

Badanie polimorfizmu wybranych genów i poszukiwanie ich powiązań z cechami reprodukcyjnymi loch^{*)}

AGNIESZKA KORWIN-KOSSAKOWSKA, GRAŻYNA SENDER,
MARIAN KAMYCZEK*, JOLANTA KURYŁ

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN Jastrzębiec, ul Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska

*Instytut Zootechniki, Zootechniczny Zakład Doświadczalny, ul. Mielżyńskich 14, 64-122 Pawłowice

Korwin-Kossakowska A., Sender G., Kamyczek M., Kurył J.

Polymorphism of chosen candidate genes and their relation to reproductive traits in sows

Summary

The aim of the current study was to examine the relation between the polymorphism of RBP4 (Retinol-binding protein 4) genes and reproductive traits. The experimental material consisted of 367 sows of commercial line 990. The following traits were included in the study: total number born, number born alive, number of piglets at 21 days of age, number of weaned piglets, litter weight at 21 days of age, litter weight at weaning. The relation between the genotypes and the reproductive traits was estimated with the least squares method. The RBP4 locus genotype was found to have a significant effect on: total number born, number born alive and litter weight at weaning, based on an analysis of records from the first parity of each sow. In all cases the highest value of the traits was observed in animals having 2/2 homozygote. No significant effect of these genotypes was noted in relation to litter size after analyzing records from the 1 to 5 parities of each sow. The only trait significantly associated with this genotype was litter weight at the 21st day of age.

Keywords: sow, genes, reproduction

Nowoczesne metody molekularne pozwalają na badanie polimorfizmu specyficznych rejonów DNA (genów), a co za tym idzie – zmienności istniejącej pomiędzy zwierzętami w badanej populacji. Ten polimorfizm może być użyty do budowania map genetycznych, jak również wyznaczania różnic pomiędzy markerami w ekspresji istotnych cech. W wielu przypadkach stwierdzenie wpływu danego genu na cechę i znalezienie mutacji leżącej u podstaw zmienności jest identyfikowane metodą poszukiwań genów kandydujących (candidate gene approach) (3). Strategia poszukiwania genów kandydujących wiąże się ściśle z wykorzystaniem informacji o biologii oraz funkcji ich produktów w organizmie. Gen taki jest badany pod kątem znalezienia w nim polimorfizmu i jeśli rezultat jest pozytywny, ten polimorfizm dalej analizuje się w związku z cechą. Jeżeli zostaje znaleziony związek istotny, sugeruje się zastosowanie tego genu kandydata jako genu głównego (lub markera blisko sprzężonego z genem głównym).

Z ekonomicznego punktu widzenia interesujące są przede wszystkim cechy związane z reprodukcją trzo-

dy chlewnej. Najważniejszą z nich jest liczebność miotu, będąca typową cechą ilościową, kontrolowaną przez dwa czynniki: podłoże genetyczne i środowisko. Efektywne zwiększenie liczebności miotu świń (lub liczby zwierząt odchowanych w miocie) prowadzi do podniesienia opłacalności produkcji wieprzowiny.

Zastosowanie selekcji wspomagananej markerami (MAS-Marker Assisted Selection) stwarza nowe możliwości w tym zakresie. Na przestrzeni ostatnich lat podjęto wiele prób poszukiwania markerów genetycznych mających powiązania z cechami reprodukcyjnymi i indywidualnych genów z pożądanym wpływem na daną cechę (4). Markery genetyczne pozwalają na identyfikację poświadczonych alleli u obu płci we wczesnym okresie życia, a przez to redukcję przerwy międzypokoleniowej i uzyskanie szybkiego wzrostu poziomu danej cechy.

Wśród wielu proponowanych genów, mogących stać się markerami cech reprodukcyjnych, wyróżnia się kilka, m.in. gen białka wiążącego retinol (Retinol binding protein) RBP4, którego ekspresja następuje podczas ciąży (10). Jednym z czynników wpływających na reprodukcję (m.in. na rozwój pęcherzyka jajnikowego, dojrzewanie oocytów, wczesny rozwój embrionu), jest obecność witaminy A – retinolu. Pochodzi on

^{*)} Badania finansowane w ramach grantu zamawianego PBZ-KBN-084/P06/2002 w latach 2002-2005.

z endogennego retinolu, który jest dostarczany do komórek docelowych przez RBP. Dostępność retinolu do zarodka jest limitowana do tego, który może być transportowany z macicznych naczyń włosowatych poprzez epithelium do światła macicy. Brief i Chew (1) wykazali, iż dodanie do paszy ciężarnych macior witaminy A spowodowało wzrost liczebności miotu. Biorąc pod uwagę, że embriion daje sygnał do sekrecji RBP z macicy i najwyższy poziom tego białka występuje około 12. dnia ciąży, sugeruje to istotną rolę retinolu i RBP w tym właśnie okresie. Transport i buforowe zdolności RBP w tym krytycznym okresie ciąży powodują, iż jest on poważnym genem kandydatem, oddziałującym na liczebność miotu u świń. Gen RBP4 świni został zmapowany w chromosomie 14, gdzie jest stosunkowo mało zmapowanych markerów, nie został też w tym rejonie stwierdzony żaden QTL dla cech reprodukcyjnych.

Celem badań było znalezienie markera cech reprodukcyjnych u świń należących do linii syntetycznej 990 poprzez wykazanie wpływu polimorfizmu genu RBP4 na cechy związane z liczebnością i masą miotu loch.

Materiał i metody

Materiał stanowiła grupa 367 loch linii 990, pochodzących z Zakładu Doświadczalnego Instytutu Zootechniki, zlokalizowanego w Pawłowicach. Zebrano dane dotyczące do 5 miotów każdej lochy.

Genomowy DNA izolowano z leukocytów krwi wg Kawasaki (7) Metodą PCR-RFLP w badanym materiale określono polimorfizm genu RBP4. Sekwencje starterów i warunki reakcji PCR ustalano według metodyki opisanej przez Rothschild (10). Niektóre warunki zostały zmodyfikowane. Opracowane startery są zlokalizowane w eksonach 2 i 4. Dodatkowo wszystkie osobniki zostały przebadane pod względem genotypu genu RYR1, który jako gen z dużym efektem został uwzględniony w analizie statystycznej. Wykorzystano tu znaną metodykę wg Kamińskiego i wsp. (6).

Wykonano analizę statystyczną zależności pomiędzy genotypami genów RBP4 a niektórymi cechami rozrodu, wykorzystując dane dotyczące pierwszego miotu (pierwsza analiza) i wszystkich miotów razem – od pierwszego do piątego (druga analiza). Analizę przeprowadzono za pomocą metody najmniejszych kwadratów z użyciem procedury GLM w programie SAS. Cechy, które określano: liczba prosiąt urodzonych w miocie, liczba prosiąt żywo urodzonych, liczebność miotu w 21. dniu, liczba odsadzonych prosiąt, masa miotu w 21. dniu, masa miotu przy odsadzeniu, analizowano przy użyciu modelu statystycznego z uwzględnieniem wpływu genotypu lochy (1/1, 1/2, 2/2), kolejnego miotu (1...5), roku (2003, 2004) i sezonu wyproszenia (1, 2, 3, 4) oraz losowego wpływu ojca. We

Tab. 1. Wpływ genotypów RBP4/MspI na poziom cech reprodukcyjnych badanych loch na podstawie wyników z pierwszego miotu (LSM ± SE)

Cecha/genotyp	1/1 n = 216	1/2 n = 130	2/2 n = 21
Liczba prosiąt urodzonych w miocie	8,97 ^A ± 0,24	9,29 ^a ± 0,26	10,45 ^{Bb} ± 0,56
Liczba prosiąt żywo urodzonych	8,13 ^a ± 0,24	8,44 ± 0,26	9,29 ^b ± 0,56
Liczebność miotu w 21. dniu	7,84 ± 0,25	7,91 ± 0,27	8,87 ± 0,58
Liczba odsadzonych prosiąt	7,79 ± 0,25	7,97 ± 0,27	8,87 ± 0,58
Masa miotu w 21. dniu (kg)	41,57 ± 1,37	41,08 ± 1,48	47,08 ± 3,17
Masa miotu przy odsadzeniu (kg)	53,74 ^a ± 1,81	53,95 ± 1,95	62,32 ^b ± 4,18

Objaśnienia: LSM – średnie najmniejszych kwadratów; SE – błąd standardowy; a, b, A, B – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie: a, b przy $p < 0,05$, A, B przy $p \leq 0,01$

Tab. 2. Wpływ genotypów RBP4/MspI na poziom cech reprodukcyjnych badanych loch na podstawie wszystkich miotów razem (LSM ± SE)

Cecha/genotyp	1/1 n = 615	1/2 n = 387	2/2 n = 67
Liczba prosiąt urodzonych w miocie	9,75 ± 0,25	10,11 ± 0,23	10,30 ± 0,44
Liczba prosiąt żywo urodzonych	8,75 ± 0,24	9,10 ± 0,22	9,28 ± 0,43
Liczebność miotu w 21. dniu	8,18 ± 0,24	8,68 ± 0,23	9,00 ± 0,47
Liczba odsadzonych prosiąt	8,21 ± 0,27	8,74 ± 0,25	8,86 ± 0,60
Masa miotu w 21. dniu (kg)	44,87 ^A ± 1,36	46,58 ^a ± 1,26	52,21 ^{Bb} ± 2,60
Masa miotu przy odsadzeniu (kg)	58,56 ± 1,94	60,43 ± 1,80	65,18 ± 4,33

Objaśnienia: jak w tab. 1.

wszystkich przypadkach zastosowana została regresja na wartość addycji i dominacji genotypu RYR1 (HAL^A, HAL^P).

Wyniki i omówienie

Wśród przebadanych osobników, w wyniku trawienia fragmentu genu RBP4 (produkt PCR o długości 550 pz) enzymem MspI, otrzymano allel „1” (190, 154 i 136 par zasad) z częstością 0,76, natomiast allel „2” (190, 136 i 125 par zasad) z częstością 0,23. Częstości te są podobne jak we wcześniejszych opracowaniach (2, 8-10).

W analizie wykonanej na podstawie danych uzyskanych z pierwszego miotu każdej lochy istotne różnice ($p \leq 0,01$) uzyskano dla cechy „liczba prosiąt urodzonych w miocie” pomiędzy genotypami 2/2 i 1/1 oraz ($p < 0,05$) pomiędzy 2/2 i 1/2, natomiast dla cechy „liczba prosiąt żywo urodzonych” pomiędzy genotypami 1/1 i 2/2 ($p < 0,05$). W obydwu przypadkach zwierzęta o genotypie 2/2 miały liczniejsze mioty. W cechach „liczebność miotu w 21. dniu” i „liczba odsadzonych prosiąt” wyniki znajdowały się na granicy istotności (odpowiednio: $p < 0,0872$ i $p < 0,0729$), przy czym tendencje były podobne (2/2 – najwyższa wartość). Przy cechach związanych z masą miotu – „masy miotu w 21 dniu” zależności te znajdowały się na granicy istotności ($p < 0,0979$), natomiast już w momencie odsadzenia – „masa miotu przy odsadzeniu”

różnica pomiędzy 2/2 a 1/1 była istotna ($p < 0,05$) i była korzystniejsza (wyższa masa miotu) dla tego pierwszego genotypu (tab. 1).

Inaczej natomiast wyglądały wyniki analizy przeprowadzonej na wszystkich miotach wziętych razem. Nie uzyskano istotnych zależności pomiędzy wartością cech związanych z liczebnością miotu a genotypem RBP4. Jedyne istotne różnice stwierdzono dla cechy „masa miotu w 21. dniu” pomiędzy 2/2 i 1/1 ($p \leq 0,01$) i pomiędzy 2/2 i 1/2 ($p < 0,05$) (tab. 2). Wyniki powyższych badań różnią się nieco od uzyskanych przez innych autorów. Już pierwsze rezultaty związane z RBP4 jako genem kandydatem (9) wykazują wpływ korzystnego allelu na liczebność miotu, dając około 0,53 prosięcia więcej na jeden miot w rasie wielkiej białej w populacji francuskiej. Badania Rothschilda (10) na komercyjnych liniach świń (2500 miotów), wykazują różnice pomiędzy allelami „1” i „2” oraz genotypami 1/1 i 2/2. Jednak w tym przypadku to osobniki o genotypie 1/1 wykazywały korzystniejsze wyniki, tzn. miały o 0,5 prosięcia więcej w miocie w cesze TNB (ogólna liczba zwierząt urodzonych), 0,26 w cesze NBA (liczba zwierząt żywo urodzonych). Interesującym faktem jest to, iż allel korzystniejszy w każdej populacji występował z wyższą frekwencją. W badaniach Drogemuller i wsp. (2) frekwencja allelu „1” była również wyższa, ale *locus* RBP4 nie wykazuje istotnego wpływu na liczebność miotu w badanej linii syntetycznej. Podobne rezultaty otrzymał Linville i wsp. (8). Podsumowując należy stwierdzić, że istnieją rozbieżności w wynikach pomiędzy różnymi populacjami, jednak otrzymane rezultaty potwierdzają, że mogą istnieć istotne zależności pomiędzy genotypem genu RBP4 a rozrodem. Niestety, na podstawie tych badań trudno stwierdzić czy RBP4 jest genem głównym, czy tylko sprzężonym z genem ma-

jącym wpływ na cechę. Polimorfizm badany w tym opracowaniu został zlokalizowany w obrębie intronu tego genu, a więc nie musi być mutacją przyczynową. Z drugiej jednak strony niektóre introny odgrywają rolę w regulacji ekspresji genów, a więc występujące tam SNPs mogą bezpośrednio wpływać na zmienność funkcjonalną (5). Reasumując, otrzymane wyniki wymagają dalszych badań na większej populacji zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Brief S., Chew B. P.: Effects of vitamin A and B-carotene on reproductive performance in gilts. *J. Anim. Sci.* 1985, 60, 998-1004.
2. Drogemuller C., Hamann H., Distl O.: Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. *J. Anim. Sci.* 2001, 79, 2565-2570.
3. Harlizius B., van der Lende T.: Contribution of genomics to unravel the physiological background of economically important traits in livestock. 52nd Annual Meeting of the EAAP, Budapest 2001, GPh3.
4. Isler B. J., Irvin K. M., Neal S. M., Moeller S. J.: Examination of the relationship between the paternally expressed gene 3 and reproductive tract components in swine. 7th Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier 2002, (poz. 08-28).
5. Jiang Z., Robinson J. A. B., Verrinder Gibbins A. M., Gibson J. P., Archibald A. L., Haley C. S.: Mapping of QTLs for prolificacy traits on SSC 8 using a candidate gene approach. 7th Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier 2002, (poz. 08-02).
6. Kamiński S., Wójcik E., Ruś A., Brym P.: Frekwencja alleli locus RYR1 u knurków hodowlanych różnych ras z regionu Warmii i Mazur. XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Genetycznego, Poznań 2001, Streszczenia, s. 55.
7. Kawasaki E. S.: Sample preparation from blood, cells and other fluids, [w:] Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J.: PCR Protocols; A guide to methods and application. Academy Press, New York 1990, 146-152.
8. Linville R. C., Pomp D., Johnson R. K., Rothschild M. F.: Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *J. Anim. Sci.* 2001, 79, 60-67.
9. Ollivier L., Messer L. A., Rothschild M. F., Legault C.: The use of selection experiments for detecting quantitative trait loci. *Genet. Res.* 1997, 69, 227-232.
10. Rothschild M. F., Messer L., Day A., Wales R., Short T., Southwood O., Plastow G.: Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mamm. Genome* 2000, 11, 75-77.

Adres autora: dr Agnieszka Korwin-Kossakowska, Jastrzębiec, ul. Po-
stępu 1, 05-552 Wólka Kosowska; e-mail: a.kossakowska@ighz.pl