

technik – bezkonkluzyjne. Przed kilkoma laty nie znano jeszcze funkcji, mechanizmów działania wielu białek biorących udział w regulacji wchłaniania żelaza. Niektóre z tych białek nie były jeszcze nawet zidentyfikowane. Dzięki zakrojonym na szeroką skalę badaniom podstawowym, prowadzonym przez setki naukowców w laboratoriach na całym świecie, możemy dzisiaj rutynowo badać ekspresję genów kodujących te białka nie tylko u zwierząt laboratoryjnych, ale i gospodarskich. Dla Czytelników pewnym zaskoczeniem może być fakt, że do identyfikacji wielu genów odgrywających rolę w absorpcji żelaza posłużyła słodkowodna ryba akwariowa o nazwie danio pręgowany (*Danio rerio*, ang. zabrafish), kręgowiec pozornie nie mający wiele wspólnego ze świnia domową (*Sus scrofa*). Ze względu na szybki cykl życiowy (stadium od jaja do larwy trwa około 3 dni) oraz przezroczystość powłok ciała postaci larwalnej, danio pręgowany stał się modelowym orga-

nizmem do badań podstawowych nad metabolizmem żelaza. Wspomniana przezroczystość pozwala na obserwacje zmian zabarwienia narządów w żywych organizmach, szczególnie nie bez znaczenia w badaniach nad metabolizmem żelaza, ponieważ funkcje poszczególnych białek mogą być monitorowane na podstawie ujawniania się barwy krwistej lub barwy żelazistej ochry. Efekty tych badań były dla naszego zespołu podstawą do zaproponowania modyfikacji suplementacji żelaza zmniejszającej negatywne oddziaływanie żelaza na organizm nowo narodzonych prosiąt. Warto, aby – wzorem państw zachodnich – w środowisku naszych hodowców zakorzeniła się świadomość, że siłą napędową postępu w hodowli zwierząt gospodarskich są **BADANIA PODSTAWOWE** w zakresie genetyki, biologii molekularnej i fizjologii, i aby polskie związki hodowców podjęły wysiłek ich współfinansowania.

Cytogenetyczne i molekularne badania zmienności genetycznej w wybranych populacjach zwierząt

**Kazimierz Jaszczak, Rafał Parada,
Barbara Wardęcka, Mariusz Sacharczuk,
Kinga Boruszewska, Magdalena Kawka,
Michał Kaszuba, Kamila Fedorowicz**

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Identyfikacja i lokalizacja w chromosomach genów cech użytkowych oraz markerów z nimi sprzężonych stały się przedmiotem licznych badań, a to za sprawą możliwości ich wykorzystania w ocenie struktury genetycznej populacji, a także w programach hodowlano-selekcyjnych.

Od kilku lat w Zakładzie Cytogenetyki Molekularnej IGiHZ PAN w Jastrzębcu prowadzone są badania zmienności cytogenetycznej i molekularnej wewnątrz i między niektórymi populacjami zwierząt gospodarskich. W ramach tego tematu badano między innymi chimeryzm limfocytny i związaną z tym niepłodność jarek w stadzie owiec rasy merynos booroola oraz przyczyny jego wysokiej częstości występowania w miotach mnogich różnoplciowych. Chimeryzm limfocytny 54XX/54XY stwierdzono u 20 jarek i 22 tryczków (odpowiednio 12,0 i 13,7%), co stanowiło łącznie 25,7% analizowanej karyotypowo grupy owiec, a 8,5% wszystkich urodzonych w tym czasie w badanym stadzie. Rodzinne i rodowodowe zależności w częstości występowania chimeryzmu limfocytnego wskazują, że tworzenie się anastomoz łożyskowych między płodami owiec może mieć charakter dziedziczny [6]. W tym samym czasie podjęto badania nad występowaniem

aberracji chromosomowych u koni z zaburzeniami płodności. U przebadanych cytogenetycznie 244 klaczy z 23 stadnin państwowych i prywatnych, stwierdzono nieprawidłowości chromosomowe u 4% ogółu zbadanych zwierząt i 12,8% w stosunku do klaczy uznanych za całkowicie nieplodne [7]. Analiza cytogenetyczna ośmiu par bliźniąt różnoplciowych konika polskiego, koni zimnokrwistych, pełnej krwi angielskiej i koni półkrwi wykazała chimeryzm limfocytny XX/XY w przypadku czterech par, co wskazuje na wystąpienie anastomoz naczyniowych między błonami płodowymi bliźniąt. U bliźniąt z chimeryzmem limfocytnym dominowała własna linia komórek, a więc z chromosomami płci XX u klaczek i XY u ogierków. Komórki linii tzw. obcej, pochodzącej od współbliźniaka stanowiły od 4 do 12%. Klaczki z chimeryzmem charakteryzowały się prawidłowo rozwiniętymi narządami rozrodczymi, dwie z nich zażrebiły się i wydały potomstwo [1].

W ramach kontroli prawidłowości karyotypu buhajków przeznaczonych do rozrodu stwierdzono rzadki przypadek chimeryzmu komórkowego 60,XY/61,YYY u buhajka rasy hf. Średni procent limfocytów z karyotypem 61,YYY wynosił 28,25%. Badania cytogenetyczne buhajka, przeprowadzone w wieku 14 miesięcy, wykazały również występowanie dwu linii komórkowych w hodowli fibroblastów skóry, komórek nerki, śledziony i płuc. Stosunek komórek z karyotypem 60,XY:61,YYY wynosił odpowiednio: w skórze – 72:28, w nerce – 68:32, w śledzionie – 62:32 i w płucach – 61:39. Badania chromosomów mejoetycznych w spermatocytach I rzędu wykazały występowanie bivalentów XY i triwariantów XYY [2].

Badania karyotypowe wczesnych zarodków ptaków wykazały, że spontaniczne nieprawidłowości chromosomowe występują u nich dosyć często. Większość z nich ma charakter letalny. Analiza cytogenetyczna dwóch linii indyków: średnio ciężkiej – Nicholas 300 i ciężkiej – Nicholas 700, wykazała wysoką (w porównaniu do innych gatunków drobiu) częstość występowania nieprawidłowości chromosomowych (odpowiednio 15,4% i 8,0%). Wśród nieprawidłowości karyotypowych stwierdzono cztery różne aberracje chromosomowe, z czego większość stanowiły haploidia i chimeryzm haploidno-diploidalny [3].

We współpracy ze Stacją Zasobów Genetycznych Drobiu Wodnego w Dworzyskach, przeprowadzono badania karyotypowe zarodków kaczek utrzymywanych w stadach zachowawczych: khaki campbell x orpington (Kho-1), pekin pocho-

dzenia angielskiego (A3, LsA), orpington (01). Stada utrzymywane są od lat 70. (około 30 pokoleń) jako populacje zamknięte. W stadach takich, o małej liczebności, może dochodzić do szybkiego wzrostu nieprawidłowości chromosomowych, które są przyczyną zaburzeń w reprodukcji i mogą powodować wzrost śmiertelności zarodków. Wśród badanych kariotypowo łącznie 336 zarodków, u 8,0% wystąpiły nieprawidłowości chromosomowe. Stwierdzono duże zróżnicowanie w częstości występowania nieprawidłowości chromosomowych między badanymi stadami kaczek: od 4,9% w stadzie A3 do 13,7% w stadzie LsA. Wśród nieprawidłowości kariotypowych zanotowano głównie haploidia i chimeryzm haploidalno-diploidalny, w dwóch przypadkach mozaikowatość 2AZZ/4AZZZZ i u jednego zarodka czystą tetraploidię 4A/ZZZZ. Zaznaczyć trzeba, że zidentyfikowane nieprawidłowości chromosomowe nie występują u wylężonych osobników, co oznacza, że zarodki z tymi aberracjami zamierają w okresie inkubacji [4].

W ostatnich latach w kontynuowanych i nowo podjętych badaniach zaczęto w Zakładzie stosować w szerszym zakresie metody biologii molekularnej. Prowadzono badania polimorfizmu minisatelitarnych i mikrosatelitarnych sekwencji DNA i jego wykorzystania w analizie bioróżnorodności w populacjach zwierząt domowych i dzikich oraz markerów w mapowaniu genów cech ilościowych (QTL) u zwierząt gospodarskich. W celu mapowania QTL związanych z nieśnością i jakością jaja utworzono rodzinę referencyjną poprzez skrzyżowanie dwóch ras kur różniących się znacznie użytecznością nieśną. Komponentami były zielononóżka kuropatwiana (Zk) i rhode island red (RIR). Uzyskane stado charakteryzuje się wysokimi współczynnikami heterozygotyczności oraz dużą liczbą specyficznych alleli analizowanych *loci* mikrosatelitarnych. Mapowanie genów oddziałujących na wartość cech nieśności i jakości jaja, przy wykorzystaniu markerów mikrosatelitarnych, wykazało obecność dwunastu QTL oddziałujących na badane cechy. Rozmieszczone one były na chromosomach 1, 3, 4, 5 i 7. Znalaziono regiony wykazujące istotne oddziaływanie na masę żółtka i białka jaja, grubość i masę skorupy oraz jej procentowy udział w masie jaja, a także cechy charakteryzujące wytrzymałość mechaniczną skorupy jaja [11]. Zlokalizowanie tych kilkunastu markerów, w pobliżu których prawdopodobnie znajdują się regiony QTL determinujące w znacznym stopniu ważne cechy użyteczności nieśnej, było przesłanką do badań mających na celu weryfikację przydatności markerów mikrosatelitarnych sprzężonych z cechami użyteczności nieśnej kur i próbę ich wykorzystania w selekcji kur nieśnych. Na dwóch fermach (klatkowy i podłogowy system chowu) przeprowadzono czteropokoleniową selekcję – dla RIR rozbieżną i dla Zk pozytywną, na wybrane cechy jakości jaja (wytrzymałość skorupy, masy jaja i masy żółtka). Stwierdzono jednak, że wykorzystanie w selekcji informacji markerowej dotyczącej badanych *loci* jest praktycznie niemożliwe, tak ze względu na zbyt mały wpływ sprzężonych QTL, jak i na ich plejotropowe, antagonistyczne działanie na inne ważne cechy użyteczności nieśnej. Dalsze badania mapowania QTL ograniczono tylko do chromosomu 4, ale przy dużym zagęszczeniu *loci* cech markerowych. Zidentyfikowano w 12 regionach chromosomu 4 geny odpowiedzialne za cechy jakości jaj. Niektóre z nich zostały potwierdzone fizycznie metodą FISH [9].

Badając dwie linie kur, uzyskane w wyniku prowadzonej przez sześć pokoleń selekcji w kierunku wysokiej (linia H) oraz niskiej (linia L) częstości występowania wrodzonych wad kręgosłupa, stwierdzono, że selekcja rozbieżna spowodowała zmiany frekwencji alleli mikrosatelitarnych w piętnastu anali-

zowanych *loci*. Zidentyfikowano 8 alleli specyficznych dla linii H i 6 alleli specyficznych dla linii L. W badanych liniach kur zidentyfikowano również polimorfizm genu hormonu wzrostu, posługując się metodą PCR-RFLP. W intronie 4 genu hormonu wzrostu znaleziono nowe miejsce restrykcyjne dla enzymu MspI. Częstość wad szkieletowych u embrionów w 6. pokoleniu wynosiła 30,7% dla linii H i 3,7% dla linii L [13].

Wykorzystując metodę DNA fingerprinting prowadzono badania zróżnicowania genetycznego linii królików i myszy, uzyskanych w wyniku dwukierunkowej selekcji myszy związanej z behawiorem [8]. W badaniach molekularnych dwu linii królików selekcjonowanych przez 9 pokoleń na wysoką i niską aktywność ruchową stwierdzono zróżnicowanie genetyczne między nimi, charakteryzujące się obecnością prążków markerowych we wzorze DNA fingerprinting.

W ośmiu stadach zachowawczych kaczek badano zmienność genetyczną przy wykorzystaniu polimorfizmu długości sekwencji mikrosatelitarnych. Analizowano 6 mikrosatelitów u 15 osobników z każdego stada kaczek. W badanych 6 *loci* mikrosatelitarnych zidentyfikowano łącznie 26 alleli. Najbardziej polimorficzne było *locus* APH 04, w którym łącznie stwierdzono 10 alleli. W każdym z pozostałych *loci* stwierdzono występowanie 4 alleli mikrosatelitarnych. Liczba alleli w poszczególnych *loci* wahała się od 4 do 10, łącznie dla wszystkich badanych stad (średnio 5,2 na jedno *locus*). Średnia liczba alleli w *locus* w jednym stadzie wahała się między 2,8 a 3,8. W analizowanym materiale stwierdzono występowanie alleli specyficznych dla niektórych stad kaczek.

Wady szkieletu występują w stadach kur z różną częstością i stanowią istotny problem gospodarczy. Analiza wad szkieletu u 1053 zarodków z dwóch stad reprodukcyjnych kur brojlerowych wykazała, że brak kości pokrywowych czaszki (exencephaly) jest najczęściej występującą anomalią i stanowi 48% wszystkich diagnozowanych wad szkieletu. Badano ekspresję genów w tkankach czaszki kurczątków z wadami braku kości pokrywowych (exencephaly), przy użyciu mikroprocesorów DNA (cDNA microarrays) zawierających 1152 geny i etykiety sekwencji ulegających ekspresji. Analiza wykazała zwiększoną ekspresję 11 znanych genów/homologów oraz zmniejszoną ekspresję 51 znanych genów/homologów. Geny tioredoksyny (AL585511) i reduktazy tioredoksyny (AL584253) biorą udział u myszy w rozwoju syndromu NTD (neural tube defects). U kurczątków z brakiem kości czaszki ekspresja genu tioredoksyny była 25-krotnie mniejsza, a reduktazy tioredoksyny 2,4-krotnie mniejsza niż u kurczątków normalnych. Różnice w ekspresji tych dwu genów zostały potwierdzone analizą ilościową Real-Time PCR. Dane te wskazują, że geny AL584253 i AL585511 są genami kandydatami dla dziedzicznego braku kości czaszki u kurczątków [10, 12].

Analiza ekspresji genów homeotypycznych kierujących rozwojem: Hox A1, Hox B3 i Hox D3 wykazała, że u kurczątków z wadami rozwojowymi czaszki ekspresja genu Hox A1 jest prawie 16-krotnie większa niż u zdrowych kurczątków. Ekspresja genów Hox B3 i Hox D3 nie wykazała większych zmian [5].

Prowadzone są także badania bioróżnorodności przy użyciu markerów molekularnych w populacjach cietrzewia występujących na terenie północno-wschodniej Polski, w celu ich wykorzystania w programach ochrony tego ginącego gatunku. W ramach projektu wykonuje się analizy genetyczne, polegające na zbadaniu polimorfizmu długości sekwencji mikrosatelitarnych DNA w 10-15 *loci* specyficznych dla cietrzewia. Materiałem wykorzystywanym jako źródło DNA do analiz są pióra ptaków, zebrane w ostojach cietrzewia w północno-wschodniej Polsce w latach 2004-2005. Uzyskane wyniki, w postaci

długości alleli mikrosatelitarnych dla każdego niepowtarzalnego genotypu, zostaną wykorzystane do obliczeń statystycznych. Analiza wyników będzie polegała na obliczeniu zróżnicowania genetycznego populacji, obserwowanej (H_o) i oczekiwanej (H_e) heterozygotyczności, odchyłań od równowagi Hardy-Weinberga (RHW), nierównowagi sprzężeniowej, indeksu zróżnicowania genetycznego między populacjami (FST), średniej liczby osobników migrujących wymienionych między populacjami w jednym pokoleniu (Nem), oszacowaniu inbrodu w każdej populacji oraz ustaleniu dystansu genetycznego między populacjami. Celem projektu jest zbadanie struktury genetycznej wewnątrz i pomiędzy populacjami cietrzewia, występującymi na terenie północno-wschodniej Polski, na podstawie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA i zaproponowanie wytycznych dla prawidłowej ochrony i zachowania cietrzewia na całym obszarze jego występowania w tym regionie kraju.

Literatura: 1. Jaszczak K., Parada R., 1999 – *Animal Sciences Papers and Reports* 17, 3, 115-121. 2. Jaszczak K., Parada R., Jasz-

czak J., 2002 – *Animal Science Papers and Reports* 20, 3, 74-76. 3. Jaszczak K., Parada R., Sacharczuk M., 2003 – *Journal of Animal and Feed Sciences* 12, 835-839. 4. Jaszczak K., Książkiewicz J., Parada R., Sacharczuk M., 2005 – *Journal of Animal and Feed Sciences* 14, 571-575. 5. Jaszczak K., Malewski T., Parada R., Malec H., 2006 – *Journal of Animal and Feed Sciences* 16, 463-469. 6. Keszka J., Jaszczak K., 1996 – *Journal of Applied Genetics* 37, 4, 367-372. 7. Parada R., Jaszczak K., Sysa P., Jaszczak J., 1996 – *Prace i Mat. Zoot.* 48, 71-81. 8. Sacharczuk M., Sadowski B., Parada R., Świergiel A.H., Jaszczak K., 2005 – *Animal Science Papers and Reports* 23, 2, 129-138. 9. Sazanov A.A., Romanov M.N., Wardęcka B., Sazanova A.L., Korczak M., Smirnov A.F., Jaszczak K., Dodgson J., 2005 – *Animal Genetics* 36, 161-163. 10. Sazanov A.A., Stekolnikova V.A., Korczak M., Sazanova A.L., Jaszczak K., Zięba G., Malewski T., 2007 – *Poultry Science* 87, 202-205. 11. Wardęcka B., Olszewski R., Jaszczak K., Zięba G., Pierzchała M., 2003 – *Czech Journal of Animal Science* 48, 97-105. 12. Wardęcka B., Jaszczak K., Parada R., Korczak M., Zięba G., 2005 – *Journal of Animal and Feed Sciences* 14, 561-570. 13. Wardęcka B., Jaszczak K., Pierzchała M., Parada R., Korczak M., 2004 – *Journal of Applied Genetics* 45(1), 61-71.

Poznawcze i aplikacyjne zastosowania wyników badań mtDNA

**Beata Prusak, Barbara Gralak,
Ewa Karpiniak, Irmina Bieńkowska,
Grzegorz Grzybowski**

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Po przełomowym odkryciu obecności DNA w mitochondriach, szeroki nurt badań genetycznych doprowadził do wyodrębnienia się problematyki określanej mianem mitochondrialnej genomiki porównawczej roślin i zwierząt.

Struktura genomu mitochondrialnego (mtDNA) u różnych gatunków jest bardzo podobna, lecz różni się zasadniczo od organizacji DNA jądrowego – mtDNA ma fizyczną postać kolistej, kowalencyjnie zamkniętej, dwuniciowej cząsteczki. Dwie nici mtDNA charakteryzują się odmiennym składem zasad – nić bogata w reszty guaniny określana jest jako nić ciężka (H), nić bogata w reszty cytozyny nazywana jest nicią lekką (L). Organizacja mtDNA jest bardzo oszczędna i charakteryzuje ją duża zwartość – geny nie zawierają intronów, a poza tzw. regionem kontrolnym (pętlą D), zawierającym miejsce inicjacji replikacji nici H oraz promotory dla transkrypcji nici H i L (odpowiednio PH i PL), w cząsteczce brak odciników niekodujących. Sekwencja genomu mitochondrialnego człowieka, z właściwą dla niej numeracją nukleotydów (1-16569), stosowana jest jako wzorzec porównawczy w badaniach kolejnych genomów mtDNA i stąd określana jest mianem sekwencji referencyjnej.

W genomie mitochondrialnym obecnych jest zaledwie 37 genów (kodujących cząsteczki rRNA: 12S i 16S, 22 cząstecz-

ki tRNA oraz 13 białek będących składnikami enzymatycznych kompleksów fosforylacji oksydacyjnej). Szczególnie duże znaczenie dla analiz filogenetycznych ma fakt dziedziczenia mtDNA w linii matczynej oraz brak rekombinacji. Wprawdzie plemniki ssaków zawierają niewielką ilość mtDNA, lecz po wnikięciu do komórki jajowej ojcowski mtDNA zostaje naznaczony poprzez ubiquitynację i ulega degradacji. System selektywnej degradacji ojcowskich mitochondriów ssaków, którego poznanie uznawane jest za jedno z najbardziej doniosłych odkryć w biologii, ma charakter wewnątrzgatunkowy i działa bardzo efektywnie.

Wspomniane cechy oraz fakt, że występowanie mutacji w tzw. rejonie kontrolnym (określanym także jako pętla D) około dziesięciokrotnie przewyższa średnią częstość mutacji w DNA jądrowym, unaocznia dużą przydatność polimorfizmu sekwencji mtDNA jako markera w badaniach z dziedziny genetyki ewolucyjnej oraz w różnorodnych analizach o charakterze poznawczym i aplikacyjnym. Zarówno ze względu na możliwość wzbogacenia wiedzy w dyscyplinie tradycyjnie zwanej taksonomią, a także z uwagi na liczne praktyczne zastosowania tej dziedziny wiedzy, bardzo ważna jest możliwość bezbłędnej i szybkiej identyfikacji gatunków. Celowi temu służy, między innymi, światowa inicjatywa „Tworzenie Drzewa Życia” (w 2006 r. IGiHZ PAN przyłączył się do tego programu), mająca na celu wdrożenie zunifikowanego systemu identyfikacji gatunków i opisu bioróżnorodności. Standardem tego typu proponowanym dla zwierząt jest jeden z genów mitochondrialnych (COI – gen pojednostki pierwszej oksydazy cytochromowej).

Poza dziedziną taksonomii, gdzie mtDNA unikatowych okazów muzealnych można rozpoznać i scharakteryzować tylko poprzez pozyskanie śladów biologicznych, istnieje wiele innych dziedzin działalności człowieka, w których analizy polimorfizmu mitochondrialnego DNA są częstokroć jedyną dostępną metodą działania. W zależności od charakteru śladu biologicznego, dostępnego do badań oraz zależnie od ukie-