인 3배체의 染色體를 mosaic 狀態로 발견할 수가 있었다. Fig. 9에서와 같이 host embryo의 성腺에서 발견된 donor PGC의 3배체상은 인위적인 PGC移植이 입증되고 있는 結果였다.

本 研究에서 donor 細胞의 染色體像의 頻度는 1%정도로 나타났으며 genetic vector로서 이용될 PGC의 遺傳的 能力 發現은 host embryo가 孵化 成長하여 性成熟에 도달한 후 즉 PGC 移植 후 2번째 세대의 개체에서 發現된다.

Shoffner와 Guise(1984)는 marker를 가진 PGC를 이식한 host embryo의 제 2번째 세대에서 donor의 genetic marker를 가진 개체를 확인하지 못하였다고 보고하였는데 이는 本 研究의 結果에서와 같이 이식된 PGC의 比率이 낮은 경우를 주 원인으로 고려할 수 있고 또 genetic marker를 가진 PGC와 host PGC와의 생리적인 불균형도 예상할 수 있음을 지적하였으며 또한 이들은 많은 PGC생산을 위해서 體外的 培養液에서 PGC의 인위적인 배양방법은 중요한 과제임을 시사하였다.

인위적인 培養方法으로 많은 PGC의 생산이 이루어질 때 앞에서 지적한 microcell이나 chromosome mediated gene transfer 技術로서 遺傳因자의 移植

에 의한 닭의 能力改良을 용이하게 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 摘 要

遺傳物質의 總合體인 染色體의 分離와 分析을 精確히 하여 遺傳因자의 位置를 밝히고 또한 遺傳子操作 技術을 이용할 수 있는 方法을 究明하여 닭의 能力改良을 꾀하기 위해서 실시된 本 研究의 結果를 要約하면 아래와 같다.

1. 白血球 培養을 통하여 染色體를 分離하고 Giemsa banding을 통한 染色體 分析에서 1번 染色體의 경우 20層에 달하는 banding pattern을 發見할 수 있는 精確한 分析으로 1~9번, 性染色體의 正常 banding pattern을 밝힐 수 있었고, C-banding의 結果 모든 染色體에서 遺傳子 作用이 없는 constitutive heterochromatin의 位置를 밝힐 수 있었다.

2. 遺傳子 操作 技術중 중요한 단계인 genetic vector로서 닭의 原始生殖細胞(Primordial germ cell, PGC)를 이용하기 위하여 genetic marker로서 3배체의 染色體를 가진 PGC를 정상 host embryo에 이식시켜서 성장중인 host embryo의 성腺에서 donor PGC의 genetic marker(3n)가 발견되므로써 PGC를 이용한 家禽의 遺傳子 操作이 可能함을 밝혔다.

V. 引用文獻

1. Bitgood, J. J., J. S. Otis, R. N. Shoffner and N. S. Fechheimer. 1981. A cyclical translocation, t(1:8:5), in the domestic chicken. *Cytogenetics and cell genetics* 30: 243-247.
2. Bitgood, J. J., R. N. Shoffner, J. S. Otis and N. Wang, 1982. Recombinant inversion chromosomes in phenotypically normal chickens. *American Asso. for the Advancement of Sci.* 215: 409-411.
3. Comings, D. E., E. Avelino., T. A. Okada and A. Z. Wyandt, 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Experimental cell Research*. 77: 469-493.
4. Curtis, O. and R. W. Horbine, 1982. Chromosome banding; specification of structural feature

- of dyes giving rise to C - banding. *Histochemical J.* 14: 911-928.
5. Davidson, R. L., K. A. O'Malley and T. B. Wheeler, 1976. Polyethylen glycol - induced mammalian cell hybridization, effect of PEG molecular weight and concentration. *Somatic cell genetics*, 2: 271-280.
 6. Hughes, S. H., E. Stubblefield, F. Payver, J. D. Engel, J. B. Dodgson, D. Spector, B. Cordell, R. T. Schimke and H. E. Varmus, 1979. Gene location by chromosome fractionation; Globin genes are on at least two chromosomes and three estrogen-inducible genes are on three chromosomes. *Genetics*, 76: 1348-1352.
 7. Kao, F. T., 1973. Identification of chick chromosomes in cell hybrids formed between chicken erythrocytes and adenine-requiring mutants of chinese hamster cells. *Prod. National Academy Sci. USA*, 70: 2893-2898.
 8. Kit, S., W. C. Leung, G. Jorgensen, D. Trkula and D. R. Dubbs, 1974. Acquisition of chick cytosol thymidine kinase activity by thymidine-deficient mouse fibroblast cells after fusion with chick erythrocytes. *The Jour of cell Biology*, 63: 505-514.
 9. Leung W. C., T. R. Chen, D. R. Dubbs and S. Kit, 1975. Identification of chick thymidine kinase determinant in somatic cell hybrids of chick erythrocytes and thymidine kinase-deficient mouse cell. *Exp. Cell Research*, 95: 320-326.
 10. McKnight, G. S., R. E. Hammer, E. A. Kuenzel and R. L. Brinster, 1983. Expression of chicken transferrin gene in transgenic mice. *Cell*, 34: 335-341.
 11. Otis, J. S, 1984. *Animal cytogenetics Manual*.
 12. Perucho, M., D. Hanahan, L. Lipsich and M. Wigler, 1980. Isolation of chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue. *Nature*, 285: 207-210.
 13. Pollock, B. J. and N. S. Fechheimer, 1981. Variable C-banding pattern and a proposed C-band karyotype in *Gallus Domesticus*. *Genetica*, 54: 273-279.
 14. Shoffner, R. N., 1981. Maker chromosomes and G-banding for location of genes in the chicken. *Poultry Sci.* 60: 1372-1375.
 15. Shoffner, R. N. and K. Guise, 1984. Genetic-biotechnological characterization and perservation of poultry germ plasma. *Ann. Report of the MN coop. Region. project-NC-168*.
 16. Schuman, R. M., 1981. Primordial germ cell transfer in chicken *Gallus Domesticus*. Thesis of the Graduate school of the univ. of MN.
 17. Schuman, R. N., R. N. Shoffner, M. Emerman and H. W. Temin, 1984. Vertical transmission of REV by inoculation of developing ovarian follicles. A thesis of the Graduate school of the Univ. of MN.
 18. Stock. A. D. and T. D. Bunch, 1982. The evolutionary implications of chromosomal banding pattern homologies in the bird order Galliforms. *Cytogenetics and cell genetics*, 34: 136-148.
 19. Summer, A. T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin, *Exp. Cell Research*, 75: 304-306.
 20. Summer, A. T. and H. J. Evans, 1973. Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and giemsa; II. The interaction of the dyes with the chromosome components. *Exp. Cell Research*, 81: 223-226.
 21. Wang. N., R. N. Shoffner, J. S. Otis and K. M. Cheng, 1982. The induction of chromosomal structural change in male chicken by the alkylating agents; triethylene melamine and ethyl methane sulfonate. *Mutation Research*, 96: 53-66.
 22. Wooster, W. E., N. S. Fechheimer and R. G. Jaap. 1977. Structural rearrangement of chromosomes in the domestic chicken; experimental production by X-irradiation of spermatozoa. *Canadian. J. of Genetics and Cytology*. 19: 437-446.