

Wykorzystanie markerów SNP w hodowli bydła

Stanisław Kamiński

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Współczesne programy hodowlane zwierząt gospodarskich korzystają z teorii dziedziczenia cech ilościowych, według której cechy użytkowe są uwarunkowane działaniem wielu hipotetycznych genów, których efekty działania sumują się i w określonym środowisku kształtują poziom ocenianej cechy. Choć podejście to zawoocowało w ostatnich 50 latach ogromnym postępem w hodowli podstawowych gatunków zwierząt, w ostatnich dwóch dekadach obserwujemy próby odpowiedzi na pytanie: co kryje się za tymi hipotetycznymi genami? Gdzie w genomie i jakie konkretne geny warunkują zmienność genetyczną cech użytkowych, będących obiektem doskonalenia w programach hodowlanych zwierząt gospodarskich? Ewolucję osiągnięć na tym polu najlepiej obrazują wyniki badań genetycznych bydła mlecznego, a w szczególności historia odkrywania i praktycznego zastosowania jednonukleotydowych polimorfizmów (ang. Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs).

Bezpośrednią przyczyną tego typu polimorfizmu genetycznego są zmiany sekwencji nukleotydowej DNA, przy czym najczęściej mają one charakter zamiany jednego nukleotydu na drugi, rzadziej delecji lub insercji. Skutki, jakie mutacje te mogą wywoływać w produkcji genu, czyli białku, mogą być bardzo rozmaite: od nieistotnych (mutacje ciche) poprzez takie, które powodują zamianę aminokwasów (mutacje typu missense), aż po te, które prowadzą do dysfunkcji białka (mutacje nonsensowne). Odrębną grupę stanowią mutacje występujące w obrębie sekwencji regulacyjnych genu, tj. w promotorach, sekwencjach wzmacniających (tzw. enhancerach) i wyciszających (silencerach) transkrypcję, sekwencjach składania egzonów czy innych funkcjonalnych miejscach genu (np. alternatywne promotory czy enhancery zlokalizowane w intronach). Te z kolei mogą mieć wpływ na poziom ekspresji genu, a więc na zmiany ilościowe produktu genu. Reasumując można stwierdzić, że SNP-y stanowią bardzo zróżnicowaną grupę zmian w sekwencji DNA, która jest w stanie tłumaczyć zarówno zmiany strukturalne, jak i zmiany ilościowe białek, a zatem także zmienność genetyczną cech złożonych, na które składają się efekty działania wielu białek. To właśnie z tego powodu SNP-y nieustannie były w centrum zainteresowania genetyków, a słowo „polimorfizm” było i jest jednym z najczęściej występujących w tytułach prac z zakresu genetyki.

„Kariera” SNP-ów ma swoje początki w badaniach nad występowaniem strukturalnych wariantów białek w czasach, kiedy główną metodą wykrywania genetycznej natury zmienności białek była ich elektroforeza i analiza ich dziedziczenia w rodzinach. Już w latach 50. XX wieku identyfikowano „elektroforetyczne” warianty niektórych białek, a dzięki śledzeniu ich dziedziczenia w obrębie rodzin, określano je mianem genetycznych wariantów białkowych.

Jednak dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej, od połowy lat 80. XX wieku pole eksploracji zostało przeniesione z białek na DNA i taki stan trwa do dzisiaj.

Przejście z badań białek na DNA stało się szczególnie cenne w przypadku tych genów, których ekspresja jest zależna od płci. Dobrym przykładem jest tutaj gen kappa-kazeiny, którego warianty zaczęto oznaczać w DNA buhajów, także w Polsce [6], co dzięki inseminacji dało szansę na szybkie rozprzestrzenienie pożądanego allelu w populacji. Buhaje w Polsce nadal są badane na nosicielstwo wariantów kappa-kazeiny, co publikowane jest w katalogach buhajów krajowych (Bydgoszcz, Łowicz, Krasne) i zagranicznych (Genetyka Holenderska) centrów hodowlanych.

Dużo większe praktyczne zastosowanie znalazło odkrycie w sekwencji DNA mutacji wywołujących defekty genetyczne, semiletalne lub letalne (Baza OMIA – Online Inheritance of Animals).

Klasyczna metoda krzyżówki wstecznej pozwalała na identyfikację nosicieli niepożądanych mutacji z dużym opóźnieniem, aż do pojawienia się pokolenia F_2 . Bezpośrednie wykrywanie mutacji w DNA pozwalało skutecznie wykrywać nosicieli (a więc osobniki zdrowe, przy założeniu autosomalnego recesywnego dziedziczenia). W ten właśnie sposób ograniczono lub wyeliminowano nosicieli defektów DUMPS i BLAD z populacji bydła HF w wielu krajach, w tym w populacji polskiego bydła mlecznego [1, 5, 7]. W przypadku defektu CVM, śladem innych krajów, w Polsce w zasadzie oczyszczono populację bydła HF z mutacji wywołującej tę chorobę [9]. Najnowszy defekt – Brachyspina – jest obecnie w trakcie programu identyfikacji pierwszych nosicieli. Spośród stawki 71 buhajów wykryto 8 nosicieli (Kamiński i Ruś, 2015, w opracowaniu).

Mimo licznych badań nad znalezieniem mutacji w pojedynczych genach, które istotnie kształtują zmienność cech użytkowych u bydła mlecznego, jedynym wybitnym osiągnięciem okazało się odkrycie SNP w obrębie genu DGAT (acylotransferazy diacyloglicerlu CoA), odpowiedzialnego za ok. 45% zmienności genetycznej zawartości tłuszczu w mleku [2].

Preludium do prawdziwej kariery markerów typu SNP stała się nowa technologia zwana mikromacierzami. To nowe techniczne narzędzie dawało możliwość jednoczesnego badania setek, a nawet tysięcy SNP-ów [3]. Zespół z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, jako jeden z pierwszych na polu badań genetycznych zwierząt gospodarskich wykorzystał tę szansę, projektując wspólnie z firmą biotechnologiczną AsperBiotech mikromacierz niskiej gęstości MilkProtChip, zawierającą 75 SNP-ów o udowodnionym lub potencjalnym związku z biosyntezą białek mleka [4]. Nasze próby, choć w miniskali, bezpośrednio poprzedziły boom na mikromacierze SNP, jaki nastąpił po roku 2009. W tym właśnie roku opublikowano pełną sekwencję genomu bydła [11]. Oprócz wartości poznawczych, odkrycie to ujawniło obecność setek tysięcy SNP-ów równomiernie rozproszonych w całym genomie. Wówczas zauważono, że SNP-y mogą doskonale pełnić rolę markerów minisegmentów chromosomów, bez przypisywania im roli mutacji sprawczych. Jednocześnie firmy Affymetrix i Illumina opracowały technologie mikromacierzy wysokiej gęstości, zdolne do jednoczesnego genotypowania setek tysięcy SNP-ów. Obecnie firma Illumina jest dominującym producentem mikromacierzy wysokiej gęstości dla bydła, zawierającym od 7000 do 777 000 markerów SNP (www.illumina.com). Pojawienie się tego nowego narzędzia badawczego pozwoliło na skanowanie całego genomu i określenie efektu niewielkich fragmentów każdego z chromosomów, reprezentowanego przez określony SNP. Jeśli w pobliżu SNP leżał gen wpływający na poziom cechy użytkowej oznaczało to, że marker SNP i ów nieznany gen powinny się razem dziedziczyć. Dzięki temu markery pozwalały na oszacowanie wartości genetycznej różnych cech. Opracowanie matematycznej metody szacowania addytywnych efektów tych markerów dla cech użytkowych bydła [8], doprowadziło do stworzenia zupełnie nowej metody przewidywania wartości genetycznej, zwanej dzisiaj powszechnie oceną genomową. To dzięki temu wdrożeniu, SNP-y (nazywane w żargonie „snip”) stały się rozpoznawalne nie tylko wśród naukowców, ale także wśród hodowców. W ślad za USA i Kanadą przodujące w hodowli bydła kraje europejskie, takie jak Holandia, Francja czy Niemcy, już w 2010 roku zdecydowały się na wdrożenie oceny genomowej do praktyki hodowlanej i w ten sposób ta nowa metoda zagościła na stałe w rutynowej ocenie wartości hodowlanej bydła. Liderzy hodowli na świecie uznali, że korzyści płynące z możliwości bardzo wczesnej oceny buhajów, nawet z niższą dokładnością, są większe niż koszty oczekiwania na ocenę buhajów na podstawie wydajności ich córek. Także wczesna ocena jałówek, w celu bardziej trafnej selekcji, zwłaszcza dawczyń zarodków – stała się w ostatnich 3 latach rutynową praktyką w najlepszych stadach zarodowych. Ta rewolucyjna zmiana jest już faktem nieodwracalnym i zaakceptowanym przez hodowców w wielu krajach. Przełomowy charakter wdrożenia oceny na podstawie SNP-ów porównuje się do wprowadzenia inseminacji w latach 60. XX wieku, dzięki której dokonano spektakularnego skoku w poziomie produkcji bydła mlecznego, a bez której nie można sobie wyobrazić współczesnej hodowli.

Ocena genomowa zaistniała także w Polsce. Bezpośrednie prace naukowe były poprzedzone utworzeniem w 2004 roku Polskiego Banku DNA Buhajów w Katedrze Genetyki Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, finansowanego w całości przez Stację Hodowli i Unasienniania Zwierząt w Bydgoszczy. Próbkę DNA zgromadzone od ponad 1200 buhajów pozwoliły na uruchomienie projektu badawczego w ramach Konsorcjum MASinBULL (Marker Assisted Selection in Bulls), koordynowanego przez Katedrę Genetyki Zwierząt UWM w Olsztynie, przy współpracy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (prof. Joanna Szyda) oraz Instytutu Zootechniki w Balicach, projektu także finansowanego przez SHiUZ w Bydgoszczy. W ramach konsorcjum stworzono pierwszą populację referencyjną, stanowiącą ponad 2600 buhajów mających tradycyjną ocenę wartości hodowlanej w Polsce i jednocześnie zgenotypowanych mikromacierzą zawierającą 54 000 SNP-ów. Same obliczenia genomowej wartości hodowlanej buhajów [10] przeszły pozytywną weryfikację przez organizację INTERBULL już w 2010 roku. Dzięki pracy konsorcjum MASinBULL, Polska znalazła się w elitarniej grupie zaledwie 9 państw, które przeszły pierwszy test walidacyjny, potwierdzający poprawność obliczeń i ich odpowiednią jakość. W końcu listopada tego roku INTERBULL wydał pozytywną rekomendację dla krajowych ocen genomowych (w tym dla Polski), co skutkowało decyzją UE o oficjalnym uznaniu oceny genomowej, jako równoprawnej do oceny na podstawie potomstwa. Warunkiem było osiągnięcie dokładności oceny na poziomie 50% dla cech produkcyjnych. Poziom ten został osiągnięty w polskim programie genomowym już w 2011 roku, a obecnie kształtuje się na poziomie 65%.

Perturbacje prawne spowodowały, że w Polsce dopiero od sierpnia 2014 roku młode buhaje tylko z oceną genomową mogą być dopuszczone do inseminacji jako dawcy nasienia. Hodowcy mogą zatem korzystać z nasienia najnowszej generacji buhajów, bez oczekiwania na potwierdzenie ich wartości genetycznej na podstawie potomstwa. Jest to swoista rewolucja i u części hodowców może budzić niepewność. Jedynym czynnikiem, który może wzbudzać wahanie hodowców jest nieco niższa dokładność polskiej oceny genomowej od dokładności oceny buhajów z Holandii, Francji czy Niemiec. Różnice te dla cech produkcyjnych sięgają kilku procent. Musimy jednak zwrócić uwagę, że różnica ta może być zminimalizowana przez fakt, że w ocenie polskiej uwzględniona została specyfika środowiska (żywienie, utrzymanie, dobrostan *etc.*), w jakim oceniane były córki buhajów wchodzących w skład tzw. krajowej populacji referencyjnej. Populacja ta stanowi jądro oceny genomowej, gdyż służy do szacowania wpływu markerów genetycznych na poziom badanych cech. A wpływ ten zależy nie tylko od DNA, ale także od jego interakcji z warunkami środowiska, w którym córki i krewni buhaja funkcjonują. Tutaj należy upatrywać atutu krajowych ocen genomowych i zachować odpowiedni dystans w konfrontowaniu ich z ocenami buhajów z innych krajów. Drugim elementem, który wpłynie na podniesienie

dokładności oceny genomowej będzie powiększenie populacji referencyjnej buhajów o buhaje udostępnione Polsce przez inne kraje. Dzięki działalności Konsorcjum MASinBULL, Polska stała się członkiem Konsorcjum EuroGenomics (Francja, Holandia, Niemcy, kraje skandynawskie, Hiszpania, Polska) i zyskała prawo do wymiany wyników badań DNA buhajów, co wkrótce powinno doprowadzić do znaczącego zwiększenia dokładności krajowej oceny genomowej.

SNP-y wdzierają się także na arenę kontroli pochodzenia u bydła. Powszechnie dotychczas stosowane sekwencje mikrosatelitarne mają być zastąpione „snipami”. Wynika to z upowszechnienia ocen genomowych i chęci połączenia w ramach jednego badania obu celów: oceny wartości genetycznej i kontroli pochodzenia, co wydaje się bardziej opłacalne i technicznie prostsze. Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG) przeprowadziło pierwsze testy porównawcze, w którym wzięło udział 25 laboratoriów, w tym Laboratorium Genomiki Zwierząt SHiUZ w Bydgoszczy, umieszczone przy Katedrze Genetyki Zwierząt UWM w Olsztynie. Należy oczekiwać, że ze względów ekonomicznych, w najbliższych kilku latach mikromacierze będą służyły do jednoczesnego badania wartości hodowlanej, poprawności rodowodu i nosicielstwa defektów genetycznych.

Kariera jaką przeszły SNP-y w genetyce i hodowli bydła pokazuje, jak osiągnięcia technologiczne (mikromacierze) i odkrycia poznawcze (sekwencjonowanie genomu), umiejętnie połączone, mogą doprowadzić do rewolucyjnej zmiany w całej hodowli bydła. Ukazują także, jak odrębnie rozwijane gałęzie genetyki (populacyjna i molekularna) znalazły punkt zbieżny, w postaci nowego systemu oceny genomowej wartości hodowlanej. Jednocześnie jednak rozkład efektów markerów SNP dla prawie wszystkich cech użytkowych bydła ujawnił, że niezwykle rzadkością są pojedyncze geny o bardzo dużym wpływie na tak złożone cechy, jakimi są cechy ilościowe. Zasadą jest raczej, że na takie cechy jak wydajność mleczna czy liczba komórek somatycznych w mleku składają się małe efekty tysięcy genów.

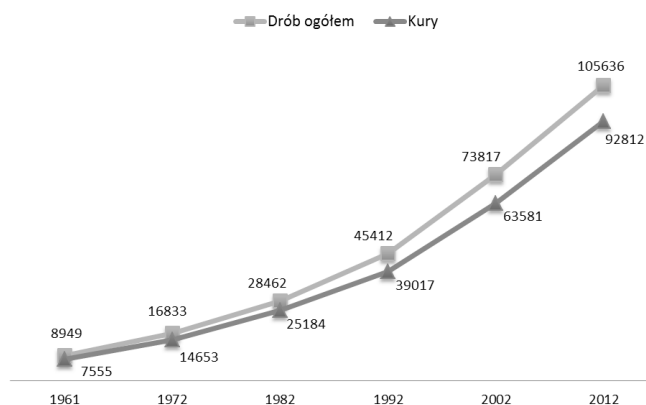
Literatura: 1. Czarnik U., Grzybowski G., Kamiński S., Prusak B., Zabolwicz T. 2007 – J. Appl. Genet. 48 (4), 375-377. 2. Grisart B., Coppiepers W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Mni M., Reid S., Simon P., Spelman R., Georges M., Snell R. 2002 – Genome Res. 12, 222-231. 3. Kamiński S., 2002 – J. Appl. Genet. 43(2), 123-130. 4. Kamiński S., Ahman A., Ruś A., Wójcik E., Malewski T., 2005 – J. Appl. Genet. 46 (1), 45-58. 5. Kamiński S., Czarnik U., 1997 – J. Appl. Genet. 38(1), 51-55. 6. Kamiński S., Figiel I., 1993 – Pol. Genet. 34(1), 65-72. 7. Kamiński S., Grzybowski G., Prusak B., Ruś A. 2005 – J. Appl. Genet. 46(4), 395-397. 8. Meuwissen T.H., Hayes B.J., Goddard M.E. 2001 – Genetics 157(4), 1819-1829. 9. Ruś A., Hering D., Puckowska P., Barcewicz M., Kamiński S., 2013 – Pol. J. Vet. Sci. 16 (3), 579-581. 10. Szyda J., Żarnecki A., Suchocki T., Kamiński S., 2011 – J. Appl. Genet. 52, 363-366. 11. Zimin A.V., Delcher A.L., Florea L., Kelley D.R., Schatz M.C., Puiu D., Hanrahan F., Pertea G., Van Tassel C.P., Sonstegard T.S., Marçais G., Roberts M., Subramanian P., Yorke J.A., Salzberg S.L., 2009 – Genome Biol. 10 (4), R42.

Genetyczne doskonalenie drobiu – sukces i co dalej?

Tomasz Szwaczkowski

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Drobiarstwo należy do jednej z najprężniej rozwijających się gałęzi produkcji zwierzęcej, zarówno w skali globalnej, jak i wielu krajów, abstrahując od ich położenia geograficznego. Potwierdza to dynamika wzrostu produkcji brojlerów (rys. 1). Dane przedstawione na rysunku dotyczą tylko mięsa brojlerów kurzych. Jednak z drugiej strony, w niektórych rejonach świata udział mięsa pochodzącego od innych gatunków drobiu (szczególnie mięsa indyczego i kaczego) jest znaczny.



Rys. 1. Wielkość produkcji mięsa drobiowego (ogółem) i mięsa kurczego na świecie (w tys. ton), wg FAOSTAT [6]