

Wykorzystanie biologii molekularnej w hodowli zwierząt

Czytanie z genomów



Prof. dr hab. Lech Zwierzchowski kieruje Zakładem Biologii Molekularnej IGZH PAN, jest specjalistą w zakresie biotechnologii zwierząt hodowlanych

LECH ZWIERZCHOWSKI
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Jastrzębiec
Polska Akademia Nauk
L.Zwierzchowski@ighz.pl

Buhajów kwalifikowanych do rozrodu nie będzie się już oceniać na podstawie wydajności mlecznej czy mięsnej potomstwa, ale ich własnego genotypu! To wielka rewolucja w hodowli zwierząt

Polimorfizm genów wynika z naturalnie powstających w trakcie ewolucji różnic sekwencji nukleotydów w materiale genetycznym organizmów żywych. Takie różnice powstają głównie wskutek mutacji i mogą wynikać z podstawienia pojedynczych nukleotydów (tzw. *single nucleotide polymorphism* - SNP), wypadnięcia lub wstawienia jednego lub kilku nukleotydów (*insertion/deletion* - InDel) albo ze zmiennej liczby powtórzeń krótkich sekwencji nukleotydów (*short tandem repeats* - STR). Dość wcześnie zwrócono uwagę, że zmienność sekwencji nukleotydów w DNA

lub sekwencji aminokwasów w białkach może być wskaźnikiem cech człowieka lub zwierząt, zarówno tych zewnętrznych: wyglądu, budowy, rozmiarów ciała, jak i wewnętrznych: przemian biochemicznych, tempa metabolizmu itp. W ten sposób powstało pojęcie markerów genetycznych.

Ocena MAS

Badania nad markerami genetycznymi cech produkcyjnych bydła i świń prowadzone są już od lat 50. XX wieku. Początkowo badaniom poddawano antygeny grupowe krwi, białka krwi i białka mleka. Słusznie przypuszczano, że na podstawie obecności różnych wariantów genetycznych białek będzie można przewidzieć predyspozycje zwierzęcia do wysokiej produkcji mleka, mięsa czy jaj. W latach 80. rozpoczęła się era badania DNA. Badając polimorfizm DNA, można analizować genotyp zwierząt bardzo młodych, genotyp białek mleka u buhajów, a nawet genotypować zarodki. Takie postępowanie znacznie przyspiesza wycenę buhajów kwalifikowanych do rozrodu. Nie trzeba już ich oceniać na podstawie wydajności mlecznej czy mięsnej potomstwa, ale ich

Genom bydła ma podobne rozmiary jak genom człowieka (około 3 mld par zasad) i zawiera podobną liczbę genów. Na zdjęciu krowa rasy hereford - L1 Dominette 0144, której genom zsekwencjonowano



Michael MacNeil, USDA

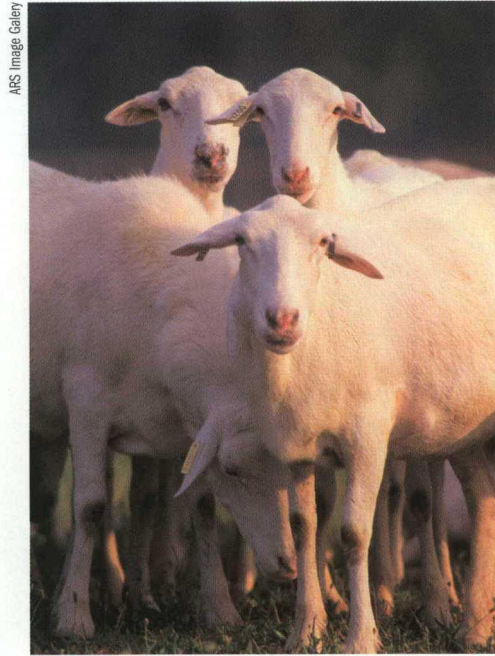
własnego genotypu. Na razie ocena wartości hodowlanej zwierząt MAS (*marker assisted selection*) mimo solidnych podstaw naukowych nie jest powszechnie stosowana.

Cechy ilościowe

Do lokalizacji i identyfikacji genów warunkujących cechy produkcyjne, np. użytkowość mleczną lub mięsna bydła, stosuje się dwie metody. W pierwszej, wykorzystując polimorfizm typu STR, mapuje się hipotetyczne QTL (*quantitative trait loci*), czyli położenie genów kodujących cechy ilościowe w genomie zwierzęcia. Na podstawie analizy sprzężeń z markerami genetycznymi zlokalizowano na różnych bydlęcych chromosomach kilkaset QTL wpływających na wydajność mleka, tłuszczu i białka oraz procentową zawartość tłuszczu i białka w mleku. Zmapowano także QTL dla innych cech produkcyjnych, np. mięsności i jakości mięsa u bydła i świń. Przypisując potencjalne QTL do coraz krótszych regionów chromosomowych, można ostatecznie przeprowadzić procedurę klonowania pozycyjnego danego genu, a następnie zidentyfikować w jego obrębie mutację kształtującą zmienność badanej cechy. Takie podejście pozwoliło na przykład na identyfikację mutacji Phe/Tyr w obrębie domeny transmembranowej receptora hormonu wzrostu bydła jako QTL o dużym efekcie na wydajność mleka i procentową zawartość tłuszczu. W drugiej metodzie identyfikacji markerów cech ilościowych ocenia się wpływ polimorfizmu tzw. genów kandydujących na fenotypową wartość określonych cech ilościowych. Badania takie dotyczą genów o znanej sekwencji nukleotydowej i zdefiniowanym udziale w regulacji procesów biochemiczno-fizjologicznych kształtujących określoną cechę.

Podwójne umięśnienie

Jednym z najbardziej efektywnych osiągnięć genomiki bydła było wykrycie „funkcjonalnych” mutacji w genie miostatyny, która jest inhibitorem wzrostu i różnicowania mięśni. Niektóre z tych mutacji powodują powstanie przedwczesnych kodonów „stop” lub przesunięcie ramki odczytu i powstanie skróconego, nieaktywnego białka. Prowadzi to do przerostu mięśni – tzw. fenotyp podwójnego umięśnienia (*double muscled cattle*). U owiec Textel mutacja w genie miostatyny tworzy miejsce przyłączenia mikroRNA (odpowie-



Funkcjonalna genomika zwierząt jest prężnie rozwijającą się dziedziną. Na zdjęciu owce St. Croix, które wykazują odporność na pasożyty i tolerancję na wysokie temperatury

dzialnego za regulację procesów produkcji białek), co prowadzi do zahamowania tworzenia miostatyny. Nazwa owiec Callipyge, u których mutacja w genie *DLK-1* prowadzi do przerostu mięśni, oznacza (po grecku) „piękne pośladki” – rozrost mięśni dotyczy głównie części zadniej zwierzęcia.

Geny białek mleka

Uznanyymi markerami cech produkcji mlecznej składu i jakości mleka krów są geny kodujące białka mleka – kazeiny, białka serwatki. W latach 50. badano związek polimorfizmu białek mleka z cechami produkcyjnymi bydła. Dziś bada się polimorfizm genów kodujących te białka. Badania prowadzone przez wiele lat w wielu ośrodkach naukowych wykazały, że polimorfizm kazeiny κ bydła jest związany z szybkością koagulacji mleka pod wpływem podpuszczki. Jest więc doskonałym markerem jakości mleka jako surowca do produkcji serów. Polimorfizm genu β -laktoglobuliny jest związany z wydajnością mleczną krów i składem białek mleka. Z kolei polimorfizm genów laktoferyny i lizozymu wiąże się z odpornością krów na zapalenie wymienia (mastitis), a niektóre warianty genu kazeiny β bydła kodują białko, którego spożywanie może być przyczyną cukrzycy i chorób układu krążenia u ludzi.

U kóz polimorfizm kazeiny α S1 wpływa na zawartość kazeiny α w mleku. Wykryto kilkanaście wariantów genu kazeiny α S1 kozy

Wykorzystanie biologii molekularnej w hodowli zwierząt

Producenci mięsa wieprzowego i wołowego we współpracy z ośrodkami naukowymi zidentyfikowali już wiele markerów genetycznych pozwalających na wczesne monitorowanie cech mięsności bydła i świń



AIS Image Gallery

- A-F i 0. Warianty „silne” - A, B, C - warunkują dużą zawartość kazeiny α w mleku. Warianty „słabe” - E, F - małą zawartość kazeiny α . Wariant 0 - całkowity brak tej kazeiny w mleku kóz. Polimorfizm genu kazeiny α S1 istotnie wpływa na jakość mleka wykorzystywanego do produkcji serów. We Francji rutynowo wykonuje się identyfikację tego białka w hodowli.

Markery jakości mięsa

Nadprodukcja żywności spowodowała, że w krajach rozwiniętych coraz większą wagę przywiązuje się nie do ilości, lecz do jakości produktów pochodzenia zwierzęcego. Producenci mięsa wieprzowego i wołowego we współpracy z ośrodkami naukowymi pilnie poszukują markerów genetycznych pozwalających na wczesne monitorowanie cech mięsności i jakości mięsa bydła i świń. Wiele takich markerów już zidentyfikowano. Są to w większości geny związane ze wzrostem i różnicowaniem tkanki mięśniowej (z syntezą lub degradacją białek mięśniowych). Geny kodujące enzymy szlaków proteolitycznych mięśni, np. *CAST*, *CATB* i *CAPN2S*, wydają się obiecującymi markerami jakości wołowiny, a polimorfizm odpowiednich genów *RYR1*, *PRKAG3*, *PKM2*, *GLUT4*, *MYOG* może być wskaźnikiem jakości wieprzowiny. Dla cech otluszczenia zwierząt ważnymi markerami są geny leptyny (*LEP*) - białka odgrywającego rolę w regulacji pobierania pokarmu i gospo-

darki energetycznej organizmu i jej receptora, a także geny melanokortyny (*MC4R*) - hormonu zaangażowanego w regulację pobierania pokarmu - i rodzina genów białek wiążących kwasy tłuszczowe (*FABP*).

Zsekwencjonowany genom krowy

Znane są już całe genomy człowieka, szympansa, myszy, szczura, kury, bydła, psa, konia, kota i oposa. Sekwencjonowanie genomu świni zostanie przypuszczalnie zakończone w 2010 roku. Sekwencjonowanie genomu bydła - krowy rasy hereford - L1 Dominette 0144 zaczęto w 2003 roku. W 2006 r. genom został zsekwencjonowany 7,1-krotnie. Taka „krotność” wskazuje na dokładność sekwencjonowania. Genom bydła ma podobne rozmiary jak genom człowieka (około 3 mld par zasad) i zawiera podobną liczbę genów.

Bada się różne fragmenty genomów - sekwencje kodujące genów, sekwencje regulatorowe, niekodujące, cDNA i inne. Są one deponowane w odpowiednich bazach danych, np. GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) i ogólnie dostępne, co umożliwia ich wykorzystanie w pracach nad polimorfizmem genów.

Poznanie sekwencji całych genomów nie rozwiązuje sprawy oddziaływania genów i ich zmienności na cechy fenotypowe organizmów, w tym związane z produkcją zwierzęcą. Uczeni zainteresowali się więc funkcjonowaniem genomów. Nowa dziedzina

wiedzy – genomika funkcjonalna – obejmuje zjawiska związane z ekspresją genów: transkrypcją (syntezą informacyjnego RNA), translacją (syntezą białek), a także przemianami metabolitów związanych z funkcjonowaniem genów. Badane są funkcje różnych sekwencji genomowych przy zastosowaniu nowoczesnych metod molekularnych: transkryptomiki, proteomiki, metabolomiki.

Doskonalenie mięsa i mleka

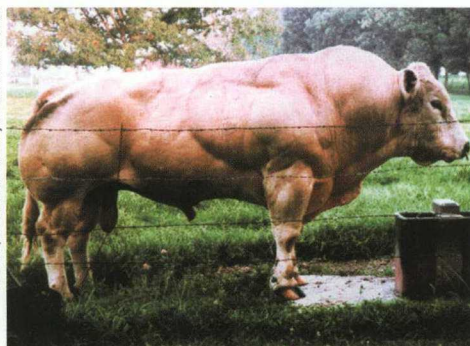
W Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu pod Warszawą prowadzimy badania nad wykorzystaniem genomiki do doskonalenia cech produkcyjnych i funkcjonalnych bydła oraz jakości produktów zwierzęcych. Nasze badania oparte są na założeniu, że polimorfizm genów – substytucje lub delecje/insercje nukleotydów – mogą wpływać na poziom ich ekspresji lub funkcje kodowanych białek, a zwierzęta o wyraźnie różniące się użytkowości, np. mięsnej i mlecznej, różnią się profilem ekspresji genów tkankowo specyficznych. Poszukiwanie genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję u zwierząt różnych ras, różniących się genotypem czy potencjałem produkcyjnym, może doprowadzić do uzyskania nowych sposobów wykorzystania markerów genetycznych w hodowli i selekcji zwierząt gospodarskich. Wykryliśmy kilkadziesiąt nowych polimorfizmów w genach kandydujących na markery cech wydajności i jakości mięsa i mleka u bydła. Udowodniliśmy związek niektórych polimorfizmów w rejonach kodujących i regulatorowych genów bydła z cechami wydajności mleka, mięsa, tuszy, a także z cechami związanymi z rozrodem i zdrowiem wymion. Poszukiwaliśmy też molekularnych mechanizmów oddziaływania polimorfizmu genów na cechy fenotypowe zwierząt. Nasze najciekawsze badania dotyczą transkryptomiki bydła. Podstawowe pytanie funkcjonalnej genomiki zwierząt gospodarskich brzmi: które geny podlegają ekspresji i w jakim stopniu ta ekspresja zmienia się u zwierząt charakteryzujących się różną wydajnością i jakością mięsa lub mleka? Porównaliśmy poziom ekspresji w tkankach i narządach buhajków czterech ras bydła znacznie różniących się wydajnością i jakością produkowanej wołowiny, a także wydajnością mleczną – mlecznej rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, polskiej czerwonej, lokalnej rasy bydła o podwójnym użytkowaniu mięsno-mlecznym oraz typowych mięsnych

ras – limousin i hereford. Wykorzystanie mikromacierzy ekspresyjnych pozwoliło na jednoczesną analizę ekspresji kilku tysięcy genów w wątrobie lub mięśniach buhajków. Znaczne różnice profilu transkryptomicznego były związane z rasą lub typem produkcyjnym bydła. Istotne różnice poziomu ekspresji genów pomiędzy rasami dotyczyły od kilkudziesięciu do kilkuset genów, w tym wielu o kluczowym znaczeniu dla kształtowania się cech. Wytypowaliśmy kilka genów, których zróżnicowana ekspresja może determinować określone cechy produkcyjne. Są one obecnie testowane na dużych populacjach bydła.

Narzędzia jutra

Mogłoby się wydawać, że ogromny postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w badaniach markerów genetycznych i w funkcjonalnej genomice zwierząt gospodarskich, sprawi, że ich wyniki znajdą praktyczne zastosowanie, a hodowcy masowo zaczną wykorzystywać analizę DNA do selekcji i doskonalenia bydła, świń i drobiu. Niemal co dzień identyfikowane są nowe mutacje o potencjalnym znaczeniu genetycznych markerów cech produkcyjnych zwierząt. Większość z nich jest patentowana. Pojawiły się nowe narzędzia – mikromacierze SNP – pozwalające na równoczesną analizę setek tysięcy mutacji u jednego zwierzęcia. Jednak do powszechnego zastosowania selekcji zwierząt opartej na MAS jest jeszcze dość daleko. Analiza DNA jest nadal dość kosztowna, a hodowcy w dalszym ciągu nie są przekonani, czy zastosowanie selekcji wspomaganą markerami przyniesie im realne korzyści finansowe. ■

© 1997, The National Academy of Sciences of the USA



Jednym z najbardziej efektywnych osiągnięć genomiki bydła było wykrycie „funkcjonalnych” mutacji w genie miostatyny. Zdjęcie przedstawia buhaja rasy blue belgian z przerostem mięśni (*double muscled*) z mutacją *nt821(del11)* w genie miostatyny

Chcesz wiedzieć więcej?

Zwierzychowski L., Świtoński M. (Red.). (2009). *Genomika bydła i świni*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego.