

Kriokonserwacja nasienia knura pełni istotną rolę we wprowadzaniu i zachowaniu pożądaných zasobów genetycznych pochodzących od samców o wybitnych wartościach rozrodczych. Skuteczność tej metody jest często ograniczona poprzez wyraźnie obniżoną zdolność zapładniającą kriokonserwowanych plemników. Optymalna przeżywalność plemników w procesie zamrażania zależy nie tylko od zastosowanej technologii, lecz także od indywidualnej podatności na kriouškodzenia. Na podstawie właściwości biologicznych plemników po procesie zamrażania-rozmrażania możliwa jest klasyfikacja przydatności nasienia knurów do kriokonserwacji. U knurów należących do różnych ras oraz linii genetycznych zaobserwowano istnienie dużych różnic międzyosobniczych w przydatności nasienia do wyżej wymienionej technologii. Wyżej omawiane zjawisko może mieć podłoże genetyczne. Dlatego głównym celem projektu będzie identyfikacja markerów genetycznych warunkujących przydatność nasienia do kriokonserwacji. Zadanie to będzie realizowane poprzez sekwencjonowanie transkryptomu plemnika (RNA-seq) z wykorzystaniem technologii NGS (Illumina). Technika RNA-seq umożliwi scharakteryzowanie transkryptomu plemników knurów rasy wielka biała polska (wbp), identyfikację komórkowo-specyficznych transkryptów oraz markerów genetycznych warunkującymi dobrą lub słabą przydatność ejakulatów do zamrażania. Uzyskane wyniki pozwolą na poszerzenie wiedzy w zakresie andrologii i będą stanowiły podstawę do przyszłego genetycznego doskonalenia knurów w zakresie cech reprodukcyjnych.

Materiał badawczy będzie stanowiło 296 ejakulatów pozyskanych przez okres 10 lat od 40 knurów rasy wbp. Wykorzystanie szerokiego spektrum wyznaczników właściwości biologicznych plemników takich jak: parametry ruchliwości (TMOT, PMOT), przeżywalność (test SYBR-14/PI), status mitochondriów (JC-1/PI) oraz integralność DNA (test kometowy), pozwoliły na wytypowanie 21 knurów cechujących się nasieniem o dobrej przydatności i 19 knurów o słabej przydatności do kriokonserwacji. Realizacja założeń projektu obejmuje szereg etapów przedstawionych w 4 zadaniach: i) izolacja RNA z plemników knura oraz procedury QC, ii) sekwencjonowanie transkryptomu plemników *Sus scrofa*, metodą NGS iii) Analiza bioinformatyczna zsekwencjonowanych transkryptomów plemników knurów rasy wbp oraz iv) walidacja genów o zróżnicowanej ekspresji (DE) i markerów SNP potencjalnie związanych z jakością nasienia po kriokonserwacji. Do izolacji całkowitego RNA z plemników zastosowana zostanie zmodyfikowana wersja metody TRIzol. Izolaty RNA plemników 3 knurów o dobrej i 3 osobników o słabej przydatności do kriokonserwacji, zostaną zsekwencjonowane techniką RNA-seq za pomocą aparatu NextSeq 500 (Illumina) a uzyskane wyniki zostaną poddane analizom bioinformatycznym. Walidacja różnic w poziomach ekspresji genów (qRT-PCR) oraz potwierdzenie występowania mutacji o charakterze SNP będą przeprowadzone na większej grupie zwierząt (n=40), co umożliwi identyfikację genów powiązanych z przydatnością nasienia do kriokonserwacji. Przewiduje się, że około 20 genów kandydujących zostanie poddanych szczegółowym analizom. Różnice w ekspresji na poziomie białek będą weryfikowane za pomocą techniki Western blot w celu potwierdzenia ich roli biologicznej w kriotolerancji plemników.

Zespoły naukowe w Polsce i za granicą, skupiają się zazwyczaj na prowadzeniu programów hodowlanych, z wykorzystaniem selekcji w oparciu o markery (MAS), geny (GAS), a ostatnio także o selekcję genomową (GS). Podstawowym celem projektu będzie identyfikacja markerów genetycznych warunkujących przydatność nasienia do kriokonserwacji oraz ich zastosowanie w programach doskonalenia rozrodu świń. Może to znaleźć zastosowanie w doskonaleniu technik kriokonserwacji nasienia knura oraz w ułatwieniu selekcji osobników o najwyższym potencjale reprodukcyjnym. Planowane jest zgłoszenie wytypowanych markerów typu EST i SNP do bazy NCBI, co przyczyni się ich upowszechnienia w programach hodowlanych. Ponadto, realizacja projektu może stanowić impuls do stworzenia regionalnych kriobanków nasienia. Uzyskane wyniki zostaną wykorzystane jako punkt wyjścia dla kolejnych projektów dotyczących kriokonserwacji nasienia innych gatunków zwierząt gospodarskich.