

## Poglavje 3

# Molekularne metode v selekciji prašičev

Tina Flisar <sup>1,2</sup>, Špela Malovrh <sup>1</sup>, Milena Kovač <sup>1</sup>

### Izvleček

V prispevku želimo prikazati uporabo molekularne genetike v selekciji prašičev. Uporabimo lahko informacije tako kodirajočih, kot tudi nekodirajočih delov dednega materiala. Zanimajo nas spremembe v kodirajočem delu genoma, ki spremenijo izražanje gospodarsko pomembnih lastnosti, kot npr. mesnatost, plodnost, kakovost mesa in odpornost proti boleznim. Najpogostejša aplikacija molekularne genetike v prašičereji je genski test za RYR1 gen. S testom odkrivamo živali, ki so dovzetne za prašičji stresni sindrom. Mikrosatelite uporabljamo za preverjanje porekla, sledljivost proizvodov in vrednotenje genetske pestrosti. Do razlik med osebki pride zaradi mutacij v številu ponovitev. Nove tehnike v genetiki prinašajo nove informacije, za katere moramo poiskati način, kako jih kar najbolje izkoristiti v selekciji domačih živali. Kljub temu, da je znano nekaj rutinskih genskih analiz v prašičereji, v genetiki ostaja izziv najti oz. določiti take gene, ki imajo velik učinek na proizvodne lastnosti.

Ključne besede: prašiči, molekularna genetika, selekcija

### Abstract

Title of the paper: **Application of molecular genetics in pig breeding.**

The purpose of the paper is to present possibilities of molecular genetics application in pig breeding. The information from coding and noncoding sequences of genome can be used in selection. The main interest is focused in differences in coding sequences, which are expressed in economical important traits, such as leanness, reproduction traits, meat quality, and diseases resistance. The most frequently used genetic test in pigs is test for the RYR1 gene. Stress susceptible animals are identified. Microsatellites are used for parentage testing, traceability, and assessment of genetic diversity. Differences between individuals are caused by mutations in number of repetitions. New methods in molecular genetic contribute information which could be utilized by pig breeding programs. The challenge to find genes with large effect on performance traits remains despite of some regular genetic tests used.

Keywords: pigs, molecular genetics, animal breeding

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale

<sup>2</sup>E-pošta: tina@mrcina.bfro.uni-lj.si

### 3.1 Uvod

Na lastnosti, od katerih je odvisna prireja, ima vpliv tako okolje kot tudi genotip. Kot vpliv okolja mislimo predvsem na tehnologijo reje, kot vpliv genotipa pa mislimo na dedni material, ki ga deduje osebek po starših. Za selekcijo domačih živali izkoriščamo genetske razlike med živalmi. Večina genetskega napredka v živinoreji je bilo opravljenega na osnovi kvantitativnih metod, s katerimi izračunamo agregatni genotip iz fenotipskih meritev. Kljub opaznemu genetskemu napredku, pa nam spremenjena porazdelitev lastnosti predstavlja problem za odbiro živali (Malovrh in Kovač, 2000). Dodatno lahko v selekcijske programe vključujemo tudi molekularno tehnologijo. Informacije, ki jih dobimo s pomočjo molekularnih metod, v Sloveniji v selekcijo prašičev vključujemo od leta 1994 (Šalehar in sod., 1998).

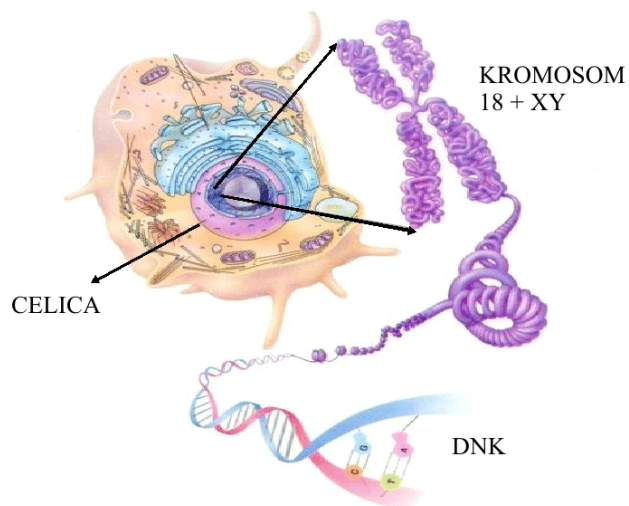
Razvoj molekularne genetike nam omogoča vpogled v strukturo genoma prašičev in nam pomaga razumeti procese v organizmu. Dandanes poznamo več dejavnikov, ki vplivajo na proizvodne lastnosti. Razliko v prireji povzročajo, poleg tehnologije, tudi spremembe v dednem materialu. Poznavanje sprememb v dednem materialu, ki se odražajo v kvantitativnih lastnostih, omogoča direktno odbiro na želeni genotip živali. Velik napredek je bil na področju genetike dosežen v zadnjih 20 letih. Leta 1990 je bilo pri prašiču na genetski mapi določenih le 50 genov, dandanes pa poznamo več kot 5 000 regij z več kot 4 000 geni. Take regije imenujemo lokusi.

Cilj tega prispevka je prikazati možnosti uporabe molekularne genetike v selekciji prašičev ter nakazati možnost vključevanja informacij iz molekularne genetike v napoved plemenske vrednosti prašičev.

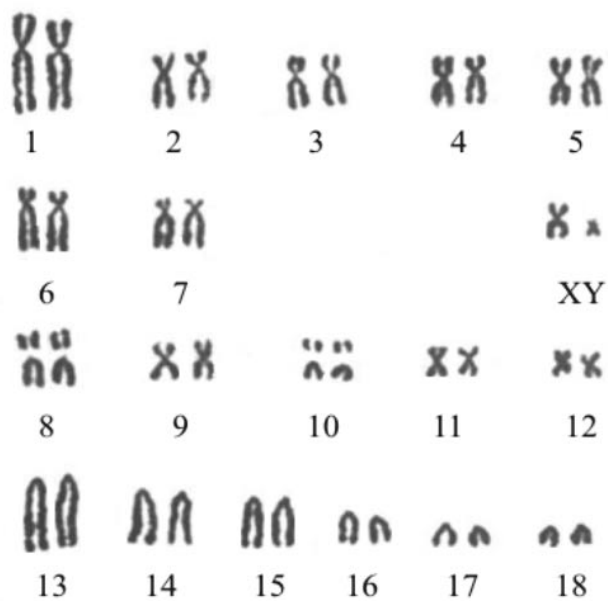
### 3.2 Dedni material in vpliv na lastnosti

Dedni material, ki ga imenujemo deoksiribonukleinska kislina (DNK), je shranjen v jedru celic (slika 1). Število kromosomov se med vrstami razlikuje. Udomačeni prašiči imajo 38 kromosomov, kateri so v parih, razen dveh, ki se imenujeta spolna kromosoma (slika 2). Število kromosomov pri divjem prašiču pa znaša 36 ali 38 kromosomov. Genom domačega prašiča torej sestavlja 18 parov avtosomalnih kromosomov in dva spolna kromosoma.

DNK je sestavljena iz več kot tri milijarde sestavnih delov, ali pa, da si bomo bolj predstavljali, iz tri milijarde črk. Razlike med osebki povzročajo razlike v zaporedju sestavnih delov oz. črk. Zmotno je mišljenje, da DNK sestavljajo le geni. Nasprotno, genov je manj kot 5 %, funkcionalnih pa celo manj kot 3 %. Kar 63 % DNK je medgenske, od tega so za nas uporabne ponovitve DNK, ki so med osebki zelo različne in jih imenujemo mikrosateliti. Funkcionalne vloge mikrosatelitov še ne poznamo, vemo pa, da je število mutacij veliko prav zaradi tega, ker ne kodirajo genov in niso pomembni za življenjske funkcije celice. In prav zato, ker se med osebki zelo razlikujejo, jih uporabljamo za preverjanje starševstva, vrednotenje genetske pestrosti populacije, za preverjanje sledljivosti živalskih proizvodov, itn.



Slika 1: Živalska celica



Slika 2: Kromosomi pri prašiču

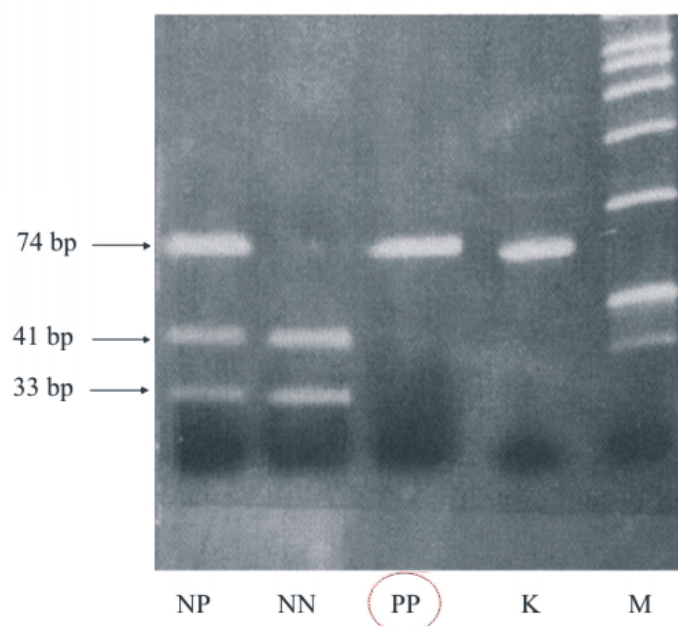
Lastnosti delimo na dve skupini glede na način dedovanja ter naravo lastnosti. Prva skupina so kvalitativne lastnosti, na katere vpliva eden ali nekaj genov, okolje pa na lastnost ne vpliva. Take lastnosti so npr. barva oči, odpornost proti nekaterim boleznim. Takih lastnosti je v prašičereji zelo malo. Ena od njih je tudi dovzetnost oz. odpornost na stres, ki jo bomo omenili v nadaljevanju, saj je genski test za RYR1 gen ena izmed najuporabnejših aplikacij v prašičereji. Druga skupina lastnosti so kvantitativne lastnosti in nanje vpliva veliko število genov, za večji del variabilnosti pa je odgovorno tudi okolje. Sem spada večina lastnosti, pomembnih v prašičereji (npr. mesnatost, vsebnost intramuskularne maščobe, hitrost rasti).

Vendar pa imajo npr. na mesnatost geni različno velike učinke. Ločimo gene z velikim učinkom (major geni) in z majhnim učinkom (minor geni). Tako nam v genetiki ostaja izziv določiti tiste gene, ki pojasnijo velik delež variabilnosti. Večina raziskovalnih študij je torej usmerjena v iskanje oz. določanje genov z velikim učinkom na plodnost, hitrost rasti, izkoriščanje krme, mesnatost, kakovost mesa, od katerih so še posebno zanimive tiste, ki so povezane s sočnostjo in okusnostjo mesa, torej barva, pH mesa, sposobnost za vezanje vode ter vsebnost intramuskularne maščobe.

### 3.3 Aplikacije v prašičereji

Kot smo že omenili, je najpogostejša aplikacija v selekcijskih programih genski test na sindrom maligne hipertermije (SMH). S testom odkrijemo prašiče, ki so dovzetni za prašičji stresni sindrom in na dejavnike stresa reagirajo z znaki maligne hipertermije (tresenje, togost mišic, povečanje telesne temperature, ...), kar pa se odraža v kakovosti mesa, saj je meso takih živali blede, mehko in vodeno. Ozadje te bolezni je genetsko. Odgovoren je gen RYR1, znan tudi kot Hal gen, imenujejo ga pa tudi CRC1. Dovzetnost za stres povzroča sprememba nukleotidnega zaporedja. Če tako spremembo z genskim testom zaznamo, jo označimo kot alelo P, v primeru, ko pa ni spremembe zaporedja, pa alelo označimo s črko N. Alela P ima torej spremenjen gen RYR1, ki kodira protein kalcijevega kanala na sarkoplazmatskem retikulumu skeletnih mišic (MacLennan in sod., 1990). V kolikor ima prašič obe aleli gena RYR1 na kromosomih okvarjeni in ga označimo kot genotip PP, ga predlagamo za izločitev, saj okvarjenega gena zaradi gospodarskih izgub ne želimo prenesti v naslednjo generacijo. Prašič, ki ima obe aleli gena RYR1 označeni s črko N, torej genotip NN, pa je na stres odporen. Z izločanjem recesivnih homozigotov želimo povečati preživitveno sposobnost in izboljšati kakovost mesa. Spreminjanje frekvence alele P v zadnjih letih so opisali Flisar in sod. (2004), vpliv gena na kakovost mesa na slovenskih populacijah prašičev pa so analizirali Šalehar in sod. (1994) ter Dovč in sod. (1996).

Teste izvajamo pri pasmah, kjer je pogostost okvarjene alele P večja, torej pri pasmi pietrain, obeh linijah pasme slovenska landrace, large white (Kovač in sod., 2005). DNK izoliramo iz koščka uhlja prašiča. Odsek kromosoma, kjer se gen nahaja, pomnožimo, da gen dobimo v več kopijah. Okvarjeno alelo razberemo s slike agaroznega gela, saj je alela P s 74 baznimi pari daljša kot alela N, ki razpade na dva dela, dolžin 41 in 33 baznih parov (slika 3). Iz slike razberemo genotip živali, saj nam agarozna elektroforeza omogoča ločevanje odsekov DNK, torej naših alel, po dolžinah.



Slika 3: Rezultati genskega testa na SMH

Vendar pa je takih primerov aplikacij v praksi le okoli ducat. Znani so geni, ki imajo velik učinek na velikost gnezda (ESR), mesnatost (MC4R), kakovost mesa (PRKAG3 in RYR1). Velike farme v tujini so že navezale stik s posameznimi laboratoriji za molekularno genetiko in za njih določajo lokuse za posamezne lastnosti. Tako je leta 2002 družba Newsham Genetics (ZDA), v sodelovanju z družbo Gentec NV iz Belgije, patentirala lokus BETTergen muscle+, ki povečuje mesnatost za 2 do 4 %. Družba deluje pod okriljem družbe Seghers. Pred časom pa so patentirali tudi lokus BETTergen G1.

Za večino lastnosti lokacije genov z velikim učinkom še ne poznamo, zato uporabljamo označevalce (angl. marker), ki se nahajajo v bližini genov, ki vplivajo na kvalitativne lastnosti. Tako se s pomočjo označevalcev orientiramo in živali odbiramo na osnovi oblike označevalcev, saj se običajno označevalec in lokus nahajata zelo blizu na kromosomu in se zato dedujeta skupaj. Verjetnost, da se bosta dedovala skupaj se zmanjšuje z medsebojno oddaljenostjo. To metodo imenujemo selekcija s pomočjo molekularnih označevalcev (angl. marker assisted selection).

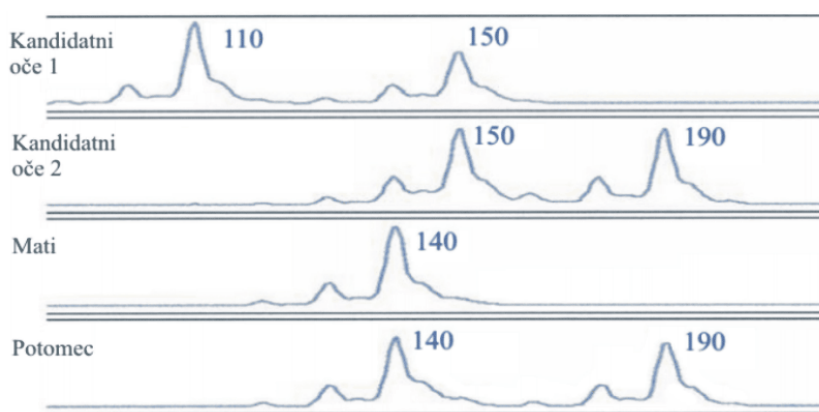
Nekateri povečanje učinkovitosti selekcije s pomočjo molekularnih informacij ocenjujejo tudi od 1 do 60 %, predvsem zaradi večje natančnosti genetskega vrednotenja in intenzivnosti selekcije, vendar pa je to odvisno od lastnosti in strukture populacije (Liu in sod.,

2001). Prednosti te metode so dobrodošle predvsem pri selekciji lastnosti z nizko heritabilnosta (plodnost, kakovost semena, starost ob spolni zrelosti), težko merljivih, merljivih le pri enem spolu in pri lastnostih, ki jih lahko merimo le pozno v življenju (odpornost proti boleznim, kakovost mesa).

Kljub temu, da je znano nekaj rutinskih genskih analiz v praši čereji, pa selekcija, podprta z molekularnimi označevalci še ni dosegla pričakovanih koristi v selekcijskih programih. Tu mislimo predvsem na aplikacije pri kvantitativnih lastnostih, na katere vpliva večje število genov. Ključni dejavniki so ekonomski, saj uporaba molekularnih označevalcev za ekonomsko pomembne lastnosti povečuje stroške selekcijskih programov (Dekkers in Hospital, 2002). Stroške namreč povečujejo iskanje lokusov za kvantitativne lastnosti, zbiranje vzorcev, genotipizacija in analize.

Kot smo že omenili, pa ne izkoriščamo le informacij kodirajočih delov genoma, temveč tudi kratke, tandemske ponovitve, ki med osebki zelo variirajo v številu in vzorcu ponovitve. Tako se lahko npr. vzorec (TA) ponovi tudi 10x zaporedoma. Tako zaporedja imenujemo mikrosateliti. Najdemo jih po celem genomu. Do razlik med osebki pride zaradi mutacij v številu ponovitev. Mikrosateliti so najhitrejše mutirajoče sekvence v genomu. Ker eno alelo osebek podeduje od matere in eno od očeta, mikrosatelite na nivoju osebkov izkoriščamo za preverjanje porekla ter sledljivost proizvodov. Za take analize pa ni dovolj preveriti le en mikrosatelit, saj verjetnost trditve narašča s številom analiziranih mikrosatelitov. Na osnovi rezultatov lahko s 100 % verjetnostjo trdimo, da prašič ni potomec nekega merjasca, verjetnost potrditve pa nikoli ne doseže 100 %.

Starševstvo potrdimo s pomočjo analize dolžine mikrosatelita (slika 4). Primer prikazuje bi-alelni mikrosatelit s štirimi možnimi dolžinami. Potomec eno alelo podeduje po materi, drugo po očetu in ker ima mati obe aleli velikosti 140 baznih parov (bp), sklepamo, da je potomec alelo velikosti 140 bp podedoval od matere. Ugotoviti moramo še, od katerega



Slika 4: Rezultati preverjanja starševstva

kandidatnega očeta je podedoval alelo dolžine 190 bp. Ker kandidatni oče št. 1 nima alele te dolžine, zaključimo, da je kandidatni oče št. 2 oče tega potomca, saj smo prvega izključili.

Na nivoju populacije pa so mikrosateliti zelo uporabni za vrednotenje genetske pestrosti, primerjavo pasem med seboj ter izdelavo filogenetskih dreves. Heterogenost oz. homogenost populacije ugotovljamo s pomočjo števila alel za posamezen mikrosatelit. Laval in sod. (2000) so primerjali 11 evropskih pasem prašičev, v analizo pa so vključili več kot 20 mikrosatelitov. Ugotavljali so podobnost tako znotraj pasem, kot podobnost med pasmami. V majhnih populacijah je genetska pestrost majhna, predvsem pri avtohtonih pasmah. Hargett in sod. (2006) so pri pasmi turopoljski prašič pregledali 10 mikrosatelitov in ugotovili veliko homogenost populacije. V majhnih, homogenih populacijah na tak način iščemo nesorodne živali. Prednosti mikrosatelitov so enostavna uporaba, majhne napake ter praviloma velika informativnost.

### 3.4 Zaključki

Nove tehnike v genetiki prinašajo nove informacije, za katere moramo poiskati način, kako jih kar najbolje izkoristiti v selekciji domačih živali. Kljub temu, da selekcija z molekularnimi označevalci povečuje genetski napredek, bo v praksi potrebno pretehtati učinkovitost in stroške uporabe. Pri tem pa je potrebno stroške razdeliti na stroške razvoja in stroške rutinskih analiz. Potrebno bo torej ekonomsko ovrednotiti koristi, ki jih prinaša molekularna genetika v tradicionalne selekcijske programe.

Informacije, ki jih dobimo z genskimi analizami, želimo vključiti v napoved plemenske vrednosti. Povečanje genetskega napredka pa je odvisno tako od lastnosti same kot od značilnosti populacije, pri čemer so mišljene v prvi vrsti frekvence genov. Prednosti odbire s pomočjo genskih analiz so predvsem pri lastnostih, ki jih je težko meriti, ki so merljive le pri enem spolu, pri lastnostih, ki jih lahko merimo le pozno v življenju ter predvsem tistih, ki imajo nizko heritabiliteto, kot npr. velikost gnezda. V prihodnje bodo molekularne tehnike zelo verjetno uporabne in pogosto uporabljene pri selekciji prašičev.

### 3.5 Viri

Dekkers J.C.M., Hospital F. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat. Rev. Genet.*, 3: 22–32.

Dovč P., Šalehar A., Kovač M., Kastelic M. 1996. Frequency of the RYR1 n allele in different breeds of Slovenia and its influence on some growth and carcass traits. V: *Book of Abstracts of the 47th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, Lillehammer. Wageningen, Wageningen Academic Publishers.

Flisar T., Gorjanc G., Malovrh Š., Ule I., Kovač M. 2004. Genski test na sindrom maligne hipertermije. V: *Spremljanje proizvodnosti prašičev*, III. del. Kovač M., Malovrh Š. (ur.). Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za etologijo, biometrijo in selekcijo ter prašičerejo: 51–60.

- Harcet M., Đikić M., Gamulin V. 2006. Low genetic diversity of the Turopolje pig breed. *Food Tech. Biotech.*, 44: 105–109.
- Kovač M., Malovrh Š., Čop Sedminek D. 2005. Rejski program za prašiče SloHibrid. Ljubljana, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije: 375 str.
- Laval G., Iannuccelli N., Legault C., Milan D., Groenen M.A.M., Giuffra E., Andersson L., Nissen P.H., Jørgensen C.B., Beeckmann P., Geldermann H., Foulley J., Chevalet C., Ollivier L. 2000. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genet. Sel. Evol.*, 32: 187–203.
- Liu H., Zhang Q., Zhang Y. 2001. Relative efficiency of marker assisted selection when marker and qtl are incompletely linked. *Chinese Sci. Bull.*, 46: 2058–2063.
- MacLennan D.H., Duff C., Zorzato F., Fujii J., Phillips M., Korneluk R.G., Frodis W., Britt B.A., Wortont R.G. 1990. Ryanodine receptor gene is a candidate for a predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*, 343: 559–561.
- Malovrh Š., Kovač M. 2000. Genetic changes for performance traits in Slovenian pig nucleus herds. V: *Animal products and human health. 8th International symposium Animal science days. Osijek, 20.-22. Sep. 2000. Osijek, Faculty of agriculture, Zootechnical department. Poljoprivreda (Osijek) 6: 90–93.*
- Šalehar A., Dovč P., Kovač M. 1998. Frekvence genov RYR1 po pasmah v Sloveniji v letih od 1994 do 1997. *Sodobno kmetijstvo. Priloga: Slovenska prašičereja VIII*, 31: 340–341.
- Šalehar A., Kastelic M., Dovč P. 1994. Frekvenca gena in vpliv genotipa RYR1 na rast in sestavo telesa prašičev treh pasem. *Sodobno kmetijstvo. Priloga: Slovenska prašičereja IV*, 27: 304–306.