

Isolasi dan Jumlah *Primordial Germ Cell* Sirkulasi (PGC-Sirkulasi) pada Stadium Perkembangan Embrio Ayam Gaok

Kostaman T¹, Yusuf TL², Fahrudin M³, Setiadi MA²

¹ Balai Penelitian Ternak, Badan Litbang Pertanian, PO Box 221, Bogor 16002
E-mail: tatankostaman@gmail.com

² Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

³ Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Diterima 8 Januari 2013, disetujui 28 Januari 2013)

ABSTRACT

Kostaman T, Yusuf TL, Fahrudin M, Setiadi MA. 2013. Isolation and number of circulated primordial germ cells (circulated-PGCs) on stages of embryonic development of Gaok chicken. JITV 18(1): 27-33.

Avian primordial germ cell (PGCs) show a unique migration pathway during early development. During the early embryonic development, as soon as the formation of blood vessels, PGCs enter the circulatory system and migrate to the gonadal primordial. The aim of this study was to examine the number of circulated-PGCs from Gaok chicken at different developmental stages of embryo. One hundred fertile eggs were divided into 5 groups and incubated in a portable incubator at 38°C and humidity 60%. Hatching was set according to the embryonic development stage between 14-18. The blood collection was done through the dorsal aorta using micropipette under microscope. The collected blood was grouped based on the embryonic stages and placed on a 1.5 ml eppendorf tube which had been filled with 1.000 µl of Calcium and Magnesium-free phosphate buffered saline (PBS -). The PGCs were then purified using nycodenz density gradient centrifugation. The results showed that the average number of circulated-PGCs per embryo from Gaok chicken were significantly affected by the stage of embryonic development ($P < 0.05$). The number of circulated-PGCs at stages 14, 15, 16, 17 and 18 were 42.8 ± 8.9 , 51.0 ± 5.8 , 37.6 ± 5.9 , 32.8 ± 3.6 and 32.6 ± 3.2 , respectively. However, the number of circulated-PGCs was no different between stage of 17 and 18. At Gaok chicken, the number of circulated-PGCs reach the peak at stage 15, it is recommended that collection of PGCs embryonic chicken from blood circulation was the best on stage 15. This information is useful in efficiency production of germline chimera and to preserve PGCs of other Indonesian native chicken.

Key Words: Gaok Chicken, PGCs, Embryonic Development Stages

ABSTRAK

Kostaman T, Yusuf TL, Fahrudin M, Setiadi MA. 2013. Isolasi dan jumlah *primordial germ cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi) pada stadium perkembangan embrio ayam Gaok. JITV 18(1): 27-33.

Primordial germ cell (PGC) ayam memiliki jalur migrasi yang unik. Pada perkembangan awal embrio, segera setelah pembuluh darah terbentuk PGC masuk ke sistem sirkulasi dan bermigrasi ke *gonadal primordial*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah PGC ayam dalam peredaran darah (PGC-sirkulasi) dari ayam Gaok pada stadium perkembangan embrio yang berbeda, untuk tujuan transfer PGC. Dalam penelitian ini digunakan 100 butir telur fertil yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yang masing-masing diinkubasi pada suhu 38°C dan kelembaban 60% dalam inkubator portable. Pengambilan PGC diatur sesuai dengan stadium perkembangan embrio 14-18. Pengambilan darah embrio dilakukan melalui *aorta dorsalis* dengan menggunakan mikropipet di bawah mikroskop. Darah yang terkumpul dikelompokkan berdasarkan stadium perkembangan embrio dan ditempatkan pada tabung *eppendorf* 1,5 ml yang telah diisi 1.000 µl larutan *phosphate buffered saline* tanpa Calcium dan Magnesium (PBS-). PGC kemudian dimurnikan dengan menggunakan gradien sentrifugasi menggunakan nycodenz. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, rataan jumlah PGC- sirkulasi per embrio dipengaruhi oleh stadium perkembangan embrio ($P < 0,05$). Rataan jumlah PGC-sirkulasi per embrio pada stadium 14, 15, 16, 17 dan 18 masing-masing adalah $42,8 \pm 8,9$; $51,0 \pm 5,8$; $37,6 \pm 5,9$; $32,8 \pm 3,6$ dan $32,6 \pm 3,2$. Jumlah PGC-sirkulasi antara stadium 17 dan 18 tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Pada ayam Gaok, jumlah PGC-sirkulasi paling banyak didapatkan pada stadium 15, sehingga disarankan pengumpulan PGC melalui sirkulasi darah embrio ayam yang terbaik dan terbanyak dapat dilakukan pada stadium 15. Hasil penelitian berguna untuk efisiensi produksi *germline chimera* dan untuk preservasi PGC ayam lokal Indonesia lainnya.

Kata Kunci: Ayam Gaok, PGC, Stadium Perkembangan Embrio

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki tidak kurang dari 31 rumpun ayam lokal (Nataamijaya, 2000), salah satunya adalah ayam Gaok yang banyak ditemui di desa Gapurana, Poteran, dan Palasan, Pulau Poteran, Kabupaten Sumenep, Madura. Keistimewaan dari ayam Gaok adalah memiliki suara yang panjang mirip ayam Pelung. Meskipun populasi ayam Gaok tidak diketahui dengan pasti, namun diperkirakan di seluruh kabupaten di Madura terdapat sekitar 2.000 ekor (Sartika dan Iskandar, 2007). Penyebarannya juga tidak luas bila dibandingkan dengan ayam kampung biasa, karena mortalitas ayam Gaok yang tinggi $15,3 \pm 4,7\%$ (Nataamijaya et al. 1994), sehingga untuk mempertahankan keberadaan ayam Gaok supaya populasinya tidak semakin berkurang perlu dicari cara atau metode pelestariannya.

Primordial germ cell (PGC) adalah leluhur dari sperma dan sel telur, dapat dipergunakan untuk sumber genetik dan untuk produksi ayam transgenik (Kagami et al. 1997; Petite et al. 2004; Kuwana et al. 2006; Van de Lavoie et al. 2006; Liu et al. 2007; Furuta 2012). Wang et al. (2010) menyatakan bahwa karakteristik PGC yang pluripoten dapat menjadi model yang baik untuk mempelajari perkembangan embrio secara *in vitro*. Oleh karena itu, kriopreservasi PGC pada unggas merupakan cara alternatif untuk konservasi materi genetik pada unggas jantan maupun betina.

Pada embrio ayam, PGC pertama kali terdeteksi pada akhir proses gastrulasi (Ginsburg 1997), yang dapat diisolasi dari bagian tengah area pelusida (Ginsburg dan Eyal-Giladi, 1987; Kagami et al. 1997). Pada stadium *primitive streak*, PGC ditemukan pada bagian ekstraembrionik yang disebut dengan *germinal crescent* (England dan Matsumura, 1993).

Primordial germ cell (PGC) yang berada di sirkulasi darah dikenal dengan PGC-sirkulasi atau cPGC, dapat diperoleh dari darah embrionik pada stadium 13-16 dan dapat dimurnikan dengan menggunakan ficol, filtrasi atau nycodenz (Yasuda et al. 1992; Tajima et al. 2003; Zhao dan Kuwana 2003). PGC-sirkulasi untuk sementara waktu berada di peredaran darah sebelum pindah ke *gonadal primordial* (Fujimoto et al. 1976; Kuwana 1993). Akhirnya PGC berdiferensiasi menjadi spermatogonia di testes atau oogonia di ovarium. Jumlah PGC-sirkulasi berbeda pada setiap stadium perkembangan awal embrio (Tajima et al. 1999; Li et al., 2001). Bahkan variasi jumlah PGC-sirkuler pada stadium perkembangan yang sama, dapat dipengaruhi variasi telur yang berbeda (Zhao et al. 2003).

Jalur migrasi yang unik dari PGC ayam memudahkan PGC dikoleksi dan memberikan peluang untuk memanipulasi atau mengisolasi PGC untuk tujuan konservasi. Ada beberapa metode untuk mengisolasi PGC dari ayam, dan yang paling banyak digunakan

adalah mengisolasi PGC dari pembuluh darah (Mozdziak et al. 2005; Liu et al. 2007; Tagami et al. 2007; Yamamoto et al. 2007; Naito et al. 2007, 2009; Nakamura et al. 2009). *Primordial germ cell* (PGC) memasuki pembuluh darah setelah 45 jam masa inkubasi (Qian et al. 2010), kemudian meninggalkan pembuluh darah sekitar 72 jam masa inkubasi dan menetap di *gonadal primordial* dimana PGC kemudian menyebar dengan cepat untuk membentuk *germ cell* (Fujimoto et al. 1976; Nakamura et al. 1988).

Informasi dasar yang tersedia untuk jumlah PGC-sirkulasi dari embrio ayam adalah pada stadium 13-18 (Tajima et al. 1999). Pada burung puyuh, jumlah PGC-sirkulasi terbanyak pada stadium 13 (Li et al. 2001), sedangkan untuk itik (stadium 16), ayam Silky (stadium 14-15), ayam *White Leghorn* (stadium 15), dan ayam Kureko Dori (stadium 14) (Ye et al. 2002; Kuwana et al. 2006; Qian et al. 2010). Sementara itu, untuk embrio ayam lokal Indonesia informasi tentang jumlah PGC-sirkulasi belum tersedia.

Penelitian ini dimaksudkan untuk menentukan stadium perkembangan embrio yang paling tepat untuk isolasi PGC melalui sirkulasi darah embrio pada ayam Gaok. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi dasar penentuan stadium perkembangan embrio yang tepat untuk mengisolasi PGC melalui sirkulasi darah embrio dari ayam lokal Indonesia.

MATERI DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi, Balai Penelitian Ternak, Ciawi-Bogor dan Laboratorium Fertilisasi In Vitro, Bagian Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dimulai dari bulan April 2011 sampai bulan Juli 2011.

Isolasi dan koleksi *Primordial Germ Cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi)

Telur yang digunakan dalam penelitian sebanyak 100 butir telur fertil ayam Gaok hasil IB yang berasal dari Balai Penelitian Ternak, Ciawi-Bogor. Telur dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan (20 butir untuk masing-masing stadium perkembangan embrio) diinkubasi pada suhu 38°C dan kelembaban 60% menggunakan inkubator portable (P-008B Biotype; Showa Furanki, Saitama, Jepang). Pemanenan embrio diatur sesuai dengan stadium perkembangan embrio 14-18 (Hamburger dan Hamilton, 1951), yaitu setelah diinkubasi 50-67 jam. Setelah telur mencapai stadium perkembangan embrio yang diinginkan, kerabang telur dipecahkan dan dipindahkan ke plastik *petri dish*.

Pengambilan darah embrio dilakukan melalui *aorta dorsalis* dengan menggunakan mikropipet (50 µl; Drummond Scientific Co., PA USA) di bawah mikroskop (Olympus SZ30, Jepang). Darah yang terkumpul dikelompokkan berdasarkan stadium perkembangan embrio dan ditempatkan pada tabung *ependorf* 1,5 ml yang telah diisi dengan 1.000 µl larutan *phosphate buffered saline* (PBS -). Selanjutnya PGC dimurnikan dengan menggunakan metode gradien sentrifugasi menggunakan *nycodenz* (Zhao dan Kuwana, 2003).

Peubah

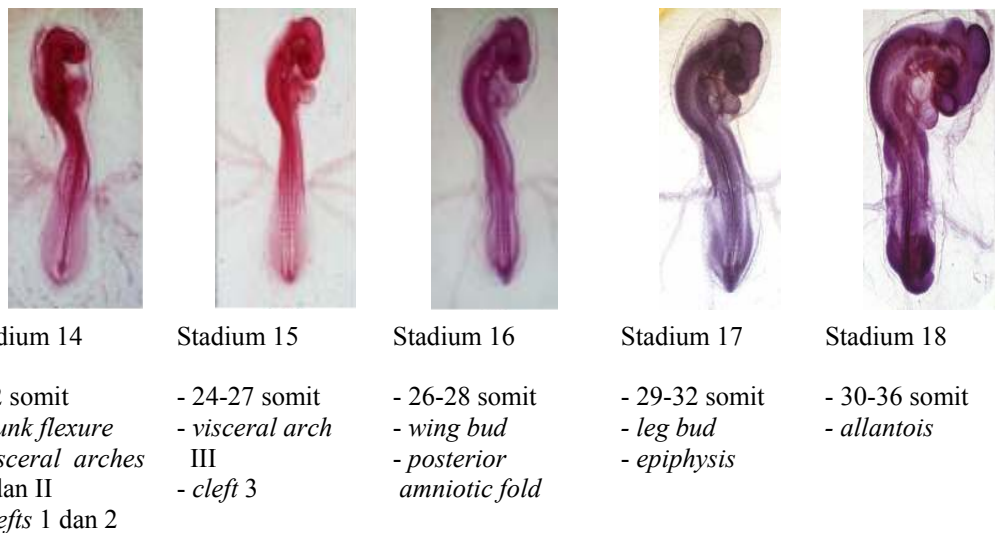
Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah jumlah PGC-sirkulasi dari ayam Gaok pada stadium perkembangan embrio 14, 15, 16, 17 dan 18.

Cara penentuan stadium perkembangan embrio ayam Gaok

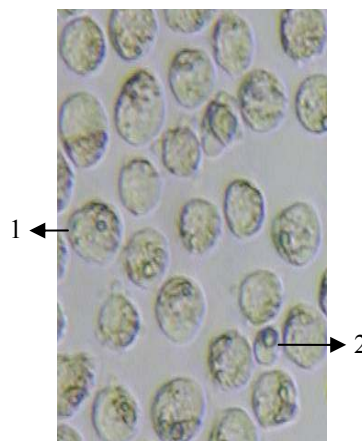
Untuk menentukan stadium perkembangan embrio ayam Gaok digunakan standar yang dilaporkan oleh Hamburger dan Hamilton (1951), yaitu berdasarkan waktu inkubasi, banyaknya somit dan perkembangan organ embrio (Gambar 1).

Cara Membedakan *Primordial Germ Cell* Sirkulasi (PGC-Sirkulasi) dengan Sel Darah Merah

Untuk membedakan PGC-sirkulasi dari sel darah merah, selain melihat dari ukurannya juga dapat diamati dari intinya yang sperikal dan besar, dan terdapat lemak refraktif pada sitoplasmanya, serta pada pinggirnya tampak sebagai suatu cincin di bawah mikroskop (Olympus CKX41, Jepang) (Gambar 2).



Gambar 1. Penentuan stadium perkembangan embrio ayam berdasarkan waktu inkubasi banyaknya somit dan perkembangan organ embrio (Hamburger dan Hamilton, 1951)



Gambar 2. PGC-sirkulasi yang diamati di bawah mikroskop fase kontras. Pembesaran 400x. 1 = PGC; 2 = sel darah merah (Setioko et al. 2007)

Penghitungan jumlah *Primordial Germ Cell* Sirkulasi (PGC-Sirkulasi)

Jumlah PGC-sirkulasi ayam Gaok per embrio dihitung dengan menggunakan rumus dari Zhao dan Kuwana (2003) sebagai berikut:

$$\frac{\text{Jumlah PGC yang berhasil di isolasi}}{\text{Jumlah embrio yang digunakan dalam setiap perlakuan}}$$

Analisis statistik

Data jumlah PGC-sirkulasi dari masing-masing stadium perkembangan embrio (14, 15, 16, 17 dan 18) dianalisa dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan ulangan sebanyak 20 kali. Data penelitian dianalisis dengan ANOVA yang sebelumnya sudah diuji kenormalannya dengan Kolmogorof-Smirnov Z dan apabila terdapat perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan sesuai petunjuk Steel dan Torrie (1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan koleksi *Primordial Germ Cell* Sirkulasi (PGC-Sirkulasi)

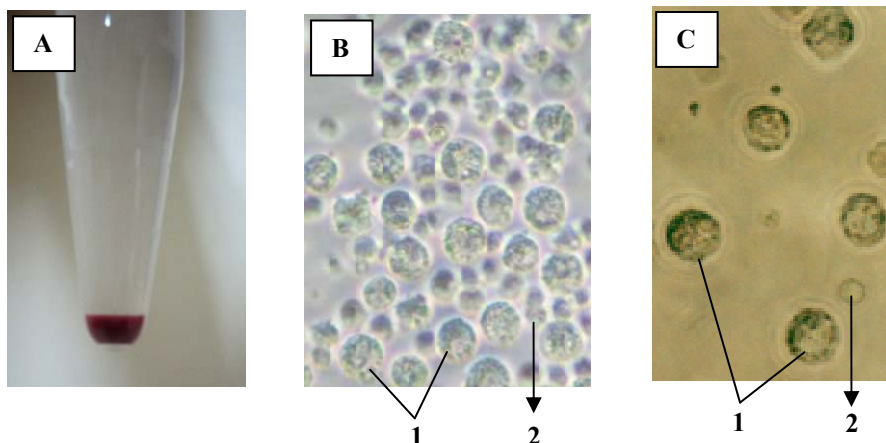
Pada penelitian ini, PGC ayam Gaok yang berasal dari sirkulasi darah embrio dengan metode gradien sentrifugasi menggunakan nycodenz berhasil diisolasi dan dikoleksi PGC-sirkulasinya dari masing-masing sampel darah pada stadium 14-18 (Gambar 3A, B, C). Karakteristik morfologi PGC-sirkulasi dari ayam Gaok hampir sama dengan yang telah dilaporkan Yasuda et al. (1992), Chang et al. (1998), dan Zhao dan

Kuwana (2003) terhadap PGC-sirkulasi dari ayam *White Leghorn* dan burung puyuh, yaitu antara lain ukurannya lebih besar dari sel darah merah dan bentuknya bulat (Gambar 3C).

Pada penelitian ini, dengan menggunakan metode nycodenz akan mengurangi jumlah sel darah merah, sehingga PGC-sirkulasi dapat diisolasi dengan mudah. Keuntungan mengisolasi PGC-sirkulasi dengan menggunakan nycodenz adalah akan diperoleh koleksi PGC-sirkulasi dengan kemurnian yang tinggi (bisa mencapai 90%), simpel dan lebih efisien daripada metode yang sudah dilaporkan sebelumnya (Zhao dan Kuwana, 2003). Hal ini disebabkan nycodenz adalah bahan kimia non-ionic, mempunyai berat molekul sebesar 821 dan densitas sebesar 21 g/ml dalam bentuk bubuk. Keuntungan yang lain dari nycodenz adalah toksisitasnya rendah, daya larut dalam air tinggi, dan lebih stabil ketika di autoklaf. Selain itu, nycodenz mempunyai viscositas yang rendah dan dapat digunakan untuk memisahkan sel darah (Boyum dan Scand, 1976; Rickwood et al. 1982).

Jumlah *Primordial Germ Cell* Sirkulasi (PGC-Sirkulasi)

Hasil pengamatan rata-rata jumlah PGC-sirkulasi ayam Gaok selama penelitian ditunjukkan pada Tabel 1. Rataan jumlah PGC-sirkulasi pada stadium 15 lebih banyak dibandingkan dengan stadium 14, 16, 17 dan 18 ($P < 0,05$), ini memperlihatkan bahwa rata-rata jumlah PGC-sirkulasi per embrio ayam Gaok dipengaruhi oleh stadium perkembangan embrio, akan tetapi rata-rata jumlah PGC-sirkulasi pada stadium 17 dan 18 tidak berbeda ($P > 0,05$). Rataan jumlah PGC-sirkulasi pada stadium perkembangan embrio yang berbeda memperlihatkan kecenderungan yang bervariasi pada jumlah PGC-sirkulasi dengan perkembangan embrio.



Gambar 3. Isolasi PGC-sirkulasi ayam Gaok dengan metode gradien sentrifugasi menggunakan nycodenz. A) Sampel darah dikoleksi dari masing-masing embrio stadium 14-18. B) Pemurnian pertama, PGC-sirkulasi yang masih bercampur dengan sel darah merah. C) PGC-sirkulasi yang diperoleh dengan metode nycodenz. 1=PGC dan 2=sel darah merah. Pembesaran 400 x

Tabel 1. Rataan jumlah PGC-sirkulasi ayam Gaok berdasarkan stadium perkembangan embrio yang berbeda

Stadium Perkembangan Embrio	Ulangan (n)	Rataan Jumlah PGC-Sirkulasi per Embrio
14	20	42,8 ^b ± 8,9
15	20	51,0 ^a ± 5,8
16	20	37,6 ^c ± 5,9
17	20	32,8 ^{de} ± 3,6
18	20	32,6 ^e ± 3,2

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Pada stadium 14, jumlah PGC-sirkulasi dari sampel darah meningkat dan mencapai jumlah maksimal pada stadium 15, karena pada stadium 15 PGC-sirkulasi sangat aktif bermigrasi dan kemungkinan PGC sudah berada semua di sistem peredaran darah embrio, dan setelah itu jumlah PGC-sirkulasi akan menurun setelah mencapai stadium 15. Pada penelitian ini, terbukti bahwa jumlah PGC-sirkulasi ayam Gaok semakin menurun jumlahnya setelah embrio mencapai stadium 16, 17 dan 18.

Menurunnya jumlah PGC-sirkulasi pada stadium tersebut di atas, kemungkinan ada sebagian PGC yang sudah meninggalkan sistem peredaran darah karena keberadaan PGC dalam sirkulasi darah hanya sebentar dan setelah itu membentuk koloni di bagian *germinal ridge*, akibatnya pada waktu pengambilan darah yang mengandung PGC tidak terambil secara maksimal. Hasil yang sama dilaporkan oleh Li et al. (2001) pada burung puyuh, Zhao et al. (2003) pada ayam *Rhode Island Red*, Kuwana et al. (2006) pada ayam *White Leghorn* dan Kureko Dori, Nakamichi et al. (2006) pada ayam *Barred Plymouth Rock*, Atsumi et al. (2008) pada ayam *White Leghorn* dan Qian et al. (2010) pada ayam *Silky*, yaitu bahwa semakin bertambahnya umur embrio jumlah PGC-sirkulasi semakin menurun atau berkurang.

Jumlah PGC-sirkulasi pada penelitian ini mencapai jumlah maksimal pada stadium 15 sebanyak 51 sel per embrio, sedikit lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian yang sudah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya, yaitu untuk ayam *Rhode Island Red* pada stadium 15, jumlah PGC-sirkulasi bervariasi antara 67-73 sel per embrio (Nakamura et al., 2007), sebaliknya pada ayam *Silky*, jumlah PGC-sirkulasi mencapai puncaknya pada stadium 14 sebanyak 65 sel per embrio (Qian et al. 2010). Hal ini disebabkan, keberadaan PGC-sirkulasi dalam tubuh embrio ayam

selalu berpindah-pindah sesuai dengan perkembangan umur embrio dan jenis ayam yang digunakan (Atsumi et al. 2008). Selain itu, secara umum volume darah dan jumlah sel darah meningkat linier dengan perkembangan embrio (Zhao et al. 2003).

Nakamura et al. (2007) melaporkan bahwa pada saat embrio ayam *Rhode Island Red* pada stadium satu atau baru saja ditelurkan, sekitar 100 PGC tersebar dibagian tengah dari area *pelusida epiblast*, kemudian pada stadium 5 atau sekitar 20 jam masa inkubasi, dengan terbentuknya *primitive streak*, PGC bergerak ke bagian anterior dan menyebar. Pada stadium 9 atau 30 jam masa inkubasi, hampir seluruh PGC ada di epidermal *ectoderm* dan di *proamnion*. Pada stadium 11, beberapa PGC mulai berada di sirkulasi darah dan diberi nama *circulating PGC* (cPGC). Pada stadium 15 jumlah PGC-sirkulasi bervariasi antara 67-73 sel per embrio dan sesudah itu menurun jumlahnya.

Pada penelitian ini, pengambilan darah embrio dilakukan mulai dari stadium 14. Hal ini disebabkan dari beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pada stadium 13 PGC-sirkulasi jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan stadium 14. Zhao et al. (2003) melaporkan bahwa jumlah PGC-sirkulasi ayam *Rhode Island Red* pada stadium 13 lebih sedikit dibandingkan dengan stadium 14, yaitu 23,5 vs 26,8 sel per embrio. Pada ayam *Silky*, PGC-sirkulasi juga memperlihatkan hasil yang sama, yaitu 40 vs 65 sel per embrio (Qian et al. 2010), demikian juga untuk ayam Kureko Dori dan *White Leghorn*, PGC-sirkulasi pada stadium 13 jumlahnya lebih sedikit daripada stadium 14 (Kuwana et al. 2006). Selain itu, pengambilan darah embrio pada stadium 13 memerlukan teknik dan ketelitian yang lebih baik atau cermat, hal ini disebabkan pembuluh darah dari embrio masih halus (Li et al. 2001).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada ayam Gaok, jumlah PGC-sirkulasi paling banyak didapatkan pada stadium 15, sehingga disarankan pengumpulan PGC melalui sirkulasi darah embrio ayam yang terbaik dan terbanyak dapat dilakukan pada stadium 15.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof (R) Dr. Argono Rio Setioko dan Dr. Tike Sartika yang telah memberikan bantuan materi penelitian hingga terselesaikannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Atsumi Y, Tagami T, Kagami H, Ono T. 2008. Restriction of germline proliferation by soft X-ray irradiation of chicken embryos and its application to chimera production. *J Poult Sci.* 45:292-297.
- Boyum A, Scand J. 1976. Isolation of lymphocytes, granulocyte and macrophages. *Immunology* 5: 9-15S.
- Chang IK, Naito M, Kuwana T, Mizutani M, Sakurai M. 1998. Production of germline chimeric quail by transfer of gonadal primordial germ cells preserved in liquid nitrogen. *J Poult Sci.* 35:321-328.
- England MA, Matsumura G. 1993. Primordial germ cells in primitive streak stages chick embryo as studied by scanning electron microscopy. *J Anat* 183:67-73.
- Fujimoto T, Ukeshima A, Kiyofuji R. 1976. The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *Anat Rec.* 185:139-145.
- Furuta H. 2012. Establishing germline chimeric chickens using primordial germ cells. *J Poult Sci.* 49:1-4.
- Ginsburg M. 1997. Primordial germ cells development in avians. *Poult. Sci.* 76:91-95.
- Ginsburg M, Eyal-Giladi H.. 1987. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development.* 101:209-219.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 88:49-92.
- Kagami H, Tagami T, Matsubara Y, Harumi T, Hanada H, Maruyama K, Sakurai M, Kuwana T, Naito M. 1997. The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the off-spring in the chicken. *Mol. Reprod Dev.* 48:501-510.
- Kuwana T. 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Dev. Growth Differ.* 35:237-243.
- Kuwana T, Kawashima T, Naito M, Yamashita H, Matsuzaki M, Takano T. 2006. Conservation of a threatened indigenous fowl (Kureko Dori) using the germline chimeras transplanted from primordial germ cells. *J Poult Sci.* 43:60-66.
- Li HC, Matsui K, Ono T. 2001. Population of circulating primordial germ cells in early Japanese quail embryos. *J Poult Sci.* 38:175-180.
- Liu CH, Chang IK, Sasse J, Dumatol CJ, Basker JV, Wernery U. 2007. Xenogenic of chicken (*Gallus domesticus*) female primordial germ cells in germline chimeric quail (*Coturnix japonica*) ovary. *Anim Reprod Sci.* 101:344-350.
- Mozdziak PE, Angerman-Stewart J, Rushton B, Pardue SL, Petite JN. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult Sci.* 84:594-560.
- Naito M, Minematsu T, Harumi T, Kuwana T. 2007. Intense expression of GFP gene in gonads of chicken embryos by transfecting circulating primordial germ cells in vitro and in vivo. *J Poult Sci.* 44:416-425.
- Naito M, Minematsu T, Harumi T, Kuwana T. 2009. Preferential migration of transferred primordial germ cells to left germinal ridge of recipient embryos in chicken. *J Poult Sci.* 46:40-45.
- Nakamichi H, Sano A, Harumi T, Matsubara Y, Tajima A, Kosugiyama M, Naito M. 2006. Effects of soft X-ray irradiation to stage X blastoderm on restriction of proliferation of primordial germ cells in early chicken embryos. *J Poult Sci.* 43:394-400.
- Nakamura Y, Kuwana T, Miyayama Y, Fujimoto T. 1988. Extragonadal distribution of primordial germ cells in the early chick embryo. *Anat Rec.* 222:90-94.
- Nakamura Y, Usui F, Atsumi Y, Otomo A, Teshima A, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. 2009. Effects of busulfan sustained release emulsion on depletion and repopulation of primordial germ cells in early chicken embryos. *J Poult Sci.* 46:127-135.
- Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. 2007. Migration and proliferation of primordial germ cells in early chicken embryo. *Poult Sci.* 86:2182-2193.
- Nataamijaya AG. 2000. Ayam Kampung Indonesia. *Bull Plasma Nutfah* 6:1-6.
- Nataamijaya AG, Diwyanto K, Haryono, Sumantri E, Kusni M. 1994. Karakteristik morfologi delapan varietas ayam bukan ras (buras) langka. Dalam: Bakrie B, Haryanto B, Wina E, KOMPIANG IP, Diwyanto K, penyunting. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Peternakan.* Bogor, 25-26 Januari 1994. Bogor; Balai Penelitian Ternak. hlm. 605-614.
- Petitte JN, Liu G, Yang Z. 2004. Avian pluripotent stem cells. *Mech Dev.* 121:1159-1167.
- Qian C, Zhou Z, Han H, Zhao C, Jin X, Zhao H, Zhang Y, Chen W, Yang N, Li Z. 2010. Influence of microgravity on the concentration of circulating primordial germ cells in Silky chicken offspring. *J Poult Sci.* 47:65-70.
- Rickwood D, Ford TC, Graham J. 1982. Nycodenz: a new nonionic iodinated density gradient medium. *Analyt Biochem.* 123:23-31.
- Sartika T, Iskandar S. 2007. Mengenal plasma nutfah ayam Indonesia dan pemanfaatannya. Edisi Pertama. Balai Penelitian Ternak, Bogor.

- Setioko AR, Tagami T, Tase H, Nakamura Y, Takeda K, Nirasawa K. 2007. Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) from White Leghorn embryo using commercial cryoprotectants. *J Poult Sci.* 44:73-77.
- Tagami T, Kagami H, Matsubara Y, Harumi T, Naito M, Takeda K, Hanada H, Nirasawa K. 2007. Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Mol Reprod Dev.* 74:68-75.
- Tajima A, Barbato GF, Kuwana T, Hammerstedt RH. 2003. Conservation of a genetically selected broiler line (42L) using cryopreserved circulating primordial germ cells (PGCs) isolated by filtration method. *J Poult Sci.* 40:53-61.
- Tajima A, Hayashi H, Kamizumi A, Ogura J, Kuwana T, Chikamune T. 1999. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J Exp Zool.* 28:759-764.
- Van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Hayer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature.* 441:766-769.
- Wang Y, Hou L, Li C, Guan W, Chen L, Li X, Yue W, Ma YH. 2010. Isolation, culture and biological characteristics of primordial germ cells from Beijing fatty chicken. *J Reprod Dev.* 56:303-308.
- Yamamoto Y, Usui F, Nakamura Y, Ito Y, Tagami T, Nirasawa K, Matsubara Y, Ono T, Kagami H. 2007. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biol Reprod.* 77:115-119.
- Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T. 1992. A method to obtain avian germ-line chimeras using isolated primordial germ cells. *J Reprod Fertil.* 96:521-528.
- Ye RZ, Zhang YD, Gao JM, Guo XL. 2002. Observation of the primordial germ cells in embryonic blood and in vivo DNA transfer into the primordial germ cells in sheldrake. *J Xiamen Univ Nat Sci.* 41:624-628.
- Zhao DF, Kuwana T. 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *Br Poult Sci.* 44:30-35.
- Zhao DF, Yamashita H, Matsuzaki M, Takano T, Abe SI, Naito M, Kuwana T. 2003. Genetic factors affect the number of circulating primordial germ cells in early chick embryos. *J Poult Sci.* 40:101-113.