

AUTOREFERAT - OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH dr Inga Kowalewska-Łuczak

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Al. Piastów 45
70-311 Szczecin
tel. 91 449 67 81
inga.kowalewska-luczak@zut.edu.pl

1. DANE PERSONALNE:

Imię i nazwisko: Inga Kowalewska-Łuczak
Miejsce pracy: Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Aleja Piastów 45
70-311 Szczecin

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

13.06.2000 magister biologii,
Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński
praca magisterska pt.: *"Wpływ ołowiu na metabolizm energetyczny krwinki szczura"*
Promotor : prof. zw. dr hab. Alina Joanna Hłyńczak
23. 03.2005 doktor nauk rolniczych w zakresie zootechniki,
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza w Szczecinie
praca doktorska pt.: *„Polimorfizm w genie aromatazy cytochromu P450 oraz możliwości wykorzystania poszczególnych jego wariantów w doskonaleniu cech użytkowości mlecznej bydła”*
Promotor: prof. dr hab. Marek Kmiec

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

03.02.2005 – 31.12.2005 asystent,
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt,
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Akademia Rolnicza w Szczecinie.
01.01.2006 – 31.12.2008 adiunkt,
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt,
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,
Akademia Rolnicza w Szczecinie.
od 01.01.2009 adiunkt,
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt,
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 15 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 ROKU O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):

4.1 Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl publikacji jednotematycznych pod tytułem:

„Analiza wybranych genów chromosomu 6 i ich związku z cechami użytkowości bydła mlecznego”

w skład, którego wchodzi następujące publikacje:

Lp.	Publikacja	IF ^{a)}	Punkty MNiSW ^{b)}	Punkty MNiSW ^{c)}
H1	<p>Kowalewska-Łuczak I., Kulig H., Kmiec M. (2009) Amplification created restriction sites for genotyping SNPs in the bovine ABCG2 and its association with milk production traits. <i>Archiv Tierzucht</i> 52 (6), 647-649.</p> <p><i>Indywidualny wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, wiodący udział w planowaniu eksperymentu, wybór materiału zwierzęcego do badań, gromadzenie danych użytkowych do analiz statystycznych, wiodący udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, sformułowanie stwierdzeń i wniosków, przygotowanie manuskryptu do druku (75%)</i></p>	0,595	15	20
H2	<p>Kowalewska-Łuczak I., Kulig H., Kmiec M. (2010) Associations between the bovine PPARGC1A gene and milk production traits. <i>Czech Journal of Animal Science</i>, 55 (5), 195-199.</p> <p><i>Indywidualny wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, wiodący udział w planowaniu eksperymentu, wybór materiału zwierzęcego do badań, gromadzenie danych użytkowych do analiz statystycznych, wiodący w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, sformułowanie stwierdzeń i wniosków, przygotowanie manuskryptu do druku (75%)</i></p>	1,190	20	25
H3	<p>Kowalewska-Łuczak I., Kulig H., Kosobucki M. (2011) Polymorphism am PPARGC1A-Gen beim Milchrind, <i>Tierärztliche Umschau</i> 66 (4), 147-150.</p> <p><i>Indywidualny wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, wiodący udział w planowaniu eksperymentu, wybór materiału zwierzęcego do badań, gromadzenie danych użytkowych do analiz statystycznych, wiodący udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, sformułowanie stwierdzeń i wniosków, przygotowanie manuskryptu do druku (75%)</i></p>	0,273	15	15
H4	<p>Kowalewska-Łuczak I., Kulig H. (2013) Polymorphism of the FAM13A, ABCG2, OPN, LAP3, HCAP-G, PPARGC1A genes and somatic cell count of Jersey cows - Preliminary study, <i>Research in Veterinary Science</i> 94, 252-255.</p> <p><i>Indywidualny wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, główny udział w planowaniu eksperymentu, wybór materiału zwierzęcego do badań, gromadzenie danych użytkowych do analiz statystycznych, wiodący udział w</i></p>	1,774	35	35

<i>przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, sformułowanie stwierdzeń i wniosków, przygotowanie manuskryptu do druku (80%)</i>				
Kowalewska-Łuczak I., Kulig H. (2013) Genetic polymorphisms of FAM13A1, OPN, LAP3 and HCAP-G in Jersey cattle. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 37 (6), 631-635.				
H5	<i>Indywidualny wkład: sformułowanie hipotezy badawczej, wiodący udział w planowaniu eksperymentu, wybór materiału zwierzęcego do badań, gromadzenie danych użytkowych niezbędnych do analiz statystycznych, wiodący udział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, sformułowanie stwierdzeń i wniosków, przygotowanie manuskryptu do druku (80%)</i>	0,276	20	20
Razem		4,108	105	115

^{a)} współczynnik Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy, dla prac H4 i H5 wykazano IF za rok 2012;

^{b)} liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy;

^{c)} liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW z dnia 17.12.2013.

Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych wraz z określeniem ich indywidualnego udziału wykazano w załączniku nr VIII.

4.2. Omówienie celu naukowego w/w publikacji, jak również osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WSTĘP I CEL NAUKOWY

Hodowla bydła mlecznego w Polsce jest gałęzią rolnictwa o dużym znaczeniu gospodarczym oraz wieloletniej tradycji. Obserwowane w ostatnich latach zmniejszenie pogłowia tego gatunku skłoniło hodowców do bardziej intensywnej pracy hodowlanej. Istotnym stało się pozostawienie w hodowli zwierząt o jak najwyższej wydajności mlecznej, co ma zrekompensować zmniejszoną liczbę krów oraz pozwolić utrzymać się istniejącym gospodarstwom i nie obniżyć ilości dostarczanych na rynek produktów mlecznych. W ostatniej dekadzie prowadzono liczne badania mające na celu odkrycie genetycznych podstaw cech użytkowych i produkcyjnych zwierząt gospodarskich istotnych z ekonomicznego punktu widzenia. Skupiono się na identyfikacji genów odpowiedzialnych za dziedziczenie cech ilościowych (QTL- quantitative trait locus), ich mutacji oraz sprzężonych z nimi genów tzw. markerów genetycznych, co pozwoliło na selekcję na podstawie genotypu, zwierząt o pożądanych cechach użytkowych. Mapowanie genów jest podstawowym krokiem do wskazania lokalizacji QTLs wpływających na cechy użytkowości zwierząt gospodarskich. Następnym krokiem jest wskazanie czy allele danego genu wpływają znacząco na kształtowanie się fenotypu. U zwierząt gospodarskich pomyślnie zidentyfikowano tylko kilka funkcjonalnych mutacji leżących u podłoża QTL

w tym gen czynnika insulinopodobnego 2 (*IGF2*) u świni, gen callipyge (*CLPG*) u owiec oraz gen *DGAT1* u bydła, kodujący acylotransferazę diacyloglicerolową 1.

W przypadku bydła o mlecznym kierunku użytkowania największy nacisk położono na wykrycie QTLs odpowiedzialnych za produkcję mleka oraz procesy fizjologiczne, które mogą oddziaływać na cechy użytkowości mlecznej takie jak: wydajność mleka, wydajność białka i tłuszczu, zawartość białka i tłuszczu w mleku. Wobec tego, informacje na temat QTL dla tych cech są zasadnicze dla skutecznej selekcji.

Często, badania ukierunkowane na identyfikację QTLs, wskazują kilka regionów chromosomowych, w których należy szukać genów istotnych dla cech użytkowości (Charon, 2007). Spośród wszystkich autosomów genomu bydła, wiele, szczególnie BTA 3, 6, 9, 14, 20 i 29, zostało wytypowanych jako „skupiska” QTL odpowiadających za cechy użytkowości mlecznej. Wśród licznych doniesień dotyczących powiązania QTL z cechami użytkowości mlecznej bydła najwięcej prac skupia się na chromosomie 6 (BTA6) (Khatkar i wsp., 2004). Początkowo skoncentrowano się na chromosomie 6 bydła ze względu na zlokalizowany w nim kompleks genów kazein. QTLs wykryte przez Georges i wsp. (1995) w BTA6 w połączeniu z wiedzą o obecności kompleksu genów kazein zachęciły wielu badaczy do podjęcia szerszych badań nad tym chromosomem. Godna wspomnienia jest spójność między różnymi badaniami na temat lokalizacji QTL wpływających na zawartość białka. Większość dostępnych badań różnych autorów lokalizuje liczne QTL powiązane z zawartością białka oraz tłuszczu w mleku blisko markera BM143 (Khatkar i wsp., 2004; Olsen i wsp., 2005; Ron i wsp., 2001). Oszacowana lokalizacja sugeruje, że są to te same geny. Velmala i wsp. (1999) wykazali obecność dwóch QTL powiązanych z zawartością białka, wydajnością mleka i wydajnością tłuszczu. Ich analizy sugerują obecność jednego QTL blisko markera BM143, natomiast drugi QTL zlokalizowano blisko kompleksu genów kazein. Klungland i wsp. (2001) zwraca uwagę, że znalazł istotne dowody na obecność QTL powiązanego z liczbą komórek somatycznych w mleku również blisko markera BM143.

Otrzymane wyniki badań zestawione w cyklu jednotematycznych prac pokazują próbę oszacowania, czy genotypy wybranych genów powiązane są z cechami użytkowości bydła mlecznego. Tym samym badania te mogą przyczynić się do rozszerzenia obecnego stanu wiedzy w zakresie podjętego zagadnienia oraz być może niektóre z rozpatrywanych mutacji znajdą zastosowanie w rozbudowywaniu programów hodowlanych bydła o mlecznym kierunku użytkowania. Przedmiotem badań są wybrane geny zlokalizowane blisko markera BM143, w regionie liczącym około 6,2 cM. W tym przedziale znajdują się geny o zbadanym już wpływie na cechy użytkowości bydła (*ABCG2*, *OPN*, *PPARGC1A*) jak również geny, które potencjalnie mogą mieć wpływ na te cechy (*FAM13A1*, *LAP3*, *HCAP-G*).

Sugeruje się, że geny *FAM13A1* (family with sequence similarity 13, member A1), *LAP3* (leucine aminopeptidase 3) i *HCAP-G* (zwany także *NCAPG*; non-SMC condensin I complex, subunit G) mogą być powiązane z cechami użytkowości bydła głównie ze względu na ich lokalizację w analizowanym regionie, jak również ze względu na fakt, iż stwierdzono ekspresję tych genów, na różnym poziomie, w gruczole mlekowym (Cohen i wsp., 2004; Cohen-Zinder i wsp., 2005; Olsen i wsp., 2005; Ron i wsp., 2001; www.ncbi.nlm.nih.gov). W nielicznych pracach istnieją doniesienia na temat wstępnego oszacowania powiązania tych genów z cechami użytkowości mlecznej. I tak na zwiększenie wydajności tłuszczu i białka może wpływać gen *LAP3*, na zmianę zawartości białka mogą wpływać geny *FAM13A1* i *LAP3*, a ze zwiększeniem wydajności mleka powiązано gen *LAP3* (Cohen i wsp., 2004; Cohen-Zinder i wsp., 2005; Olsen i wsp., 2005; Ron i wsp., 2001). W przypadku genu *HCAP-G* wykazano, że może on wpływać na odkładanie tłuszczu u bydła mięsnego (Weikard i wsp., 2010).

Geny *ABCG2*, *OPN* i *PPARGC1A* mogą być powiązane z cechami użytkowości mlecznej, zarówno ze względu na pełnione funkcje oraz wykrytą ekspresję tych genów w gruczole mlekowym, jak również ze względu na lokalizację blisko markera BM143 (Cohen-Zinder i wsp., 2005; Leonard i wsp., 2005; Weikard i wsp., 2004; www.ncbi.nlm.nih.gov).

ABCG2 (ATP-binding cassette, sub-family G, member 2), należy do nadrodziny transporterów zawierających domenę wiążącą ATP. Białko to jest półtransporterem z tylko jednym miejscem wiążącym ATP w N-końcu i z jednym w C-końcu w domenie transbłonowej (Sarkadi i wsp., 2004). W procesach zależnych od ATP *ABCG2* odpowiada za transport przez błonę komórkową różnych ksenobiotyków i cytostatyków. W innych badaniach Jonker i wsp. (2005) wykazali, że u myszy poziom ekspresji genu *ABCG2* wzrastał w późnym okresie ciąży oraz (głównie) w czasie laktacji, natomiast u myszy nie będących w ciąży i nie laktujących ekspresji tego genu nie wykazano. Ekspresja genu *ABCG2* ma miejsce w wierzchniej części błony pęcherzyka gruczołu mlekowego i odpowiada za białka transporterów ABC z podrodziny G - *ABCG1*, *ABCG5* i *ABCG8*, które pełnią rolę transporterów steroli. Dlatego przypuszcza się, że *ABCG2* może też być transporterem cholesterolu do mleka. W genie *ABCG2* bydła zidentyfikowano kilka miejsc polimorficznych, np. intron 3 - pojedyncze podstawienie nukleotydowe A/T w pozycji 29444 oraz ekson 14 - podstawienie A/C w pozycji 62569 (sekwencja GenBank AJ871176). Wykazano, że zamiana A/C w eksonie 14 powoduje powstanie aminokwasowego podstawienia w tyrozyny serotoniną w miejscu 581 (Y581S) w piątym zewnątrzkomórkowym regionie białka *ABCG2*, co może wpływać na jego funkcje transportowe (Cohen-Zinder i wsp., 2005). W pracach różnych autorów wykazano wpływ tej substytucji na użytkowość mleczną bydła – powodowała zwiększenie zawartości białka i tłuszczu mleka, natomiast wydajność mleka zmniejszała się (Cohen-Zinder i wsp., 2005; Ron i wsp., 2006).

Osteopontyna (*OPN*, zwana też *SPP1*, *Eta-1*) jest fosforylowaną glikoproteiną, która odgrywa rolę w różnych procesach w organizmie - komórkowej adhezji, chemotaksji, uczestniczy w

interakcjach w cytoplazmie komórkowej i komórkowym przekazywaniu sygnału poprzez łączenie się z integryną i receptorem CD44 oraz uczestniczy w regulacji wzrostu i rozwoju płodu oraz inicjowaniu i utrzymywaniu ciąży (Johnson i wsp., 2003). U większości gatunków ssaków osteopontyna jest białkiem liczącym około 300 aminokwasów, np. odpowiednio: ludzie - 300, myszy – 294 i bydło – 278 aminokwasów (Leonard i wsp., 2005). Analiza porównawcza sekwencji cDNA bydłowej OPN z różnymi gatunkami pokazuje sekwencje zarówno konserwatywne jak i niekonserwatywne. Dowiedziono również że sekwencja białkowa OPN bydła i owiec posiada 22 aminokwasową lukę w porównaniu z innymi badanymi gatunkami. Wykazano ekspresję OPN w wielu tkankach - białko to jest obecne głównie w mleku, osoczu oraz moczu. Stężenie OPN w mleku ludzi jest w zakresie 3-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Leonard i wsp., 2005). Nagatomo i wsp. (2004) podczas analizy mleka u ludzi, wykazali, że *OPN* osiąga najwyższy poziom ekspresji spośród 240 przebadanych genów w mleku. Zespół ten wykazał również, że zarówno poziom mRNA jak i białka OPN były wysokie przez cały okres laktacji. Obecność OPN w mleku i jej wysoki poziom ekspresji w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego mogą powodować proliferację i różnicowanie się gruczołu mlekowego (Nagatomo i wsp., 2004). Osteopontyna u bydła również została wykryta w mleku i stężenie jej wynosiło 8 mg/L (Bayless i wsp., 1997). W ostatnim okresie prowadzono badania na bydle o mięsny typie użytkowości i wykazano, że mutacja typu insercja/delecja (nazwana OPN3907) związana jest cechami wzrostu (Allan i wsp., 2007). W eksonie 7 *OPN* wykryto zamianę nukleotydów G/T w pozycji 156531 (GenBank AJ871176) oraz w intronie 4 *OPN* zidentyfikowano podstawienie nukleotydowe T/C, które wykrywane jest przy pomocy enzymu *BsrI*. Wykazano powiązanie tego intronowego SNP z zawartością białka i tłuszczu w mleku oraz z wydajnością tłuszczu (Khatib i wsp., 2007; Leonard i wsp., 2005).

PPARGC1A (peroxysome proliferator-activated receptor- γ cocativator -1 α) pełni kluczową rolę w aktywowaniu różnorodnych jądrowych receptorów hormonów i czynników transkrypcyjnych regulujących równowagę energetyczną. Wykazano również, że PPARGC1A pośredniczy w ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm oksydacyjny, adipogenezę i glukoneogenezę (Puigserver i Spiegelman, 2003). Ludzki gen *PPARGC1A* zmapowano w chromosomie 4 (HSA4), w regionie powiązanym z zawartością insuliny i licznymi parametrami związanymi z otyłością (Snyder i wsp., 2004). Genetyczne warianty ludzkiego genu *PPARGC1A* wykazują zależność z opornością na insulinę, podatnością na cukrzycę typu II, lipodystrofią i wskaźnikami otyłości (Ek i wsp., 2001; Esterbauer i wsp., 2002). Snyder i wsp. (2004) wykazali, że liczne QTL związane z otyłością zlokalizowane są u myszy i świń w regionach chromosomu 5 (Mmu5) i chromosomu 8 (SSC8), odpowiednio. Powyższe porównanie genomów sugeruje, że region zawierający gen *PPARGC1A* jest konserwatywny i odgrywa rolę w syntezie tłuszczu. Przypuszczano, że *PPARGC1A* może odgrywać rolę w metabolizmie gruczołu mlekowego, jednakże w badaniach nie wykazano tej roli ani u ludzi, ani u myszy ani u przeżuwaczy. Wydajność wysokowydajnych krów mlecznych za cały okres laktacji jest ograniczona procesami

metabolicznymi z powodu radykalnych następujących po sobie zmian metabolizmu glukozy i tłuszczu od momentu rozpoczęcia laktacji. Podczas laktacji dostępność glukozy, która jest zależna od stanu ciągłości glukoneogenezy w wątrobie, jest czynnikiem ograniczającym produkcję mleka. Znaczenie wątrobowej glukoneogenezy jest specjalnie podkreślone przez fakt, że u najbardziej wydajnych laktujących krów mlecznych, produkcja glukozy musi wzrosnąć siedmiokrotnie, aby odpowiadać wymaganiom gruczołu mlekowego w porównaniu z krowami Nielaktującymi. W gruczole mlekowym ok. 60-70% glukozy wykorzystywane jest do syntezy laktozy i ok. 20-30% glukozy jest wykorzystywane podczas syntezy kwasów tłuszczowych (Bell i Bauman, 1997). Wykazana istotna rola PPARGC1A w wielu aspektach metabolizmu glukozy, tłuszczu i równowadze energii oraz jego zdolność do koordynowania procesów metabolicznych wątroby, tkanki tłuszczowej i mięśni u ludzi i myszy, wskazują na możliwość modulowania procesów metabolicznych podczas laktacji u bydła mlecznego przez PPARGC1A i dlatego PPARGC1A może być potencjalnym głównym pośrednikiem metabolicznie wymaganym dla rozpoczęcia i rozwoju laktacji u bydła mlecznego (Weikard i wsp., 2004). W obrębie genu *PPARGC1A* wykryto kilka podstawień nukleotydowych, z czego dwa mogą wpływać na zmienność cech użytkowości mlecznej. Jedno z podstawień (C/T) zmapowano w intronie 9 w pozycji 1892, a drugie (A/C) w rejonie 3'UTR w pozycji 3359. Wykazano, że tranzycja w intronie 9 powiązana jest z wydajnością mleka oraz wydajnością i zawartością tłuszczu, natomiast transwersja w regionie 3'UTR powiązana jest również z wydajnością mleka, wydajnością i zawartością tłuszczu oraz z zawartością białka w mleku (Khatib i wsp., 2007; Weikard i wsp., 2004).

Potrzeba poszukiwania genów mogących wpływać na zmienność cech użytkowości bydła o mlecznym kierunku użytkowania skłoniły do podjęcia badań, których głównym celem badawczym była analiza mutacji typu pojedyncze podstawienie nukleotydowe (SNP) w wybranych genach zlokalizowanych w chromosomie 6 w odniesieniu do wyżej wymienionych cech.

Na główny cel badawczy składają się poniższe cele szczegółowe:

- określenie częstości występowania alleli i genotypów w odniesieniu do miejsc polimorficznych genów zlokalizowanych w pobliżu markera BM143 (*FAM13A1*, *ABCG2*, *OPN*, *LAP3*, *HCAP-G*, *PPARGC1A*) w stadzie bydła rasy jersey (181 krów) oraz w stadzie bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej (169 krów, gen *PPARGC1A*);
- oszacowanie ewentualnych asocjacji między oznaczonymi wariantami genetycznymi badanych genów i genotypami kombinowanymi poszczególnych genów a wybranymi cechami użytkowości (wydajność mleka, białka i tłuszczu oraz zawartość białka i tłuszczu oraz liczba komórek somatycznych).

W badaniach ujęto następujące pojedyncze podstawienia nukleotydowe (SNP):

- gen *ABCG2* - 2 SNP, A/T w intronie 3 i A/C w eksonie 14; zamiany w obu przypadkach wykrywane są w oparciu o sekwencję GenBank (AJ871176), po samodzielnym opracowaniu metodyki;

- gen *OPN* - 2 SNP, zmiana nukleotydu T/C w intronie 4 wykrywana metoda PCR-RFLP wg. Leonard i wsp. (2005) i zamiana nukleotydu G/T w eksonie 7 wykryta w oparciu o sekwencję z GenBank (AJ871176);
- gen *PPARGC1A* – 2 SNP, C/T w intronie 9 i A/C w rejonie 3'UTR wykrywane metodą PCR-RFLP wg. Khatib i wsp. (2007) z zastosowaniem enzymów *HaeIII* oraz *NheI*, odpowiednio do polimorfizmów;
- gen *FAM13A1* – 2 SNP, zamiana nukleotydów C/A w eksonie 12 wykrywana metodą PCR-RFLP wg. Cohen i wsp. (2004) przy użyciu enzymu restrykcyjnego *AvaII* oraz G/A w intronie 9 wykrywana w oparciu o sekwencją dostępną w GenBank (AJ510139);
- gen *LAP3* – 1 SNP T/C zlokalizowany w eksonie 12; wykrywany w oparciu o sekwencję dostępną w GenBank – AJ871963;
- gen *HCAP-G* - 1 SNP A/C zlokalizowany w intronie (numer nieznan), wykrywany w oparciu o sekwencję GenBank AY744569.

Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu programu Statistica wersja 7.1. [2006]. Dane użytkowe pochodziły z dokumentacji hodowlanej stad prowadzonej w ramach kontroli użytkowości.

WYNIKI

Gen *ABCG2*

Podczas badań opisanych w pracy **H1** dotyczących genu *ABCG2* testowano dwa polimorfizmy typu SNP - A/C w eksonie 14 (znany również jako Y581S) i A/T w intronie 3 w stadzie bydła rasy jersey. Dla polimorfizmu zlokalizowanego w intronie 3 opracowano metodykę oznaczania wariantów genetycznych w oparciu o ACRS-PCR. Analiza otrzymanych wyników wskazała na obecność tylko jednego genotypu (z trzech możliwych) w przypadku polimorfizmu w intronie 3. Natomiast dla drugiego z testowanych polimorfizmów stwierdzono następującą frekwencję alleli - allel A 0,80 i allel C 0,20 oraz genotypów: AA - 0,61; AC - 0,39 obecności genotypu CC nie stwierdzono. W pracach innych autorów dotyczących polimorfizmu Y581S wykazano, że allel A jest allelem najczęściej występującym, a jego frekwencja wynosi od 0,80 do 0,99 u różnych ras bydła zarówno *Bos taurus* jak i *Bos indicus* (Komisarek i Dorynek, 2009; Ron i wsp., 2006; Collis i wsp., 2011; Cohen-Zinder i wsp., 2005). Polimorfizm zlokalizowany w intronie 3 opisany został tylko w pracy Cohen-Zinder (2005) i frekwencja allelu, który częściej występował (allel A) wynosiła 0,55.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników pozwoliła na stwierdzenie statystycznie istotnej ($P \leq 0,01$) przewagi heterozygotycznego genotypu nad genotypem AA w odniesieniu do zawartości tłuszczu w mleku. W przypadku innych analizowanych cech (wydajność mleka i zawartość białka) nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic, ale krowy o genotypie AC osiągały wyższe wydajności analizowanych cech. Praca **H1** jest jedną z pierwszych prac badawczych odnoszących się do relacji

między wariantami genetycznymi polimorfizmu Y581S a fenotypowymi cechami użytkowości mlecznej bydła. Publikacje innych autorów skupiają się na analizie oszacowanych wartości hodowlanych buhajów dla wydajności mleka, białka i tłuszczu oraz zawartości białka i tłuszczu. I tak Cohen-Zinder i wsp. (2005) wykazali, że allel A istotnie (różne poziomy istotności) pozytywnie wpływał na wartość hodowlaną dla wydajności białka i tłuszczu oraz zawartości białka i tłuszczu natomiast istotnie ($P < 0,0001$) negatywnie wpływał na wartość hodowlaną dla wydajności mleka. W pracy Komisarek i Dorynek (2009) wykazano, że buhaje z genotypem AA charakteryzowały się istotnie wyższą oszacowaną wartością hodowlaną dla wydajności tłuszczu i białka ($P \leq 0,01$) oraz dla zawartości białka ($P \leq 0,05$).

Gen *PPARGC1A*

W przypadku genu *PPARGC1A* również testowano dwa miejsca polimorficzne - w intronie 9 w pozycji 1892 C/T, a drugie (A/C) w rejonie 3'UTR w pozycji 3359. Badania prowadzono w dwóch stadach bydła: jersey (181 osobników) i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej (169 osobników). Dla obydwu SNP obliczono frekwencję alleli, genotypów i genotypów kombinowanych. Dla polimorfizmu 1892 C/T frekwencja najczęściej występujących alleli i wszystkich genotypów w obydwu stadach była następująca: T - 0,63 i TT - 0,27, TC - 0,72 CC - 0,01 (jersey) oraz C - 0,58 i TT - 0,08, TC - 0,68, CC - 0,27 (polskie holsztyńsko-fryzyjskie czerwono-białe). W przypadku polimorfizmu 3359 A/C frekwencja najczęściej występujących alleli i poszczególnych genotypów i była następująca: A - 0,88 i AA - 0,76, AC - 0,24 (jersey) oraz A - 0,82 i AA - 0,64, AC - 0,6 (polskie holsztyńsko-fryzyjskie czerwono-białe). Genotypu CC w obydwu badanych stadach nie stwierdzono. Dla genotypów kombinowanych 1892T/C-3359A/C najwyższą frekwencję odnotowano dla genotypu TC/AA i wynosiła ona odpowiednio dla rasy jersey i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej: 0,558 i 0,450. Ze względu na brak genotypu CC polimorfizmu 1892 T/C nie stwierdzono obecności genotypów kombinowanych AA/CC, AT/CC i TT/CC. Obydwa polimorfizmy w genie *PPARGC1A* analizowane były przez innych autorów na różnych rasach bydła. Frekwencja allelu najczęściej występującego w odniesieniu do polimorfizmu 1892 T/C kształtowała się następująco: bydło czarno-białe - 0,73 (Komisarek i Dorynek, 2009), bydło polskie holsztyńsko-fryzyjskie - 0,72 (Komisarek i Walendowska, 2012), bydło Dutch Holstein-Fresian - 0,75 (Schennik i wsp., 2009), bydło German Holstein - 0,84 (Weikard i wsp., 2005). W przypadku polimorfizmu 3359 A/C frekwencja allelu najczęściej występującego u różnych ras bydła była następująca: bydło czarno-białe - 0,64 (Komisarek i Dorynek, 2009), bydło German Holstein - 0,56 (Weikard i wsp., 2005).

Analiza statystyczna wyników otrzymanych w obydwu omawianych pracach **H2** i **H3** pracy nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi genotypami obydwu badanych polimorfizmów a cechami użytkowości mlecznej, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi przez innych autorów analizujących gen *PPARGC1A* u bydła (Weikard i wsp., 2005; Khatib i wsp., 2007;

Komisarek i Dorynek, 2009; Schennik i wsp., 2009). Jedynie w przypadku genotypów kombinowanych stwierdzono statycznie istotne różnice - krowy rasy jersey o genotypie kombinowanym CC/AC charakteryzowały się najniższą dobową wydajnością mleka ($P \leq 0,05$ i $P \leq 0,001$) oraz najwyższą zawartości białka w mleku ($P \leq 0,001$) oraz krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej o genotypie kombinowanym TC/AA charakteryzowały się istotnie ($P \leq 0,05$) najwyższą wydajnością mleka za III laktację.

Gen OPN

Analiza skupiająca się na genie kodującym osteopontynę (OPN) objęła dwa miejsca polimorficzne (polimorfizm typu SNP - intron 4 T/C i ekson 7 G/T) w stadzie bydła rasy jersey (**H5**). Dla polimorfizmu zlokalizowanego w intronie 4 wykazano obecność wszystkich trzech możliwych genotypów o następujących frekwencjach: TT - 0,011, TC - 0,411 i CC - 0,578. Na podstawie częstości występowania alleli wyliczono frekwencję alleli i wynosiła ona: T - 0,22 i C - 0,78. W przypadku polimorfizmu w eksonie 7 najpierw opracowano metodykę analizy w oparciu o sekwencję zdeponowaną w GenBank (AJ871176) oraz o metodę ACRS-PCR. Po wykonaniu analiz laboratoryjnych stwierdzono obecność tylko dwóch z trzech możliwych genotypów: GT i TT (frekwencje odpowiednio: 0,755 i 0,245), natomiast obliczona frekwencja alleli była następująca: G - 0,38 oraz T - 0,62. W publikacjach różnych autorów realizujących badania z wykorzystaniem różnych ras bydła frekwencja allelu T dla polimorfizmu w intronie 4 była zdecydowanie wyższa niż w badaniach własnych i wynosiła od 0,51 do 0,84 (Leonard i wsp., 2005; Khatib i wsp., 2007; Oztobak i wsp., 2008; Pareek i wsp., 2008; Boleckowa i wsp., 2012). Natomiast przeprowadzone badania własne dotyczące polimorfizmu w eksonie 7 są pierwszymi badaniami skupiającymi się na tym SNP i dlatego brak doniesień dotyczących frekwencji innych autorów.

Po przeprowadzeniu analizy statystycznej nie stwierdzono istotnych zależności między poszczególnymi genotypami obydwu testowanych polimorfizmów a cechami użytkowości mlecznej (dobowa wydajność mleka, zawartość białka i tłuszczu). W publikacjach innych autorów analizowano efekt substytucji allelu C oraz wpływ poszczególnych genotypów i wykazano, że allel C wpływa na zmniejszenie zawartości białka i tłuszczu w mleku (Leonard i wsp., 2005) oraz wykazano istotne (przy różnych poziomach istotności) powiązanie genotypów z takimi cechami jak zawartość białka oraz tłuszczu i wydajność tłuszczu (Khatib i wsp., 2007; Boleckowa i wsp., 2012). Pareek i wsp. (2008) analizowali powyższy polimorfizm w odniesieniu do przyrostu wagi w 3, 6 i 12 miesiącu życia u bydła rasy holsztyńskiej. Wykazano statycznie istotne różnice ($P \leq 0,05$) między poszczególnymi genotypami w przypadku jałówek w 6 i 12 m-cu, a w przypadku buhajków w 3, 6 i 12 m-cu życia.

Gen FAM13A1

W pracy **H5** badano również polimorfizm w genie *FAM13A1* - dwa SNP w intronie 9 (G/A) i eksonie 12 (C/A) w stadzie bydła rasy jersey. Frekwencja alleli i genotypów dla SNP zlokalizowanego

w intronie 9 wynosiła odpowiednio G -0,66 i A - 0,34 oraz GG - 0,326, GA - 0,672 i AA 0,02. Dla polimorfizmu w eksonie 12 stwierdzono następujące frekwencje alleli i genotypów A -0,56 i C -0,44 oraz AA 0,203, AC - 0,723 i CC 0,074. Do chwili obecnej poza pracą **H5** dostępnych jest niewiele publikacji dotyczących polimorfizmu w genie *FAM13A1*. W pracy Cohen i wsp. (2004) wykazali dla polimorfizmu w intronie 9, że allel A występował z wyższą częstością 0,59, a frekwencja genotypów wynosiła: GG-0,15, GA-0,525 i AA-0,325 natomiast w przypadku polimorfizmu w eksonie 12 frekwencja częściej występującego allelu (C) wynosiła 0,818 i genotypów: CC -0,66, CA - 0,31 i AA 0,03.

Po wykonaniu obliczeń przy użyciu pakietu Statistica 7.1. nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między poszczególnymi genotypami obydwu testowanych SNP a rozpatrywanymi cechami użytkowości mlecznej. Zaobserwowano jednak, że krowy o genotypie AA (SNP C/A; ekson 12) charakteryzowały się wyższą dobową wydajnością mleka oraz zawartością tłuszczu w mleku. Natomiast w publikacji Cohen-Zinder i wsp. (2005), w której szacowano wartość hodowlaną buhajów rasy holsztyńskiej stwierdzono negatywną zależność ($P < 0,0001$) allelu G i oszacowanej wartości hodowlanej dla zawartości białka w mleku. Natomiast dla allelu C (C/A; ekson12) autorzy wykazali, że wpływał on istotnie ($P < 0,05$) na obniżenie wartości hodowlanej dla wydajności mleka oraz również istotnie wpływała na zwiększenie wartości hodowlanej dla zawartości tłuszczu ($P < 0,001$) i dla zawartości białka ($P < 0,0001$).

Gen LAP3

Do prowadzonych badań włączono również gen *LAP3* i mutację typu SNP (T/C) zlokalizowaną w eksonie 12 [publikacja **H5**]. Po przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych stwierdzono obecność tylko dwóch z trzech możliwych genotypów, których frekwencja wynosiła: TT - 0,85 i TC - 0,15. Frekwencja częściej występującego genotypu wynosiła 0,93 i była ona znacznie wyższa od frekwencji stwierdzonej przez Cohen-Zinder i wsp. (2005), gdzie frekwencja częściej występującego allelu wynosiła 0,573.

Analiza statystyczna otrzymanych wyników nie wykazała statystycznie istotnych różnic między otrzymanymi genotypami w odniesieniu do rozpatrywanych cech użytkowości mlecznej. Zaobserwowano jednak, że zwierzęta o genotypie TC charakteryzowały się wyższą wydajnością mleka, ale o niższej zawartości białka i tłuszczu. W publikacji Cohen-Zinder i wsp. (2005) autorzy wykazali statystycznie istotny wpływ allelu C na wydajność tłuszczu ($P < 0,01$) i białka ($P < 0,001$) oraz zawartość tłuszczu ($P < 0,01$) i białka ($P < 0,0001$).

Gen HCAP-G

W tej samej pracy **H5** badano również polimorfizm w intronie (numeracja nieznana) genu *HCAP-G*. Stwierdzono obecność wszystkich trzech genotypów, których frekwencje wynosiły: AA - 0,006, AC - 0,976 i CC -0,018. Natomiast frekwencja alleli przedstawiała się następująco A - 0,49 i C

0,51. W pracy Olsen i wsp. (2005) realizowanej w stadzie norweskiego bydła mlecznego, wśród wielu badanych genów, analizowano również polimorfizm w genie *HCAP-G* (nazwany *HCAP-G-R_318*) i stwierdzono następującą frekwencję alleli A - 0,72 i C - 0,28.

W przypadku tego testowanego polimorfizmu nie wykazano statystycznie istotnych relacji między poszczególnymi genotypami a badanymi cechami użytkowości mlecznej. Zauważono jednak, że osobniki o genotypie AC charakteryzowały się wyższą wydajnością mleka oraz wyższą zawartością tłuszczu w mleku. Wśród dostępnych publikacji nie napotkano na opracowania traktujące o zależnościach między genotypami *HCAP-G* a cechami użytkowości bydła.

W pracy **H4** podjęto badania mające na celu oszacowanie ewentualnych zależności między polimorfizmem w genach *ABCG2*, *OPN*, *PPARGC1A*, *FAM13A1*, *LAP3* i *HCAP-G* a liczbą komórek somatycznych transformowanych na skalę logarytmiczną (SCS) jako istotnego wskaźnika stanu zdrowotności bydła. Badania prowadzono w stadzie bydła rasy jersey. Rozpatrywano zarówno poszczególne genotypy wyżej wymienionych genów, jak i genotypy kombinowane w przypadku genów gdzie analizowano dwa SNP, ale niektóre genotypy (*FAM13A1* intron 9 AA) i genotypy kombinowane (*FAM13A1* AA/AC oraz *PPARGC1A* CC/AC) nie zostały uwzględnione w analizie statystycznej z powodu małej liczebności. Wyniki badań wskazują na statystycznie istotne ($P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$) różnice pomiędzy średnimi wartościami liczby komórek somatycznych (SCS) u badanych krów z różnymi genotypami *FAM13A1* (intron 9) oraz genotypami kombinowanymi *FAM13A1* oraz *OPN*.

Najwyższą wartość SCS wykazano dla krów o genotypie TT *OPN* (intron 4). Różnica między krowami o genotypie TT i CT wynosiła 0,757 natomiast między osobnikami o genotypie TT i TC była nieznacznie niższa i wynosiła 0,717 – różnice te zostały statystycznie potwierdzone ($P \leq 0,001$). Dla pozostałych analizowanych polimorfizmów nie wykazano statystycznie istotnych różnic. W przypadku genotypów kombinowanych *FAM13A1* najwyższą wartość SCS wykazano u krów o genotypie GA/CC. Różnica pomiędzy osobnikami o genotypie GA/CC a GG/AA (najniższa wartość SCS) wynosiła 0,903, natomiast pomiędzy zwierzętami o genotypie GA/CC a GG/AC oraz GG/CC była nieco niższa i wynosiła odpowiednio 0,890 i 0,811. Różnice te zostały potwierdzone statystycznie ($P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$). Analiza statystyczna genotypów kombinowanych *OPN* potwierdziła wyniki uzyskane podczas poszczególnych SNP w genie *OPN*. Wykazano, że osobniki o genotypie kombinowanym TT/GT osiągały dużo wyższą wartość SCS niż pozostałe osobniki, co zostało statystycznie potwierdzone ($P \leq 0,001$). W odniesieniu do genotypów kombinowanych dla *PPARGC1A* nie wykazano statystycznie istotnych różnic.

W dostępnym piśmiennictwie jest mało publikacji dotyczących powiązania polimorfizmu w badanych genach z liczbą komórek somatycznych. Jedynie w pracy Komisarek i Dorynek (2009)

wykazano, że osobniki o genotypie *PPARGC1A* A968C AC osiągały niższe SCS niż osobniki o genotypie homozygotycznym AA oraz wykazano, że w przypadku polimorfizmu *PPARGC1A* T19C najniższe SCS osiągały osobniki o genotypie homozygotycznym CC, natomiast w tym badaniu najniższe SCS charakteryzowały osobniki o genotypie TT.

ANALIZA UZYSKANYCH WYNIKÓW ORAZ ICH EWENTUALNE WYKORZYSTANIE

Zmienność między zwierzętami w odniesieniu do genetycznego podłoża danej cechy powodowana jest przez różny układ alleli w genomie tych zwierząt. Wybór zwierząt o najlepszej kombinacji alleli lub genów może zapewnić postęp genetyczny. Do niedawna selekcja była oparta tylko na informacjach dotyczących fenotypu zwierząt. Ze względu na duży wpływ czynników środowiskowych na ekspresję cech użytkowości, informacja o fenotypie zapewniała tylko część wiedzy na temat genetycznego potencjału danej cechy. Zastosowanie technik molekularnych, które w ostatnich dekadach zostały znacznie rozwinięte, może znacząco zwiększyć dostępność informacji na temat potencjału genetycznego zwierząt. Markery genetyczne zapewniają możliwość śledzenia dziedziczenia cech przekazywanych z rodziców na potomstwo i analizę jaki wariant markera otrzymało potomstwo. Weller i wsp. (1990) wykazali, że taka strategia jest możliwa i skuteczna także u bydła mlecznego. Ponieważ markery genetyczne można analizować już u bardzo młodych osobników (lub nawet embrionów) to dokładność selekcji może się zwiększyć, a tym samym różnica między pokoleniami może się zmniejszyć. Soller i Beckman (1982) byli pierwszymi, którzy uwzględnili potencjalne korzyści wynikające z użycia selekcji wspomaganą markerami w programach hodowlanych bydła mlecznego. Obecność *loci* cech ilościowych została wykazana zarówno w doświadczalnych jak i komercyjnych stadach bydła, świń oraz owiec. W przypadku bydła mlecznego jako pierwsze zostały stwierdzone markery związane z wydajnością i składem mleka (Georges i wsp., 1995) oraz produkcją serów (Graham i wsp., 1984).

Analiza wyników badań dotyczących mapowania QTL wykazała, że liczne geny odpowiadające za cechy ilościowe (w tym przypadku związane z użytkowością mleczną) znajdują się głównie w chromosomach 3, 6, 14 i 20 bydła. Geny zmapowane w chromosomie 14 mają istotny wpływ na zawartość tłuszczu w mleku, natomiast geny zlokalizowane w chromosomach 3, 6 i 20 wpływają na zawartość białka w mleku, a spośród nich chromosom 6 jest najbogatszy w QTL. QTL zlokalizowane w pobliżu środka chromosomu 6 (BTA6) wpływające na zawartość białka w mleku po raz pierwszy zostały wykryte przez Georges i wsp. (1995) w populacji bydła holsztyńskiego w USA. Te same QTL zostały również wykryte w innych populacjach bydła holsztyńskiego, jak również u takich ras jak bydło Finnish Ayrshire (Velmała i wsp., 1999) i bydło norweskie (Olsen i wsp., 2002). Ron i wsp., (2001) wykazali w swoich badaniach, że region zawierający analizowane QTL zlokalizowany jest około 4 cM od mikrosatelity BM143, natomiast Olsen i wsp. (2002) przy użyciu mapowania fizycznego, kombinowanych sprzężeń i mapowania przy użyciu nierównowagi sprzężeń określili lokalizację tych

QTL – znajdują się one wewnątrz regionu liczącego 420 kbp i zawartego między genami *ABCG2* i *LAP3*.

Jak wykazano podczas omówienia otrzymanych wyników frekwencje poszczególnych alleli czy genotypów badanych genów w większości różniły się od wyników jakie w swoich publikacjach prezentowali różni autorzy. Taką zaistniałą rozbieżność można tłumaczyć przede wszystkim różnorodnością ras bydła, na których prowadzono analizy. Badania własne prowadzone były w głównie stadzie bydła rasy jersey (tylko jedna publikacja **H3**, stado bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej), natomiast prace innych badaczy prowadzone były na różnych stadach bydła holsztyńskiego. Należy również nadmienić, że prace innych autorów badających omawiane geny nie są zbyt liczne i często mają one charakter badań wstępnych. W przypadku genu *ABCG2* i szeroko analizowanego polimorfizmu Y581S, gdzie badania prowadzono na różnych rasach *Bos taurus* jak i *Bos indicus* wykazano zbliżoną frekwencję najczęściej występującego allelu zarówno w badaniach własnych **H1** jak i pracach innych autorów. Kolejnym wyjaśnieniem różnicy dotyczącej frekwencji alleli genotypów może być mała liczebność stad bydła, w których prowadzono badania.

Otrzymane wyniki analizy zależności między SNP w genach znajdujących się w badanym fragmencie BTA6 dla cech użytkowych bydła a wartościami średnimi wskazują statystycznie istotne ($P \leq 0,01$) powiązanie genotypu heterozygotycznego polimorfizmu genu *ABCG2* Y581S z zawartością tłuszczu w mleku (publikacja **H1**) oraz tendencję (nie potwierdzoną statystycznie) do uzyskiwania wyższej wydajności mleka i zawartości białka. W przypadku polimorfizmu w genie *PPARGC1A* wykazano, że zwierzęta o genotypach kombinowanych 1892T/C-3359A/C CC/AC i CC/AA istotnie różniły się średnimi wartościami analizowanych cech - zwierzęta o tych genotypach produkowały istotnie mniej mleka, ale o wyższej zawartości białka i tłuszczu (publikacje **H2** i **H3**). Dla pozostałych analizowanych genów nie wykazano istotnych zależności między poszczególnymi genotypami a cechami użytkowości mlecznej, zaobserwowano jednak pewne tendencje do otrzymywania od krów o poszczególnych genotypach wyższej wydajności mleka o niższej zawartości tłuszczu bądź białka [publikacja **H5**]. Trudno jest też porównać otrzymane wyniki z badań własnych z wynikami otrzymanymi przez innych autorów, ponieważ duża część publikacji koncentruje się na oszacowanych wartościach hodowlanych dla cech użytkowości mlecznej buhajów lub jak w przypadku osteopontyny dotyczy przyrostu masy ciała buhajków i cieliczek.

Trzy spośród analizowanych SNP zlokalizowane są w eksonach – *FAM13A1* C/A w eksonie 12, *OPN* G/T w eksonie 7 i *LAP3* T/C w eksonie 12. Wykazano, że w przypadku *FAM13A1* na skutek zamiany nukleotydów C/A następuje niesynonimiczne podstawienie aminokwasowe Ile/Leu – obydwie aminokwasy są aminokwasami niepolarnymi, dlatego też zamiana ta nie powoduje znacznych zmian w konformacji białka (Cohen et al., 2004). W przypadku *LAP3* i zamiany nukleotydów T/C dochodzi do synonimicznego podstawienia aminokwasowego Ala, dlatego też ten

SNP nie uwidacznia się w potranslacyjnej strukturze polipeptydu *LAP3* (GenBank CAI44744). Natomiast w przypadku *OPN* G/T, SNP zlokalizowany jest wprawdzie w eksonie, ale w jego części niekodującej (3'UTR), która nie ulega translacji (Pareek et al., 2008). Pomimo iż powyższe SNP zlokalizowane są w eksonach to nie przekładają się one w istotny sposób na strukturę swojego produktu, dlatego też wszystkie analizowane SNP zarówno te zmapowane w intronach jak i eksonach podczas dalszych badań mogą zostać potraktowane jako markery cech użytkowości. Mając na względzie wyżej przedstawione informacje można konstatować, iż wyniki prac **H1,H2,H3,H5** wskazują na wykorzystanie, jako markery genetyczne, w selekcji mającej na celu doskonalenie cech użytkowości mlecznej bydła genów *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OPN*, *FAM13A1*, *LAP3* i *HCAP-G*.

Analiza zależności między poszczególnymi genotypami oraz genotypami kombinowanymi wybranych genów z fragmentu chromosomu 6 a liczbą komórek somatycznych transformowanych na skalę logarymiczną wykazała istotne zależności między wariantami genu *OPN* (SNP w intronie 4) oraz genotypami kombinowanymi dla genów *OPN* i *FAM13A1*. Pozwoliło to stwierdzić, że uzyskane w pracy **H4** mogą przelożyć się na korzyści ekonomiczne dla producentów mleka. Zestawienie otrzymanych wyników sugeruje możliwość wykorzystania w programach hodowlanych bydła mlecznego polimorfizmu w genie *OPN* (intron4) lub genotypów kombinowanych w obrębie genów *OPN* i *FAM13A1*. Należałoby preferować krowy o genotypach powiązanych z najniższą ilością komórek somatycznych lub eliminować osobniki o genotypach powiązanych z najwyższą ilością komórek somatycznych w mleku (*OPN* TT; *OPN* TT/GT; *FAM13A1* GG/AC). Ważnym jest też, aby mieć na uwadze prowadząc selekcję, że nadmierne obniżanie ilości komórek somatycznych w mleku (<200 000 cell/ml) może negatywnie wpływać na odporność i może być powiązane ze wzrostem ryzyka klinicznego mastitis jak reakcja zapalna wymienia.

Zestawiając powyższe informacje można stwierdzić iż przeprowadzone badania własne pozwoliły na wykazanie istotnego wpływu niektórych polimorfizmów typu SNP na analizowane cechy bydła mlecznego. Wykazano również, że mimo braku statystycznie istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi genotypami rozpatrywanych genów w odniesieniu analizowanych cech, możliwe było wykazanie pewnych tendencji do osiągnięcia niższych lub wyższych wartości danej cechy przez osobnika o określonym genotypie. Z tego względu wydaje się, że warto przeprowadzać też dalsze badania dotyczące genów skupionych w regionie sąsiadującym z BM143 w BTA6 a cechami użytkowości bazując na większych stadach krów oraz na różnych rasach bydła mlecznego

PODSUMOWANIE

Jednotematyczny cykl publikacji stanowiący podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego prezentuje wyniki badań związanych z analizą genów z regionu BTA6 skupionych blisko markera genetycznego BM143 w powiązaniu z cechami użytkowości bydła

mlecznego. Jest to o tyle istotne, że w programach hodowlach w Niemczech i we Francji chromosom 6 bydła już jest włączony do projektu MAS (ang. *Marker Assisted Selection*).

W publikacjach przedstawiono otrzymane frekwencje alleli, genotypów oraz genotypów kombinowanych genów *ABCG2*, *OPN*, *PPARGC1A*, *FAM13A1*, *LAP3* i *HCAP-G*. Aby móc przeprowadzić badania opracowano metodyki pozwalające na analizę wybranych sześciu z dziesięciu SNP (dla których nie były wcześniejszych opracowań) w standardowo wyposażonym laboratorium molekularnym. Jednakże zasadniczym celem jednotematycznego cyklu prac było oszacowanie czy istnieją zależności między wytypowanymi do badań genami a cechami użytkowości mlecznej oraz liczbą komórek somatycznych. Po przeprowadzeniu analiz statystycznych można dojść do wniosku, iż wyżej wymienione geny wpływają (w wielu przypadkach wpływ ten jest potwierdzony statystycznie) na analizowane cechy użytkowości bydła. Pozwala to stwierdzić, że wyniki powyższych badania po uwzględnieniu ich w programach hodowlanych bydła mlecznego mogą przełożyć się na korzyści ekonomiczne dla producentów mleka.

Cytowane piśmiennictwo

1. Allan M.F., Thallman R.M., Cushman R.A., Echternkamp S.E., White S.N., Kuehn L.A., Casas E., Smith T.P.L. 2007. Association of a single nucleotide polymorphism in *SPP1* with growth traits and twinning in a cattle population selected for twinning rate. *Journal of Animal Science* 85,341–347.
2. Bayless K.J., Davis G.E., Meininger G.A. 1997. Isolation and biological properties of osteopontin from bovine milk. *Protein Expression And Purification* 9, 309–314.
3. Bell A.W., Bauman D.E. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2, 265–278.
4. Boleckova J., Matejickova J., Stipkova M., Kyselova J., Barton L. 2012. The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle. *Czech Journal of Animal Science* 57, 45–53.
5. Charon K.M. 2007. Analiza uwarunkowań produkcyjności i zdrowotności zwierząt. *Przegląd hodowlany* 9,8-13.
6. Cohen M., Reichenstein M., Everts-van der Wind A., Heon-Lee J., Shani M., Lewin H.A., Weller J.I., Ron M., Seroussia E. 2004. Cloning and characterization of *FAM13A1* - a gene near a milk protein QTL on BTA6: evidence for population-wide linkage disequilibrium in Israeli Holsteins. *Genomics* 84, 374– 383.
7. Cohen-Zinder M., Seroussi E., Larkin D.M., Looor J.J., Everts-van der Wind A., Lee J.H., Drackley J.K., Band M.R., Hernandez A.G., Shani M., Lewin H.A., Weller J.I., Ron M. 2005. Identification of a missense mutation in the bovine gene *ABCG2* with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Research* 15, 936-944.

8. Collis E., Fortes M. R. S., Zhang Y., Tier B., Schutt K., Barendse W., Hawken R. 2011. Genetic variants affecting meat and milk production traits appear to have effects on reproduction traits in cattle. *Animal Genetics* 43, 442-446.
9. Ek J., Andersen G., Urhammer S.A., Gaede P.H., Drivsholm T., Borch-Johnsen K., Hansen T., Pedersen O. 2001. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 44, 2220–2226.
10. Esterbauer H., Oberkofler H., Linnemayr V., Iglseder B., Hedegger M., Wolfsgruber P., Paulweber B., Fastner G., Krempler F., Patsch W. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene locus: associations with obesity indices in middle-aged women. *Diabetes* 51, 1281–1286.
11. Georges M., Nielsen D., Mackinnon M., Mishra A., Okimoto R., Pasquino A.T., Sargeant L.S., Sorensen A., Steele M.R., Zhao X., Womack J.E. and Hoeschele I. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139, 907-920.
12. Graham E.R.B., McLean D.M., Zuiedrans P. 1984. The effect of milk protein genotypes on the cheese making properties of milk and on yield of cheese. In: *Proceedings of the Fourth Conference of the Australia Association of Animal Breeding and Genetics*, Adelaide, Australia, pp. 36.
13. Johnson G.A., Burghardt R.C., Bazer F.W., Spencer T. E. 2003. Osteopontin: Roles in implantation and placentation. *Biology of Reproduction* 69, 1458–1471.
14. Jonker J.W., Merino G., Musters S., van Herwaarden A.E., Bolscher E., Wagenaar E., Mesman E., Dale T.C., Schinkel A.H. 2005. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nature* 435, 127–129.
15. Khatib H., Zaitoun I., Wiebelhaus-Finger J., Chang Y.M., Rosa G.J.M. 2007. The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. *Journal of Dairy Science* 90, 2966-2970.
16. Khatkar M.S., Thomson P.C., Tammen I., Raadsma H.W. 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetics Selection Evolution* 36, 163–190.
17. Klungland H., Sabry A., Heringstad B., Olsen H.G., Gomez-Raya L., Våge D.I., Olsaker I., J. Ødegård, Klemetsdal G., Schulman N., Vilki J., Ruane J., Aasland M., Rønningen K., Lien S. 2001. Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mammalian Genome* 12, 837–842.

18. Komisarek J, Dorynek Z. 2009. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics* 50, 125-132.
19. Komisarek J., Walendowska A. 2012. Analysis of the PPARGC1A gene as a potential marker for productive and reproductive traits in cattle. *Folia Biologica (Kraków)* 60, 171-174.
20. Leonard S., Khatib H., Schutzkus V., Chang M.Y., Maletacca C. 2005. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 88, 4083-4086.
21. Nagatomo T., Ohga S., Takada H., Nomura A., Hikino S., Imura M., Ohshima K., Hara T. 2004. Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. *Clinical & Experimental Immunology* 138,47-53.
22. Olsen H.G., Gomez-Raya L., Våge D.I., Olsaker I., Klungland H., Svendsen M., Ådnøy, Sabry A., Klemetsdal G., Schulman N., Krämer W., Thaller G., Rønningen K., Lien S. 2002. A genome scan for quantitative trait loci affecting milk production in Norwegian dairy cattle. *Journal of Dairy Sciences* 85, 3124-3130.
23. Olsen H.G., Lien S., Gautier M., Nilsen H., Roseth A., Berg P.R., Sundsaasen K.K., Svendsen M., Meuwissen T.H.E. 2005. mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genetics* 169, 275-283.
24. Oztobak K., Un C., Tesfaye D., Akis I., Mengi A. 2008. Genetic polymorphisms of osteopontin (OPN), prolactin (PRL) and pituitary-specific transcript factor-1 (PIT-1) in South Anatolian and East Anatolian Red cattle. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Sciences* 58, 109-112.
25. Pareek Ch.S., Czarnik U., Pierzchała M., Zwierzchowski L. 2008. An association between the C>T single nucleotide polymorphism within intron IV of osteopontin encoding gene (SPP1) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports* 26, 251-257.
26. Puigserver P., Spiegelman B.M. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews* 24, 78-90.
27. Ron M., Cohen-Zinder M., Peter C., Weller J.I., Erhardt G. 2006. A polymorphism in ABCG2 in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *Journal of Dairy Science* 89, 4921-4923.
28. Ron M., Kliger D., Feldmesser E., Seroussi E., Ezra E., Weller J.I. 2001. Multiple quantitative trait locus analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. *Genetics* 159, 727-735.
29. Sarkadi B., Özvegy-Laczka C., Németh K., Váradi A. 2004. ABCG2 – a transporter for all seasons. *FEBS Letters* 567, 116-120.

30. Schennik, A., Bovenhuis H., Leon-Kloosterziel K.M., Arendonk J. A.M, Visker M.H.P.W. 2009. Effect of polymorphism in the FASN, OLR, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Animal Genetics* 40, 909-916.
31. Snyder E.E., Walts B., Perusse L., Chagnon Y.C., Weisnagel S.J., Rankinen T., Bouchard C. 2004. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obesity Research* 12, 369–439.
32. Soller M., Beckmann J.S. 1982. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement. In: *Second World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Madrid*, 6: 396-404.
33. Velmala R.J., Vilkki H.J., Elo K.T., de Koning D.J., Mäki-Tanila A.V. 1999. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Animal Genetics*. 30,136-143.
34. Weikard R., Altmaier E., Suhre K., Weinberger K.M., Hammon H.M., Albrecht E., Setoguchi K., Takasuga A., Kühn Ch. 2010. Metabolomic profiles indicate distinct physiological pathway affected by two loci with major divergent effect on *Bos taurus* growth and lipid deposition. *Physiological Genomics* 42A, 79-88.
35. Weikard R., Kühn Ch., Goldammer T., Freyer G., Schwerin M. 2004. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiological Genomics* 21, 1–13.
36. Weller J.I., Kashi Y., Soller M. 1990. Power of “daughter” and “granddaughter” designs for genetic mapping of quantitative traits in dairy cattle using genetic markers. *Journal of Dairy Science* 73, 2525-2537.

5. POZOSTAŁE FORMY AKTYWNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ

5. 1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Główne kierunki działalności naukowo-badawczej:

- 5.1.1. analiza polimorfizmu w genie kodującym aromatazę cytochromu P-450;
- 5.1.2. poszukiwanie markerów genetycznych cech użytkowości mlecznej bydła;
- 5.1.3. szacowanie relacji między genami zaangażowanymi w metabolizm kwasów tłuszczowych a cechami użytkowymi i funkcjonalnymi bydła;
- 5.1.4. określenie genów powiązanych z zawartością komórek somatycznych w mleku bydła;
- 5.1.5. polimorfizm wybranych genów i ich związek z cechami użytkowości rozplodowej knurów i loch.

Ad. 5.1.1. Analiza polimorfizmu w genie kodującym aromatazę cytochromu P-450

Rozród i laktacja są silnie ze sobą powiązane, dlatego też wszystkie procesy fizjologiczne oraz hormony wpływające na rozwój układu rozrodczego mają również wpływ na laktację. Do takich hormonów o szerokim spektrum działania należą estrogeny syntetyzowane w jajnikach. Estrogeny wytwarzane są drogą aromatyzacji androgenów. Kluczowym enzymem odpowiedzialnym za biosyntezę estrogenów z androgenowych prekursorów jest kompleks enzymatyczny znany jako aromataza, kodowany przez gen *CYP19*. W obrębie genu *CYP19* u bydła wykryto kilka pojedynczych podstawień nukleotydowych (SNP), zlokalizowanych w regionach promotorowych. Analizie poddano dwa z nich zlokalizowane w regionie promotorowym Pl.1 w odniesieniu do cech użytkowości mlecznej i liczby komórek somatycznych dla dwóch ras bydła - rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej oraz jersey.

W badaniach prowadzonych na bydle rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej analizowano cechy użytkowości mlecznej zarówno dla poszczególnych genotypów jak i dla genotypów kombinowanych oraz przeprowadzono analizę strukturę genetyczną dla tej populacji, ponieważ była to populacja składająca się z kilku stad bydła. Wyniki badań wskazują, że zwierzęta o genotypach BB *CYP19/Cfr13I* oraz AA *CYP19/Pvull* charakteryzowały się najwyższymi wartościami średnimi analizowanych cech ($P \leq 0,05$) (A14). Również ocena wyników dla genotypów kombinowanych potwierdziła powyższe badania - krowy o genotypie kombinowanym BB/AA *CYP19/Cfr13I-Pvull* także charakteryzowały się najwyższymi wartościami średnimi dla rozpatrywanych cech użytkowości mlecznej ($P \leq 0,05$) (A5). Podczas analizy struktury genetycznej brano pod uwagę takie parametry jak frekwencja genotypów (zarówno poszczególnych, jak i homo- i heterozygotycznych) i alleli (obserwowana i oczekiwana) oraz współczynnik średniej heterozygotyczności stad. Otrzymane wyniki nie wykazały odchylenia od równowagi Hardy'ego-Weinberga. Genotypy homozygotyczne występowały z wyższą częstością w każdym testowanym

stadzie, bez statystycznie istotnych różnic między obserwowaną a oczekiwaną liczebnością homo- i heterozygotycznych genotypów (A6).

Badania te stanowiły część analiz realizowanych w ramach grantu promotorskiego 2 P06D 035 26 pt. „Polimorfizm w genie aromatazy cytochromu P450 oraz możliwości wykorzystania poszczególnych jego wariantów w doskonaleniu cech użytkowości mlecznej bydła”.

W doświadczeniu skupiającym się na rasie jersey szacowano relacje dla cech użytkowości mlecznej oraz dla liczby komórek somatycznych w również w odniesieniu do polimorfizmów w regionie PI.1. Analiza otrzymanych wyników nie pozwoliła jednoznacznie stwierdzić zależności między genotypami *CYP19* a testowanymi cechami użytkowości ze względu na brak istotnych różnic. Natomiast ze względu na brak obecności genotypu homozygotycznego BB w badanym stadzie krów trudno jest oszacować, czy miałby on wpływ na analizowane cechy (A19, E6).

Wyżej przedstawione rezultaty badań skupiających się na genie *CYP19*, kodującym aromatazę, wskazują na prawdopodobieństwo wykorzystania polimorfizmu w tym genie do poprawy cech użytkowości mlecznej bydła, ale pod warunkiem przeprowadzenia jeszcze powtórzonych badań w oparciu o bardziej liczne i składające się z różnych ras stada bydła.

Ad.5.1.2. Poszukiwanie markerów genetycznych cech użytkowości mlecznej bydła

Wiedza w zakresie wpływu poszczególnych genów lub kombinacji genów na istotne cechy użytkowości zwierząt gospodarskich może prowadzić do modyfikowania lub tworzenia nowych, bardziej wydajnych populacji. Zamiast konwencjonalnych programów hodowlanych zwierząt gospodarskich opierających się wyłącznie na informacjach o fenotypie i rodowodzie, można by włączyć wykryty QTL do oceny genetycznej zwierzęcia, co pozwoli na zwiększenie dokładności selekcji i przyspieszy genetyczne doskonalenie produktywności zwierząt. Dlatego wydaje się ważne prowadzenie badań, które pozwoliły na wykrycie genu o potencjale markera genetycznego. W ramach tych poszukiwań podjęto prace ukierunkowane na analizę genów zaangażowanych w tzw. "oś somatotropową", przemiany energetyczne w organizmie, ponadto badano geny kodujące główne białka serwatkowe mleka odpowiedzialne za syndrom BLAD.

5.1.2.1. Analiza genów zaangażowanych w szeroko pojętą "oś somatotropową"

Wiele z cech produkcyjnych zwierząt jest wynikiem połączenia dostępności składników pokarmowych i różnych interakcji pomiędzy układem hormonalnym oraz czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Chociaż wielu autorów publikacji donosi, że hormon wzrostu (GH) odgrywa kluczową rolę w kontroli metabolizmu organizmu, hormon ten jest tylko jednym z czynników w kaskadzie procesów, które opisywane są jako oś somatotropowa. Oś somatotropowa odgrywa ważną rolę w kontroli regulacji metabolizmu i procesów fizjologicznych poprzez hormon wzrostu (GH) i

insulinopodobny czynnika wzrostu (IGF-I i IGF-II) oraz przez receptory z nimi związane. Przynajmniej jeden czynnik transkrypcyjny (Pit1) jest komórkowo specyficznym czynnikiem transkrypcyjnym niezbędnym podczas aktywacji ekspresji genów prolaktyny (PRL) i GH w przednim płacie przysadki mózgowej. Natomiast receptor prolaktyny pośredniczy w przekazywaniu sygnału od hormonów laktogennych (takich jak prolaktyna) do promotorów genów białek mleka. Czynnikiem transkrypcyjnym STAT5, znany jest jako główny pośrednik działania hormonu wzrostu i prolaktyny na docelowe dla tych hormonów geny. Celem badań było przetestowanie relacji między polimorfizmami w tych genach a cechami użytkowości mlecznej bydła (wydajność mleka, białka i tłuszczu, zawartość białka i tłuszczu w mleku). Badania początkowo skupiały się na genach hormonu wzrostu, somatoliberyny i przysadkowego czynnika wzrostu. Analizowano polimorfizmy typu SNP (oraz frekwencje alleli i genotypów) w odniesieniu do wybranych cech użytkowości mlecznej bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej głównie odmiany czerwono-białej, jak i odmiany czarno-białej oraz bydła rasy jersey.

Badania polimorfizmu w genie hormonu wzrostu prowadzono na dwóch rasach bydła - polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej i jersey. Frekwencje alleli analizowanych polimorfizmów u obydwu badanych ras były zbliżone (**E7, F4, F7**). Oszacowane relacje między polimorfizmem w intronie 3 genu *GH* wykazały istotne zależności między wariantami genetycznymi tego polimorfizmu a badanymi cechami użytkowości mlecznej (**F4, F7**).

Analiza mutacji w genie *GHRH* prowadzona była na bydło rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (czarno- i czerwono-białej) i wykazała zbliżone frekwencje alleli badanego polimorfizmu (**D2, F3**). Stwierdzono również, że krowy o homozygotycznym genotypie AA charakteryzowały się wyższymi wartościami średnimi analizowanych cech użytkowości mlecznej (**A8, D4**).

Kolejnym zagadnieniem badawczym oscylującym wokół osi somatotropowej była analiza polimorfizmu w genie *STAT5A* (intron 7) u bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno- i czerwono-białej. Badania prowadzone u obydwu ras bydła okazały się bardzo zbliżone - frekwencja alleli i genotypów bydła zbliżona i nie odbiegała od doniesień innych autorów. Analiza statystyczna otrzymanych wyników w odniesieniu do cech użytkowości mlecznej nie wykazała zależności pomiędzy wariantami genetycznymi polimorfizmu a testowanymi cechami (**A3, A9, F8, F12**).

Dla genów *Pit-1*, *GHR* i *IGF-1* przeprowadzono pojedyncze badania wstępne, których efektem są doniesienia na konferencjach. W badaniach analizowano tylko frekwencje genotypów i alleli, które okazały się zgodne z danymi literaturowymi (**D2, E7, F11**).

Prowadzono również badania skupione na oszacowaniu zależności między wariantami genetycznymi genu receptora prolaktyny (intron 9) a cechami użytkowości mlecznej w stadzie bydła rasy jersey. Stwierdzono utrzymującą się tendencję do osiągania najwyższych średnich wartości w odniesieniu do wydajności mleka, białka i tłuszczu przez osobniki o genotypie heterozygotycznym, natomiast w

przypadku zawartości białka i tłuszczu w mleku najwyższe wartości tych cech osiągały krowy o genotypie homozygotycznym CC (**A10**).

Powyższe przeprowadzone badania wskazują na możliwość wykorzystania polimorfizmu w genach *GH*, *GHRH* oraz *PRLR* do doskonalenia cech użytkowości mlecznej bydła. Należy podkreślić, że są to głównie badania wstępne, które nie pozwalają na postawienie ostatecznych wniosków. Dlatego konieczne są dalsze analizy powyższych genów, co pomoże zweryfikować otrzymane wyniki.

5.1.2.2. Analiza genów zaangażowanych w przemiany metaboliczne

Kluczowym zagadnieniem jest zakres, w którym selekcja genetyczna w celu osiągnięcia zwiększonej produkcji wpływa na zdolność zwierząt do adaptacji do środowiska, w którym przebywa. Na poziomie indywidualnym, adaptacja wykorzystuje systemy regulacji, w skład których wchodzi komponenty behawioralne i fizjologiczne, które umożliwiają poszczególnym osobnikom radzenie sobie ze zmianą warunków środowiska. U zwierząt fizjologiczna regulacja pobierania pokarmów, wzrostu i rozdziału energii oraz adaptacja do zmian środowiska są pod kontrolą wielu genów, które mogą okazać się ważnymi elementami leżącymi u podłoża zmienności cech użytkowości istotnych z ekonomicznego punktu widzenia. Dlatego też w tym nurcie badawczym wytypowano do analizy geny, których produkty uczestniczą w regulacji wyżej wymienionych procesów - należą do nich *LEP*, *CRH*, *PRKAG3*, *GHRL* i *TG*.

Dowiedziano, że leptyna (*LEP*) wpływa na szereg procesów zachodzących w organizmie, a w szczególności bierze udział w utrzymaniu bilansu energetycznego poprzez regulację pobierania pokarmu i wydatkowania energii. Zaangażowana jest również w procesy związane z reprodukcją. Gen *PRKAG3* koduje jedną z podjednostek kinazy aktywowanej AMP - podjednostkę $\gamma 3$. Kluczową rolę kinazy aktywowanej AMP jest regulowanie bilansu energetycznego w komórce. Grelina (*GHRL*) jest hormonem biorącym udział w regulacji gospodarki energetycznej organizmu. Hormon ten wykazuje silne działanie ogólnoustrojowe, a jego stężenie we krwi zwiększa się przed głównymi posiłkami sygnalizując konieczność dostarczenia pokarmu. Wykazano, że grelina jest najsilniejszym z dotychczas poznanych stymulatorów wydzielania hormonu wzrostu, a przez ten fakt jest pomostem łączącym wzrost i budowę ciała z ogólnym metabolizmem. Tyreoglobulina (*TG*) jest głównym białkiem tarczycy będącym substratem do produkcji hormonów tarczycy oraz nośnikiem trijodotyroniny (*T3*) i tyroksyny (tetrajodotyroniny, *T4*). Natomiast same hormony tarczycy odgrywają ważną rolę w regulacji metabolizmu oraz wywierają ogromny wpływ na wzrost, różnicowanie i homeostatyczny skład komórek tłuszczowych. Regulacja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (*HPA*) ma kluczowe znaczenie podczas adaptacji organizmu zwierząt do zmian środowiska. Głównym regulatorem osi *HPA* jest hormon uwalniający kortykotropinę (*CRH*), który jest produkowany w podwzgórze i jest istotnym celem pętli sprzężenia zwrotnego dla glikokortykoidów. Podjęto badania

prowadzące do oszacowania ewentualnych zależności między polimorfizmem genów, których produkty zaangażowane są w regulację gospodarki energetycznej zwierząt a wybranymi cechami użytkowości mlecznej różnych ras bydła.

Podczas analizy polimorfizmu w genie kodującym leptynę prowadzono badania na bydło rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej oraz jersey. Do analizy wykorzystano polimorfizmy zlokalizowane w intronie 2 i eksonie 3. W przypadku obu ras bydła analizowano frekwencję alleli i genotypów (**A7, D1**), a dla bydła rasy jersey przeprowadzono analizę statystyczną prowadzącą do oszacowania relacji między wariantami genetycznymi a cechami użytkowości mlecznej. Wyniki analizy wskazywały na powiązanie polimorfizmu A59V z wydajnością mleka, białka i tłuszczu (różnice zostały potwierdzone statystycznie; $P \leq 0,01$, $P \leq 0,05$), natomiast dla polimorfizmu zmapowanego w intronie 2 nie wykazano żadnego powiązania (**A7**). W przypadku badań genu *CRH* testowano dwa polimorfizmy (ekson 1 i ekson 2) u dwóch ras bydła - jersey i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej (odpowiednio). Stwierdzono powiązanie polimorfizmu w eksonie 1 ze zwiększoną wydajnością tłuszczu oraz zwiększoną zawartością tłuszczu i białka w mleku (**A16**). Natomiast polimorfizm genu *CRH* w eksonie 2 powiązany był z wyższą wydajnością mleka i białka (**A18**). Wyniki te w obydwu przypadkach zostały potwierdzone statystycznie ($P \leq 0,05$). W doświadczeniach koncentrujących się na genach takich jak *PRKAG3*, *TG* oraz *GHRL* otrzymane wyniki badań wykazały, że istnieją pewne zależności między analizowanymi genotypami a wybranymi cechami użytkowości mlecznej, jednakże nie były one statystycznie istotne (**A15, A13, A17**).

Początkowo leptyna została wytypowana jako główny hormon odpowiadający za homeostazę energetyczną organizmu, niedawno jednak uznano również rolę greliny jako istotnego komponentu kompleksu centralnej regulacji bilansu energetycznego. Zapewne z upływem czasu i poszerzaną wiedzą na temat innych elementów składających się na efektywną regulację metabolizmu do leptyny i greliny mogą dołączyć inne białka czy też hormony. Dlatego warto jest prowadzić badania, które pozwolą nam ustalić jak przekłada się to na cechy użytkowości zwierząt. Przedstawione wyżej wyniki są efektem badań prowadzonych tylko na kilku wybranych genach i niezbyt licznych stadach bydła, ale sygnalizują już ewentualność wykorzystania ich w celu zwiększenia produktywności bydła mlecznego. Badania prowadzone na dużych stadach krów oraz na stadach różnych ras bydła mogłyby pomóc zweryfikować otrzymane wyniki analiz.

5.1.2.3. Analiza genów białek serwatkowych oraz genu odpowiadającego za syndrom BLAD

Alfa-laktoalbumina (LALBA) i β -laktoglobulina (LGB) są głównymi białkami serwatkowymi mleka. Zawartość tych białek zależy od okresu laktacji, wieku i stanu zdrowia zwierzęcia. Określony wariant β -laktoglobuliny wpływa na wydajność mleka i jego składników, natomiast α -laktoalbumina wraz z galaktozylotransferazą, tworzą kompleks syntazy laktozowej, katalizujący syntezę laktozy.

W badaniach prowadzonych na trzech stadach bydła (rasa jersey oraz rasa polska holsztyńsko-fryzyjska czarno- i czerwono-biała) szacowano relacje między polimorfizmem w genie *LGB* a cechami użytkowości mlecznej (wydajność mleka, białka i tłuszczu, zawartość białka i tłuszczu). Analiza statystyczna uzyskanych wyników wskazuje na brak istotnych zależności pomiędzy poszczególnymi genotypami *LGB* a testowanymi cechami (**D3**). Badania dotyczące powiązania cech użytkowości mlecznej z polimorfizmem w genie *LALBA* prowadzono w stadzie bydła rasy jersey. W tym przypadku analiza statystyczna pokazuje, że istnieje zależność między genotypami *LALBA* a wydajnością mleka, białka i tłuszczu (**E5**).

Niedobór adhezji leukocytów u bydła (*bovine leukocyte adhesion deficiency*, BLAD) u bydła rasy holsztyńskiej jest wrodzoną autosomalną recesywną chorobą, która charakteryzuje się nawracającymi zakażeniami bakteryjnymi, zahamowaniem wzrostu i opóźnionym gojeniem ran. Molekularną podstawą BLAD jest SNP w pozycji 383 genu kodującego podjednostkę CD18 β_2 -integryny. Przeprowadzono badania przesiewowe na stadzie bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej w celu sprawdzenia czy któraś z krów może być nosicielką BLAD (heterozygota). Testowane stado liczyło 1086 krów i wykazano obecność mutacji odpowiedzialnej za wystąpienie BLAD u 8 zwierząt (**F1**). Testowanie molekularne na obecność powyższego SNP odgrywa istotną rolę zwłaszcza w przypadku hodowców bydła o mlecznym kierunku użytkowania, którzy dążą do poprawy jakości puli genowej rodzimego bydła poprzez wykorzystanie nasienia buhajów hf importowanego z USA.

Ad. 5.1.3. Szacowanie relacji między genami zaangażowanymi w metabolizm kwasów tłuszczowych a cechami użytkowymi i funkcjonalnymi bydła

Skład i jakość mleka zależą od różnych czynników, m.in. uwarunkowań genetycznych, środowiskowych oraz stanu fizjologicznego zwierząt. Jako główny składnik mleka, tłuszcz zawiera około 400 różnych kwasów tłuszczowych, co wpływa na jego wysoce złożoną naturę. Tłuszcz znajdujący się w mleku krów jest jego głównym składnikiem energetycznym oraz charakteryzuje się dobrą przyswajalnością, która wynika z łatwości emulgowania się. Tłuszcz mleka ma postać zdyspergowanych kulek tłuszczu rozproszonych w fazie wodnej, które właśnie tworzą emulsję. Na metabolizm kwasów tłuszczowych składa się wiele białek pełniących różną rolę. Białka wiążące kwasy tłuszczowe (FABP) są rodziną małych, wysoce konserwatywnych cytoplazmatycznych białek wiążących długołańcuchowe kwasy tłuszczowe i inne hydrofobowe ligandy. Ich główną funkcją jest wychwytywanie, transport i metabolizm kwasów tłuszczowych. Jak do tej pory zidentyfikowano dziewięciu członków tej rodziny (FABP1-FABP9). FABP3, podobnie jak inne białka z rodziny FABP, zaangażowany jest w metabolizm kwasów tłuszczowych - odpowiada za transport kwasów tłuszczowych od błony cytoplazmatycznej do mitochondriów, gdzie zachodzi proces β -oksydacji.

FABP4 odgrywa istotną rolę w regulacji homeostazy lipidów i glukozy poprzez współdziałanie z PPARs znajdującymi się w jądrze komórkowym. Ponadto FABP4 bierze udział w hydrolizie lipidów i wewnątrzkomórkowych przemianach kwasów tłuszczowych. Desaturaza stearoilo-CoA (SCD) jest kluczowym enzymem komórkowej biosyntezy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Ponieważ w ten sposób odgrywa istotną rolę w metabolizmie lipidów, to gen kodujący SCD może być istotny dla selekcji w kierunku poprawy jakości tłuszczu mleka. Produkty dwóch genów *ANXA9* i *SCL27A3* zaangażowane są w transport lipidów przez błonę cytoplazmatyczną. Geny te zlokalizowane są w jednym chromosomie (BTA3). Z tego względu obydwie geny mogą być rozpatrywane jako geny kandydujące jako markery pozycyjne i funkcjonalne dla cech jakości tłuszczu mleka. Aneksyna 9 (*ANXA9*) należy do rodziny białek wiążących Ca^{+2} i fosfolipidy, natomiast białko transportujące kwasy tłuszczowe typu 3 (*SLC27A3*) jest białkiem, które ułatwia transport długołańcuchowych kwasów tłuszczowych przez błonę cytoplazmatyczną.

W porównaniu z innymi składnikami mleka, kwasy tłuszczowe są najbardziej podatne na możliwość zmiany. Wykazano, że wiedza na temat genetycznego podłoża możliwych zmian w odniesieniu do tłuszczu mleka może być użyteczna podczas planowanej zmiany składu mleka. W związku z tym rozpoczęto badania, których celem była ocena relacji między polimorfizmem w wyżej wymienionych genach a cechami użytkowości mlecznej oraz oszacowanie wartości hodowlanych dla tych cech. Badania prowadzono na dwóch stadach bydła - rasy jersey i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Początkowo prowadzono badania, w których skupiono się na cechach użytkowości takich jak dzienna wydajność mleka, zawartość tłuszczu i białka oraz liczba komórek somatycznych w odniesieniu do polimorfizmu w genach *SCD* (dwa SNP 10153 G/A i 10329 C/T), *ANXA9*, *SLC27A3*, *FABP3* i *FABP4*. Materiałem badawczym były krowy rasy jersey. Analiza otrzymanych wyników wskazuje, że polimorfizm w genie *ANXA9* oraz *SCD1* (określany jako 10329 C/T) powiązany był z liczbą komórek somatycznych. Różnice pomiędzy poszczególnymi genotypami zostały statystycznie potwierdzone ($P \leq 0,01$). Zwierzęta o genotypie TT (*SCD* 10329 C/T) oraz o genotypie GG (*ANXA9*) charakteryzowały się najwyższą liczbą komórek somatycznych (**A11**, **A12**). W przypadku polimorfizmu w genie *FABP3* stwierdzono statystycznie istotne różnice ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,05$) pomiędzy zwierzętami o poszczególnych genotypach w odniesieniu do zawartości tłuszczu i białka w mleku. Krowy o genotypie AA charakteryzowały się najwyższymi średnimi wartościami tych cech. Dla genu *SLC27A3* wykazano monomorfizm. Natomiast dla pozostałych polimorfizmów zlokalizowanych w genach *SCD1* i *FABP4* nie wykazano zależności pomiędzy zlokalizowanymi w nich polimorfizmami a testowanymi cechami użytkowości (**A11**, **A12**).

Omówione wyżej wyniki badań wskazują ewentualność wykorzystania polimorfizmu w genach *FABP3* i *ANXA9* w celu doskonalenia cech takich jak zawartość tłuszczu, białka i komórek

somatycznych. Uzyskane wyniki należałoby zweryfikować w trakcie realizacji kolejnych badań z wykorzystaniem liczniejszych stad różnych ras bydła.

Kolejne badania koncentrowały się na analizie tych polimorfizmu w wyżej wymienionych genach i oszacowaniu wartości hodowlanej dla cech użytkowości mlecznej (wydajność mleka, białka i tłuszczu, zawartość białka i tłuszczu oraz indeks) stada bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Analiza statystyczna wskazała, że polimorfizm w genie *SCD* (10329 C/T), *FABP4* oraz *SLC27A3* (14791 C/T) wpływał istotnie ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$) na wartość hodowlaną dla zawartości białka (**A20, A21, A22, E8**). Polimorfizm zlokalizowany w genie *ANXA9* wpływał istotnie ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,05$) na wartość hodowlaną dla zawartości tłuszczu. Natomiast polimorfizm w genie *FABP3* i *FABP4* wpływał istotnie ($P \leq 0,05$) na wartość hodowlaną dla wydajności tłuszczu i białka (odpowiednio) (**A21**).

Otrzymane wyniki wskazują, że uwzględnienie w selekcji osobników z genotypem *SCD* TT, *FABP4* GG oraz *SLC27A3* CC mogłoby przyczynić się do zwiększenia zawartości białka w mleku, natomiast włączenie do selekcji zwierząt z genotypem *ANXA9* GG mogłoby wpłynąć na zmniejszenie zawartości tłuszczu w mleku, a biorąc pod uwagę osobniki z genotypem *FABP3* GG i *FABP4* GG istnieje możliwość zwiększenia wydajności białka i tłuszczu w mleku (odpowiednio) krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej.

Ad.5. 1.4. Określenie genów powiązanych z zawartością komórek somatycznych w mleku bydła.

Komórki somatyczne są jednym ze składników mleka tak jak białko, tłuszcz, czy laktoza. Powstają na skutek naturalnej regeneracji tkanki gruczołowej wymienia. Komórki somatyczne to także białe ciała krwi, a ich liczba u zdrowej krowy nie powinna przekraczać 200 000 cell/ml. Ze względu na fakt, że komórki somatyczne w mleku obrazują stan zdrowotny krów ich poziom jest istotnym wskaźnikiem dla hodowców bydła. To właśnie zbyt wysoki poziom komórek somatycznych w mleku jest jednym z pierwszych sygnałów alarmowych, że organizm krowy jest zaatakowany przez niepożądane bakterie. Znaczna część doniesień z dziedziny genetyki skupia się na liczbie komórek somatycznych (LKS) jako na odzwierciedleniu wskaźnika zdrowia. Pomimo iż, odziedziczalność LKS jest mała lub średnia ($h^2 =$ od 0,07 do 0,14) uważa się, że możliwe jest doskonalenie tej cechy.

U bydła antygeny zgodności tkankowej określa się jako *bovine lymphocyte antigen* (BoLA). Geny zaangażowane w BoLA, głównie gen *BoLA-DRB*, związane są występowaniem takich chorób jak *mastitis* oraz białaczka i są powszechnie stosowane jako markery dla chorób lub cech układu immunologicznego. Wykazano, że istnieją co najmniej trzy *loci* genów *BoLA-DRB*, ale tylko *BoLA-DRB3* jest genem funkcjonalnym. Poza powszechnie znanym szerokim zakresem działania leptyny na utrzymanie bilansu energetycznego organizmu, leptyna zaangażowana jest w działanie układu immunologicznego. Wykazano, że leptyna odgrywa znaczącą w odpowiedzi immunologicznej,

pośredniczy w aktywności limfocytów T, a także przyczynia się do wydzielania prozapalnych cytokin. Stwierdzono również podwyższone stężenie leptyny we krwi w czasie infekcji i procesów zapalnych. Analizowano powiązanie polimorfizmu w genie *BoLA-DRB3* głównie w odniesieniu do liczby komórek somatycznych (transformowanych na skalę logarytmiczną) oraz dzienną wydajność mleka, zawartość białka i tłuszczu w mleku. W przypadku cech użytkowości mlecznej nie wykazano zależności między polimorfizmem w genie *BoLA-DRB3* a tymi cechami. Natomiast dla liczby komórek somatycznych wykazano, że zwierzęta o genotypie AE charakteryzowały się najwyższą LKS, a krowy o genotypie BB najniższą LKS, różnice te zostały statystycznie potwierdzone (**A8, D5**).

Analizie poddano również polimorfizm w genie kodującym leptynę. W osobnych badaniach testowano dwa polimorfizmy zlokalizowane w eksonie 2 (R4C) i 3 (*LEP/HphI*). Szacowano ewentualne zależności między wybranymi polimorfizmami a LKS i cechami użytkowości mlecznej takimi jak dzienna wydajność mleka, zawartość białka i tłuszczu. Początkowo skupiono się na analizie polimorfizmu w 3 eksonie (nazwany *LEP/HphI*) w dwóch stadach bydła - rasy jersey i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Otrzymane wyniki wskazują, że krowy rasy jersey o genotypie AB charakteryzowały się najwyższą, a zwierzęta o genotypie BB najniższą liczbą komórek somatycznych (różnica potwierdzona statystycznie $P \leq 0,01$) (**E3**), natomiast krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej o genotypie AA (ten sam polimorfizm) cechowały się najwyższą dzienną wydajnością mleka ($P \leq 0,01$) (**F6**). Analiza drugiego z badanych polimorfizmów prowadzona na stadzie bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej pokazuje, że polimorfizm ten istotnie ($P \leq 0,05$) wpływa na dobową wydajność mleka - zwierzęta o genotypie AA charakteryzowały się najwyższą średnią wartością tej cechy (**A4**). Szacowano również wpływ czynników pozagenetycznych na zawartość komórek somatycznych oraz współczynnik odziedziczalności i powtarzalności LKS w stadzie bydła rasy polskie holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czerwono-białej. Wykazano, że w badanej populacji wszystkie rozpatrywane czynniki miały statystycznie istotny wpływ na LKS ($P \leq 0,001$). Współczynnik odziedziczalności dla trzech pierwszych laktacji wynosił 0,099, a oszacowany współczynnik powtarzalności wynosił 0,271 (**F10**).

Uzyskane wyniki wskazują, że istnieje zależność między polimorfizmem w genie leptyny a analizowanymi cechami użytkowości. Pomimo iż w przypadku genu *DRB3* nie stwierdzono zależności między poszczególnymi genotypami a rozpatrywanymi cechami, warto kontynuować badania w tym kierunku, które pozwolą na zweryfikowanie otrzymanych wyników.

Ad. 5.1.5. Polimorfizm wybranych genów i ich związek z cechami użytkowości rozplodowej knurów i loch.

Opłacalność hodowli trzody chlewnej warunkowana jest pewnymi czynnikami takimi jak tempo wzrostu zwierząt, ich zdrowotność, mięsność, jakość tuszy oraz efektywność reprodukcji. W

coraz szerszym zakresie poznawane są genetyczne uwarunkowania cech produkcyjnych. W odniesieniu do trzody chlewnej ważne są głównie cechy związane z rozrodem, które przekładają się na osiąganą produkcję i jej opłacalność. Gen *RYS1* uważany jest za gen główny mięsności świń, a równocześnie decyduje on w znacznym stopniu o występowaniu mięsa o obniżonej wartości technologicznej (mięso obciążone wadą PSE -mięso blade, miękkie i wodniste) oraz o obniżonym potencjale rozrodczym. Innym istotnym genem, jest gen kandydujący do roli genu głównego lub z nim związany, odpowiedzialnego za liczbę żywo urodzonych prosiąt jest gen *ESR*. Produkt receptora estrogenu należy do rodziny czynników transkrypcyjnych, regulujących poziom transkrypcji w komórkach docelowych.

W prowadzonych badaniach analizowano zależności między wariantami polimorficznymi genów *ESR* (**A1, F2, E4**) i *RYS1* (**E1, E2**) w odniesieniu do cech jakości nasienia knurów różnych ras. Wykazano, że analizowany polimorfizm istotnie ($P \leq 0,01$) wpływa na większość testowanych cech jakości nasienia. Badano również ewentualne powiązanie pomiędzy poszczególnymi genotypami a genami *PRLR*, *GH*, *ESR* i *IGH1R* (**F5, D6, D7, D8, F9**) a cechami użytkowości rozrodczej loch, również różnych ras. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na stwierdzenie, iż istnieje możliwość wykorzystania polimorfizmów typu SNP w analizowanych genach w doskonaleniu cech reprodukcyjnych świń. Szczególnie interesujące wydają się polimorfizmy w genach *GH* i *PRLR*, dla których wykazano istotną ($P \leq 0,05$) różnicę w liczbie i procencie upadków w miocie (gen *GH*) i istotną przewagę zwierząt o genotypie AA w odniesieniu do wielkości miotu (gen *PRLR*). Oczywiście stwierdzenia te wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach wzbogaconych o większą liczbę zwierząt i przy wykorzystaniu różnych ras świń.

Przedstawione wyżej wyniki badań opublikowane w postaci różnych publikacji naukowych zostały docenione w postaci nagród naukowych zespołowych jak i indywidualnych:

- Nagroda Zespołowa JM Rektora (III^o), za rok 2004;
- Nagroda Zespołowa JM Rektora (I^o), za rok 2006;
- Nagroda Zespołowa JM Rektora (III^o), za rok 2008;
- Nagroda Indywidualna JM Rektora (III^o), za rok 2009;
- Nagroda Indywidualna JM Rektora (III^o), za rok 2010;
- Zachodniopomorski Nobel w dziedzinie nauk rolniczych za badania nad znaczeniem wybranych genów w kształtowaniu cech użytkowości mlecznej krów, za rok 2010.

6. UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH

6.1. Projekty w ramach KBN/MNiSW:

2004-2005 Grant promotorski MNiSW, 2 P06D 035 26 „Polimorfizm w genie aromatazy cytochromu P450 oraz możliwości wykorzystania poszczególnych jego wariantów w doskonaleniu cech użytkowości mlecznej bydła” (Główny wykonawca).

6.2. Projekty w ramach badań własnych AR w Szczecinie/ZUT w Szczecinie:

2001-2003 Grant doktorski AR w Szczecinie, BW/DB/04/2001 „Możliwości wykorzystania polimorfizmu genów *CYP19* i *LGB* w doskonaleniu cech użytkowości mlecznej bydła” (Kierownik projektu);

2005-2008 Grant w ramach badań własnych AR w Szczecinie, BW/IB/06/2005 „Polimorfizm genów osi somatotropowej u bydła czerwono-białego” (Wykonawca);

2008-2012 Grant habilitacyjny ZUT w Szczecinie - BW/HB/02/08 „Analiza polimorfizmu wybranych genów zlokalizowanych w chromosomie szóstym w powiązaniu z cechami użytkowości mlecznej bydła” (Kierownik projektu).

6.3. Projekty w ramach badań statutowych/utrzymania potencjału badawczego:

2002-2008 Projekt statutowy, 501-01-022—1187-03/02 „Identyfikacja mutacji odpowiedzialnych za występowanie syndromu BLAD i DUMPS w stadach bydła”;

2011-2012 Projekt statutowy, 517-01-022-3318/17 „Analiza polimorfizmu wybranych genów zlokalizowanych w chromosomie szóstym w powiązaniu z cechami użytkowości mlecznej bydła”;

2011-2013 Projekt statutowy, 518-01-022-3115-01/18 „Analiza zależności między polimorfizmem DNA wybranych genów a cechami użytkowymi zwierząt”;

7. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie **60** pozycji, z czego **27** to oryginalne prace twórcze, z których 5 stanowi jednotematyczny cykl publikacji, **4** artykuły przeglądowe, **28** doniesień konferencyjnych i **1** monografia.

Wartość punktowa wszystkich publikacji (wg list czasopism punktowanych MNiSW zgodnie z rokiem ukazania się pracy) wynosi **391** punktów, w tym po uzyskaniu stopnia doktora **380** punktów, natomiast zgodnie z najnowszą dostępną listą czasopism punktowanych MNiSW (z dnia 17.12.2013) wynosi odpowiednio **487** punktów i po uzyskaniu stopnia doktora **467** punktów. Sumaryczny **Impact Factor (IF)** publikacji naukowych według listy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi **10,591**, **liczba cytowań** (według bazy Web of Science) wynosi **16** (bez autocytowań 14), a **indeks Hirscha** według bazy Web of Science **2**.

Zestawienie publikacji naukowych z podziałem na: oryginalne prace twórcze, artykuły przeglądowe, monografie, prace i komunikaty konferencyjne

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	IF ^{a)}	Suma punktów MNiSW ^{b)}	Suma punktów MNiSW ^{c)}
Oryginalne prace twórcze				
- opublikowane w czasopismach z bazy JCR	19	10,306	309	360
- opublikowane w czasopismach spoza bazy JCR	8		45	67
Ogółem oryginalne prace twórcze	27	10,306	354	427
Artykuły przeglądowe	4	0,285	37	60
Monografie	1			
Prace i doniesienia konferencyjne	28			
Ogółem publikacje naukowe	60	10,591	391	487

^{a)} współczynnik Impact Factor (IF) wg. bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy; dla publikacji z roku 2013 podano IF za rok 2012;

^{b)} liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy;

^{c)} suma punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW (z dnia 17.12.2013).

Zestawienie liczbowe czasopism, w których opublikowano prace naukowe

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba publikacji	IF ^{a)}	Suma punktów wg MNiSW ^{b)}	Suma punktów wg MNiSW ^{c)}
1.	Acta Scientiarum Polonorum ser. Zootechnica	4	-	23	24
2.	Animal Science Papers and Reports	1	0,918	25	25
3.	Archiv für Tierzucht	1	0,519	15	20
4.	Czech Journal of Animal Science	1	1,190	20	25
5.	Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis*	1	-	4	5
6.	Journal of Animal and Veterinary Advances	2	0,292	20	30
7.	Journal of Central European Agriculture	1	-	8	8
8.	Medycyna Weterynaryjna	5	0,285	47	75
9.	Russian Journal of Genetics	5	2,213	68	75
10.	Tierärztliche Umschau	3	0,448	33	45

11.	Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences	2	0,618	23	40
12.	Prace i komunikaty konferencyjne	28	-	-	-
Razem		54	6,483	286	372
Czasopisma, w których opublikowano prace składające się na cykl jednotematyczny prac					
1.	Archiv fur Tierzucht	1	0,595	15	20
2.	Czech Journal of Animal Science	1	1,190	20	25
3.	Research in Veterinary Science	1	1,774	35	35
4.	Tierärztliche Umschau	1	0,273	15	15
5.	Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences	1	0,276	20	20
Razem		5	4,108	105	115
Ogółem		59	10,591	391	487

* obecnie *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura Alimentaria Piscaria et Zootechnica*, podano punktację MNiSW za rok 2008 ze względu na brak wcześniejszych danych;

^{a)} współczynnik Impact Factor (IF) wg. bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy, dla publikacji z roku 2013 podano IF za rok 2012;

^{b)} liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy;

^{c)} suma punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW (z dnia 17.12.2013).

Zestawienie publikacji naukowych z podziałem na oryginalne prace twórcze, artykuły przeglądowe, artykuły popularno-naukowe, prace i komunikaty konferencyjne opublikowane przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Rodzaj publikacji	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
Oryginalne prace twórcze			
- opublikowane w czasopismach z bazy JCR	-	19	19
- opublikowane w czasopismach spoza bazy JCR	1	7	8
Ogółem oryginalne prace twórcze	1	26	27
Artykuły przeglądowe	1	3	4
Monografie	-	1	1
Prace i doniesienia konferencyjne	16	12	28
Ogółem publikacje naukowe	18	42	60

Inga Kowalewska-Łuczak