

## **AUTOREFERAT**

## **OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

---

Dr inż. Daniel Polasik

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Szczecin, 2019

### 1. Dane personalne:

Imię i nazwisko Daniel Polasik  
Miejsce zatrudnienia Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie  
al. Piastów 45  
70-311 Szczecin

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

10.06.2002r. magister inżynier w zakresie biotechnologia w produkcji roślinnej  
Akademia Rolnicza w Szczecinie  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt  
praca magisterska pt. „Zagęszczanie mapy genetycznej żyta (*Secale cereale*) z użyciem markerów RAPD”  
promotor: prof. dr hab. Piotr Masojć

11.10.2007r. doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biologia  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii  
praca doktorska pt. „Polimorfizm 10 eksonu genu receptora hormonu wzrostu (*GHR*) szynszyli (*Chinchilla lanigera*)”  
promotor: prof. dr hab. Marek Kmieć

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.02.2008r. – 30.09.2008r. asystent  
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt  
Akademia Rolnicza w Szczecinie

01.10.2008r. – 30.09.2011r. adiunkt  
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt  
Akademia Rolnicza w Szczecinie

od 01.10.2011r. 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 rozprawa pod tytułem "**Analiza zależności pomiędzy polimorfizmem wybranych genów a cechami tucznymi, rzeźnymi i jakością mięsa świń**" tworząca jednolity cykl następujących publikacji:

**G1. Polasik D.**, Tyra M., Szyndler - Nędza M., Żak G., Lambert B., Terman A. (2018) Association of *miR-208b* polymorphism with meat quality traits and texture parameters in pigs. *Czech Journal of Animal Science* 63(11): 435-442.

IF<sub>2017</sub> – 0,955; 30 pkt. MNiSW

*Indywidualny wkład: pomysłodawca hipotezy badawczej, wiodący udział w planowaniu eksperymentu, wiodący udział w analizach laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu do druku (70%)*

**G2. Polasik D.**, Tyra M., Żak G., Terman A. (2018) An analysis of *MYH7* SNP (g.17104G>A) in relation to growth and carcass traits in pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences* 27(4): 335-340.

IF<sub>2017</sub> – 0,900; 20 pkt. MNiSW

*Indywidualny wkład: pomysłodawca hipotezy badawczej, wiodący udział w planowaniu eksperymentu, wiodący udział w analizach laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu do druku (80%)*

**G3. Polasik D.**, Tyra M., Szyndler - Nędza M., Korpala A., Woźniak-Męch K., Terman A. (2018) Relationship between *VRTN* gene polymorphism and growth, slaughter and meat quality traits in three polish pig breeds. *Ciência e Agrotecnologia* 42(5): 540-549.

IF<sub>2017</sub> – 0.672; 30 pkt. MNiSW

*Indywidualny wkład: pomysłodawca hipotezy badawczej, wiodący udział w planowaniu eksperymentu, wiodący udział w analizach laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu do druku (70%)*

**G4. Polasik D.**, Kamionka E.M., Tyra M., Żak G., Terman A. (2019) Analysis of *FTO* and *PLIN2* polymorphisms in relation to carcass and meat quality traits in pigs. *Annals of Animal Science* 19(1): 71-83.

IF<sub>2017</sub> – 1,018; 20 pkt. MNiSW

*Indywidualny wkład: pomysłodawca hipotezy badawczej, wiodący udział w planowaniu eksperymentu, wiodący udział w analizach laboratoryjnych, wiodący udział w analizie uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu do druku (70%)*

Ogólna liczba punktów za jednolity cykl publikacji wg wykazu czasopism naukowych MNiSW za lata 2013-2016 (z dnia 26.01.2017) wynosi **100 punktów**.

Sumaryczny Impact Factor (IF) za jednolity cykl publikacji wg bazy Journal Citation Reports (JCR) za rok 2007 wynosi **3,545**.

*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**

### **4.2.1. Wprowadzenie**

Wieprzowina od wielu lat jest najczęściej spożywanym mięsem w Polsce, co związane jest z tradycją, przyzwyczajeniem konsumentów, a także jej ceną. Wraz ze wzrostem świadomości w zakresie zdrowego odżywiania wzrosło zainteresowanie mięsem, cechującym się wysoką jakością, uzyskaną dzięki prowadzonym przez szereg lat pracom hodowlanym. Cechy wpływające na jakość mięsa należą do cech ilościowych, a więc uwarunkowane są przez genotyp oraz czynniki środowiskowe. O ile warunki środowiska na fermie można dostosować do istniejących potrzeb, o tyle w przypadku genotypu prace są znacznie bardziej skomplikowane. Geny, które powiązane są z daną cechą można wytypować na 3 różne sposoby. Pierwszy z nich to mapowanie QTL (*loci* cech ilościowych), a więc poszukiwanie regionów w genomie, które są sprzężone z analizowaną cechą (identyfikacja pozycyjna). Pozostałe 2 polegają na identyfikacji funkcjonalnej, czyli powiązaniu funkcji białka kodowanego przez dany gen z analizowaną cechą lub założeniu, że gen o znanej funkcji będzie odgrywał analogiczną rolę u gatunków blisko spokrewnionych. Oprócz wytypowania genów, ważne jest też określenie ich wariantów polimorficznych, które mogą się przyczyniać w różnicowany sposób do wartości danej cechy. Dzięki wiedzy o tym, czy dany genotyp jest korzystny bądź nie, możliwa jest selekcja zwierząt w celu poprawy wartości cech, które są istotne ze względów ekonomicznych, jak również oczekiwań konsumentów.

W niniejszych badaniach wytypowano 4 różne geny i analizowano ich warianty w odniesieniu do cech tucznych oraz jakości tuszy i mięsa u świń utrzymywanych w Polsce.

MikroRNA (miRNA) są małymi, niekodującymi cząsteczkami RNA, które hamują ekspresję genów, głównie na poziomie potranskrypcyjnym. MikroRNA, które są specyficzne dla tkanki mięśniowej lub występują w niej w znacznej większej ilości niż w innych tkankach określane są jako myomiRs (*Siracusa i wsp., 2018*). Są one zaangażowane w proliferację i różnicowanie mioblastów, regenerację mięśni oraz determinują proporcję włókien mięśniowych (*Diniz i Wang, 2016*). Większość genów kodujących myomiRs zlokalizowana jest wewnątrz innych genów. Przykładem mogą być *miR-208a*, *miR-208b* i *miR-499*, które mieszczą się w intronach genów odpowiednio *MYH6*, *MYH7* i *MYH7b* (*van Rooij i wsp., 2009*). Gen *MYH7* (łańcuch ciężki  $\beta$ -miozyny) u świni zbudowany jest z 40 eksonów przedzielonych 39 intronami i zajmuje obszar 22 kpb na chromosomie 7 (*Ssc7*). W porównaniu do genu *MYH7* człowieka jest on nieco dłuższy ze względu na obecność dodatkowego eksonu nie ulegającego translacji w pozycji 5'. Wykazano, że insercja 6 nukleotydów w eskonie 30 genu *MYH7* (c.4320\_4321insCCCGCC), wprowadzająca

dodatkowe 2 aminokwasy powiązana jest z dziedziczną drżączką świń (syndrom Campus) (*Murgiano wsp.*, 2012). Inny polimorfizm (rs328743478), mieszczący się w 30 intronie genu *MYH7*, położony w odległości 105pz od *pre-miR-208b*, może być rozpatrywany w dwojaki sposób:

- jako polimorfizm genu *miR-208b* (mikroRNA 208b), jak zaproponowali *Kim i wsp.* (2015) (**G1**);
- jako polimorfizm genu "gospodarza" *MYH7*, w którym zlokalizowany jest inny gen - *miR-208b* (**G2**).

W dalszych rozważaniach ujednotcono nazwę i określana będzie ona jako polimorfizm genu *miR-208b*.

*Kim i wsp.* (2015), którzy wykryli polimorfizm *miR-208b* wykazali, że jest on powiązany z proporcją włókien mięśniowych typu I i IIb oraz z ubytkiem wody u świń. Cechy włókien mięśniowych powiązane są z jakością mięsa, dlatego w publikacji **G1** podjęto próbę oszacowania zależności pomiędzy poszczególnymi wariantami *miR-208b*, a cechami jakości mięsa z uwzględnieniem parametrów tekstury.

Ci sami autorzy udowodnili również, że poszczególne genotypy *miR-208b* były powiązane z poziomem ekspresji dojrzałego miR-208b. Z kolei wyższy poziom miR-208b był negatywnie skorelowany z ekspresją genu docelowego dla tego typu mikroRNA - *SOX-6*, natomiast pozytywnie skorelowany z ekspresją genu "gospodarza" - *MYH7*. *Komatsu i wsp.* (2016) w swych badaniach wykazali natomiast, że ilość transkryptów genu *MYH7* u świń rasy landrace, charakteryzujących się skrajnie niskim tempem wzrostu była prawie 20-krotnie wyższa w stosunku do świń o skrajnie wysokim tempie wzrostu. Z uwagi, że polimorfizm *miR-208b* jest skorelowany z ekspresją genu *MYH7*, a ta z kolei z tempem wzrostu, w pracy **G2** analizowano poszczególne genotypy w odniesieniu do cech wzrostu, jak i cech tuszy u ras świń utrzymywanych w Polsce.

Drugi z analizowanych genów rozpatrywany jest w aspekcie liczby kręgów. Ich liczba u poszczególnych ssaków jest dość konserwatywna, jednak w przypadku świń odnotowano zmienność dotyczącą liczby kręgów piersiowych i lędźwiowych. Wykazano, że dziki oraz rasy lokalne charakteryzują się mniejszą liczbą kręgów piersiowo-lędźwiowych, która najczęściej wynosi 19, natomiast rasy wysokoprodukcyjne tj. duroc, wielka biała i landrace cechują się ich większą liczbą, która waha się pomiędzy 20 a 23 (*Huang i wsp.*, 2017). Liczba kręgów u świń jest cechą istotną z ekonomicznego punktu widzenia, gdyż powiązana jest z wielkością ciała, a także z długością tuszy (*Fan i wsp.*, 2013). Odkrycie genów powiązanych z liczbą kręgów piersiowo-lędźwiowych pozwoliłoby na selekcję w kierunku zwiększenia wartości cech, które są z nią skorelowane. W wyniku skanu genomu w poszukiwaniu QTL, wytypowano 2 *loci* powiązane z liczbą kręgów u świni, mieszczące się na chromosomach *Ssc1* i *Ssc7*. Następnie w obszarze *Ssc1* zlokalizowano gen kandydujący - *NR6A1* (*nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1*), którego wariant nazwany "dziki" występował tylko u dzików i lokalnych ras chińskich, natomiast drugi tylko u wysokoprodukcyjnych ras europejskich (*Mikawa i wsp.*, 2007). Ze względu, że u ras cechujących się zróżnicowaniem liczby kręgów występował ten sam allel, uznano, iż gen *NR6A1* nie jest dobrym markerem tej cechy. Dalsze analizy, obejmujące *Ssc7* wskazały jednoznacznie, że gen *VRTN* (*vertnin*) jest powiązany ze zmiennością liczby kręgów u wysokoprodukcyjnych ras świń, zarówno chińskich jak i europejskich. Wykazano, że allel Q (insercja o długości 291pz) jest skorelowany z większą liczbą kręgów, natomiast allel *Wt* (bez insercji) z mniejszą (*Mikawa i wsp.*, 2005, 2007, 2011; *Fan i wsp.*, 2013). Gen *VRTN* u świni zbudowany jest z 2 eksonów, a insercja g.20311\_20312ins291 zlokalizowana jest w intronie,

który je oddziela (Ensembl, Sscrofa11.1). Jak dotąd rola genu *VRTN* nie była znana, jednak najnowsze badania udowodniły, że jest on niezbędny do rozwoju kręgów piersiowych u ssaków (*Duan i wsp., 2018*). W publikacji **G3** przedstawiono analizę zależności pomiędzy wariantami genu *VRTN*, a cechami wzrostu, jakości tuszy i mięsa u 3 ras świń - puławskiej, objętej programem ochrony zasobów genetycznych oraz wysokoprodukcyjnych (pbz i wbp).

Gen *FTO* (*fat mass and obesity associated gene*) koduje alfa-ketoglutaranozależną dioksygenazę, która odpowiedzialna jest za demetylację kwasów nukleinowych. Preferencyjnie wiąże się ona z pre-mRNA w regionach intronowych, w pobliżu eksonów ulegających alternatywnemu splicingowi oraz w miejscach poliadenylacji (*Bartosovic i wsp., 2017*). Badania przeprowadzone na licznych populacjach ludzi wykazały, że warianty genu *FTO* powiązane są ze wskaźnikiem BMI oraz ryzykiem otyłości (*Fawcett i Barroso, 2010*). Od momentu gdy zidentyfikowano pierwsze locus powiązane z otyłością, wzrosło również zainteresowanie genem *FTO* u świń. Jest on zlokalizowany na chromosomie 6 (*Ssc6*), zajmuje obszar ponad 436 kpb i składa się z 9 eksonów oraz 8 sekwencji intronowych (*Huang i wsp., 2012*). W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano jego największą ekspresję w podskórnej tkance tłuszczowej i płucach. Ponadto znacznie wyższą ekspresję genu *FTO* wykryto u świń cechujących się dużym otluszczeniem w stosunku do świń o małym otluszczeniu, co sugeruje, że może on pełnić rolę w odkładaniu tłuszczu (*Fu i wsp., 2013; Chen i wsp., 2016*). Wykryto wiele wariantów tego genu, z których najbardziej obiecujący wydaje się g.400C>G, ponieważ wykazano jego związek z grubością słoniny, marmurkowatością mięsa oraz całkowitą zawartością tłuszczu u mieszańców berkshire × yorkshire (*Fan i wsp., 2009*). Kolejne badania potwierdziły korelację tego polimorfizmu z cechami otluszczenia, a także niektórymi cechami wzrostu i tuszy u mieszańców ras komercyjnych i Meishan × Pietrain (*Dvořáková i wsp., 2012*). Pomimo, że polimorfizm g.400C>G, zlokalizowany w eksonie 3 genu *FTO* nie zmienia sekwencji aminokwasowej białka (Ala198Ala), może jednak wpływać na transkrypcję, splicing, transport mRNA oraz translację, oddziałując na fenotyp (*Goymer, 2007*). W pracy **G4** poddano analizie polimorfizm genu *FTO* u 3 ras świń oraz w grupie łączonej obejmującej 6 ras (pbz, wbp, puławska, pietrain, duroc, hampshire) w odniesieniu do cech jakości tuszy oraz mięsa.

Perylipina 2 (*PLIN2*) jest głównym białkiem powiązanim z kroplami lipidowymi, które reguluje wewnątrzkomórkową homeostazę lipidową oraz formowanie kropeł lipidowych (*Nguyen i wsp., 2019*). Gen *PLIN2* u świń zlokalizowany jest na chromosomie 1 (*Ssc1*) i składa się z 9 eksonów (Ensembl, Sscrofa11.1). Wykazano, że poziom transkryptów genu *PLIN2* jest pozytywnie skorelowany z grubością słoniny, natomiast negatywnie ze średnicą polędwicy oraz średnimi przyrostami dziennymi. Ponadto zaobserwowano wyższą ekspresję *PLIN2* w mięśniach (*m. levator scapulae* i *m. longissimus*) u świń cechujących się dużym otluszczeniem (mangalica, mangalica × duroc, wujin) w porównaniu do świń o niskim otluszczeniu (wielka biała węgierska, pietrain × duroc, landrace). Zasugerowano więc, że gen ten może się przyczyniać do akumulacji tłuszczu śródmięśniowego (IMF) (*Tempfli i wsp., 2016; Yang i wsp. (2017)*). Hipotezę tą potwierdzają wyniki wcześniejszych badań *Gandolfi i wsp. (2011)*, którzy wykazali wyższą ekspresję *PLIN2* w mięśniach (*m. semimembranosus*) charakteryzujących się wysokim poziomem IMF. W genie *PLIN2* u świń wykryto 6 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) i wykazano, że polimorfizm zlokalizowany w regionie 3' niepodlegającym translacji (3'-UTR) - g.98G>A u rasy duroc utrzymywanej we Włoszech był skorelowany ze średnim przyrostem dziennym, zużyciem paszy na kg przyrostu, wyrębami o niskiej zawartości tłuszczu oraz masą szynki (*Davoli i wsp., 2011*). W późniejszych badaniach, przeprowadzonych u tej samej rasy wykazano, że jest on również

powiązany z ogólnym wzrostem na wczesnym etapie życia, wzrostem umięśnienia oraz zawartością mięsa w tuszy (Gol i wsp., 2016). W publikacji **G4** przedstawiono analizę zależności pomiędzy wariantami genu *PLIN2* a cechami jakości tuszy i mięsa u 3 ras świń.

#### 4.2.2. Cel badawczy

Celem badawczym czterech publikacji, które stanowią podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego była analiza polimorfizmów w wybranych genach, które są istotnie powiązane z cechami tuszy i jakości mięsa u świń.

Szczegółowe cele badawcze obejmowały:

- a) zaprojektowanie testów opartych na metodzie PCR, użytych do detekcji polimorfizmów (publikacje **G1**, **G2**, **G4**)
- b) detekcję polimorfizmów w genach:
  - *miR-208b* - publikacje **G1**, **G2**
  - *VRTN* - publikacja **G3**
  - *FTO* - publikacja **G4**
  - *PLIN2* - publikacja **G4**
- c) oszacowanie parametrów populacyjnych u badanych ras świń
- d) analizę zależności pomiędzy poszczególnymi wariantami analizowanych genów a:
  - cechami wzrostu (publikacje **G2**, **G3**)
  - cechami tuszy (publikacje **G2**, **G3**, **G4**)
  - cechami jakości mięsa (publikacje **G1**, **G3**, **G4**)
  - teksturą mięsa (publikacje **G1**, **G3**).

#### 4.2.3. Materiał i metody badawcze

##### **Materiał badawczy**

Badania przeprowadzono na 578 loszkach należących do 6 ras: polska biała zwisłoucha (n = 269), wielka biała polska (n = 189), puławska (n = 68), pietrain (n = 31), duroc (n = 14) i hampshire (n = 7). Zwierzęta utrzymywano w 3 Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy) mieszczących się w Pawłowicach, Chorzelowie i Melnie. Warunki utrzymania i żywienia były ujednolicone dla wszystkich zwierząt. Świnie zostały wprowadzone na stacje w wieku nie przekraczającym 12 tygodni przy masie ciała 20-26 kg. Tucz kontrolny rozpoczęto w momencie gdy zwierzęta uzyskały masę ciała 30 kg. Podczas tuczu kontrolnego świnie żywiono *ad libitum* do osiągnięcia masy ciała 100 kg ( $\pm 2,5$ ) zgodnie z metodyką obowiązującą w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej.

##### **Analizowane cechy**

W okresie od rozpoczęcia testu do chwili uboju w stacjach kontroli określono następujące cechy wzrostu:

- życiowy przyrost dzienny masy ciała [g/dzień];
- przyrost dzienny masy ciała w tuczu kontrolnym [g/dzień];
- zużycie paszy na kg przyrostu [kg];
- dzienne zużycie paszy [kg];

- wiek w dniu uboju [dni];
- liczba dni tuczu w czasie testu [dni].

Po tuczu kontrolnym zwierzęta poddano ubojowi, a w trakcie dysekcji określono następujące cechy tuszy:

- wydajność rzeźna [%];
- masa połowicy bez słoniny i skóry [kg];
- masa szynki bez słoniny i skóry [kg];
- średnia grubość słoniny z 5 pomiarów [cm];
- szerokość "oka" połowicy [cm];
- wysokość "oka" połowicy [cm];
- powierzchnia "oka" połowicy [cm];
- procentowa zawartość mięsa w tuszy [%];
- masa mięsa wyrębów podstawowych [kg].

Po dysekcji, pobrano fragmenty 2 mięśni - *m. longissimus lumborum* (połowica) i *m. semimembranosus* (szynka), które posłużyły do określenia następujących cech jakości mięsa:

- zawartość tłuszczu śródmięśniowego [%];
- barwa - jasność ( $L^*$ );
- barwa - czerwoność ( $a^*$ );
- barwa - żółtość ( $b^*$ );
- wodochłonność.

Ponadto na wiszących tuszach dokonano pomiaru kwasowości czynnej w *m. longissimus lumborum* i *m. semimembranosus* 45 min. po uboju (pH45) i 24 h po uboju (pH24). Zawartość tłuszczu śródmięśniowego w homogenatach *m. longissimus dorsi* oznaczono z użyciem analizatora tłuszczów SOX 406 (Gerhardt, Niemcy), natomiast do określenia parametrów barwy połowicy wykorzystano kolorymetr CR-310 (Minolta, Japonia). Wodochłonność mięsa została wyznaczona z użyciem metody Grau-Hamma (Hamm, 1986). Pomiaru pH dokonano stosując miernik pH pH-Star (Matthäus, Niemcy).

Do pomiaru tekstury obu mięśni wykorzystano 2 metody - test cięcia i test analizy profilu tekstury (TPA).

W przypadku testu cięcia określono:

- jędrność (*firmness*);
- twardość (*toughness*).

Siłę cięcia oznaczono na mięśniach surowych i gotowanych przy użyciu teksturometru TA-XTplus (Stable Micro Systems, UK) z przystawką Warnera-Bratzlera, zaopatrzoną w nóż z trójkątnym wycięciem.

W przypadku analizy profilu tekstury określono:

- twardość (*hardness*);
- sprężystość (*springiness*);
- kohezję (*cohesiveness*);
- żujność (*chewiness*);
- odbojność (*resilience*).

TPA oznaczono z użyciem tego samego instrumentu z przystawką w formie walca o średnicy 50 mm.



## Analiza DNA

DNA do dalszych badań wyizolowano z pobranych tkanek. Polimorfizm genu *VRTN* analizowano z użyciem metody PCR (ang. *polymerase chain reaction*), genów *miR-208b* i *FTO* stosując metodę PCR-RFLP (ang. *PCR-restriction fragments length polymorphism*), natomiast *PLIN2* - ACRS-PCR (ang. *PCR-based amplication created restriction site*). Startery do PCR zaprojektowano z użyciem programów Primer3 i OligoAnalyzer 3.1. W przypadku genu *VRTN* zastosowano sekwencje zaproponowane przez Mikawa i wsp. (2011). Reakcję zoptymalizowano w termocyklerze z gradientem temperatury (TGradient, Biometra). Uzyskane amplikony z wyjątkiem *VRTN* trawiono odpowiednio dobranymi enzymami restrykcyjnymi (InSilico, RestrictionMapper) i rozdzielano w żelach agarozowych. Parametry dotyczące detekcji poszczególnych polimorfizmów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Parametry detekcji polimorfizmu w analizowanych genach

Gen	Temperatura annealingu [°C]	Liczba cykli	Enzym	Stężenie żelu [%]	Allele
<i>miR-208b</i>	55	32	<i>HinfI</i>	2	G - 160 pz A - 130, 30 pz
<i>VRTN</i>	55	29	-	1,5	Q - 125 pz Wt - 411 pz
<i>FTO</i>	54	30	<i>RsaI</i>	2,5	C - 123 pz G - 92, 31 pz
<i>PLIN2</i>	63	32	<i>PvuII</i>	3,0	A - 127 pz G - 99, 28 pz

## Analiza statystyczna

Parametry populacyjne poszczególnych ras świń określono z użyciem programu PowerMarker. Zależność pomiędzy ocenianymi cechami świń a poszczególnymi genotypami oszacowano z użyciem procedury GLM (ang. *general linear model*) programu SAS/STAT. W analizie wykorzystano następujący model:

$$Y_{ijk} = \mu + b_i + g_j + (bg)_{ij} + \beta SW + e_{ijk}$$

gdzie:

$Y_{ijk}$  – obserwacja;

$\mu$  – średnia ogólna;

$b_i$  – efekt i rasy;

$g_j$  – efekt j genotypu;

$(bg)_{ij}$  – interakcja pomiędzy genotypem j a rasą i (gdy istotna);

$\beta SW$  – kowariancja na masę półtuszy prawej (tylko dla cech jakości tuszy);

$e_{ijk}$  – błąd losowy.

Obliczenia wykonano oddzielnie dla ras pbz, wbp i puławska oraz w przypadku genów *miR-208b* i *FTO* dla grupy łączonej, obejmującej 6 ras (pbz, wbp, puławska, pietrain, duroc, hampshire).

#### 4.2.4. Uzyskane wyniki badań

Analizując polimorfizm genu *miR-208b* (**G1**, **G2**) wykazano zróżnicowanie frekwencji alleli i genotypów w obrębie poszczególnych ras. U wszystkich ras najczęściej występował genotyp GG, z wyłączeniem pietrain, u której najczęstszy był genotyp AG. Podobnie, najwyższą frekwencję genotypu GG zaobserwowano w badaniach opublikowanych przez innych autorów u ras berkshire, yorkshire i landrace. U rasy landrace genotyp GG był jednak rzadszy niż u pbz, natomiast frekwencja osobników heterozygotycznych była dwukrotnie wyższa (Kim i wsp., 2015). Allel A występował z najwyższą frekwencją u ras puławska i pietrain, natomiast G u pbz i wbp.

W wyniku przeprowadzonych badań (**G1**) wykazano zależności pomiędzy poszczególnymi wariantami *miR-208b*, a niektórymi cechami mięsa. Udowodniono, że genotyp AA powiązany był z najwyższą zawartością tłuszczu śródmięśniowego w grupie łączonej ( $p \leq 0,05$ ). IMF jest pozytywnie skorelowany z ilością włókien czerwonych (Hwang i wsp., 2010), co jest zgodne z wynikami Kim i wsp. (2015), którzy potwierdzili, że genotyp AA jest powiązany z większą zawartością włókien typu I. Najwyższe wartości jasności ( $L^*$ ) u rasy puławskiej i grupy łączonej zaobserwowano z kolei u osobników o genotypie GG ( $p \leq 0,05$ ). Cząsteczki miR-208b wraz z miR-499 odpowiedzialne są za konwersję włókien szybkokurczliwych w wolnokurczliwe (Quitat i wsp., 2011; Ma i wsp., 2015), co jest zgodne z poprzednimi wynikami, gdyż genotypy AG i GG są skorelowane z niższą zawartością włókien typu I, a genotyp AA z najwyższym poziomem ekspresji *miR-208b*. Ostatnim parametrem jakości mięsa, powiązany z genotypami *miR-208b* była wodochłonność. U trzech analizowanych ras, jak i w grupie łączonej genotyp GG cechował się najwyższymi wartościami tej cechy ( $p \leq 0,05$ ). Wodochłonność mięsa jest wysoce skorelowana z utratą wody (Jennen i wsp., 2007), dlatego zaobserwowano takie same zależności jak Kim i wsp. (2015) względem poszczególnych genotypów.

Analizując teksturę mięsa wykazano zależność pomiędzy polimorfizmem *miR-208b*, a siłą cięcia. W populacji łączonej oraz u świń rasy wbp genotyp AA wiązał się z najwyższymi wartościami jędrności i twardości świeżej jak i gotowanej szynki ( $p \leq 0,05$ ). W przypadku analizy polędwicy stwierdzono odwrotną zależność, gdyż w większości przypadków najwyższe wartości siły cięcia odnotowano dla genotypu GG ( $p \leq 0,05$  lub  $p \leq 0,01$ ). Różnice te mogą wynikać z proporcji poszczególnych typów włókien w obu mięśniach (Gentry i wsp., 2004). Podobną tendencję zaobserwowano również dla jednego z parametrów tekstury - żujności. Najwyższe jej wartości w szynce odnotowano u zwierząt o genotypie AA, natomiast w polędwicy u zwierząt o genotypie GG ( $p \leq 0,05$ ). Odwrotny rozkład cech twardości, sprężystości i żujności w obu mięśniach względem genotypów wykazali również Ropka-Molik i wsp. (2016) analizujące gen *MTP* (mikrosomalne białko transportujące trójglicerydy).

W badaniach opisanych w publikacji **G2** analizowano polimorfizm *mir-208b* w odniesieniu do cech wzrostu oraz cech tuszy świń. Wykazano, że osobniki z genotypem AA charakteryzowały się najwyższymi dziennymi przyrostami masy ciała ( $p \leq 0,05$  lub  $p \leq 0,01$ ). Zależność tą zaobserwowano dla ras puławska i wbp oraz dla całej grupy. W przypadku rasy pbz genotyp AA nie był ujęty w analizach ze względu na zbyt małą frekwencję. Uzyskane wyniki przekładają się bezpośrednio na wartości innych parametrów, tj. wieku w dniu uboju i liczby dni tuczu w czasie testu. Najwyższe ich wartości odnotowano dla genotypu GG ( $p \leq 0,05$  lub  $p \leq 0,01$ ). Poprzednie badania wykazały, że genotyp AA jest powiązany z wysoką ekspresją genu *MYH7*, która z kolei jest charakterystyczna dla świń o niskim tempie wzrostu (Kim i wsp., 2015; Komatsu i wsp., 2016). Rozbieżności tych wyników mogą być rezultatem

zróznicowania wieku świń użytych w eksperymentach. W badaniach Komatsu i wsp. (2016) analizowano świnię w wieku 23 dni, natomiast w niniejszych, świnię w wieku ubojowym tj. ok. 180 dni. Wydaje się więc prawdopodobne, że ekspresja genu *MYH7* jest zróznicowana na różnych etapach rozwojowych, co wymaga przeprowadzenia dodatkowych analiz.

W przypadku cech jakości tuszy jednoznaczne wyniki uzyskano tylko dla 1 cechy, tj. średniej grubości słoniny z 5 pomiarów. U świń rasy puławska, wbp i w grupie łączonej genotyp AA skorelowany był z największą grubością słoniny w stosunku do pozostałych genotypów ( $p \leq 0,05$ ). Żak i wsp. (2009) wykazali, że obniżenie tempa wzrostu u świń rasy wbp i pzb wiązało się ze zmniejszeniem powierzchni tłuszczu nad „okiem” połówicy i grubości słoniny nad „okiem” połówicy oraz ze zwiększeniem stosunku tłuszczowo-mięśniowego. Ponadto u świń rasy pbz większe przyrosty dzienne były skorelowane z większą średnią grubością słoniny z 5 pomiarów. Uzyskane wyniki są zgodne z niniejszymi dla ras wbp, puławskiej i grupy łączonej, u których genotyp AA powiązany był z większymi przyrostami dziennymi, a także z większą średnią grubością słoniny z 5 pomiarów. Inną cechą powiązaną z wariantami *miR-208b* była wydajność rzeźna, jednak uzyskane wyniki nie były jednoznaczne w odniesieniu do poszczególnych ras. U świń rasy wbp największą wartością tej cechy odznaczały się osobniki o genotypie GG ( $p \leq 0,01$ ), natomiast u puławskiej o genotypie AA ( $p \leq 0,05$ ). Puławska jest rasą prymitywną, objętą programem ochrony, którą dzieli znaczny dystans genetyczny od rasy wbp, co może prowadzić do uzyskiwania niejednoznacznych wyników. Jest to także widoczne w przypadku 2 innych cech - powierzchni „oka” połówicy i procentowej zawartości mięsa w tuszy. U rasy puławskiej genotyp GG był istotnie powiązany z największymi wartościami tych cech ( $p \leq 0,05$ ), czego nie zaobserwowano u innych ras i grupy łączonej.

W przypadku polimorfizmu genu *VRTN* (**G3**) wykazano zróznicowanie częstości alleli i genotypów w zależności od badanej rasy. U świń rasy wbp i pbz dominował allel Q, w przeciwieństwie do rasy puławskiej, u której był to allel Wt. Rasa ta charakteryzowała się także największą heterozygotycznością. Podobną frekwencję allelu Q (0,66) jak u rasy pbz wykazał Fontanesi i wsp. (2014) u rasy włoski landrace (0,74), natomiast znacznie mniejszą u wielkiej białej włoskiej (0,36) w stosunku do wbp (0,52). Autorzy stwierdzili także niższą frekwencję allelu Q u pięciu lokalnych ras włoskich (0,05-0,48), podobnie jak u rasy puławska (0,45). Podobną zależność odnotowali Fan i wsp. (2013) u 16 lokalnych ras chińskich (0,00-0,29) w stosunku do wysokoprodukcyjnych ras zachodnich (0,54-0,71). Yang i wsp. (2016) zaproponowali hipotezę, że haplotyp zawierający allel Q pochodzi od chińskich ras i został wprowadzony do ras europejskich. Następnie haplotyp ten rozprzestrzenił się na skutek selekcji, przez co obserwujemy jego wysoką częstość u ras europejskich.

Analizując cechy wzrostu wykazano zależności pomiędzy poszczególnymi wariantami *VRTN* a przyrostem dziennym. U ras wbp i pbz najwyższe jego wartości odnotowano dla genotypu QQ, natomiast w przypadku rasy puławskiej dla genotypu WtWt ( $p \leq 0,05$ ). Podobną tendencję zaobserwowano dla średniego przyrostu dziennego masy ciała i potwierdzono ją statystycznie u ras pbz i puławskiej ( $p \leq 0,05$ ). Rozbieżności te mogą wynikać z różnego tempa wzrostu analizowanych ras. Wykazano bowiem, że rasa pbz cechuje się większymi przyrostami w stosunku do puławskiej, co przekłada się na dłuższy czas tuczu (Babicz i wsp., 2014). Jest to wyraźnie widoczne w przypadku wieku w dniu uboju i liczby dni tuczu w czasie testu. U rasy puławskiej genotyp QQ skorelowany był z wyższymi wartościami tych cech, natomiast u pozostałych dwóch z niższymi. U ras duroc i wielka biała włoska nie wykazano związku z genotypami *VRTN* i przyrostami dziennymi (Hirose i wsp., 2013; Fontanesi i wsp., 2014; Nakano i wsp., 2015).

W odniesieniu do cech tuszy odnotowano, że zwierzęta o genotypie QQ charakteryzowały się niższą wydajnością rzeźną, co zostało potwierdzone statystycznie tylko u rasy wbp ( $p \leq 0,01$ ). Biorąc pod uwagę średnią grubość słoniny z 5 pomiarów uzyskane wyniki nie były jednoznaczne, gdyż u ras wbp i pbz jej wartości były najwyższe dla genotypu *WtWt* ( $p \leq 0,05$  lub  $p \leq 0,01$ ), natomiast u puławskiej dla QQ ( $p \leq 0,01$ ). Rasa puławska reprezentuje typ użytkowy pośredni pomiędzy tłuszczowo-mięsnym, a mięsnym, natomiast pbz i wbp - typ mięsny (*Szyndler-Nędzka i wsp., 2008*), co może być przyczyną zaobserwowanych rozbieżności. U rasy puławskiej odnotowano również związek genu *VRTN* z dwoma cechami polędwicy oraz z masą mięsa wyrębów podstawowych, gdzie genotyp *WtWt* był korzystny dla tych cech ( $p \leq 0,05$ ). *Fontanesi i wsp. (2014)* wykazali, że allel Q może być powiązany z niższą masą szynki. Taką tendencję odnotowano dla masy szynki bez słoniny i skóry u ras wbp i puławska, jednak różnic nie potwierdzono statystycznie.

Biorąc pod uwagę cechy jakości mięsa, wykazano powiązanie wariantów genu *VRTN* z IMF, barwą mięsa i pH24. *Hirose i wsp. (2013)* udowodnili, że u świń rasy duroc genotyp *WtWt* powiązany był z większą zawartością tłuszczu śródmięśniowego w *m. longissimus*. Taką samą tendencję zaobserwowano u ras wbp i puławska ( $p \leq 0,05$ ) oraz pbz, z tym, że dla ostatniej z nich nie była ona statystycznie istotna. Autorzy zasugerowali też, że *VRTN* wpływa niezależnie na tempo wzrostu i odkładanie tłuszczu, co jest dobrze widoczne gdy porównamy życiowy przyrost dzienny masy ciała, przyrost dzienny masy ciała w tuczu kontrolnym oraz IMF. Najwyższe przyrosty odnotowano dla osobników o genotypie QQ, natomiast najwyższy poziom IMF dla osobników o genotypie *WtWt*. Podobny trend zaobserwowano dla ras wysokoprodukcyjnych w przypadku przyrostów i średniej grubości słoniny z 5 pomiarów. Związek z barwą mięsa (żółtość) i pH24 odnotowano dla pojedynczych ras (odpowiednio puławska, wbp) ( $p \leq 0,05$ ).

Pomiaru tekstury mięsa w odniesieniu do genotypów *VRTN* dokonano w 2 mięśniach - *m. longissimus lumborum* (polędwica) i *m. semimembranosus* (szynka). Wykazano, że osobniki o genotypie QQ cechowały się najwyższą kohezją (wbp, pbz) i żujnością (pbz, puławska) polędwicy oraz żujnością szynki (wbp, pbz) ( $p \leq 0,05$ ). Gotowana polędwica świń o genotypie QQ charakteryzowała się również większą jędrnością i twardością lecz zaobserwowane różnice potwierdzono statystycznie tylko u ras odpowiednio pbz i wbp ( $p \leq 0,05$ ). W przypadku świeżej i gotowanej szynki oraz świeżej polędwicy nie uzyskano jednoznacznych wyników w obrębie badanych ras.

Analizując polimorfizm *FTO* (**G4**) wykazano, że pomimo małej liczby osobników reprezentujących rasy duroc i hampshire, genotyp CC występował u nich najczęściej (0,57). Genotyp GG występował znacznie rzadziej (0,00-0,18), a największy jego odsetek odnotowano u rasy pbz. U rasy tej zaobserwowano również najwyższą heterozygotyczność (0,61). Biorąc pod uwagę frekwencję alleli wykazano, że u rasy wbp allel C (0,69) występował częściej niż u rasy wielka biała czeska (0,45), natomiast rzadziej u rasy pbz (0,52) w porównaniu do czeskiego landrace (0,66) (*Dvořáková i wsp., 2012*).

Analiza zależności wykazała, że poszczególne genotypy *FTO* były skorelowane ze średnią grubością słoniny z 5 pomiarów u świń rasy wbp i w grupie łączonej ( $p \leq 0,05$ ). Największą wartością tego parametru cechowały się zwierzęta o genotypie CC. Takie same wyniki uzyskała *Dvořáková i wsp. (2012)* w przypadku średniej grubości słoniny z 3 pomiarów u mieszańców pietrain × (czeski landrace × wielka biała czeska), a także w populacji łączonej obejmującej 7 grup mieszańców i 1 rasę czystą. *Fan i wsp. (2009)* z kolei dowiedli, że większą grubością słoniny nad ostatnim kręgiem lędźwiowym, cechowały się osobniki o genotypie GC, należące do mieszańców berkshire × yorkshire, natomiast większą

marmurkowatością i całkowitą zawartością tłuszczu o genotypie GG. Średnia grubość słoniny jest bardziej reprezentatywna, gdyż oznaczana jest w kilku punktach w przeciwieństwie do grubości słoniny nad ostatnim kręgiem lędźwiowym. Marmurkowatość i całkowita zawartość tłuszczu reprezentują otluszczenie wewnątrzmięśniowe. W niniejszych badaniach nie odnotowano statystycznych różnic dotyczących IMF, jednak wykazano pewną tendencję. Osobniki o genotypie GG należące do ras wbp, puławska i grupy łączonej wykazywały najwyższy poziom IMF, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami. *Dvořáková i wsp. (2012)* zasugerowali, że genotyp GG jest korzystny dla cech umięśnienia, co widoczne jest u rasy wbp, gdzie zaobserwowano większe wartości masy szynki i polędwicy, powierzchni "oka" polędwicy i zawartości mięsa w tuszy dla osobników o tym genotypie ( $p \leq 0,05$ ).

Podczas analizy IMF u lokalnych i wysokoprodukcyjnych niemieckich ras świń wykazano że jego poziom jest pozytywnie skorelowany z wartością pH w *m. longissimus dorsi* (*Baulain i wsp., 2000*). W niniejszych badaniach podobnie jak zawartość IMF, pH45 i pH24 wykazywały taki sam trend i były najwyższe u osobników o genotypie GG, jednak różnice statystyczne potwierdzono tylko dla rasy wbp i grupy łączonej ( $p \leq 0,05$ ). Genotyp GG był również powiązany z największą wodochłonnością u rasy puławskiej ( $p \leq 0,01$ ).

Rozpatrywany w publikacji **G4** polimorfizm genu *PLIN2* zlokalizowany jest w regionie 3'-UTR. Pomimo, że nie zmienia on sekwencji aminokwasowej, może przyczyniać się do wprowadzania lub znoszenia miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, które modulują poziom transkrypcji. Analiza polimorfizmu g.98G>A z wykorzystaniem programu Tfsitescan (*Ghosh, 2000*) wykazała, że allel G znosi miejsce dla wiązania czynnika transkrypcyjnego GATA-1. Udowodniono, że czynniki GATA w gruczołach endokrynnych przyczyniają się do ekspresji wielu genów kodujących hormony (*Viger i wsp., 2008*).

Biorąc pod uwagę frekwencję genotypów i alleli, wykazano, że genotyp AA występował tylko u połowy badanych ras. Pomimo małej liczebności najczęstszy był u rasy duroc (0,57); u pozostałych dominował genotyp GG (0,72-0,97). Zaobserwowano niski odsetek osobników heterozygotycznych (0,03-0,14), wyłączając rasę duroc (0,43), u której nie występował również genotyp GG. Porównując frekwencje alleli u ras włoski landrace i pbz wykazano, że są one identyczne, natomiast w przypadku duroca utrzymywanego we Włoszech frekwencja allelu G była dwukrotnie wyższa niż u utrzymywanego w Polsce (*Davoli i wsp., 2011*). Ze względu na niską frekwencję genotypu AA u rasy puławskiej, został on wyłączony z analizy zależności. Podobnie ze względu na dużą dysproporcję frekwencji genotypów pomiędzy rasą duroc i pozostałymi nie przeprowadzono analiz dla grupy łączonej.

Analizując cechy tuszy w odniesieniu do genu *PLIN2* wykazano związek jego wariantów z 3 parametrami polędwicy. Stwierdzono, że u ras wbp i puławskiej masa polędwicy bez słoniny i skóry oraz jej wysokość były najwyższe dla genotypu GG ( $p \leq 0,05$ ). Masa polędwicy jest wysoce skorelowana z powierzchnią "oka" polędwicy (*Newcom i wsp., 2002*), co również znalazło odzwierciedlenie w jej najwyższych wartościach dla tego genotypu u rasy wbp ( $p \leq 0,01$ ). *Davoli i wsp. (2011)* wykazali u świń rasy duroc, że genotyp AA jest najbardziej korzystny dla masy szynki, natomiast GG najmniej. Wyniki te zostały potwierdzone w innych badaniach, gdzie stwierdzono, że allel A przyczynia się do wzrostu masy szynki o 0,10kg u tej samej rasy (*Gol i wsp., 2016*). W niniejszych badaniach nie odnotowano statystycznych różnic pomiędzy genotypami dotyczących masy szynki bez słoniny i skóry. Pomimo, że genotyp AA nie występował u badanych ras lub nie został ujęty w analizie, zauważono jednak, że allel A w formie heterozygotycznej powiązany był z

większą masą szynki. Różnice te względem genotypu GG mieściły się w zakresie 0,061-0,567kg.

W odniesieniu do cech jakości mięsa, genotypy *PLIN2* skorelowane były z 3 parametrami - zawartością tłuszczu śródmięśniowego, jasnością ( $L^*$ ) i wodochłonnością (WHC - *water holding capacity*). U wszystkich ras odnotowano, że genotyp GG powiązany był z najwyższymi wartościami IMF i WHC, natomiast w przypadku  $L^*$  tylko u rasy puławskiej ( $p \leq 0,05$ ). IMF i WHC nie są ze sobą skorelowane (*Sellier, 1998*), więc możliwa jest selekcja w celu zwiększenia zawartości tłuszczu śródmięśniowego w oparciu o genotyp GG, gdyż nie wpłynie ona na wodochłonność dla której genotyp ten jest niekorzystny. Parametry takie jak IMF,  $L^*$  i WHC są brane pod uwagę w systemie jakości wieprzowiny PQS (*Pork Quality System*), który został wprowadzony w Polsce w roku 2009. Jego celem jest produkcja nieprzetłuszczonego mięsa wieprzowego przy jednoczesnym zachowaniu jego trwałości, przydatności kulinarnej i przetwórczej oraz smakowitości (*Hammermeister i wsp., 2013*). Stwierdzono, że jasność i IMF u analizowanych ras świń mieściły się w przedziale określonym dla systemu PQS. Trzeci parametr określa ilość wody, która znajduje się w mięsie, lecz w niniejszych badaniach został wyrażony jako wodochłonność, czyli zdolność do utrzymania wody pod wpływem sił zewnętrznych. W przypadku PQS natomiast określany jest jako utrata wody (*drip loss*), czyli wyciek wody z białkami bez użycia sił zewnętrznych (*Hamm, 1985*). Oba parametry są ze sobą oczywiście wysoko skorelowane (*Jennen i wsp., 2007*).

#### 4.2.5. Podsumowanie uzyskanych wyników badań

Celem przeprowadzonych badań było zaprojektowanie testów do detekcji polimorfizmu typu SNP, wykazanie różnic sekwencji DNA 4 genów, a także ich odniesienie do cech wzrostu, jakości tuszy i mięsa u świń. Zaproponowane testy z powodzeniem pozwoliły wykryć polimorfizm DNA i wykazać różnice dotyczące parametrów populacyjnych badanych ras. W przypadku każdego genu wykazano statystycznie istotne zależności pomiędzy poszczególnymi wariantami, a analizowanymi cechami, które są istotne z ekonomicznego punktu widzenia. W przypadku genu *miR-208b* jednoznaczne wyniki u 3 ras i w grupie łączonej odnotowano dla takich cech jak wodochłonność, tempo wzrostu, wiek uboju i grubość słoniny, których najwyższymi wartościami odznaczał się genotyp AA. Biorąc pod uwagę gen *VRTN*, wykazano, że wariant *WtWt* był istotnie skorelowany z większą zawartością tłuszczu śródmięśniowego, natomiast z mniejszą wydajnością rzeźną i żujnością szynki u 3 ras świń. Dla genu *FTO* istotne różnice stwierdzono tylko dla rasy wbp, u której większą zawartością mięsa w tuszy, lepszymi parametrami polędwicy oraz mniejszą grubością słoniny cechowały się osobniki o genotypie GG. Ostatni z analizowanych genów, *PLIN2* u wszystkich ras świń powiązany był z dwoma cechami. Największą zawartość tłuszczu śródmięśniowego, a jednocześnie najwyższą wodochłonność zaobserwowano dla genotypu GG. Uzyskane wyniki badań wskazują, że dane dotyczące analizowanych polimorfizmów mogłyby być wykorzystane w procesie doskonalenia cech użytkowych świń, wspomagając klasyczny proces oceny i selekcji zwierząt. Niektóre z nich wymagają jednak dalszej weryfikacji ze względu na negatywną korelację poszczególnych cech względem tego samego genotypu.

#### 4.2.6. Spis literatury

1. Babicz M., Kropiwić K., Cichoński R., Merska M., Szyndler-Nedza M., Krasucki W., Halabis M. (2014) The analysis of changes in the profitability of pig production of Polish Landrace breed and the Puławska breed on a family farm in the years 2010–2012. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska, EE, Zoot.*, 32: 17-24.
2. Bartosovic M., Molares H.C., Gregorova P., Hrossova D., Kudla G., Vanacova S. (2017) N6-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing. *Nucleic Acids Res.*, 45: 11356-11370.
3. Baulain U., Köhler P., Kallweit E., Brade W. (2000) Intramuscular fat content in some native German pig breeds. Proceedings of the joint session of the EAAP commissions on pig production, animal genetics and animal nutrition, Zurich, Switzerland, 25.08.1999, pp.181-184.
4. Chen X., Zhou B., Luo Y., Huang Z., Jia G., Liu G., Zhao H. (2016) Tissue distribution of porcine FTO and its effect on porcine intramuscular preadipocytes proliferation and differentiation. *PLoS One*, 11: e0151056.
5. Davoli R., Gandolfi G., Braglia S., Comella M., Zambonelli P., Buttazoni L., Russo V. (2011) New SNP of the porcine perilipin 2 (*PLIN2*) gene, association with carcass traits and expression analysis in skeletal muscle. *Mol. Biol. Rep.*, 38: 1575-1583.
6. Diniz G.P., Wang D.Z. (2016) Regulation of skeletal muscle by microRNAs. *Compr. Physiol.* 6: 1279-1294.
7. Duan Y., Zhang H., Zhang Z., Gao J., Yang J., Wu Z., Fan Y., Xing Y., Li L., Xiao S., Hou Y., Ren J., Huang L. (2018) *VRTN* is Required for the Development of Thoracic Vertebrae in Mammals. *Int. J. Biol. Sci.*, 14 :667-681.
8. Dvořáková V., Bartenschlager H., Stratil A., Horák P., Stupka R., Cítek J., Sprysl M., Hrdlicová A., Geldermann H. (2012) Association between polymorphism in the *FTO* gene and growth and carcass traits in pig crosses. *Genet. Sel. Evol.*, 44:13.
9. Fan B., Du Z.Q., Rothschild M.F. (2009) The fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene is associated with intramuscular fat content and growth rate in the pig. *Anim. Biotechnol.*, 20: 58-70.
10. Fan Y., Xing Y., Zhang Z., Ai H., Ouyang Z., Ouyang J., Yang M., Li P., Chen Y., Gao J., Li L., Huang L., Ren J. (2013) A further look at porcine chromosome 7 reveals *VRTN* variants associated with vertebral number in Chinese and Western pigs. *PLoS One* 8: e62534.
11. Fawcett K.A., Barroso I. (2010) The genetics of obesity: *FTO* leads the way. *Trends Genet.*, 26: 266-274.
12. Fontanesi L., Scotti E., Buttazoni L., Dall'Olio S., Russo V. (2014) Investigation of a short interspersed nuclear element polymorphic site in the porcine *vertnin* gene: allele frequencies and association study with meat quality, carcass and production traits in Italian Large White pigs. *Ital. J. Anim. Sci.*, 3: 60-65.
13. Fu Y., Li L., Ren S. (2013) Effect of *FTO* Expression and Polymorphism on Fat Deposition in Suzhong Pigs. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 26: 1365-1373.
14. Gandolfi G., Mazzoni M., Zambonelli P., Lalatta-Costerbosa G., Tronca A., Russo V., Davoli R. (2011) Perilipin 1 and perilipin 2 protein localization and gene expression study in skeletal muscles of European cross-breed pigs with different intramuscular fat contents. *Meat Sci.*, 88: 631-637.
15. Gentry J.G., McGlone J.J., Miller M.F., Blanton J.R. Jr. (2004) Environmental effects on pig performance, meat quality, and muscle characteristics. *J. Anim. Sci.*, 82: 209-217.
16. Ghosh D. (2000) Object-oriented transcription factors database (ooTFD). *Nucleic Acids Res.*, 28: 308-310.
17. Gol S., Ros-Freixedes R., Zambonelli P., Tor M., Pena R.N., Braglia S., Zappaterra M., Estany J., Davoli R. (2016) Relationship between perilipin genes polymorphisms and growth, carcass and meat quality traits in pigs. *J. Anim. Breed. Genet.*, 133: 24-30.
18. Goymer P. (2007) Synonymous mutations break their silence. *Nat. Rev. Genet.*, 8: 92.

19. Hamm R. (1985) Wasserbindungsvermögen des Fleisches - Aspekte eines wichtigen Qualitätsmerkmals. *Mitteilungsblatt BAFF*, 88: 6383-6387.
20. Hamm R. (1986) Functional properties of the myofibrillar system and their measurement. W: Bechtel P.J. (ed.): *Muscle as Food*. Academic Press Inc., London, UK, 135-199.
21. Hammermeister A., Blicharski T., Warda A. (2013) System PQS nowoczesnym rozwiązaniem dla producenta, przetwórcy i konsumenta. *Przeg. Hod.*, 81: 10-12.
22. Huang J., Yang Y., Liu G., Zhang J., Dong X., Bai Y., Fang M. (2011) Molecular cloning and characterization of the porcine FTO promoter and coding regions. *Mol. Biol. Rep.*, 38(4):2855-2862.
23. Jennen D.G., Brings A.D., Liu G., Jüngst H., Tholen E., Jonas E., Tesfaye D., Schellander K., Phatsara C. (2007) Genetic aspects concerning drip loss and water-holding capacity of porcine meat. *J. Anim. Breed. Genet.*, 124: 2-11.
24. Hirose K., Mikawa S., Okumura N., Noguchi G., Fukawa K., Kanaya N., Mikawa A., Arakawa A., Ito T., Hayashi Y., Tachibana F., Awata T. (2013) Association of swine vertnin (*VRTN*) gene with production traits in Duroc pigs improved using a closed nucleus breeding system. *Anim. Sci. J.* 84: 213-221.
25. Huang J., Zhang M., Ye R., Ma Y., Lei C. (2017) Effects of increased vertebral number on carcass weight in PIC pigs. *Anim. Sci. J.*, 88: 2057-2062.
26. Hwang Y.H., Kim G.D., Jeong J.Y., Hur S.J., Joo S.T. (2010) The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Sci.*, 86: 456-461.
27. Jennen D.G., Brings A.D., Liu G., Jüngst H., Tholen E., Jonas E., Tesfaye D., Schellander K., Phatsara C. (2007) Genetic aspects concerning drip loss and water-holding capacity of porcine meat. *J. Anim. Breed. Genet.*, 124: 2-11.
28. Kim J.M., Lim K.S., Hong J.S., Kang J.H., Lee Y.S., Hong K.C. (2015) A polymorphism in the porcine *miR-208b* is associated with microRNA biogenesis and expressions of *SOX-6* and *MYH7* with effects on muscle fibre characteristics and meat quality. *Anim. Genet.*, 46: 73-77.
29. Komatsu Y., Sukegawa S., Yamashita M., Katsuda N., Tong B., Ohta T., Kose H., Yamada T. (2016) Identification of genes showing differential expression profile associated with growth rate in skeletal muscle tissue of Landrace weanling pig. *J. Genet.*, 95: 341-347.
30. Ma J., Wang H., Liu R., Jin L., Tang Q., Wang X., Jiang A., Hu Y., Li Z., Zhu L., Li R., Li M., Li X. (2015) The miRNA transcriptome directly reflects the physiological and biochemical differences between red, white, and intermediate muscle fiber types. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 9635-9653.
31. Mikawa S., Hayashi T., Nii M., Shimanuki S., Morozumi T., Awata T. (2005) Two quantitative trait loci on *Sus scrofa* chromosomes 1 and 7 affecting the number of vertebrae. *J. Anim. Sci.*, 83: 2247-2254.
32. Mikawa S., Morozumi T., Shimanuki S., Hayashi T., Uenishi H., Domukai M., Okumura N., Awata T. (2007) Fine mapping of a swine quantitative trait locus for number of vertebrae and analysis of an orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor (*NR6A1*). *Genome Res.*, 17: 586-593.
33. Mikawa S., Sato S., Nii M., Morozumi T., Yoshioka G., Imaeda N., Yamaguchi T., Hayashi T., Awata T. (2011) Identification of a second gene associated with variation in vertebral number in domestic pigs. *BMC Genet.*, 12: 5.
34. Murgiano L., Tammen I., Harlizius B., Drögemüller C. (2012) A de novo germline mutation in *MYH7* causes a progressive dominant myopathy in pigs. *BMC Genet.* 13: 99.
35. Nakano H., Sato S., Uemoto Y., Kikuchi T., Shibata T., Kadowaki H., Kobayashi E., Suzuki K. (2015) Effect of *VRTN* gene polymorphisms on Duroc pig production and carcass traits, and their genetic relationships. *Anim. Sci. J.*, 86: 125-131.
36. Newcom D.W., Baas T.J., Mabry J.W., Goodwin R.N. (2002) Genetic parameters for pork carcass components. *J. Anim. Sci.*, 80: 3099-3106.



37. Nguyen K.T., Lee C.S., Mun S.H., Truong N.T., Park S.K., Hwang C.S. (2019) N-terminal acetylation and the N-end rule pathway control degradation of the lipid droplet protein PLIN2. *J. Biol. Chem.*, 294: 379-388.
38. Quiat D., Voelker K.A., Pei J., Grishin N.V., Grange R.W., Bassel-Duby R., Olson E.N. (2011) Concerted regulation of myofiber-specific gene expression and muscle performance by the transcriptional repressor Sox6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 10196-10201.
39. Ropka-Molik K., Podstawski P., Piórkowska K., Tyra M. (2016) Association of gene coding for microsomal triglyceride transfer protein (*MTP*) and meat texture characteristic in pig. *Ann. Anim. Sci.*, 16: 721-729.
40. Sellier P. (1998) Genetic of meat and carcass traits. In: Rothschild M.F., Rubinsky A., (ed). *The genetics of the pigs*. CAB International, New York, USA, s. 465-510.
41. Siracusa J., Koulmann N., Banzet S. (2018) Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, 9: 20-27.
42. Szyndler-Nędzka M., Blicharski T., Bajda Z. (2008) Świnie puławskie - uwarunkowania kształtujące wielkość populacji w latach 1932-2007. *Wiad. Zoot.*, 46: 37-40.
43. Tempfli K., Kiss B., Szalai K., Simon Z., Pongrácz L., Papp Á.B. (2016) Differential expression of six genes in fat-type Hungarian Mangalica and other pigs. *Arch. Anim. Breed.*, 59: 259-265.
44. Yang J., Huang L., Yang M., Fan Y., Li L., Fang S., Deng W., Cui L., Zhang Z., Ai H., Wu Z., Gao J., Ren J. (2016) Possible introgression of the *VRTN* mutation increasing vertebral number, carcass length and teat number from Chinese pigs into European pigs. *Sci. Rep.* 6: 19240.
45. Yang M., Dong K., Shu X., Li W., Huang Y., Pan H., Zhao S. (2017) Cloning of perilipin 2 gene and investigating its expression level in porcine longissimus muscle. *J. Vet. Sci. Anim. Husb.*, 5: 1-9.
46. van Rooij E., Quiat D., Johnson B.A., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Kelm R.J. Jr, Olson E.N. (2009) A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev. Cell.* 17: 662-73.
47. Viger R.S., Guittot S.M., Anttonen M., Wilson D.B., Heikinheimo M. (2008) Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Mol. Endocrinol.* 22: 781-798.
48. Zambonelli P., Gaffo E., Zappaterra M., Bortoluzzi S., Davoli R. (2016) Transcriptional profiling of subcutaneous adipose tissue in Italian Large White pigs divergent for backfat thickness. *Anim. Genet.*, 47: 306-323.
49. Żak G., Tyra M., Różycki M. (2009) Meatiness and fatness traits of Polish Large White and Polish Landrace pigs differing in fattening traits. *Ann. Anim. Sci.*, 9: 299-306.

## 5. Pozostałe formy aktywności naukowo-badawczej

### 5.1. Analiza polimorfizmu DNA u świń

#### 5.1.1. Cechy nasienia knurów

Analizy przeprowadzone przez wielu badaczy wykazały, że poszczególne geny mogą służyć jako markery cech rozrodczych świń, które mogą być zastosowane we wczesnej selekcji w kierunku poprawy efektywności inseminacji oraz wielkości miotu.

W pracach **a1**, **a4** i **e1** przedstawiono analizę 2 polimorfizmów w genie *ESR* (receptor estrogenu) w odniesieniu do jakości nasienia knurów. Wykazano, że u samców estrogen ma istotny wpływ na rozpoczęcie i utrzymanie procesu spermatogenezy. Analizując warianty *ESR/Aval* wykazano, że knury o genotypie *AA* cechowały się najwyższą objętością ejakulatu oraz ilością i odsetkiem plemników żywych, natomiast o genotypie *BB* największą

koncentracją plemników ( $p \leq 0.01$ ). Tą samą zależność odnotowano dla polimorfizmu *ESR/PvuII*. Największą koncentracją plemników cechowały się knury o genotypie *DD*, natomiast najwyższe wartości pozostałych cech zaobserwowano u zwierząt o genotypie *CC* ( $p \leq 0.01$ ).

Innym genem badanym w aspekcie użytkowości rozplodowej knurów był *GPX5* (peroksydaza glutationowa 5). *GPX5* odgrywa istotną rolę w ochronie błony komórkowej plemników przed niszczącym działaniem produktów peroksydacji lipidów. W pracach **a6** i **e4** wykazano, że genotyp heterozygotyczny (polimorfizm c.81+1896A/G) powiązany był z wyższymi wartościami analizowanych cech nasienia, oprócz koncentracji plemników ( $p \leq 0.01$ ).

### 5.1.2. Cechy rozrodcze loch

Doniesienia licznych autorów sugerowały, że jeden z wariantów (g.1843C/T) genu *RYR1* (receptor ryanodiny), który odpowiedzialny jest za podatność świń na stres ma także związek z pogorszeniem się wartości cech użytkowości rozrodczej loch. Prace **a2**, **f1** i **e2** miały na celu weryfikację tej hipotezy. U analizowanych mieszańców ras wbp × pbz wykryto około 13% nosicieli niepożądanego allele, jednak analiza statystyczna nie wykazała istotnych zależności pomiędzy poszczególnymi wariantami, a badanymi cechami rozrodczymi loch.

Kolejny z analizowanych genów, *FABGL* koduje dehydrogenazę 17 $\beta$ -hydroksysteroidową typu 8, która odpowiedzialna jest za regulację stężenia biologicznie aktywnych estrogenów i androgenów. W pracach **a5**, **D8** i **e5** analizowano polimorfizm *FABGL/BbvI* w odniesieniu do wielkości miotu u mieszańców ras wbp × pbz. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że lochy z genotypem *AA* cechowały się większą liczbą prosiąt urodzonych i odsadzonych w stosunku do loch o genotypie *BB* ( $p \leq 0.01$ ).

*RBP4* jest genem kandydatem wielkości miotu ze względu pełnione funkcje. Dowiedziono bowiem, że białko wiążące retinol typu 4 u świń jest głównym białkiem wydzielanym przez zarodek przed jego implementacją. Analiza polimorfizmu *RBP4/TaqI* u świń rasy wbp i mieszańców ras wbp × pbz wykazała statystycznie istotne zależności pomiędzy jego poszczególnymi wariantami a wielkością miotu. Dowiedziono, że u loch czystorasowych genotyp *BB* był korzystny dla liczby prosiąt urodzonych oraz odsadzonych ( $p \leq 0.01$ ). Takie same wyniki zaobserwowano także u mieszańców, u których dodatkowo wykazano pozytywny wpływ genotypu *BB* na liczbę prosiąt żywo urodzonych ( $p \leq 0.01$ ) (**a7**, **A14**, **d6**, **e3**).

Gen kodujący hormon wzrostu (*GH*) wywiera działanie plejotropowe na wiele cech organizmu. U samic przyczynia się między innymi do wzrostu, dojrzewania i liczebności pęcherzyków jajnikowych. W pracach **A8**, **d1**, **d7**, **f3**, **e6** badano dwa polimorfizmy - *GH/HaeIII* i *GH/MspI* z uwzględnieniem cech rozrodczych loch rasy wbp. W przypadku wariantów *GH/HaeIII* wykazano, że genotyp  $h^+h^+$  powiązany był w z większą liczbą prosiąt żywo urodzonych, lecz jednocześnie wiązał się z większą śmiertelnością podczas okresu odsadzenia ( $p \leq 0.05$ ). W przypadku drugiego polimorfizmu - *GH/MspI*, genotyp  $m^+m^+$  w był skorelowany z największą liczbą prosiąt żywo urodzonych i najniższą śmiertelnością, co wskazuje, że jest bardziej obiecujący jako marker genetyczny w stosunku do pierwszego.

Leptyna jest powiązana z procesami rozrodczymi poprzez stymulację wydzielania gonadolibery z podwzgórza. Analiza polimorfizmów genu *LEP* - *LEP/HinfI* u rasy wbp (**d2**) oraz *LEP/HindIII* u mieszańców wbp × pbz (**A9**, **E9**) nie wykazała jednak statystycznie istotnych powiązań z cechami rozrodczymi loch.

Podobnie, w przypadku polimorfizmu genu kodującego łańcuch beta hormonu folikulotropowego - *FSHB* (g.5894A/G) nie wykazano jego powiązania z wielkością miotu u mieszańców i loch czystorasowych (**A24**, **D10**, **F9**).

Kolejny rozpatrywany gen, kodujący  $\alpha$ 1-fukozylotransferazę (*FUT1*) jest zlokalizowany w regionie chromosomalnym, który powiązany jest z wielkością miotu. Przeprowadzone badania (**A10**) wykazały, że polimorfizm *FUT1/Hin6I* u rasy pbz i mieszańców wbp × pbz jest skorelowany z liczbą prosiąt urodzonych, żywo urodzonych i odsadzonych. Odnotowano, że genotyp GG był korzystny dla tych cech w odniesieniu do pozostałych genotypów ( $p \leq 0.05$ ).

Podobnie jak *FUT1*, gen kodujący peroksydazę glutationową 5 jest markerem pozycyjnym cech rozrodczych loch. W regionie, w którym położony jest gen *GPX5* zlokalizowano QTL (loci cech ilościowych) dla objętości macicy, tempa owulacji i wielkości miotu. W pracach **A26**, **D11** i **F5** wykazano, że substytucja (c.81+1896A/G) w pierwszym intronie genu *GPX5* jest istotnie powiązana z wielkością miotu. Dowiedziono, że lochy mieszańce z genotypem AA cechowały się większą liczbą prosiąt urodzonych, żywo urodzonych i odsadzonych w stosunku do genotypów AG i GG ( $p \leq 0.01$ ).

Ostatnim z analizowanych w aspekcie rozrodczości loch genów był *PRLR* (receptor prolaktyny). Prolaktyna jest powiązana głównie z laktacją i rozmnażaniem, a zmiany w budowie jej receptora mogą wpływać na powinowactwo do ligandu lub przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Publikacja **A25** przedstawia detekcję polimorfizmu typu zmiany sensu 1789G/A (Gly597Ser) genu *PRLR* u świń linii syntetycznej 990. Przeprowadzone badania udowodniły, że lochy o genotypie AA cechowały się lepszymi cechami liczebności miotu w stosunku do loch o genotypie BB ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.1.3. Jakość mięsa i tuszy

W przypadku cech jakości mięsa i tuszy przebadano szereg genów min. *RYR1* (receptor ryanodiny), *LEP* (leptyna), *CAST* (kalpastatyna), *PPARGC1A* (podjednostka alfa 1 koaktywatora receptora gamma aktywującego proliferację peroksysomów), *IGF-1R* (receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu-1), *ACLY* (liaza ATP-cytrynianowa) i *PIRT* (phosphoinositide-interacting protein).

Gen *RYR1* był badany w kontekście wpływu poszczególnych genotypów na cechy jakości tuszy i mięsa świń (**A23**) oraz obecności allela *T* w celu wykluczenia jego wpływu na oceniane cechy (**A11**, **A12**, **A20**, **A24**, **A25**, **A26**, **A28**, **F15**, **F17**). Przeprowadzone badania wykazały monomorfizm genu *RYR1* (CC) u świń hybrydowych (Camborough22 × PIC377), linii 990 oraz mieszańców wielka biała polska × polska biała zwisłoucha. W przypadku mieszańców z rasą pietrain oraz z rasą puławską stwierdzono natomiast obecność allela *T* w formie heterozygotycznej (CT). Analiza zależności u mieszańców z rasą pietrain nie wykazała istotnego wpływu genotypów CC i CT na cechy jakości tuszy i mięsa. Podobne wyniki uzyskano badając u tych samych świń polimorfizm genu *CAST* (*CAST/TaqI*) (**A23**).

Gen *LEP* ze względu na swoją rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu został zaproponowany jako gen kandydujący do statusu markera cech jakości tuszy. W wyniku przeprowadzonych badań (**A12**) wykazano małą zmienność genu *LEP* w odniesieniu do polimorfizmów 3469T/C i 2728 G/A u świń hybrydowych Camborough22 × PIC377. Uwzględnienie w analizie genotypów kombinowanych TT/GG ujawniło natomiast, że tuczniaki te charakteryzowały się mięsnością co najmniej 57%, a tusze w 73.5% zaliczono do klasy S lub E w systemie EUROP.

Białko PGC-1 kodowane przez gen *PPARGC1A* odgrywa istotną rolę w termogenezie, biogenezie mitochondriów, adipogenezie oraz konwersji włókien mięśniowych. W pracach **A16**, **A20**, **F5** i **F7** przebadano funkcjonalny polimorfizm 1378T/A (Cys430Ser) tego genu u świń Camborough22 × PIC377 w aspekcie cech jakości i składu mięsa, a także stopnia wykrawiania. Analiza zależności wykazała, że różne warianty genu *PPARGC1A* były powiązane ze stratami ciepła u świń. Ich wartości były najwyższe u osobników o genotypie *TT*, zaś znacznie niższe u pozostałych - *CT* i *TT* ( $p \leq 0.05$ ).

Wstępna analiza wariantów genów *IGF-1R*, *ACLY* i *PIRT* wykazała, że są one powiązane z cechami jakości mięsa (**E12**, **F16**), cechami wzrostu (**F12**) lub wykazują zróżnicowaną frekwencję w obrębie poszczególnych ras i typów użytkowych świń (**D13**, **F13**).

## 5.2. Analiza DNA u innych gatunków

### 5.2.1. Detekcja i analiza polimorfizmu u szynszyli

Realizowane badania były przedmiotem pracy doktorskiej zatytułowanej "Polimorfizm 10 eksonu genu receptora hormonu wzrostu (*GHR*) szynszyli (*Chinchilla lanigera*)". Różne warianty genu *GHR* u ludzi powiązane są z karłowatością typu Laron. 10. ekson tego genu koduje domenę wewnątrzkomórkową receptora, która odpowiedzialna jest za przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. W pracach **a3** i **d5** przedstawiono detekcję polimorfizmu w 10 eksonie genu *GHR* szynszyli z użyciem sekwencjonowania Sangera. Łącznie wykryto 4 funkcjonalne SNPy (**g1**) - 135G/C (gln/his), 352,354CAG/AAA (gln/lys) oraz 641C/A (thr/asn). W kolejnej publikacji (**A17**) zaprojektowano testy oparte na PCR (ACRS-PCR, AS-PCR, PCR-RFLP) pozwalające na analizę wykrytego polimorfizmu. Przebadane zostały szynszyle pochodzące z 2 ferm o różnym cyklu hodowlanym. Wykazano, że u szynszyli hodowanych w zamkniętym cyklu występował tylko 1 allel w odniesieniu do polimorfizmu 135G/C. Ponadto stwierdzono, że stado utrzymywane w otwartym cyklu hodowlanym cechowało się wyższym współczynnikiem średniej heterozygotyczności. Na podstawie uzyskanych wyników badań przedstawiono hipotezę dotyczącą karłowatości szynszyli, zwracając się do polskich hodowców z prośbą o pozyskanie materiału badawczego (**d5**). Okazała się ona bezskuteczna, więc badania nie były kontynuowane.

### 5.2.2. Detekcja i analiza polimorfizmu DNA u koni

Fizjologiczne podstawy wydolności fizycznej koni zostały bardzo dobrze poznane i scharakteryzowane, natomiast ich genetyczne uwarunkowania są ciągłym obiektem badań wielu naukowców.

Gen kodujący alfa-aktynę 1 (*ACTA1*) został wytypowany w wyniku skanowania genomu mającego na celu wykrycie regionów, które podlegały pozytywnej selekcji u koni czystej krwi arabskiej. W pracach **A19** i **F4** podjęto próbę detekcji polimorfizmu we fragmencie genu *ACTA1* obejmującym eksony 5, 6, 7 wraz z oddzielającymi je intronami. W wyniku sekwencjonowania wykryto 2 SNPy, zlokalizowane w intronie 5 (1:68411019G/T) i intronie 6 (1:68411368G/C) (**G2**). Analiza funkcjonalna wykrytych polimorfizmów wykazała, że substytucja G/C może aktywować kryptyczne miejsca akceptorowe. W kolejnym etapie badań zaprojektowano testy oparte na metodach PCR-RFLP i ACRS-PCR, pozwalające na szybkie i wiarygodne genotypowanie koni należących do różnych ras i typów użytkowych.

Analiza frekwencji alleli i genotypów wykazała duże zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi grupami koni. Rozkład haplotypów wykazał natomiast, że 2 z 4 były wspólne dla wszystkich ras, 1 był nieobecny u koni prymitywnych, a 1 został zaobserwowany tylko u koni czystej krwi arabskiej i rasy małopolskiej, co może odzwierciedlać długotrwałą selekcję w kierunku wydolności fizycznej.

Gen *PPARGC1A* został wytypowany jako marker wydolności sportowej koni ze względu na kluczowe funkcje metaboliczne białka PGC-1. Prace **A27** i **E8** miały na celu detekcję wariantów polimorficznych w promotorze genu *PPARGC1A* oraz ocenę ich zróżnicowania. W wyniku sekwencjonowania wykryto 1 SNP, zlokalizowany w pozycji -210bp licząc od kodonu ATG (g.100.784.525 C/G) (**G3**). Analiza miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych wykazała, że allel G wprowadza miejsce dla czynników transkrypcyjnych v-ErbA i AML-1a, natomiast allel C je znosi. Do analizy wykrytego polimorfizmu zaprojektowano test oparty na metodzie PCR-RFLP, który posłużył do określenia genotypów koni należących do 9 różnych ras. Oprócz wykazania różnic w rozkładzie genotypów i alleli, badania rozszerzono o pulę koni czystej krwi arabskiej, o znanych wynikach wyścigowych, pochodzących z USA. Analizy statystyczne ujawniły znacznie wyższą frekwencję genotypu GC u koni elitarnych w stosunku do koni przeciętnych (OR=1.69). Ponadto genotyp GC był częściej identyfikowany u koni biegających na długich dystansach niż u biegających na krótkich dystansach zarówno w grupie elitarniej (OR=1.31), jak i wszystkich analizowanych koni czystej krwi arabskiej (OR=2.00).

Ostatni gen, kodujący miostatynę (*MSTN*) jest markerem szybkości i wytrzymałości koni sportowych. W pracach **A22** i **E10** skupiono się na zaprojektowaniu testu genetycznego (ACRS-PCR) służącego do wykrywania polimorfizmu g.66493737C/T, a także na ocenie jego frekwencji u różnych ras koni. Na podstawie analiz wykazano, że genotyp CC (typ szybki, sprint) był obecny tylko u koni rasy holsztyńskiej, której przodkami były konie czystej krwi angielskiej, natomiast genotyp TT (większa wytrzymałość) był najczęstszy u polskiego konia zimnokrwistego i konika polskiego, które zalicza się odpowiednio do typu ciężkozaprzęgowego i wszechstronnie użytkowego.

#### 5.4.1. Analiza polimorfizmu u bydła

W pracach **A13**, **A18** i **E7** podjęto analizę asocjacji pomiędzy polimorfizmem genu insulinopodobnego czynnika wzrostu (*IGF-1*) a cechami użytkowości mlecznej u dwóch odmian krów rasy holsztyńsko-fryzyjska. Badany polimorfizm (-512C/T) zlokalizowany jest w promotorze i powiązany ze zróżnicowaną ekspresją genu *IGF-1*. Wykonane w pracy **A18** analizy wykazały, że może mieć to związek z obecnością miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego NF-1 dla allela T. Badając krowy odmiany czarno białej wykazano, że genotyp CC w większości przypadków był powiązany z wyższymi wartościami cech użytkowości mlecznej, jednak różnice nie okazały się statystycznie istotne. W przypadku krów odmiany czerwono białej dowiedziono, że osobniki z genotypem CC charakteryzowały się największą wydajnością mleczną ( $p \leq 0.01$ ), natomiast z genotypem TT najwyższą liczbą komórek somatycznych w mleku ( $p \leq 0.01$ ).

#### 5.4.2. Analiza DNA u dzików

Gen kodujący peroksydazę glutationową 5 (*GPX5*) ulega ekspresji głównie w najądrzach i plemnikach, lecz enzym ten wykryto również w nerkach i wątrobie. W publikacji

**A15** analizowano polimorfizm genu *GPX5* (c.81+1896A/G) u dzików z województwa zachodniopomorskiego w odniesieniu do poziomu selenu, zmierzonego w nerkach i wątrobie. Poziom selenu w tym województwie jest znacznie niższy w porównaniu do innych, a jego koncentracja w organizmach może być dodatkowo regulowana przez *GPX5*. W wyniku przeprowadzonych badań udowodniono, że zwierzęta o genotypie *AA* charakteryzowały się znacznie wyższą koncentracją selenu w obu narządach w stosunku do zwierząt o genotypach *GG* i *AG* ( $P \leq 0.05$ ).

#### 5.4.3. Analiza filogenetyczna nicieni

Dwa gatunki nicieni - *Amidostomoides monodon* i *Amidostomoides petrovi*, pasożytujących u kaczek uznawano przez długi czas za synonimy gatunku *Amidostomum acutum*. Badania tych odmiennych morfologicznie i ekologicznie grup nicieni z użyciem sieci neuronowych wykazały, że stanowią one trzy odrębne gatunki. W publikacji **A21** podjęto próbę potwierdzenia wcześniej uzyskanych wyników z zastosowaniem analiz DNA. W wyniku PCR uzyskano amplikony fragmentu genu kodującego 28s rRNA, a następnie ustalono ich sekwencje (**G4**, **G5**, **G6**). Kolejnym etapem były analizy filogenetyczne, które dały jednoznaczną odpowiedź, potwierdzającą odrębność gatunkową analizowanych nicieni.

### 6. Wykaz dorobku naukowego

#### 6.1. Zestawienie publikacji naukowych z podziałem na: oryginalne prace twórcze, artykuły przeglądowe, artykuły popularno-naukowe, prace i komunikaty konferencyjne

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	IF <sup>a)</sup>	Suma pkt. wg MNiSW <sup>b)</sup>	Suma pkt. wg MNiSW <sup>c)</sup>
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z bazy JCR	19	8,741	330	330
- w tym w wydaniach specjalnych	3	1,836	0	45
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza bazy JCR	14	0	101	101
- w tym w suplementach	1	0	0	3
<b>Ogółem oryginalne prace twórcze</b>	<b>33</b>	<b>10,577</b>	<b>436</b>	<b>484</b>
Artykuły przeglądowe	2	0	10	10
Artykuły popularno-naukowe	2	0	0	0
Prace i doniesienia konferencyjne	43	0	0	0
<b>Ogółem publikacje naukowe</b>	<b>80</b>	<b>10,577</b>	<b>446</b>	<b>494</b>

<sup>a)</sup> sumaryczny Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy, dla publikacji z 2018 i 2019r. wykazano IF za rok 2017

<sup>b)</sup> liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodny z rokiem ukazania się pracy, bez rozpraw naukowych opublikowanych w suplementach lub wydaniach specjalnych; dla publikacji z lat 2017-2019 wykazano punktacje za lata 2013-2016 (z dnia 26.01.2017)

<sup>c)</sup> liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodny z rokiem ukazania się pracy, łącznie z pracami mającymi formę recenzowanych rozpraw naukowych opublikowanych w suplementach lub wydaniach specjalnych; dla publikacji z lat 2017-2019 wykazano punktacje za lata 2013-2016 (z dnia 26.01.2017)

**6.2. Zestawienie liczbowe czasopism w których opublikowano prace naukowe**

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba publikacji	IF <sup>a)</sup>	Punkty wg MNiSW <sup>b)</sup>	Suma pkt <sup>c)</sup>	Suma pkt <sup>d)</sup>
1.	Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica	2	0	12	12	12
2.	Agricultural and Food Science	1	0,580	30	30	30
3.	Animal Science Papers and Reports - w tym w suplementach	3 1	1,333 0	50 3	50	53
4.	Annals of Animal Science*	1	1,018	20	20	20
5.	Annals of Parasitology	1	0	15	15	15
6.	Annals of Warsaw University of Life Sciences - SGGW Animal Science	1	0	12	12	12
7.	Archiv für Tierzucht - w tym w wydaniach specjalnych	4 3	2,354 1,836	15 45	15	60
8.	Biuletyn informacyjny dla hodowców szynszyli	1	0	0	0	0
9.	Canadian Journal of Animal Science	1	0,657	30	30	30
10.	Ciência e Agrotecnologia*	1	0,672	30	30	30
11.	Czech Journal of Animal Science*	1	0,955	30	30	30
12.	Electronic Journal of Polish Agricultural Universities	3	0	25	25	25
13.	Folia Pomeranea Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura Alimentaria Piscaria et Zootechnica (dawniej Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis Zootechnica)	3	0	25	25	25
14.	Indian Journal of Animal Sciences	1	0,160	10	10	10
15.	Italian Journal of Animal Science	1	0,604	15	15	15
16.	Journal of Animal and Feed Sciences*	1	0,900	20	20	20
17.	Journal of Animal and Plant Sciences	1	0,407	25	25	25
18.	Journal of Animal and Veterinary Advances	2	0,390	20	20	20
19.	Journal of Applied Genetics	1	-	6	6	6
20.	Polish Journal of Food and Nutrition Science	1	0	6	6	6
21.	Przegląd Hodowlany	2	0	10	10	10
22.	Tierärztliche Umschau	2	0,305	10	20	20
23.	Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences	1	0,242	20	20	20
24.	Wiadomości rolnicze	1	0	0	0	0
25.	Prace i komunikaty konferencyjne	43	0	0	0	0
<b>Razem</b>		<b>80</b>	<b>10,577</b>	<b>-</b>	<b>446</b>	<b>494</b>

<sup>a)</sup> sumaryczny Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy; dla publikacji z lat 2018-2019 podano IF za rok 2017

<sup>b)</sup> liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodny z rokiem ukazania się pracy; dla publikacji z lat 2017-2019 podano punktacje za lata 2013-2016 (z dnia 26.01.2017)

<sup>c)</sup> suma punktów bez prac opublikowanych w suplementach i wydaniach specjalnych

<sup>d)</sup> suma punktów uwzględniająca prace opublikowane w suplementach i wydaniach specjalnych

\* czasopisma w których opublikowano prace stanowiące cykl monotematyczny

**6.3. 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 wraz ze zdeponowanymi sekwencjami DNA**

Rodzaj publikacji	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopiśmie z bazy JCR	4	15	19
- w tym w wydaniach specjalnych	3	0	3
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopiśmie spoza bazy JCR	3	11	14
- w tym w suplementach	1	0	1
<b>Ogółem oryginalne prace twórcze</b>	<b>7</b>	<b>26</b>	<b>33</b>
Artykuły przeglądowe	0	2	2
Artykuły popularno-naukowe	0	2	2
Prace i doniesienia konferencyjne	16	27	43
<b>Ogółem publikacje naukowe</b>	<b>23</b>	<b>57</b>	<b>80</b>
Rekordy w GenBanku	1	5	6

**6.4. Wartość naukowa dorobku publikacyjnego**

- Suma punktów za publikacje wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodny z rokiem ukazania się pracy - **446**
- Suma punktów za publikacje wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodny z rokiem ukazania się pracy włączając recenzowane publikacje w wydaniach specjalnych lub suplementach - **494**
- Sumaryczny Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy - **8,741**
- Sumaryczny Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy włączając recenzowane publikacje w wydaniach specjalnych lub suplementach - **10,577**
- Liczba cytowań wg bazy ICI Web of Science - **12** (bez autocytowań)
- Indeks Hirscha wg bazy ICI Web of Science - **2**

D.P.