nio wpływać na kształtowanie wymienionych cech fenotypowych. Jest to więc wartościowa informacja potwierdzająca przydatność polimorfizmu genu GH jako markera genetycznego dla QTL.

Literatura: 1. Abdel-Meguid S.S., Shieh H.S., Smith W.W., Dayringer H.E., Violand B.N., Bentle L.A.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 6434, 1987; **2. Anfinson M.S., Davis S.L., Christian E., Everson D.O.**: Proc. West. Sec., Am. Soc. Anim. Sci. 26, 175, 1975; **3. Chen W.Y., Wight D.C., Chen N.Y., Coleman T.A., Wagner T.E., Kopchick J.J.**: J. Biol. Chem. 266, 2252, 1991; **4. De Vos A.M., Ultsch M., Kossiakoff A.A.**: Science 225, 306, 1992; **5. Eppard P.J., Bentle L.A., Violand B.N., Ganguli S., Hintz R.L., Kung Jr. L., Krivi G.G., Lanza G.M.**: J. Endocrinol. 132, 47, 1992; **6. Gluckman P.D., Breier B.H., Davis S.R.**: J. Dairy Sci. 70, 442, 1987; **7. Lee B.K., Lin G.F., Crooker B.A., Murtaugh M.P., Hansen L.B., Chester-Jones H.**: Domest. Anim. Endocrinol. 13, 373, 1996; **8. Løvendahl P., Sejrsen K.**: Anim. Prod. 56, 285, 1993; **9. Løvendahl P., Liboriussen T., Jensen J., Vestergaard M., Sejrsen K.**: Acta Agric. Scand., Sect. A, Anim. Sci. 44, 169, 1994; **10. Lucy M.C., Hauser S.D., Eppard P.J., Krivi G.G., Clark J.H., Bauman D.E., Collier R.J.**: Domest. Anim. Endocrinol. 10, 325, 1993; **11. Parmentier I., Portetelle D., Gengler N., Prandi A., Bertozzi C., Vleurick L., Gilson R., Renaville R.**: Domest. Anim. Endocrinol. 17, 139, 1999.

Od inseminacji do klonowania bydła

Anna Maria Duszewska

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Droga od inseminacji do klonowania obejmuje biotechniki, z których większość została już wprowadzona do hodowli bydła. W artykule zostaną przedstawione tylko najistotniejsze z nich, tzn. inseminacja, MOET, OPU-IVP-ET, tworzenie osobników transgenicznych oraz klonowanie. Dla postępu hodowlanego najważniejszą z biotechnik było sztuczne unasienianie i wprowadzenie programu MOET. OPU-IVP-ET stanowi pomost między technikami, które przyniosły największy postęp, a biotechnikami (tworzenie osobników transgenicznych czy klonowanie), o których trudno powiedzieć, że mogą przyczynić się do postępu hodowlanego, ale niewątpliwie są nowym i bardzo ważnym kierunkiem w hodowli bydła.

Pierwszą z biotechnik, która zrewolucjonizowała hodowlę bydła było sztuczne unasienianie. Odegrało ono ogromną rolę w osiągnięciu postępu hodowlanego i to zarówno w przypadku bydła mlecznego, jak i mięsnego. Wprowadzenie inseminacji zapewniło nieograniczony dostęp do wybitnych reproduktorów, a dzięki możliwości mrożenia nasienia, również zachowanie ich genów (Reklewska i Reklewski, 1997). Inseminacja doprowadziła do wyeliminowania genów letalnych z populacji oraz do zredukowania, czy wręcz do zwalczenia, chorób wenerycznych (Salisbury i wsp., 1978; Foote, 1981). Stało się to możliwe dzięki badaniom nad fizjologią nasienia, które zostały zapoczątkowane pod koniec XIX wieku w Rosji przez Ivanoff'a (1922), oraz badaniom nad jego pozyskiwaniem przy użyciu sztucznej pochwy, która została wprowadzona przez Amantea w 1914 roku (Perry, 1968). Dopiero kilkadziesiąt lat później opracowano metody przechowywania nasienia oraz jego mrożenia. Po raz pierwszy nasienie buhajów zostało zamrożone w 1952 roku (Polge i Rowson, 1952). Od tego czasu inseminacja jest powszechnie stosowaną techniką.

Kolejnym milowym krokiem w postępie hodowlanym było wprowadzenie programu MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer), opierającego się na wywoływaniu mnogich owulacji, tzw. superowulacji (MO) i przenoszeniu zarodków do biorczyń (ET). Powstanie programu MOET było możliwe dzięki osiągnięciom zespołów badaczy pracujących już w latach 30. nad cyklem płciowym, a zwłaszcza nad jego regulacją. Na podstawie tej wiedzy wyizolowano hormony płciowe, a następnie otrzymano ich analogi (Hansel i Convey, 1983). Kolejnym etapem były badania dotyczące synchronizacji rui i wywoływania superowulacji (Casida i wsp., 1943; Rowson, 1951; Foote i Onuma, 1971) oraz badania nad optymalizacją tych procesów (Elsden i wsp., 1978; Brackett i wsp., 1981). Połączenie tych technik z inseminacją pozwoliło uzyskać dużą liczbę zarodków, które początkowo izolowano poubojowo lub chirurgicznie.

W ten sposób od dawczyni, która została poddana superowulacji, następnie inseminacji i 5 dnia ubita w rzeźni, uzyskano 8-komórkowe zarodki, które przeniesiono do przygotowanych hormonalnie biorczyń. W wyniku tego, 19 grudnia 1950 urodziło się pierwsze cielę. W ciągu roku uzyskano tą techniką jeszcze dwa cielęta (Willet i wsp., 1951, 1953). W kolejnych latach wprowadzono techniki wypłukiwania zarodków z macicy (Foote i Onuma, 1971; Seidel, 1981). Zarodki przenoszono do biorczyń lub też mrożono. Po raz pierwszy potomstwo po zamrożeniu i rozmrożeniu zarodków uzyskał Wilmut w 1973 roku (Wilmut i Rowson, 1973). W następnych latach metody zamrażania i rozmrażania zostały na tyle zmodyfikowane, że wprowadzono je do szerokiej praktyki (Niemann, 1991). Obecnie program MOET jest powszechnie stosowany do oceny wartości hodowlanej.

Kolejną biotechniką jest OPU-IVP-ET. Pierwszym etapem tej złożonej techniki jest przyżyciowa izolacja oocytów poprzez punkcję pęcherzyków jajnikowych (OPU-Ovum Pick-up). Z izolowanych oocytów, w wyniku procedury zwanej umownie „produkcją zarodków *in vitro*" (IVP-in vitro production), uzyskuje się zarodki w stadium moruli bądź blastocysty. Zarodki w tym stadium są następnie przenoszone do biorczyń (ET-embryo transfer) lub są zamrażane. Wprowadzenie OPU-IVP-ET było możliwe dzięki opracowaniu metod hodowli *in vitro*, które pozwoliły na produkcję *in vitro* zarodków bydlęcych. Pierwsze uzyskane cielęta po zapłodnieniu *in vitro* pochodziły z oocytów „rzeźnianych", które przeszły proces dojrzewania w jajnikach, czyli w warunkach *in vivo* (Brackett i wsp., 1982). Dopiero kilka lat później uzyskano cielęta z oocytów, które proces dojrzewania przeszły w warunkach *in vitro* (Lu i wsp., 1987). Ogromne znaczenie miało wprowadzenie przez Pieterse i współpracowników przyżyciowego, wielokrotnego pobierania oocytów przez pochwę (OPU) od tej samej dawczyni. Autorzy ci jako pierwsi uzyskali cielę stosując OPU (Pieterse i wsp., 1988, 1991). Wprowadzenie OPU było bardzo istotnym krokiem w przyspieszeniu postępu hodowlanego. Po pierwsze

dlatego, że zarodki uzyskane z izolowanych oocytów pochodzą od znanych pod względem pochodzenia i uznanych pod względem wartości hodowlanej dawczyń. Po drugie, od dawczyni można uzyskać o wiele więcej zarodków niż w przypadku innych biotechnik. Stosując program MOET, od dawczyni z jednego płukania można uzyskać średnio 6 zarodków, czyli 18 zarodków przy trzykrotnym płukaniu w ciągu roku. W przypadku OPU-IVP od dawczyni już z jednej serii, obejmującej 16 sesji, można uzyskać około 20 zarodków, natomiast w ciągu roku można wykonać 3 serie OPU-IVP, czyli w sumie 60 zarodków. Nie bez znaczenia jest również fakt, że tą techniką można izolować oocyty nie tylko od jałówek i krów w naturalnym bądź stymulowanym hormonalnie cyklu, ale również od dawczyń cielnych (Duszewska i Reklewski, 2000; Duszewska i wsp., 2000), co przyczynia się do zmniejszenia odstępu międzypokoleniowego, a co za tym idzie do przyspieszenia postępu hodowlanego.

Ponadto OPU-IVP-ET jest jedną z biotechnik, które umożliwiają tworzenie osobników transgenicznych oraz klonowanie. Stąd też stanowi ona pomost między inseminacją, programem MOET a tworzeniem osobników transgenicznych i klonowaniem. Następną biotechniką jest tworzenie osobników transgenicznych, choć o wiele bardziej trafne byłoby użycie zwrotu – tworzenie osobników genetycznie zmodyfikowanych, zwłaszcza kiedy są one tworzone nie tylko na drodze wprowadzenia DNA, ale również modyfikacji lub usunięcia DNA. Najczęściej osobniki transgeniczne są tworzone poprzez wprowadzenie DNA do przedjądrza zygoty, wprowadzenie jąder komórek uprzednio transfekowanych do wyjądrzonych (pozbawionych jąder) oocytów lub też poprzez wykorzystanie wirusów jako wektorów przenoszących DNA (Piedrahita, 2000). Tworzenie transgenicznego bydła stało się możliwe dzięki badaniom zapoczątkowanym na myszach (Gordon i wsp., 1980). Sama technika jest dość skomplikowana. Zasadniczo tworzenie zwierząt transgenicznych sprowadza się do skonstruowania genu zawierającego część strukturalną i sekwencje regulacyjno-promotorowe; wprowadzenie konstruktu do komórki oraz pozyskiwanie produktu powstałego na bazie wprowadzonego genu.

Po raz pierwszy transgeniczne krowy uzyskano w 1991 roku. Do uzyskanych w warunkach *in vitro* zygot wprowadzono gen ludzkiej laktoferyny z promotorem bydlęcej kazeiny αS1. Następnie zarodki hodowano do stadium blastocysty, po czym przenoszono do biorczyń. W dwóch przypadkach urodzone cielęta były transgeniczne i były to osobniki męskie (Krimpenfort i wsp., 1991). Dlatego, aby osiągnąć efekt końcowy, czyli krowy produkujące wraz z mlekiem ludzką laktoferynę, transgeniczne buhajki zostały użyte do rozpłodu z nadzieją uzyskania transgenicznej żeńskiej linii. Niewątpliwie otrzymanie transgenicznych krów było ogromnym osiągnięciem, jednak w tym przypadku końcowy produkt mógł być uwalniany jedynie przez samice i to będące w laktacji. Stąd też w ostatnich latach tak wiele uwagi poświęca się badaniom mającym na celu pozyskiwanie interesujących nas czynników z moczu lub krwi, co uniezależnia efekt końcowy od płci, laktacji itp. (Brink i wsp., 2000; Piedrahita, 2000; Polejaeva i Campbell, 2000).

Przydatność osobników transgenicznych w hodowli bydła jest dyskusyjna. Z pewnością technika ta może być wykorzystana do tworzenia np. osobników odpornych na choroby. Natomiast jej wykorzystanie do zwiększenia przyrostów masy ciała czy też zwiększenia wydajności mlecznej nie jest uzasadnione, ponieważ tradycyjne biotechniki, np. inseminacja czy realizacja programu MOET, są skuteczniejsze i co nie bez znaczenia, o wiele tańsze. O ile jednak przydatność zwierząt transgenicznych w hodowli bydła jest dyskusyjna, o tyle ogromne znaczenie ma ich tworzenie na potrzeby przemysłu biomedycznego.

Obecnie największe znaczenie ma produkcja przez transgeniczne zwierzęta ludzkich białek o znaczeniu terapeutycznym, np. ludzkiego hormon wzrostu, tkankowego aktywatora plazminogenu, czynnika VIII i IX krzepliwości krwi, α-antytrypsyny, laktoferyny, białka C, TGFα, urokinazy, interferonów, interleukin i wielu innych biologicznie czynnych związków. Ogromne zainteresowanie wymienionymi czynnikami jest motorem napędowym dla rozwoju wszystkich kierunków biotechnologii.

Kolejną biotechniką jest klonowanie. Obecnie dysponujemy wieloma technikami otrzymywania bydlęcych klonów. Pierwsze z nich opierały się na przenoszeniu jąder komórek zarodkowych do wyjądrzonych oocytów. Za pomocą tej techniki w 1989 roku otrzymano pierwsze cielę. Pochodziło ono z blastomeru wyizolowanego z 32-komórkowego zarodka krowy rasy brangus. Izolowany blastomer został następnie wprowadzony do oocytu, z którego uprzednio usunięto jądro. Dawczynią oocytu była krowa rasy holsztyńskiej (Willadsen, 1989). Pod koniec lat 90. uzyskano klony cieląt po przeniesieniu jąder komórek somatycznych izolowanych z dorosłych osobników (Kato i wsp., 1998; Wells i wsp., 1999). Należy podkreślić, że ogromne znaczenie dla tych badań miało przyjście na świat owieczki Dolly, która była pierwszym ssakiem uzyskanym przez sklonowanie dorosłego osobnika (Wilmut i wsp., 1997). Właśnie to doświadczenie zrewolucjonizowało poglądy na wiele dziedzin nauki (Modliński i Karasiewicz, 1999).

Jednak dla postępu hodowlanego klonowanie bydła, tak jak i wielu innych gatunków zwierząt gospodarskich, nie ma większego znaczenia, ponieważ postęp hodowlany nie bierze się z biologicznej jednorodności, ale z jej ogromnej różnorodności. W każdej populacji i w każdym pokoleniu pojawiają się osobniki o rozmaitych, różnorodnych cechach zarówno ilościowych (wydajność mleczna), jak i jakościowych (zawartość tłuszczu w mleku). Ta ogromna rozmaitość, tzw. zmienność międzyosobnicza, jest źródłem postępu w hodowli. Stąd też tworzenie stada klonów jest nieuzasadnione, choć można oczywiście brać pod uwagę jakieś pojedyncze osobniki, np. krowę o wysokiej wydajności mlecznej, i tylko ją klonować.

O ile klonowanie z hodowlanego punktu widzenia nie ma znaczenia, o tyle może ono odegrać ogromną rolę w przypadku zwierząt transgenicznych. Wyprodukowanie transgenicznego osobnika jest pracochłonne, czasochłonne, kapitałochłonne i, pomimo wykorzystania do jego stworzenia rutynowych metod, w dużym stopniu zawodne. Klonowanie pozwala na powielanie osobników transgenicznych. Przeprowadzono już pierwsze próby uzyskania transgenicznych klonów (Cibelli i wsp., 1998). Autorzy tych doświadczeń użyli do klonowania fibroblastów, które izolowano od nietransgenicznego płodu i dopiero w laboratorium wprowadzono do nich gen, w konsekwencji czego uzyskano trzy transgeniczne buhajki. Nie była to jedyna próba otrzymania transgenicznych klonów, choć również i w tych badaniach użyto komórek transfekowanych w laboratorium (Cibelli i wsp., 1998; Hill i wsp., 1999).

Przypuszczalnie już w niedalekiej przyszłości przedstawiony model otrzymywania transgenicznych klonów będzie powszechnie stosowany (Brink i wsp., 2000).

Dlatego też tworzenie osobników transgenicznych, a następnie ich klonowanie, wyznacza nowy kierunek w hodowli bydła, który będzie działał na potrzeby szeroko pojętego przemysłu biotechnologicznego, jak również będzie służył badaniom podstawowym. Do zrealizowania tych celów będą potrzebne stada krów o znanym pochodzeniu, od których będzie się izolować oocyty techniką OPU i dzięki procedurze IVM będzie dostarczany materiał do wprowadzenia transfekowanych w laboratorium jąder komórek izolowanych np. z płodu lub też dzięki procedurze IVF będzie dostarczany materiał do wprowadzenia genu. Otrzymane zarodki będą hodowane do stadium blastocysty, a następnie przenoszone do biorczyń. Uzyskane potomstwo będzie tworzyło stado transgenicznych osobników, które będą produkować w mleku, moczu, krwi lub ślinie interesujące nas czynniki, a jednocześnie będą dawcami jąder komórek somatycznych (pochodzących z ucha, wymienia, krwi itp.) do klonowania. Do klonowania będzie potrzebne następne stado dawczyń oocytów i biorczyń zarodków. Niewątpliwie tworzenie transgenicznych osobników, a następnie ich klonowanie jest nowym kierunkiem w hodowli bydła.

41 pozycji literatury do wglądu u Autorki i w Redakcji.

Rozwój badań z zakresu polimorfizmu mikrosatelitarnych sekwencji DNA w hodowli koni

Maciej Żurkowski, Barbara Gralak, Cezary Niemczewski

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Rozwój hodowli zwierząt gospodarskich wiąże się niewątpliwie z rozwojem metod statystycznych i programów komputerowych, pozwalających w miarę dokładnie szacować postęp hodowlany, jaki uzyskuje się w wyniku pracy hodowlanej. Drugim istotnym elementem, który zaczyna odgrywać coraz większą rolę w hodowli jest możliwość identyfikacji tzw. genów markerów. Geny markery są to geny, które można zidentyfikować w miarę prostymi i niezawodnymi metodami, określając produkty tych genów, które dziedziczą się na zasadzie praw Mendla.

Dotychczas u koni identyfikowane były dwa genetyczne układy markerów – grupy krwi oraz polimorfizm białek i enzymów krwi. W sumie u koni jako gatunku identyfikuje się około 130 alleli, natomiast u poszczególnych ras, biorąc pod uwagę stopień zróżnicowania, identyfikowanych jest od 50 do 70 alleli. Dalsze badania tych markerów niewiele już mogą wnieść odnośnie do zwiększenia liczby identyfikowanych alleli u koni. Trzeba stwierdzić, że liczba aktualnie identyfikowanych alleli stwarza możliwości prowadzenia kontroli pochodzenia u koni przy bardzo dużym prawdopodobieństwie wykrycia błędów, umożliwia też scharakteryzowanie struktury genetycznej populacji czy określenie dystansu genetycznego pomiędzy rasami.

Obecnie hodowla zmierza do poznania genetycznych uwarunkowań cech użytkowych zwierząt gospodarskich poprzez określenie genów cech ilościowych QTL (quantitative trait loci), ocenę prawidłowego funkcjonowania organizmu poprzez rozpoznanie genetycznych uwarunkowań procesów fizjologicznych.

Ogromny postęp w badaniach z zakresu genetyki molekularnej, jaki w ostatnich latach dokonał się na świecie, zapoczątkowany odkryciem przez Skinner i wsp. [5] w 1974 roku sekwencji mikrosatelitarnych DNA, stworzył niespotykane dotychczas możliwości wykorzystania informacji genetycznej w poznaniu uwarunkowań cech użytkowych zwierząt. Mikrosatelitarne sekwencje DNA są to bloki krótkich, tandemowo powtarzających się sekwencji nukleotydów, wykazujących duże zróżnicowanie osobnicze w liczbie tych powtórzeń. Zróżnicowanie to w odniesieniu do określonego locus mikrosatelitarnego w genomie daje efekt w postaci polimorfizmu. Sekwencje te, zwane również mikrosatelitami, są równomiernie rozproszone w całym genomie, co jest bardzo istotne z punktu widzenia badań genetycznych, gdyż pozwala na uzyskanie informacji genetycznej, dotyczącej całego genomu osobnika. Dziedziczą się one zgodnie z prawami Mendla. Istotne jest również i to, że są one łatwe do identyfikacji dzięki zastosowaniu najnowocześniejszych metod z zakresu badań molekularnych, opartych na automatycznym sekwencjonowaniu fragmentów DNA, co eliminuje pewien margines błędów, który jest nie do uniknięcia przy odczytywaniu wyników zarówno w badaniach grup krwi, jak i polimorfizmu białek krwi. W przypadku mikrosatelitarnych sekwencji DNA komputer określa genotyp osobnika w danym locus (rys. 1 i 2), przy czym poszczególne allele są wyznaczane liczbą par zasad, i tak np. w locus HMS6 identyfikuje się 5 alleli: 157pz, 159pz, 161pz, 163pz, 169pz.

Bardzo istotnym elementem w określaniu polimorfizmu markerów genetycznych jest możliwość uzyskania materiału do badań. W badaniach grup krwi musi to być świeża krew, której okres przechowywania w temperaturze lodówki, przy odpowiednich konserwantach, zamyka się u koni w granicach 3-4 tygodni. Nieco lepsza sytuacja jest w przypadku badań polimorfizmu białek i enzymów krwi, gdyż zarówno krwinki, jak i surowica krwi mogą być przechowywane przez dłuższy czas w stanie zamrożenia. W badaniach mikrosatelitarnych sekwencji DNA materiałem może być: krew, kawałki skóry, cebulki włosowe, nasienie, oocyty czy zarodki, przy czym mogą to być ilości śladowe, czego przykładem jest fakt, że do badań wystarczy 4-5 cebulek włosowych. Przechowywanie próbek do badań nie stwarza żadnego problemu; pełną krew, nasienie, oocyty i zarodki przechowuje się w stanie zamrożenia, natomiast włosy wraz z cebulkami – w suchym miejscu bez specjalnej konserwacji.