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.

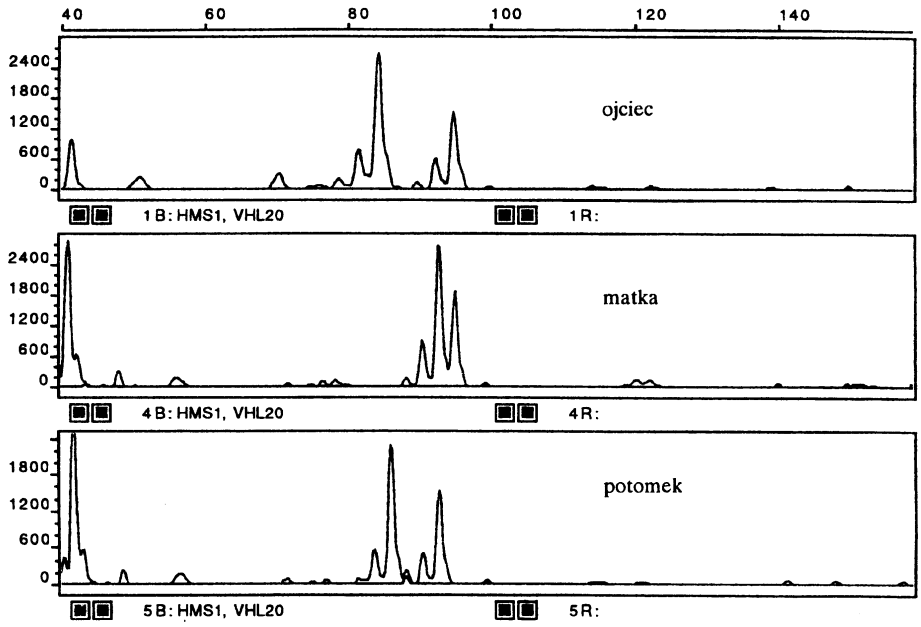
Obecnie hodowla zmierza do poznania genetycznych uwarunkowań cech użytkowych zwierząt gospodarskich poprzez określenie genów cech ilościowych QTL (quantitative trait loci), ocenę prawidłowego funkcjonowania organizmu poprzez rozpoznanie genetycznych uwarunkowań procesów fizjologicznych.

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.

Różnorodność i dostępność materiału służącego do badań ma bardzo istotne znaczenie, szczególnie w przypadku wybitnych osobników, które odegrały znaczącą rolę w rozwoju danej rasy koni. Umożliwia to na przykład prześledzenie zaistniałej mutacji, w wyniku której występują niepożądane cechy, lub wykrycie rzadko występującego allelu w populacji. Takie badania są możliwe dzięki korzystaniu z materiału zgromadzonego w różnego rodzaju bankach nasienia czy „bibliotekach włosów z cebulkami". Pozwala to na objęcie badaniami bardzo dużej liczby osobników i nie pociąga za sobą dużych kosztów w gromadzeniu i utrzymaniu materiału do przyszłych badań.

O postępie badań nad polimorfizmem DNA niech świadczy fakt, że pierwsze 5 loci mikrosatelitów u koni zostało opisanych przez Ellegrena i wsp. [3] w 1992 roku, a na I Międzynarodowym Sympozjum Mapowania Genów u Koni, zorganizowanym w Lexington w USA w październiku 1995 roku, znanych było już 129. Obecnie w literaturze światowej odnotowanych jest u koni około 500 mikrosatelitarnych markerów genetycznych. Biorąc pod uwagę tak istotne elementy, jak równomierne rozmieszczenie w genomie, duża heterozygotyczność, niezawodność metod badawczych, opartych na nowoczesnej technice, stwierdzić można z całą pewnością, że mikrosatelitarne sekwencje DNA stały się najliczniejszą i najbardziej wartościową klasą markerów genetycznych.

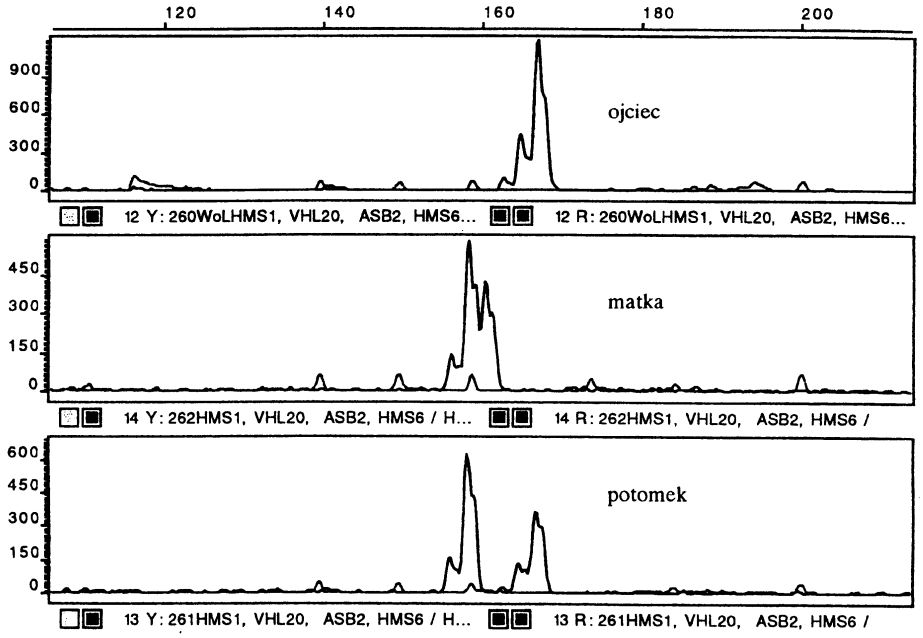


Rys. 1. Wydruk genotypów w locus VHL20: ojciec – 85/95 pz, matka – 93/95 pz, potomek – 85/93 pz

Mikrosatelitarne markery genetyczne nabrały szczególnego znaczenia w programach mapowania genów u koni, podobnie jak i u innych gatunków zwierząt gospodarskich, gdyż jest to jedyna droga rozszyfrowania genomu poprzez identyfikację genów związanych z użytkowością, a następnie wykorzystanie uzyskanych informacji w programach selekcji i doskonalenia różnych ras. Ze względu na konieczność prowadzenia badań na podstawie identyfikacji jak największej liczby mikrosatelitarnych markerów genetycznych, obejmujących maksymalnie różnorasową liczbę rodzin, powstał międzynarodowy program mapowania genów u koni, w którym uczestniczy 25 laboratoriów z różnych krajów, w tym z Polski: Zakład Immunogenetyki Zwierząt IGiHZ PAN oraz Katedra Hodowli Koni AR Poznań.

Drugim bardzo istotnym obszarem zastosowania badań polimorfizmu mikrosatelitarnych sekwencji DNA jest wykorzystanie ich jako genów markerów dla jednostek chorobowych, których występowanie ma podłoże genetyczne, lub też identyfikacji zaistniałych mutacji genowych, których wynikiem są stany niesprawności fizjologicznej organizmu. U ludzi badania takie są już mocno zaawansowane, zidentyfikowano kilkaset genów związanych z występowaniem różnych jednostek chorobowych czy anomalii, natomiast u zwierząt domowych ten kierunek badań dopiero się rozwija. Należy się liczyć z faktem, że badania te u zwierząt będą odgrywać coraz większą rolę w ustalaniu przyczyn niepowodzeń w pracy hodowlanej.

W chwili obecnej znane jest podłoże genetyczne kilku schorzeń występujących u koni. Dzięki wykorzystaniu infor-



Rys. 2. Wydruk genotypów w locus HMS6: ojciec – 169/169 pz, matka – 159/161 pz, potomek – 159/169 pz

macji genetycznej, jaką daje polimorfizm mikrosatelitarnego DNA, zlokalizowano w genomie konia gen odpowiedzialny za brak odporności (SCID – severe combined immunodeficiency disease) u koni arabskich. Genetycznym defektem odpowiedzialnym za wystąpienie tej choroby jest mutacja w genie kodującym podjednostkę DNA – zależnej katalitycznej kinazy białkowej (DNA-PKcs – DNA protein kinase catalytic). Poprzez ustalenie sprzężenia locus tego genu z loci mikrosatelitów HTG4 i HTG8, gen DNA-PKcs zmapowano w chromosomie 9 [1]. Opracowano test dający możliwość wczesnego wykrywania tego schorzenia [2]. Znane jest także podłoże genetyczne paraliżu spowodowanego okresową hiperkaliemią (HYPP – hyperkalaemic periodic paralysis) u koni rasy quarter, który uwarunkowany jest mutacją w obrębie genu kanału sodowego mięśni szkieletowych oraz defektu, jakim jest letalny syndrom białych źrebiąt związany z umaszczeniem „overo" (OLWS), za wystąpienie którego odpowiedzialna jest prawdopodobnie mutacja wewnątrz genu endotelialnego receptora B (EDNRB).

Dotychczas markery genetyczne w praktycznej hodowli zwierząt gospodarskich odegrały znaczącą rolę w kontroli pochodzenia, szczególnie jeżeli chodzi o bydło i konie. Obecnie kontrola pochodzenia opiera się na badaniach grup krwi oraz polimorfizmu białek i enzymów krwi, przy czym wiarygodność badań jest stosunkwo duża, gdyż prawdopodobieństwo wykluczenia jednego z osobników rodzicielskich u koni waha się w granicach 0,9467-0,9865, w zależności od liczby identyfikowanych alleli oraz stopnia heterozygotyczności populacji.

Należy sobie równocześnie zdać sprawę, że badania grup krwi są bardzo pracochłonne, co wiąże się z koniecznością uzyskania odpowiedniej liczby surowic testowych, pozwalających na określenie grup krwi. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, że można badać tylko osobniki żyjące, przy czym nie zawsze na podstawie badania pełnej rodziny (ogier–klacz–źrebak) jesteśmy w stanie określić genotyp badanego osobnika. Mikrosatelitarne markery genetyczne dzięki temu, że odznaczają się niespotykanym dotychczas polimorfizmem, łatwością pozyskania i różnorodnością materiału do badań oraz niezawodną i obiektywną identyfikacją, stały się podstawą nie tylko kontroli pochodzenia, lecz także stwarzają możliwość identyfikacji osobniczej. Liczące się laboratoria, prowadzące badania kontroli pochodzenia u koni, obok badań grup krwi oraz polimorfizmu białek i enzymów krwi, wprowadzają rutynowe badania mikrosatelitarynych markerów genetycznych. W jednym z największych laboratoriów na świecie, pod względem liczby badanych osobników, Laboratorium Genetyki Weterynaryjnej w Davis (Uniwersytet Kalifornijski) dla uproszczenia całej procedury polimorfizm mikrosatelitarnych sekwencji DNA oznacza się z cebulek włosowych. Już dzisiaj prawdopodobieństwo wykluczenia, przy odpowiednio dużej liczbie identyfikowanych markerów mikrosatelitarnych DNA, kształtuje się w granicach 0,9998.

W najbliższej przyszłości należy się liczyć z faktem, że uwierzytelnianie pochodzenia będzie głównie oparte na badaniach mikrosatelitarnych sekwencji DNA, a prawdopodobieństwo wykluczenia zbliży się do 100%. Pozwoli to na wydanie opinii, że dany potomek pochodzi od określonej pary rodzicielskiej, czego jednoznacznie nie jesteśmy w stanie stwierdzić na podstawie badania grup krwi oraz polimorfizmu białek i enzymów krwi.

W badaniach przeprowadzonych przez Zakład Immunogenetyki Zwierząt IGiHZ PAN, przy zastosowaniu 10 loci mikrosatelitów (identyfikowano 65 alleli), u koni pełnej krwi prawdopodobieństwo wykluczenia wynosiło 0,9967 [4], natomiast przy badaniach 10 loci mikrosatelitarnych markerów DNA i ośmiu loci polimorficznych białek i enzymów krwi, bez badania grup krwi uzyskano prawdopodobieństwo wykluczenia równe 0,9995. Z kolei prawdopodobieństwo spotkania identycznych genotypów dwóch losowo wybranych osobników na podstawie badań 10 loci sekwencji mikrosatelitarnych DNA u koni pełnej krwi wynosi $1{,}266 \times 10^{-8}$.

Obecnie podjęcie badań nad określaniem polimorfizmu mikrosatelitarnych markerów genetycznych w krajowej hodowli koni wiąże się z decyzjami władz hodowlanych, a nie z problemami metodycznymi. Biorąc pod uwagę fakt, że takie decyzje mogą zapaść w międzynarodowych gremiach hodowlanych, należałoby już obecnie opracować program wprowadzania tych badań do hodowli elitarnej, początkowo przynajmniej u czołowych ogierów arabskich czystej krwi i pełnej krwi angielskiej oraz ogierów, których nasienie znajduje się w Centrum Rozrodu Koni w Łącku.

Literatura: 1. Bailey E., Reid R.C., Skow L.C., Mathiasgn K., Lear T.L., McGuire T.C.: Anim. Genet. 28, 1997. **2. Bernoco D., Bailey E.**: Am. J. Hum. Genet. 16, 1998. **3. Ellegren H., Johansson M., Sanberg K., Andersson L.**: Anim. Genet. 23, 1992. **4. Niemczewski C., Żurkowski M.**: Anim. Science Papers and Reports 18, 2000. **5. Skinner D.M., Beati W.J., Blattner F.R., Stark B.P., Dahlberg J.E.**: Biochemistry 13, 1974.

Badania cytogenetyczne koni

Rafał Parada, Kazimierz Jaszczak

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Hodowla koni w porównaniu z hodowlą innych gatunków zwierząt gospodarskich jest trudna i kosztowna. Związane jest to ze stosunkowo niską reprodukcyjnością tego gatunku zwierząt. Dlatego też bardzo ważne jest zaźrebianie jak największej liczby klaczy w każdym sezonie i otrzymanie zdrowego potomstwa.

Wieloletnie obserwacje efektów rozrodu w państwowych i prywatnych stadninach w Polsce wskazują na stałe obniżanie się wskaźników reprodukcji, mimo zabiegów hodowlanych i weterynaryjnych. Różne są tego przyczyny, lecz głównie spowodowane są brakiem rui, nieskutecznością zapłodnienia, wczesnym zamieraniem zarodków oraz poronieniami.

Przeważnie badania nad zaburzeniami płodności u koni koncentrują się na żywieniowych, bytowych i infekcyjnych