

go Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. Zakupu testów diagnostycznych do przeprowadzenia przez laboratoria omawianych badań w wyznaczonych rejonach kraju dokonają wojewódzkie inspektoraty weterynarii z wymienionych województw. Cena jednostkowa testu diagnostycznego „Bio-Rad” wynosi 95,92 zł za 1 szt. Koszty dowozu szacuje się na 2766 tys. zł. W podanej kwocie na omawiane badania zostały również ujęte koszty utylizacji materiału zakaźnego powstałego po przeprowadzeniu badań laboratoryjnych.

Niezależnie od wyżej wspomnianych czynności, które mają zapewnić kontynuację naszego eksportu, prowadzone są działania zmierzające do restrukturyzacji i modernizacji przemysłu utylizacyjnego w Polsce, który to program został ostatnio zatwierdzony przez kierownictwo resortu oraz dostosowywanie przepisów do prawa unijnego w zakresie zarówno żywienia zwierząt (zakaz podawania przeżuwaczom białka ssa-

ków), jak i metod uboju i zagospodarowania materiału specjalnego ryzyka. Obecnie wyizolowany w rzeźniach materiał wysokiego ryzyka jest utylizowany (przerabiany na mączkę mięsno-kostną) w 9 zakładach utylizacyjnych, a następnie spalany w 3 wyznaczonych zakładach (2 cementownie i 1 zakład chemiczny ze złożem fluidalnym).

Sprawy te były przedmiotem obrad posiedzenia ministrów rolnictwa krajów CEFTA, które odbyło się 13 września w Bratysławie. Obecny tam komisarz Unii Europejskiej D. Byrne podkreślił, że kraje, które na bieżąco wdrażają przepisy unijne dotyczące BSE (badania, segregacja odpadów, żywienie zwierząt), mają prawo do końca tego roku wystąpić z wnioskiem o zmianę dotychczasowej klasyfikacji. Wola w tym zakresie znalazła się we Wspólnej Deklaracji Ministrów Rolnictwa Państw CEFTA.

Możliwości wykorzystania polimorfizmu w genie receptora prolaktyny (PRLR) w doskonaleniu cech użytkowości rozplodowej świń

Marek Kmiec, Arkadiusz Terman, Andrzej Dybus

AR w Szczecinie

Genetyka i dziedziny jej pokrewne, określane ogólnie mianem biologii molekularnej, rozwijają się niezwykle dynamicznie. Odkrycie endonukleaz restrykcyjnych i innych enzymów, umożliwiających niemal nieograniczone manipulowanie kwasami nukleinowymi, dało w połowie lat siedemdziesiątych początek inżynierii genetycznej. Jest to zespół technik pozwalających na badanie procesów dziedziczenia i ekspresji informacji genetycznej na poziomie molekularnym.

Od czasu odkrycia dziedzicznego polimorfizmu u zwierząt, zainteresowania naukowców skoncentrowały się na możliwościach powiązania go z cechami produkcyjnymi oraz na zdolnościach przystosowawczych zwierząt do warunków środowiska. Powiązania te są wynikiem dokładniejszego poznawania procesów fizjologicznych, które warunkują wartość użytkową zwierząt. Wiedza ta może dać podstawy do dokładniejszej lub wcześniejszej selekcji zwierząt utrzymywanych dla różnych cech produkcyjnych [6].

Aktualna wiedza i nowoczesne techniki laboratoryjne pozwalają na prowadzenie oceny wartości genetycznej zwierząt gospodarskich na poziomie populacji, komórki oraz DNA. Uzyskiwany postęp genetyczny w populacji zwierząt gospodarskich osiągany jest w głównej mierze poprzez dokładność oceny wartości hodowlanej, intensywność selekcji oraz wielkość zmienności genetycznej. Wraz z wykryciem genów z dużymi efektami, warunkującymi cechy użytkowe zwierząt gospodarskich, zarysowały się nowe możliwości przyspieszenia osiągania postępu hodowlanego [7]. Wynikają one przede wszystkim ze wzrostu zmienności genetycznej i tym samym umożliwiają prowadzenie skuteczniejszej selekcji. To z kolei determinowane jest wielkością efektu genotypów genów głównych i ich częstością występowania [13].

Dynamiczny rozwój genetyki molekularnej stworzył warunki dla coraz bardziej precyzyjnego badania genomów różnych organizmów, w tym zwierząt gospodarskich. Pod pojęciem genomu kryje się cała informacja genetyczna zawarta w gamecie, która zawiera haploidalną liczbę chromosomów. Mapowanie genomu polega na prowadzeniu badań zmierzających do jak najpełniejszego jego opisu, a w szczególności obejmuje zagadnienia związane:

- z lokalizacją loci genów lub sekwencji nukleotydowych w chromosomach (mapowanie fizyczne),
- z identyfikacją możliwie dużej liczby alleli w obrębie mapowanych loci,
- z ustaleniem odległości pomiędzy sprzężonymi loci oraz ich kolejności w układzie sprzężonym (mapowanie genetyczne).

W ramach światowego mapowania sporządzane są mapy chromosomowe zwierząt hodowlanych, w tym także świń (PigMap), na podstawie których można określić położenie genów warunkujących interesujące nas cechy. Również w Polsce realizowany jest program mapowania genów u świń, którego głównym celem jest identyfikacja loci cech ilościowych – QTLs [18].

Prowadzone obecnie prace zmierzają do zbudowania genomowych map markerowych, które są punktem wyjścia dla poszukiwań genów istotnie wpływających na użytkowość zwierząt. Czym są markery genetyczne? Marker genetyczny jest to cecha jakościowa zauważalna w fenotypie osobnika lub dająca się zidentyfikować za pomocą metod biochemicznych. Sam marker genetyczny nie wpływa na poziom cechy

Tabela

Częstości genotypów receptora prolaktyny (PRLR) w badanym stadzie knurów oraz średnie badanych cech w zależności od genotypu PRLR

Wyszczególnienie	Genotyp PRLR			Razem n=94
	AA n=72	AB n=11	BB n=11	
Frekwencje genotypów PRLR	0,766	0,117	0,117	1,000
Liczba ocenionych ejakulatów	1083	178	221	1482
Objętość ejakulatu, cm ³	198,5 ^{AA}	184,7 ^A	190,5 ^A	195,6
Koncentracja plemników, mln/cm ³	602,0	592,9 ^A	603,6 ^A	601,2
Procent plemników żywych	69,9	70,3	96,6	70,0
Liczba plemników żywych w ejakulacie, mld	80,2	74,5	77,1	79,0
Liczba plemników w dawce inseminacyjnej, mld	3,8 ^{AB}	3,7 ^{AC}	3,9 ^{BC}	3,8
Liczba dawek inseminacyjnych	21,5 ^{AA}	20,0 ^A	19,9 ^A	21,1
Wiek knurów, dni	341,4	343,4	340,6	341,6

Średnie w wierszach oznaczone tymi samymi literami różnią się między sobą istotnie. Małymi literami oznaczono istotność różnic przy $P \leq 0,05$; dużymi literami oznaczono istotność różnic przy $P \leq 0,01$.

ilościowej, ale jest z nią związany przez zlokalizowanie w tym samym chromosomie genów wyznaczających marker genetyczny i selekcionowaną cechę ilościową [10].

Mapowanie genów umożliwia nie tylko identyfikację genów o dużym efekcie działania. Wiele markerów genetycznych jest skorelowanych z występowaniem dewiacji metabolicznych, defektów immunologicznych i wielu innych uwarunkowanych genetycznie stanów patologicznych organizmu. Znanych jest wiele chorób genetycznych uwarunkowanych monogenowo, ale tylko w nielicznych przypadkach znane są mutacje, które są czynnikiem sprawczym, lub markery, które są sprzężone z poszukiwanym genem.

Rozwój genetyki molekularnej, a szczególnie podjęcie prac nad utworzeniem map genomów zwierząt owocuje osiągnięciami, które mogą być wykorzystane w hodowli. Zainteresowania genetyków koncentrują się przede wszystkim na molekularnej identyfikacji genów i ich zmutowanych form, które są odpowiedzialne za rozwój chorób genetycznych lub wpływają w sposób znaczący (tzw. geny główne) na cechy ilościowe, np. tempo wzrostu czy wydajność rzeźną [14].

Dynamiczny postęp w genetyce molekularnej, jaki dokonuje się w ostatnich latach, nastąpił głównie dzięki opracowaniu nowych metod inżynierii genetycznej. Na plan pierwszy wysunęła się metoda reakcji łańcuchowej polimerazy (polymeryzacja łańcuchowa – PCR), która zrewolucjonizowała badania w dziedzinie genetyki molekularnej. Bardzo szybko stała się narzędziem ułatwiającym przeprowadzenie rekombinacji oraz analizę genów czy detekcję DNA lub RNA pochodzącą z pojedynczej komórki [4].

Najważniejszym zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimerazy jest uzyskanie zwiększonej ilości fragmentu DNA, w którym występuje mutacja lub polimorfizm, a następnie jego dalsza analiza z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych (PCR-RFLP). Technika PCR-RFLP można również zastosować w badaniach, w których sztucznie wprowadza się miejsce restrykcyjne w celu zidentyfikowania mutacji. Ten rodzaj RFLP może być wykonany wyłącznie w połączeniu z reakcją PCR [11].

Chociaż metody molekularne nie są jeszcze dzisiaj szeroko wykorzystywane w praktyce hodowlanej, ze względu na wysokie koszty i ograniczoną dostępność, to z pewnością będą w przyszłości stanowiły podstawę prac selekcyjnych [6].

Dzięki wyżej wymienionym metodom można określić częstość występowania mutacji w genie receptora prolaktyny. Prolaktyna jest hormonem przysadkowym zidentyfikowanym w 1928 roku i wyizolowanym w roku 1932. Jest to hormon białkowy wydzielany przez część gruczołową przysadki mózgowej, jest jednym z najbardziej wszechstronnych hormonów w organizmie. Udokumentowano ponad 100 różnych oddziaływań tego hormonu na funkcje biologiczne organizmu [2]. U większości gatunków ssaków prolaktyna zbudowana jest ze 197-199 aminokwasów [16]. Pełni ona w organizmach zwierzęcych wiele istotnych funkcji biologicznych, wpływających między innymi na regulację funkcji reprodukcyjnych i odpornościowych, równowagę wodno-elektrolitową, wzrost i różnicowanie komórek [5].

Hormony białkowe, takie jak prolaktyna czy hormon wzrostu, działają poprzez liczne receptory ułożone w błonie komórkowej. Komórki nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego mają liczne receptory prolaktynowe, które pośredniczą także w indukowaniu przez prolaktynę ekspresji genów białek mleka [17].

Gen receptora prolaktyny został zlokalizowany na 16 chromosomie świni [15], jako gen kandydat dla cech reprodukcyjnych w sześciu liniach PIC zawierających rasę wielką białą, landrace, duroc, landrace x pietrain i wielką białą x meishan. Gen ten istotnie wpływał na liczbę prosiąt urodzonych w miocie, jak również na liczbę prosiąt żywo urodzonych. Wielkość efektu genu receptora prolaktyny PRLR w pierwszych miotach wynosiła 0,25 prosięcia na miot, ale większe efekty zaobserwowano w dalszych miotach. Nie stwierdzono różnic w średniej masie noworodków wraz ze wzrostem liczebności miotu. Wyniki dla tego genu mogą stanowić, w połączeniu z metodami tradycyjnymi, doskonałe narzędzie w genetycznym poprawianiu liczebności miotów w poszczególnych liniach i rasach świń [12]. Jednak brak jest dalszych doniesień, koniecznych do potwierdzenia efektów fenotypowych w hodowanych rasach i liniach świń dla genu PRLR.

Wykazano, że z dwóch różnych form receptora prolaktyny, jakie występują w komórkach gruczołu mlekowego: długiej – zbudowanej z 592 aminokwasów i krótkiej – zawierającej jedynie 291 aminokwasów, w działaniu prolaktyny na ekspresję genów białek mleka uczestniczy tylko dłuższa forma [8]. Przeciwnością przeciwko receptorowi prolaktyny naśladując działanie samej prolaktyny, co świadczy o tym, że degradacja prolaktyny oraz jej receptorów wewnątrz komórki nie odgrywa istotnej roli w działaniu prolaktyny na ekspresję genów białek mleka.

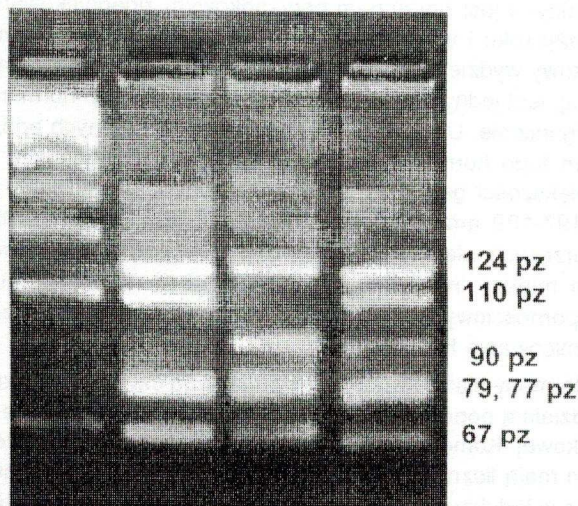
Działanie hormonów białkowych, takich jak: prolaktyna, hormon wzrostu lub insulina, na ekspresję genów poprzez receptory ułożone na powierzchni komórki zakłada istnienie wewnątrzkomórkowego przekaźnika lub przekaźników. W zbadanie dróg przekazywania sygnału prolaktyny w komórkach gruczołu mlekowego włożono już bardzo dużo pracy w różnych laboratoriach, jak na razie z miernymi efektami [17].

W budowie receptora prolaktyny wyróżnia się trzy domeny:

- zewnątrz błonową (ECD),
- śródbłonową (TM),
- cytoplazmatyczną (CYD).

U szczurów, myszy, krów, owiec i kóz ECD i TM są identyczne pod względem wielkości, a różnią się tylko domeną cytoplazmatyczną CYD. Poza tym receptor prolaktyny posia-

M AA BB AB



Rys. Elektroforetyczny rozkład prążków DNA po trawieniu produktu PCR enzymem restrykcyjnym *AluI* w żelu agarozowym
Tor 1 – M (marker wielkości fragmentów DNA – pUC19/*MspI*),
Tor 2 – genotyp receptora prolaktyny AA (124, 110, 79, 77 i 67 par zasad),
Tor 3 – genotyp receptora prolaktyny BB (124, 90, 79, 77, 67 i 20 par zasad),
Tor 4 – genotyp receptora prolaktyny AB (124, 110, 90, 79, 77, 67 i 20 par zasad).
 Fragmenty DNA wielkości 20 par zasad nie są widoczne na rysunku

da również dwie formy – długą (*lprlr*) oraz krótką (*sprlr*). Forma długa (*lprlr*) stymuluje: promotory genów białek mleka, kanały jonowe (głównie K⁺), nie ma aktywności kinazowej, ale współdziała z takimi cząsteczkami jak STAT-5 (signal transducer and activator of transcription 5). Forma krótka (*sprlr*) mediuje proliferację niektórych komórek oraz znosi aktywację wywołaną przez *lprlr* [1].

U samic prolaktyna pobudza laktację i instynkt macierzyński, natomiast u samców – zachowania samcze i „ojcowskie”. W sezonie rozrodczym sekrecja tego hormonu znacznie wzrasta u samców, sprzyjając właściwemu przebiegowi spermatogenezy i jest wyraźnie stymulowana przez akt kopulacji, jakkolwiek znaczenie zwiększonego uwalniania prolaktyny w tym okresie nie jest do końca wyjaśnione. Wiadomo jednak, że prolaktyna dodatnio stymuluje ruchliwość plemników oraz wpływa na erekcję [3].

Rolę knura w doskonaleniu cech użytkowych trzody chlewnej podkreślił już w latach sześćdziesiątych Lesley, stwierdzając, że ojciec i matka przekazują swojemu potomstwu założenia dziedziczne w jednakowym stopniu. Z genetycznego punktu widzenia wpływ ojca i matki jest jednakowy. Biorąc pod uwagę całe stado, samiec odgrywa większą rolę, gdyż pozostawia po sobie więcej potomstwa. Mówi się, że dobry knur wart jest połową stada. Ilość i jakość nasienia wytworzonego przez knury jest cechą zmienną i zależy od wielu czynników, głównie genetycznych [9].

Badania przeprowadzono na 94 knurach użytkowanych rozplodowo w Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt, od których pobierano nasienie do inseminacji loch na terenie działania stacji. Wszystkie knury były utrzymywane w jednakowych warunkach i użytkowane rozplodowo wyłącznie do in-

seminacji. Genotypy receptora prolaktyny *PRLR* identyfikowano poprzez zastosowanie metody PCR-RFLP. Amplifikowano fragment DNA o długości 457 par zasad. W celu określenia genotypu receptora prolaktyny 20 ml produktu PCR trawiono 6 jednostkami enzymu restrykcyjnego *AluI* przez 3 godziny w temperaturze 37°C. Następnie elektroforetycznie rozdzielano fragmenty restrykcyjne DNA w 5% żelach agarozowych, które były barwione bromkiem etydyny. Kolejnym etapem było analizowanie rozdziału DNA w żelu agarozowym w świetle UV. Elektroforetyczny rozkład prążków DNA po trawieniu produktu PCR enzymem restrykcyjnym *AluI* w żelu agarozowym przedstawiono na rysunku.

W badanym stadzie knurów rozplodowych stwierdzono występowanie dwóch alleli receptora prolaktyny (A i B), z częstością dla allelu *PRLR^A* wynoszącą 0,8245 i dla allelu *PRLR^B* – 0,1755. Allele te kontrolowały występowanie trzech genotypów receptora prolaktyny (AA, AB oraz BB). Najwyższą frekwencją charakteryzował się genotyp AA – 0,7660, następnie genotypy receptora prolaktyny BB oraz AB, które występowały z częstością równą 0,1170.

Zebrano i analizowano dane o pobranych i ocenionych ejakulatach od 94 knurów wieku 300-400 dni. Analizowano zależności pomiędzy genotypami receptora prolaktyny (*PRLR*) a cechami nasienia, takimi jak: objętość ejakulatu (cm³), koncentracja plemników (mln/cm³), procent plemników żywych, liczba plemników żywych w ejakulacie (mld), liczba plemników w dawce inseminacyjnej (mld), liczba dawek inseminacyjnych oraz wiek knura (dni). Wykazano istotne statystycznie zależności ($P \leq 0,05$ i $P \leq 0,01$) między genotypami receptora prolaktyny dla objętości ejakulatu, koncentracji plemników, liczby plemników w dawce oraz liczby uzyskiwanych dawek inseminacyjnych (tab.). Nie stwierdzono istotnego wpływu genotypów receptora prolaktyny na procent plemników żywych i liczbę plemników żywych w ejakulacie.

Przeprowadzone badania sugerują możliwości wykorzystania istniejącego polimorfizmu w genie receptora prolaktyny (*PRLR*) w doskonaleniu niektórych cech użytkowości rozplodowej knurów.

Literatura: 1. Berlanga J.J., Garcia-Ruiz J.P., Perrot-Appianat M., Kelley P.A., Edery M.: *Molecular Endocrinology*, 1449, 1997. 2. De-Vlaming V.L.: *Actions of prolactin among the vertebrates*. In: Barrington E.J.W. (ed) *Hormones and Evolution*, Academic Press, New York, 561-642, 1979. 3. Frantz A.G.: *N. Engl. J. Med.*, 201-204, 1978. 4. Gronek P., Stomski R.: *Przeg. Hod.* 5, 8-11, 1998. 5. Kelly P.A., Djiane J., Postel-Vinay M.C., Edery M.: *Endocrine Review* 12, 235-251, 1991. 6. Kmieć M.: *Seria rozprawy*, 180, 5-9, 1997. 7. Kmieć M.: *Prz. Hod.* 4, 4-6, 1998. 8. Lesueur L., Edery M., Ali S., Pely J., Kelly P.A.: *Biochemistry* 88, 824-828, 1991. 9. Michalski Z., Polańska E.: *Rocz. Nauk. Zoot.*, T. 10, 2, 11-18, 1983. 10. Nowicki B., Pawlina E., Kruszuński W., Łoś P.: *Leksykon terminów z zakresu genetyki i hodowli zwierząt*, PTZ, Warszawa 1994. 11. Roberts R.G., Cole C.G., Hart K.A., Bobrow M., Bentley D.R.: *Nucleic Acids Res.* 17, 811, 1989. 12. Rothschild M.F., Vincent A.L., Tuggle C.K., Evans G., Short T.H., Southwood O.I., Wales R., Plastow G.S.: *Animal Genetics* 29, 60-74, 1998. 13. Szwaczkowski T., Szydłowski M.: *Zesz. Nauk. Przeg. Hod.* 24, 51-58, PTZ, Warszawa 1996. 14. Światoński M., Kurył J.: *Przeg. Hod.* 1, 7, 1998. 15. Vincent A.L., Wang L., Tuggle C.K., Robic A., Rothschild M.F.: *Monmalian Genome* 8, 793-794, 1997. 16. Wallis M.: *Federation of European Biochemical Societies Letters* 44, 205-208, 1974. 17. Zwierzchowski L., Jaszczk K., Modliński J.A. i wsp.: *Biotechnologia zwierząt*. PWN, Warszawa 1997. 18. Żurkowski M., Kurył J., Gralak B., Kossakowska A., Niemczewski C., Reklewski T., Pierzchała M.: *Przeg. Hod.* 5, 4-7, 1995.