jących podziałów komórki te stają się coraz mniejsze i w stadium VI przestają już być widoczne przy małym powiększeniu, które można osiągnąć w binokularze.

Stosując tę metodę, w wielu przypadkach (ok. 15%) udało się otrzymać normalne zarodki osiągające stadia IV-VI (wg klasyfikacji rozwoju wewnątrzmacicznego E. Giladi), zawierające jądra komórkowe. Pozostałe oocyty były albo nie zapłodnione (rys. 3), albo o nieprawidłowym obrazie bruzdkowania lub też miały błony uszkodzone nadmiarem plemników. W tym ostatnim przypadku w błonie oocytów występowały dziurki, przez które wyciekało żółtko. W szeregu przypadków (ok. 25%) można było obserwować także pewien abortywny rozwój partenogenetyczny, przy którym następowały wizualnie normalne podziały cytoplazmy, jednak bez towarzyszących podziałów jąder. W rezultacie pod binokularem widać było normalne blastomery odpowiadające stadiom III-IV, lecz po wybarwieniu nie stwierdzano w nich obecności jąder komórkowych.

W rezultacie naszych badań udało się połączyć etap 3 (owulacja oocytu) z etapem 4 (zapłodnienie) i etapem 5a (wczesny rozwój zarodkowy). Przy przedłużeniu okresu inkubacji prawdopodobnie można byłoby pokusić się o otrzymanie zarodków bardziej zaawansowanych w rozwoju. Następnym krokiem, który można by uczynić, jest hodowla tak otrzymanych zarodków w systemie *in vitro* opracowanym przez Margaret Perry (1988), pozwalającym na wylęg żywych piskląt w hodowli *in vitro*. Prawdopodobnie w niedalekiej przyszłości będzie to już możliwe, gdyż niektóre laboratoria i firmy biotechnologiczne pracują w tym kierunku. Opracowanie systemu pozwalającego na owulację *in vitro* oocytów, ich zapłodnienie i hodowlę zarodków umożliwi znaczny postęp w biotechnologii zarodka ptaka oraz dostarczy narzędzia do badania procesów rozrodu u drobiu.

DNA fingerprinting w genetycznej analizie populacji gęsi

Małgorzata Zawadzka, Kazimierz Jaszczak

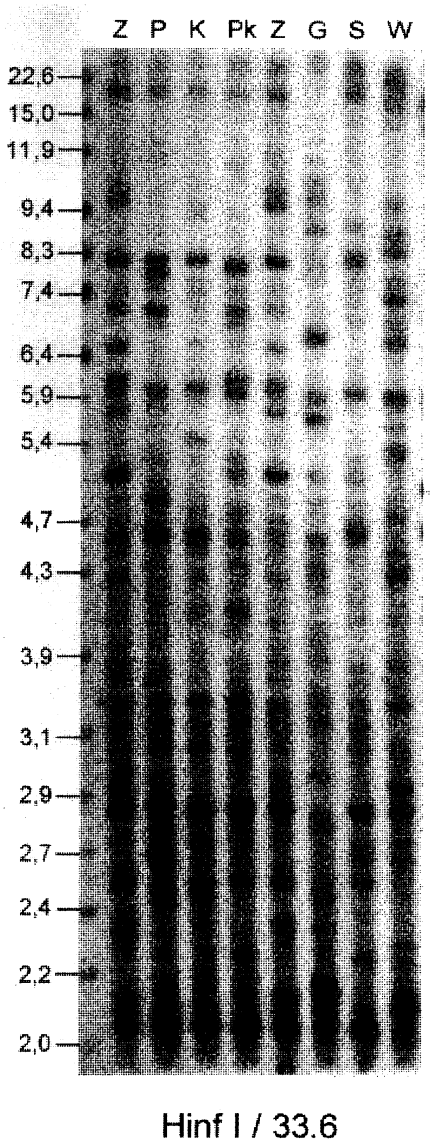
IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Wartość hodowlana zwierząt czy ich genotyp oceniane są powszechnie na podstawie pomiaru cech fenotypowych. Nie zawsze jednak cechy fenotypowe są dobrym wskaźnikiem wartości hodowlanej osobnika. Efektywność analizy genetycznej bazującej na fenotypie z natury nie jest wysoka w przypadku cech o niskiej odziedziczalności. Ponadto pomiary niektórych cech są trudne lub niemożliwe do wykonania, np. odporność na choroby czy cechy ograniczone płcią lub wiekiem. Dziedziczenie poligenowe, częściowa lub całkowita dominancja maskują także fenotypowy efekt ekspresji genów. Charakterystyka fenotypowa podlega przy tym w różnym stopniu modyfikacjom i interakcjom środowiskowym.

Opracowanie metod wykrywania naturalnie występującego polimorfizmu sekwencji DNA, z których część została wykorzystana jako markery genetyczne (wyróżniki cech), stworzyło ogromne możliwości oszacowania wartości hodowlanej osobnika na poziomie molekularnym. Markery genetyczne oparte na polimorfizmie sekwencji minisatelitarnych DNA stanowią obecnie bogate źródło informacji i mogą służyć między innymi do analizy struktury genetycznej populacji. Ich wykorzystanie ułatwia ustalenie, czy w danej populacji lub rasie występują charakterystyczne allele i z jaką częstością. Określenie podobieństwa między osobnikami w obrębie i między populacjami daje możliwość szacowania zmian zachodzących w populacjach podlegających naturalnej czy sztucznej selekcji, jak i dzielącego je dystansu genetycznego.

Wśród stosowanych systemów analizy DNA wyróżnia się metoda fingerprinting. Genomowy DNA wyizolowany z jąder komórkowych różnych tkanek poddawany jest trawieniu różnymi enzymami restrykcyjnymi. Fragmenty tak „pociętego" DNA poddaje się elektroforezie w żelu agarozowym. Rozdzielone fragmenty przenoszone są na filtr nitrocelulozowy lub nylonowy, wg metody Southerna, i hybrydyzowane z sondą molekularną. W wyniku hybrydyzacji otrzymuje się dla badanego osobnika wiele prążków, będących fizyczną reprezentacją sygnału pochodzącego od odpowiednio wyznakowanej sondy związanej z allelami wielu loci na wszystkich chromosomach. Liczba i położenie prążków we wzorze DNA fingerprinting są charakterystyczne dla każdego osobnika (z wyjątkiem bliźniąt jednojajowych oraz osobników wysoko zinbredowanych). Indywidualny wzór DNA fingerprinting jest równie niepowtarzalny, jak układ linii papilarnych człowieka. Stąd też wywodzi się nazwa tej metody testowania DNA. Prążki wchodzące w skład indywidualnego wzoru (allele minisatelitarne) są dziedziczone w prosty mendlowski sposób, po połowie od każdego z rodziców.

W Zakładzie Cytogenetyki Molekularnej IGiHZ PAN w Jastrzębcu technika DNA fingerprinting od kilku lat wykorzystywana jest w kontroli pochodzenia i weryfikacji rodowodowej, a przede wszystkim w analizie struktury genetycznej populacji, linii czy ras zwierząt gospodarskich i laboratoryjnych. Między innymi metoda DNA fingerprinting została wykorzystana do oceny zmienności genetycznej wewnątrz i między odmianami gęsi utrzymywanych w stadach zachowawczych, w porównaniu do populacji gęsi selekcjonowanych i dzikich. Polska należy do nielicznych krajów, gdzie zostało zachowane wiele lokalnych odmian i ras gęsi. Z biologicznego i hodowlanego punktu widzenia zachowanie tych unikalnych zasobów genetycznych jest bardzo ważne, gdyż są to odmiany przystosowane do miejscowych warunków środowiskowych i wykazujące często unikalne kombinacje alleli warunkujące wysoki poziom niektórych cech przydatnych w hodowli (odporność na choroby, mniejsze wymagania pokarmowe, niska zawartość tłuszczu w tuszce). Badaniami DNA fingerprinting objęto odmiany pochodzące od gęsi gęgawy *Anser anser*, tj. podkarpacka, suwalska, pomorska i kartuska, odmiana garbonosa



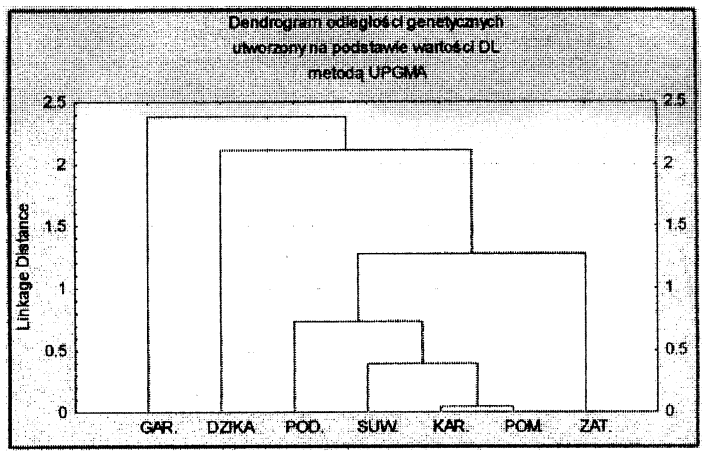
Rys. 1. Reprezentatywne wzory DNA fingerprinting badanych odmian gęsi: Z – zatorskiej, P – pomorskiej, K – kartuskiej, Pk – podkarpackiej, G – garbonosej, S – suwalskiej, Dz – gęsi dzikiej (*Anser anser*). Luminogram hybrydyzacji fragmentów DNA trawionego enzymem restrykcyjnym *Hinf*I z sondą 33.6

wywodząca się od gęsi łabędziowej chińskiej *Anser cygnoides* oraz gęś zatorska utworzona na drodze krzyżowania wymienionych odmian regionalnych.

Hybrydyzacja dwu sond minisatelitarnych (33.6 i 33.15) do fragmentów będących produktami trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi, doprowadziła do uzyskania powtarzalnych polimorficznych wzorów prążkowych DNA fingerprinting dla każdej z badanych populacji o wysokim poziomie zróżnicowania międzyosobniczego. Wzory prążkowe DNA fingerprinting poszczególnych osobników badanej populacji zostały wykorzystane do oszacowania częstości prążków i indeksu podobieństwa.

Dla gęsi zatorskiej oszacowano największe wartości indeksu podobieństwa oraz najmniejszą wartość średniej heterozygotyczności w porównaniu do pozostałych stad. Także pozostałe wskaźniki zmienności, jak liczba prążków, liczba polimorficznych loci i częstość alleli wskazuje na to, że populacja gęsi zatorskiej utraciła część zasobów zmienności genetycznej w porównaniu do odmian wyjściowych. Fakt ten można wiązać z prowadzeniem selekcji w stadzie o małej liczebności. Ponadto, po długoletnim okresie selekcji prowadzonej w zamkniętym stadzie, populacja gęsi zatorskiej zachowała największy poziom podobieństwa do gęsi podkarpackiej. We wzorach DNA fingerprinting reprezentatywnych dla gęsi zatorskiej nie zidentyfikowano żadnych prążków charakterystycznych dla poszczególnych populacji odmian wyjściowych. Najwyższą zmienność spośród badanych populacji gęsi odmian rodzimych zachowuje gęś suwalska. Wyższe wartości parametrów uzyskano tylko w populacji gęsi dzikiej. Gęsi kartuskie i pomorskie cechują zbliżone wartości ocenianych parametrów.

Wzory prążkowe osobników odmiany garbonosej charakteryzują się obecnością specyficznych prążków nie występujących u żadnej innej odmiany. Te charakterystyczne prążki pochodzą prawdopodobnie od gęsi dzikiej *Anser cygnoides*. Analiza prążków DNA izolowanych z wymieszanej równej ilości krwi 15 osobników losowo wybranych z każdej populacji, posłużyła do określenia wzajemnych zależności genetycznych (rys. 1). Zastosowanie reprezentatywnych wzorów populacyjnych pozwoliło na jednoczesne porównanie i określenie indeksu podobieństwa pomiędzy nimi, tzw. band sharing (BS). Dystans genetyczny oszacowany na podstawie indeksów podobieństwa wzorów DNA fingerprinting, odzwierciedlający pochodzenie i wzajemne relacje, łączący badane odmiany gęsi przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Graficzna prezentacja zależności pomiędzy badanymi odmianami i rasami gęsi (GAR. – garbonosa, DZIKA – *Anser anser*, POD. – podkarpacka, SUW. – suwalska, KAR. – kartuska, POM. – pomorska, ZAT. – zatorska). Wykresy wykonano na podstawie wartości dystansu genetycznego (DL)

W wielu pracach stwierdzono liniową zależność pomiędzy częstością prążków i częstością alleli we wzorach DNA fingerprinting populacji kur i indyków a charakteryzującym je współczynnikiem inbredu. Opracowane krzywe zależności pomiędzy częstością alleli a współczynnikiem inbredu mogą być wykorzystane do oceny populacji zwierząt o nieznanym poziomie tego parametru. W naszych badaniach wykorzystano to do określenia inbredu w jednym ze stad rezerwy genetycznej gęsi. Współczynnik inbredu określony tą metodą był nieco wyższy niż obliczony metodą tradycyjną, wg wzoru Wrighta.

W jednym ze stad rezerwy genetycznej, selekcjonowanym w kierunku wysokiej nieśności i masy ciała w 24 tygodniu życia, porównano reprezentatywne wzory prążkowe DNA fingerprinting gęsi charakteryzujących się skrajnymi wartościami tych cech. W celu identyfikacji ewentualnych prążków markerowych, poddano analizie preparaty DNA izolowanego z mieszaniny krwi dziesięciu ptaków z każdej grupy. Zidentyfikowano prążki różnicujące grupy ptaków o najwyższej i najniższej nieśności i masie ciała, które mogą posłużyć jako punkt odniesienia do identyfikacji sprzężeń między markerami genetycznymi, w tym przypadku prążkami DNA fingerprinting, a loci kontrolującymi cechy ilościowe (QTL), jakimi jest większość cech ważnych gospodarczo.