

MARKERY MOLEKULARNE WYKORZYSTYWANE W SELEKCJI ZWIERZĄT HODOWLANYCH

Marek Kowalczyk✉, Aleksandra Szabelak, Małgorzata Dylewska,
Andrzej Jakubczak

UP w Lublinie, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki

Streszczenie. Selekcja i dobór osobników do kojarzeń jest istotnym etapem pracy hodowlanej. Jednym z najstarszych i najbardziej powszechnych kryteriów decydujących o wyborze zwierząt do dalszych kojarzeń są cechy fenotypowe. W celu osiągnięcia lepszych efektów hodowlanych, klasyczną selekcję coraz częściej uzupełnia się wynikami badań wykorzystującymi markery molekularne powiązane z cechami użytkowymi. Pierwotnie stosowane markery były oparte na polimorfizmie losowo amplifikowanych fragmentów DNA i polimorfizmie długości fragmentów restrykcyjnych. Rozwój technik molekularnych i genomiki pozwoliły na pełniejsze zrozumienie podłoża genetycznego cech użytkowych i tym samym na wprowadzenie bardziej informatywnych technik opartych na polimorfizmie sekwencji mikrosatelitarnych, jak i wielkoskalowych analizach genomowych wielu tysięcy polimorficznych nukleotydów. W pracy przedstawiono najczęściej wykorzystywane markery molekularne, scharakteryzowano zasadę ich oznaczania oraz przedstawiono przykłady ich zastosowania w naukach zootechnicznych.

Słowa kluczowe: selekcja, polimorfizm molekularny, markery molekularne, sekwencjonowanie NGS, polimorfizm SNP

WSTĘP

Osiągnięcie postępu hodowlanego w każdej gałęzi produkcji zwierzęcej jest związane z prawidłowo zaplanowaną i prowadzoną pracą hodowlaną, która polega na doskonaleniu zwierząt z pokolenia na pokolenie, a w efekcie czego uzyskaniu osobników potomnych o lepszych parametrach użytkowych niż osobniki rodzicielskie [Ptak i in. 2015]. Istotnym etapem każdej pracy hodowlanej jest selekcja odpowiednich osobników do dalszej hodowli. W ten sposób głównym celem hodowców staje się taki dobór zwierząt, który prowadzi do utrwalania i maksymalizacji wartości cech o istotnym znaczeniu użytkowym i gospodarczym.

✉markowx@wp.pl

Podstawową metodą selekcji, która jest stosowana od tysięcy lat, jest selekcja fenotypowa, jednak coraz większe zrozumienie zależności prowadzących do wystąpienia określonego fenotypu oraz to, że na ostateczną efektywność hodowli wpływa wiele czynników, zarówno genetycznych jak i środowiskowych, wskazują, że selekcja fenotypowa nie zawsze pozwala na otrzymywanie optymalnych wyników. Postęp w genomice zwierząt hodowlanych, który dokonuje się w ostatnich latach, pozwala na lepsze zrozumienie podłoża genetycznego, które w dużej mierze decyduje o fenotypie, a tym samym o wartości użytkowej zwierzęcia. W ten sposób obiektem selekcji staje się nie efekt końcowy (fenotyp), ale instrukcja prowadząca do jego uzyskania (genotyp). Selekcja fenotypowa pozwala na stopniowe uzyskiwanie postępu hodowlanego. Pamiętać jednak należy, że uzyskanie optymalnych wyników w szybszym czasie możliwe jest dzięki danym z analiz molekularnych. Metody biologii molekularnej są coraz chętniej włączane do badań zootechnicznych, mających na celu poprawianie efektów hodowlanych poprzez wykorzystanie markerów molekularnych powiązanych z cechami użytkowymi. W efekcie selekcja genowa i genomowa znacznie usprawnia pracę selekcyjną, a selekcja wspomagana markerami ma coraz większy wpływ na kształt współczesnej zootechniki.

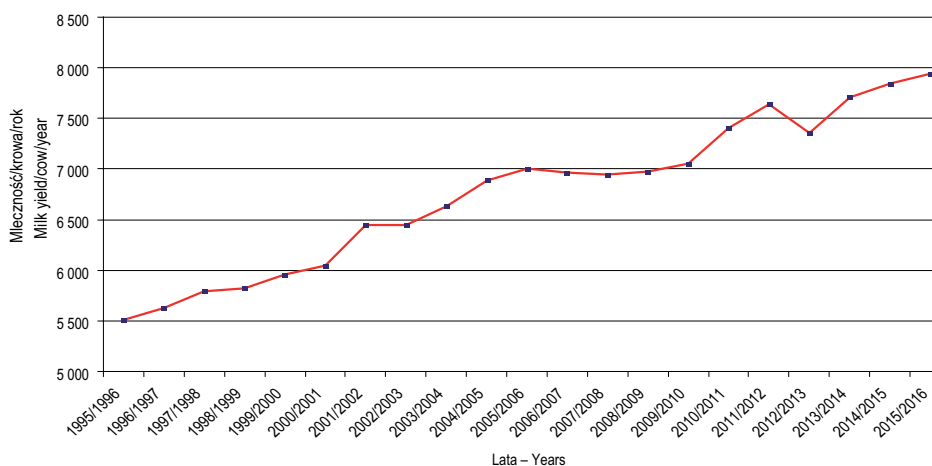
MARKERY MOLEKULARNE W HODOWLI ZWIERZĄT

Markery molekularne są coraz bardziej użytecznym elementem selekcji, a badanie ich związku z cechami użytkowymi ma nie tylko znaczenie teoretyczne, ale też ma charakter aplikacyjny. W efekcie pracy hodowlanej mogą pojawić się przypadki, w których uzyskuje się postęp fenotypowy, w którym poprawa jednej cechy może pociągać za sobą pogorszenie innej. W przypadku gatunków drobiu, które są selekcjonowane na wysokie tempo wzrostu, pojawia się zmiana struktury mięśni, miopatia, a w efekcie pogorszenie cech jakościowych mięsa [Velleman i in. 2003]. Selekcja na wysoką nieśność często jest związana z występowaniem osteoporozy [Meseret 2016]. Zwierzęta poddane selekcji rozpoczynają składanie jaj wcześniej niż osobniki nieselekcjonowane. Wcześniejsza i intensywniejsza nieśność wiąże się z osiągnięciem mniejszej masy ciała oraz z mniejszym pobieraniem paszy. W ten sposób do organizmu nie są dostarczane optymalne ilości składników mineralnych niezbędnych do prawidłowej budowy kości. Wyższa nieśność prowadzi także do przesunięcia w równowadze mineralnej. Jony wapnia są intensywnie zużywane do wytwarzania skorupki jaj. Niewystarczająca ilość wapnia w pożywieniu prowadzi do desorpcji tego pierwiastka z kości, a w efekcie do ich demineralizacji i rozwoju osteoporozy. Rozważana jest także genetyczna tendencja do występowania osteoporozy, długotrwała selekcja na cechę produkcyjną, jaką jest nieśność, mogła mieć negatywny wpływ na wytrzymałość kości.

Efekty uboczne selekcji są obserwowane u wielu gatunków zwierząt, między innymi u świń, w których selekcja na szybkie tempo wzrostu wiąże się z możliwością wystąpienia osteochondrozy i słabością kończyn [Prunier i in. 2010], czy u bydła, u którego selekcja na wysoką młeczność może pociągać za sobą obniżoną płodność, zaburzenia metaboliczne lub większą podatnością na mastitis – zapalenie wymienia [Oltenu i Broom 2010]. Niekorzystne efekty intensywnej selekcji, często wynikają z tego, że postęp w zakresie danej cechy użytkowej następuje zbyt szybko. Organizm zwierzęcia nie jest w pełni

zaadoptowany do zmian metabolicznych związanych ze wzrostem selekcjonowanej cechy, w związku z czym mogą powstać opisane wcześniej stany patologiczne. W celu pełniejszego zrozumienia efektów fenotypowych badane jest podłoże genetyczne cech użytkowych oraz ich ewentualny związek z cechami niepożądanymi w celu optymalizacji pracy hodowlanej.

W ten sposób powszechna do niedawna selekcja fenotypowa jest coraz częściej uzupełniana selekcją genową czy genomową, a strategie określane jako selekcja wspomagana markerami – MAS (ang. *Marker-Assisted Selection*), czy ocena genomowej wartości hodowlanej – GBV (ang. *Genomic Breeding Value*) stają się cennym narzędziem ułatwiającym pracę hodowlaną [Mucha i in. 2015]. Z ekonomicznego punktu widzenia szczególne znaczenie mają *loci* determinujące cechy ilościowe – QTL (ang. *Quantitative Traits Loci*), takie cechy są warunkowane wielogenowo, a główną rolą markerów molekularnych jest poszukiwanie zależności między konkretnymi układami genetycznymi a parametrami użytkowymi [Williams 2005]. Wyraźny postęp jest widoczny w dłuższym czasie. Według danych AHDB (*Agriculture and Horticulture Development Board*) dla bydła z Wysp Brytyjskich, ilość mleka produkowanego przez krowę w sezonie 1995/1996 wynosiła 5512 litrów, w sezonie 2015/2016 wynosiła 7942 litry, co wskazuje na wzrost o ponad 40% w ciągu dwóch dekad roku (rys. 1). Wielka Brytania jest jednym z krajów, w którym wdrożono ocenę genetyczną w hodowli bydła mlecznego. Projekt powstały w 2004 roku jest realizowany przez EGENES – Edinburgh Genetic Evaluations Services.



Rys. 1. Wzrost mleczności krow na Wyspach Brytyjskich w latach 1995–2016 (opracowanie własne na podstawie danych AHDB – Agriculture and Horticulture Development Board [online] <https://dairy.ahdb.org.uk/resources-library/market-information/farming-data/average-milk-yield/#.Wxv3dYouDIV> [dostęp: 24.02.2018])

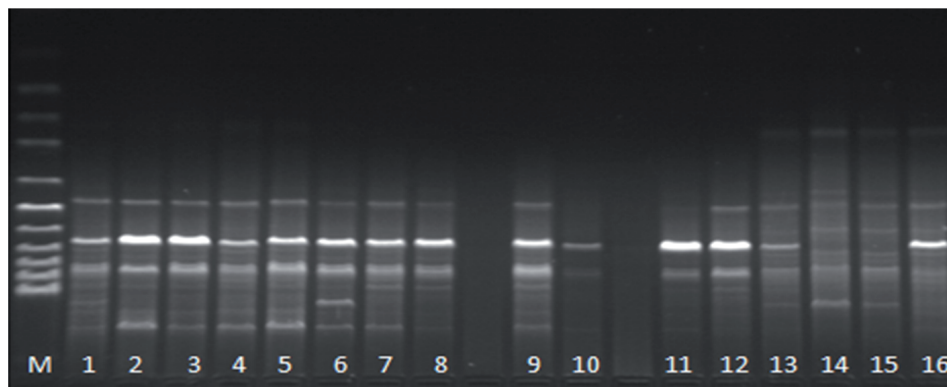
Fig. 1. Milk yield growth in 1995–2016 in the Great Britain (own elaboration on database AHDB – Agriculture and Horticulture Development Board [online] <https://dairy.ahdb.org.uk/resources-library/market-information/farming-data/average-milk-yield/#.Wxv3dYouDIV> [accessed: 24.02.2018])

TECHNIKI WYKORZYSTYWANE DO POSZUKIWANIA MARKERÓW MOLEKULARNYCH

Do poszukiwania i oznaczania markerów molekularnych stosuje się zróżnicowane techniki. Część z nich bazuje na opracowanej w latach 80. łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), która umożliwia amplifikację, a więc powielenie fragmentu matrycowego DNA. Użyteczność techniki PCR znacznie zwiększa jej modyfikacje, takie jak np. RT-PCR (ang. *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). Matrycą w tej reakcji jest RNA, który z użyciem odwrotnej transkryptazy jest przepisywany na cDNA, które może być amplifikowane w zwykłej reakcji PCR lub w qPCR (ang. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*). Amplifikacja sekwencji RNA pozwala na diagnostykę wirusów RNA, ale przede wszystkim umożliwia analizę ekspresji genów na poziomie transkryptomu. Możliwa jest również jednoczesna amplifikacja kilku lub kilkunastu sekwencji docelowych w jednej mieszaninie reakcyjnej, dzięki technice multiplex PCR. Wzrost liczby uzyskiwanych produktów pozwala na generowanie większej liczby informacji. Multiplex PCR jest wykorzystywany między innymi do oceny struktury genetycznej populacji na podstawie polimorficznych markerów molekularnych [Seilsuth i in. 2016]. Uniwersalność i wszechstronność zarówno klasycznej techniki PCR, jak i jej modyfikacji sprawiają, że techniki te są coraz powszechniej włączane do badań zootechnicznych, stanowiąc podstawę dla wielu metod molekularnych wykorzystywanych w poszukiwaniu markerów genetycznych.

POLIMORFIZM LOSOWO AMPLIFIKOWANYCH FRAGMENTÓW DNA – RAPD

Jednymi z pierwszych rodzajów markerów molekularnych wykorzystanych w zootechnice były, bazujące na technice PCR, markery RAPD (ang. *Random Amplification of Polymorphic DNA*). Metoda pozwala na równoczesną detekcję wielu polimorficznych *loci* w całym genomie. Wykorzystuje się w niej około 10 nukleotydowych startów o losowo dobranej sekwencji, które w stosunkowo niskiej temperaturze przyłączają się do genomowego DNA na zasadzie komplementarności, generując różnej wielkości produkty (rys. 2). W przeciwieństwie do klasycznej reakcji PCR, w przypadku RAPD nie jest konieczna znajomość sekwencji docelowej [Yang i in. 2013]. Metoda RAPD była wykorzystana do określenia stopnia genetycznej zmienności takich zwierząt hodowlanych jak owce czy bydło [Kantanen i in. 1995]. Analiza losowo amplifikowanego polimorficznego DNA pozwala także na ocenę zróżnicowania genetycznego wielu gatunków zwierząt wolnożyjących, tj. jeleni, dzików, rysi, wilków, borsuków czy lisów [Palomares i in. 2002, Flagstad i in. 2003, Klukowska i in. 2004]. Prowadzono także badania, w których technika RAPD została wykorzystana do porównania stopnia zmienności i relacji filogenetycznych pomiędzy populacjami jenotów hodowlanych i wolnożyjących, potwierdzając wpływ pracy hodowlanej na zmiany w strukturze genetycznej badanych populacjach [Słaska i in. 2010]. Obecnie metoda jest coraz rzadziej stosowana ze względu na małą powtarzalność wyników pomiędzy ośrodkami badawczymi, a do oceny struktury genetycznej używa się bardziej polimorficznych markerów mikrosatelitarnych [Salamon i in. 2014, Sharma i in. 2015].



Rys. 2. Wykorzystanie analizy RAPD do określenia zróżnicowania genetycznego w populacji lisów hodowlanych, M – marker wielkości, 1–16 – profile RAPD badanych osobników (badania własne)

Fig. 3. Usage of RAPD method to estimation of genetic variability in farmed foxes population, M – size marker, 1–16 – RAPD profiles of tested animals (own research)

RFLP I AFLP – MARKERY OPARTE NA WYKORZYSTANIU ENZYMÓW RESTRYKCYJNYCH

Inną techniką wykrywającą polimorfizmy, a tym samym pozwalającą na poszukiwanie markerów molekularnych jest technika wykorzystująca polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych – RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Metoda jest rozwinięciem techniki PCR, polega na trawieniu produktów reakcji amplifikacji za pomocą enzymów restrykcyjnych. Powstałe po trawieniu produkty są identyfikowane za pomocą elektroforezy żelowej. Różnice w sekwencji nukleotydowej wynikają z obecności specyficznych miejsc cięcia dla enzymów restrykcyjnych. Występujący polimorfizm jest efektem mutacji punktowych, które prowadzą do występowania różnych alleli. Metoda PCR-RFLP może być wykorzystywana do badania związku między poszczególnymi genotypami a cechami użytkowymi. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych w genach prolaktyny i receptora prolaktyny, została zastosowana do poszukiwania markerów związanych z wielkością miotu uzyskiwanego od swn [Drogemuller i in. 2001, Korwin-Kossakowska i in. 2003]. Technikę RFLP wykorzystano także do detekcji allelu genu *DGATI*, który jest związany z wyższą zawartością tłuszczu w mleku krów rasy Simental-Fleckvieh [Winter i in. 2002] oraz do analiz związku między allelami genu *POUIF1* a mlecznością i masą urodzeniową kóz [Lan i in. 2007]. Wykorzystanie markerów RFLP pozwoliło także na znalezienie związku między polimorfizmem w genie kalpastatyny (gen *CAST*) a jakością mięsa wieprzowego, co potwierdziło użyteczność markera w programach hodowlanych [Ciobanu i in. 2004, Ropka-Molik i in. 2014]. Podobne badania zostały przeprowadzone dla innych gatunków zwierząt hodowlanych takich jak bydło [Bonilla i in. 2010] i owce [Xu i in. 2009].

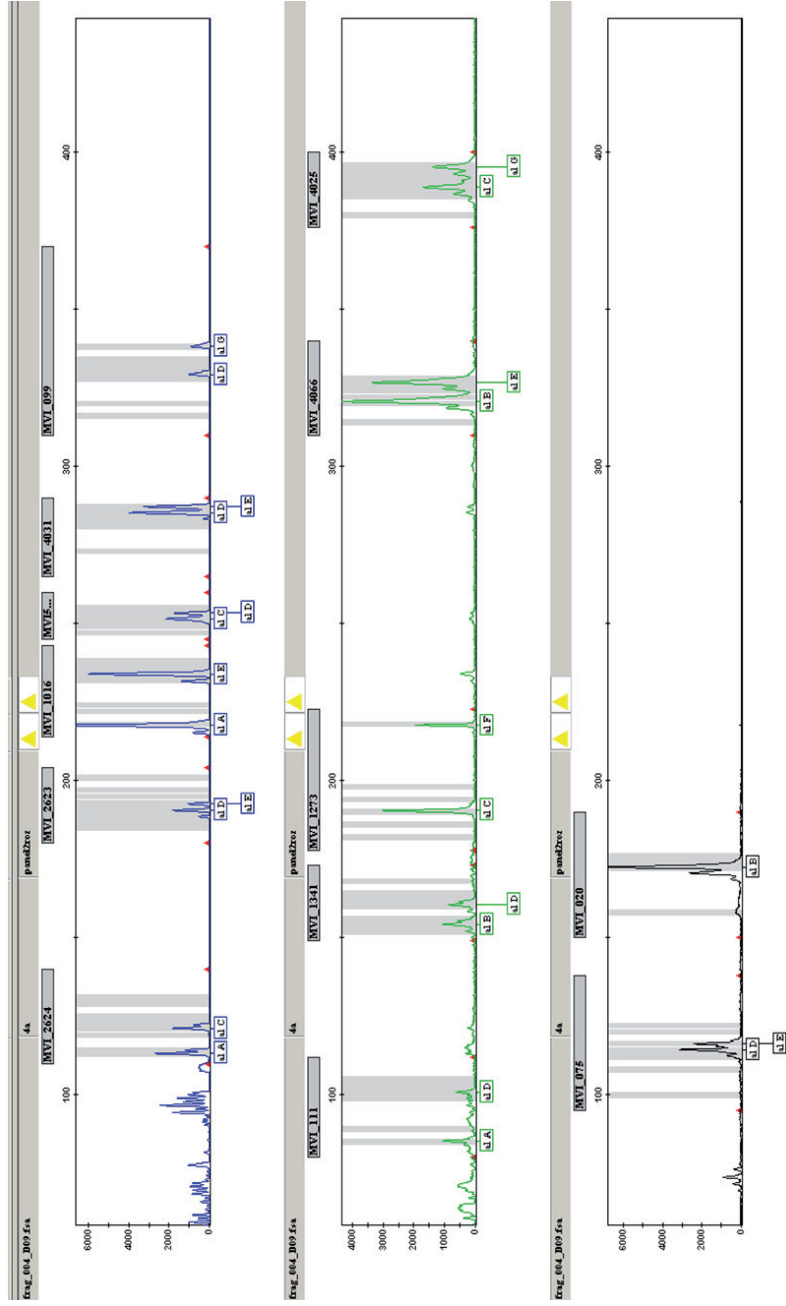
Metoda AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*), polega na trawieniu genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi (w przypadku ssaków głównie enzymami *EcoRI* i *TaqI*), przyłączeniu sekwencji adaptorowych, preamplifikacji, a następnie amplifikacji właściwej przy użyciu specyficznych starterów. Metoda AFLP pozwala na jednoczesną analizę wielu *loci*, a tym samym detekcję wielu potencjalnych miejsc markerowych [Vos i in. 1995]. Metoda została wykorzystana między innymi do oceny stopnia zróżnicowania genetycznego kóz, bydła i drobiu [Ajmone-Marsan i in. 1997, Ajmone-Marsan i in. 2001, De Marchi i in. 2006]. Oprócz analiz struktury genetycznej, technika AFLP jest używana do poszukiwania *loci* QTL związanych z parametrami mięsa u świń [Wimmers i in. 2002].

SEKWENCJE MIKROSATELITARNE – STR

Do powszechnie stosowanych markerów należą sekwencje mikrosatelitarne nazywane też sekwencjami STR (ang. *Short Tandem Repeats*). Mikrosatelity składają się z motywu powtarzalnego, zwykle 2–6 nukleotydów, który występuje w zróżnicowanej liczbie powtórzeń, co stanowi podstawę do wyodrębnienia poszczególnych alleli. Markery STR charakteryzują się wysokim polimorfizmem, dzięki czemu mogą być wykorzystane do analiz pokrewieństwa, zmienności, wykluczania bądź potwierdzania ojcostwa [Seyedabadi i Savar Sofla 2017], identyfikacji osobniczej [Al-Atiyat 2015, Bigi i in. 2015], identyfikacji gatunkowej [Jakubczak i Jeżewska 2008] jak i w kontroli pochodzenia [Kamiński 2015]. Technika służącą do badania zmienności mikrosatelitarnej jest wspomniany wcześniej multiplex PCR, który w znaczącym stopniu zwiększa ilość uzyskiwanych danych, dzięki jednoczesnej amplifikacji wielu sekwencji docelowych otrzymywany jest unikalny profil genetyczny (rys. 3).

Markery mikrosatelitarne wykorzystywane są także w hodowli zachowawczej. Bioróżnorodność jest istotnym aspektem w hodowli, a jej zachowanie powinno być jednym z priorytetów współczesnej zootechniki. Skrajnym przypadkiem bezpowrotnej utraty różnorodności jest przykład bydła, w zachodniej Europie na początku XX wieku występowało około 230 ras bydła, z których aż 70 wyginęło [Reklewski 2005]. Utrzymywanie zróżnicowanej puli genetycznej stwarza większe możliwości selekcji, a także zachowanie ras unikalnych, które są efektem długotrwałej pracy hodowlanej. Zastosowanie markerów STR umożliwia ocenę zmienności zarówno pomiędzy rasami, jak i w obrębie rasy. Znajomość takich parametrów jak heterozygotyczność, stopień polimorfizmu ułatwia planowanie pracy hodowlanej w sposób pozwalający na utrzymanie optymalnej bioróżnorodności, unikanie depresji inbredowej oraz prowadzenie selekcji w sposób umożliwiający osiągnięcie maksymalnej efektywności heterozji [Radko 2007].

Podejmowane są próby badania związku między sekwencjami mikrosatelitarnymi a cechami użytkowymi. Przykładem są badania Changa i innych [2003], którzy wskazali na istnienie zależności między występowaniem powtórzeń dinukleotydowych w transkrypcie genu desminy w mięśniach szkieletowych świń a kolorem mięsa. Analizy zależności między profilem mikrosatelitarnym a jakością mięsa przeprowadzono także dla drobiu, w przypadku kaczek wskazano na możliwość selekcji opartej na markerach



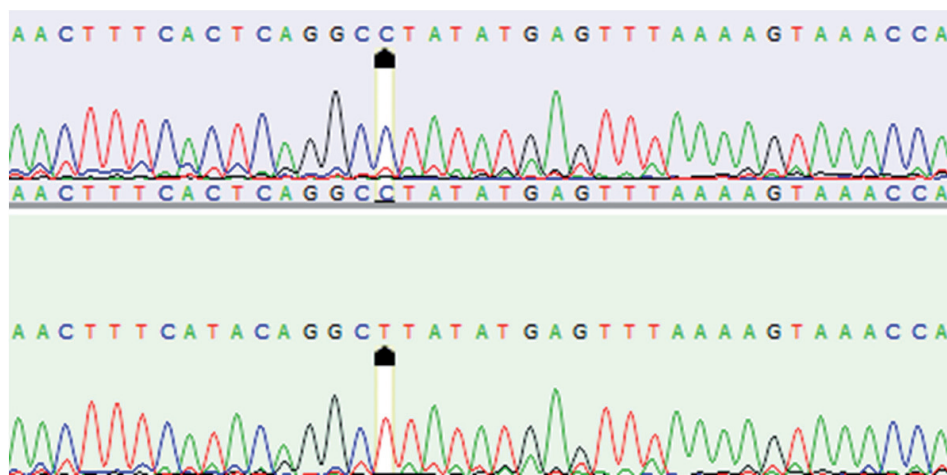
Rys. 3. Profil STR otrzymany metodą multiplex PCR dla 13 sekwencji mikrosatelitarnych, pozwalający na identyfikację osobniczą i badania populacyjne norek hodowlanych i dziko żyjących (badania własne)

Fig. 3. STR profile generated by multiplex PCR amplifying 13 microsatellite *loci*. Designed method may be used in individual identification and analysis of farmed and wild minks populations (own research)

STR, prowadzącej do uzyskania zwierząt o większej masie tuszek i mięśni piersiowych przy jednoczesnej redukcji ilości tłuszczu podskórnego [Mucha i in. 2014, Molinski i in. 2015]. Badania prowadzone zarówno na bydło rasy holsztyńskiej, jak i osobnikach mieszańcowych pozwoliły na znalezienie markerów związanych z jakością mleka [Gupta i in. 2016].

POLIMORFIZM POJEDYNCZYCH NUKLEOTYDÓW – SNP

Znacznie większy wgląd w genom organizmów żywych dają techniki sekwencjonowania. Najprostszym, ale najmniej informatywnym rozwiązaniem jest sekwencjonowanie metodą Sangera pozwalające na detekcję polimorfizmów pojedynczych nukleotydów – SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) między analizowanymi sekwencjami (rys. 4). Ciekawym rozwiązaniem jest połączenie kilku rodzajów markerów w jednej analizie, tak jak miało to miejsce podczas poszukiwania markerów związanych z jakością mięsa drobiowego [Felicio i in. 2013]. Regiony kandydatorowe zostały wytypowane na podstawie polimorfizmu mikrosatelitarnego, w ten sposób wskazano geny *FGFBP1* i *FGFBP2* jako potencjalnie związane z mięsnością. Dodatkowa analiza polimorfizmu SNP pozwoliła na wskazanie genotypów o większej masie uzyskiwanych mięśni piersiowych i mniejszym wycieku po mrożeniu [Felicio i in. 2013].



Rys. 4. Wynik sekwencjonowania metodą Sangera ze wskazanym polimorficznym nukleotydem – polimorfizm typu SNP – C>T (badania własne)

Fig. 4. Sanger sequencing results with indicated polymorphic nucleotide – Single Nucleotide Polymorphism (SNP) – C>T (own research)

Sekwencjonowanie metodą Sangera teoretycznie pozwala na poznanie całego genomu, w praktyce wykorzystywana jest jednak do sekwencjonowania krótkich fragmentów genomu i analiz porównawczych między uzyskiwanymi sekwencjami. Zasada techniki została opracowana pod koniec lat 70. XX wieku [Sanger i in. 1977], a sama metoda

wciąż znajduje zastosowanie w wielu placówkach badawczych. Jej największym ograniczeniem jest stosunkowo niewielka ilość uzyskiwanych danych.

Większość cech użytkowych jest zależna od wielu genów, dlatego też analiza pojedynczych markerów SNP pozwala na wytlumaczenie podłoża genetycznego w bardzo ograniczonym stopniu. W związku z tym sekwencjonowanie metodą Sangera nie jest odpowiednią platformą do uzyskiwania wystarczającej liczby danych, dlatego też obecnie coraz częściej wykorzystuje się technologie nowej generacji – NGS (ang. *Next Generation Sequencing*), które pozwalają na przeprowadzenie kilku milionów odczytów sekwencji i jednoczesną analizę całych genomów, co znacznie zwiększa wydajność metody w porównaniu z metodą Sangera. Różnicę w wydajności doskonale oddaje czas, jaki jest potrzebny do zsekwencjonowania całego ludzkiego genomu za pomocą tych technik. Stosując metodę Sanger, poznanie ludzkiego genomu zajęło około 10 lat, przy zastosowaniu techniki NGS wynik jest uzyskiwany w ciągu zaledwie jednego dnia [Behjati i Tarpey 2013]. Obecnie sekwencjonowania wielkoskalowe są prowadzone za pomocą technik nowych generacji z użyciem platform takich jak Illumina, Solid czy Ion Torrent. Wielkoskalowe analizy genomowe umożliwiają znacznie bardziej precyzyjne i wydajne zidentyfikowanie markerów oraz mapowanie cech ilościowych (QTL), dlatego też rozwiązania na nich oparte stopniowo wypierają stosowane wcześniej markery, wprowadzając do zootechniki rozwiązanie nazywane selekcją genomową.

Praktycznym wykorzystaniem wyników otrzymywanych metodami NGS jest wyodrębnianie na podstawie wykrytych polimorfizmów alleli wykazujących asocjacje z cechami użytkowymi. W ten sposób spośród wielu polimorfizmów typu SNP wybierane są te, które wpływają na korzystny produkcyjnie efekt fenotypowy. Komercyjnym rozwiązaniem powstałym na bazie wyników NGS są panele molekularne pozwalające na jednoczesną analizę wielu tysięcy polimorficznych nukleotydów. Tsuruta i inni [2015] wykorzystali panel umożliwiający analizę ponad 42 000 markerów typu SNP do oceny genetycznej wartości hodowlanej bydła. Analiza SNP została także wykorzystana do poszukiwania zależności między podłożem genetycznym a takimi parametrami jak mleczność i śmiertelność bydła [Tsuruta i in. 2017]. Wykorzystywane są także zestawy o znacznie mniejszej liczbie analizowanych *loci*, związanych z cechami produkcyjnymi. Przykładem zestawu ukierunkowanego na konkretną cechę jest zawierający 96 markerów SNP w 54 genach o potencjalnym związku z jakością mleka. Badania potwierdziły zależność między poszczególnymi allelami a zawartością białka, kazeiny, tłuszczu czy komórek somatycznych [Cecchinato i in. 2014].

Największymi ograniczeniami selekcji genomowej wydaje się konieczność analizy ogromnej ilości polimorficznych *loci* w celu uzyskaniu wiarygodnych wyników oraz koszt analizy. Jednak dynamika rozwoju współczesnej genomiki w znacznym stopniu prowadzi zarówno do wzrostu informatywności stosowanych metod, jak i do obniżania ceny selekcji genomowej. Zastosowanie rozwiązania „genotypowanie przez sekwencjonowanie” – GBS (ang. *Genotyping by Sequencing*) pozwala na analizę ponad 50 000 SNP w cenie niższej niż 30 USD za osobnika [De Donato i in. 2013]. W hodowli bydła mlecznego ocena genomowej wartości hodowlanej GBV (ang. *Genomic Breeding Value*), jest stosowana coraz powszechniej. Po zsekwencjonowaniu genomu bydła domowego, możliwe stało się zaprojektowanie panelu skupiającego 54 000 polimorficznych nukleotydów, który stał się komercyjnym rozwiązaniem do selekcji genomowej, stosowanym w wielu krajach

[Kamiński 2015]. Selekcja genomowa zyskuje popularność także w Polsce. W 2009 roku powstało konsorcjum MASinBULL, którego celem jest popularyzacja i wdrażanie systemu genomowej oceny wartości hodowlanej w naszym kraju [Kamiński 2012]. Panele SNP są projektowane także dla innych gatunków zwierząt hodowlanych, np. dla drobiu. Pierwszy panel SNP wykorzystany w analizach kur składał się z zaledwie 3 000 polimorfizmów SNP, współczesne komercyjne macierze zawierają ponad 60 000 SNP, jednak w wyniku dalszych badań powstają coraz bardziej złożone panele pozwalające na jeszcze pełniejszą charakterystykę genomu zwierząt hodowlanych, w efekcie zaprojektowano zestawy pozwalające na analizę niemal 600 000 polimorfizmów SNP u drobiu i ponad 600 000 u bydła [Kranis i in. 2013].

PODSUMOWANIE

Nauki zootechniczne, podobnie jak wiele innych dziedzin wiedzy, coraz intensywniej wprowadzają do rutynowych analiz techniki molekularne, w efekcie czego coraz powszechniej klasyczne metody selekcji są uzupełniane selekcją na podstawie markerów molekularnych. Poznanie podłoża molekularnego cech użytkowych pozwala na znaczne usprawnienie selekcji osobników do dalszej hodowli, a tym samym na zwiększenie efektów pracy hodowlanej. Klasyczna selekcja fenotypowa nie w pełni uwzględnia złożone relacje, które prowadzą do wystąpienia określonych fenotypów. Oceniany jest jedynie „efekt końcowy”, który jest wartością wypadkową wielu czynników, zarówno środowiskowych, jak i genetycznych. Sama selekcja genomowa nie może w pełni zastąpić selekcji fenotypowej, jednak jest niezbędna do holistycznej oceny wartości hodowlanej utrzymywanych zwierząt. Wydaje się więc, że mimo stosunkowo wysokiej ceny metody molekularne będą coraz powszechniej uzupełniały współczesne metody hodowlane.

LITERATURA

- Ajmone-Marsan P., Valentini A., Cassandro M., Vecchiotti-Antaldi G., Bertoni G., Kuiper M., 1997. AFLP™ markers for DNA fingerprinting in cattle. *Anim. Genet.* 28(6), 418–426.
- Ajmone-Marsan P., Negrini R., Crepaldi P., Milanese E., Gorni C., Valentini A., Cicogna M., 2001. Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP® markers. *Anim. Genet.* 32(5), 281–288.
- Al-Atiyat R.M., 2015. The power of 28 microsatellite markers for parentage testing in sheep. *Electron. J. Biotechnol.* 18(2), 116–121.
- Behjati S., Tarpey P.S., 2013. What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 98(6), 236–238.
- Bigi D., Marelli S.P., Randi E., Polli M., 2015. Genetic characterization of four native Italian shepherd dog breeds and analysis of their relationship to cosmopolitan dog breeds using microsatellite markers. *Animal* 9(12), 1921–1928.
- Bonilla C.A., Rubio M.S., Sifuentes A.M., Parra-Bracamonte G.M., Arellano V.W., Mendez M.R.D., Berruecos J.M., Ortiz R., 2010. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico. *Genet. Mol. Res.* 9(4), 2395–2405.

- Cecchinato A., Ribeca C., Chessa S., Cipolat-Gotet C., Maretto F., Casellas J., Bittante G., 2014. Candidate gene association analysis for milk yield, composition, urea nitrogen and somatic cell scores in brown swiss cows. *Animal* 8(7), 1062–1070.
- Chang K.C., Beuzen N.D., Hall A.D., 2003. Identification of microsatellites in expressed muscle genes: Assessment of a desmin (CT) dinucleotide repeat as a marker for meat quality. *Vet. J.* 165(2), 157–163.
- Ciobanu D.C., Bastiaansen J.W.M., Lonergan S.M., Thomsen H., Dekkers J.C.M., Plastow G.S., Rothschild M.F., 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 82(10), 2829–2839.
- De Donato M., Peters S.O., Mitchell S.E., Hussain T., Imumorin I.G., 2013. Genotyping-by-sequencing (GBS): A novel, efficient and cost-effective genotyping method for cattle using next-generation sequencing. *PLOS ONE* 8(5), e62137.
- De Marchi M., Dalvit C., Targhetta C., Cassandro M., 2006. Assessing genetic diversity in indigenous veneto chicken breeds using AFLP markers. *Anim. Genet.* 37(2), 101–105.
- Drogemuller C., Hamann H., Distl O., 2001. Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. *J. Anim. Sci.* 79(10), 2565–2570.
- Felicio A.M., Boschiero C., Balieiro J.C.C., Ledur M.C., Ferraz J.B.S., Moura A., Coutinho L.L., 2013. Polymorphisms in FGFBP1 and FGFBP2 genes associated with carcass and meat quality traits in chickens. *Genet. Mol. Res.* 12(1), 208–222.
- Flagstad Ø., Walker C.W., Vilà C., Sundqvist A-K., Fernholm B., Hufthammer A.K., Wiig Ø., Koyola I., Ellegren H., 2003. Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Mol. Ecol.* 12(4), 869–880.
- Gupta J.P., Bhushan B., Panigrahi M., Ranjan S., Asaf V.N.M., Kumar A., Sulabh S., Kumar P., Sharma D., 2016. Study on genetic variation of short tandem repeats (STR) markers and their association with somatic cell scores (SCS) in crossbred cows. *Indian. J. Anim. Sci.* 50(4), 450–454.
- Jakubczak A., Jeżewska G., 2008. Validation of StockMarks® set for identifying origin of species from the canine family. *Med. Weter.* 64(6), 832–835.
- Kamiński S., 2012. Genomowa ocena wartości hodowlanej zwierząt. *Przegl. Hod.* 80, 7–9.
- Kamiński S., 2015. Znaczenie analiz DNA w praktycznej hodowli bydła w Polsce. *Wiad. Zootech.* 53, 2, 46–51.
- Kantanen J., Vilkki J., Elo K., Makitanila A., 1995. Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep – application for detecting genetic-variation. *Anim. Genet.* 26(5), 315–320.
- Klukowska J., Strabel T., Mackowski M., Switonski, M., 2003. Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. *J. Anim. Breed. Genet.* 120(2), 88–94.
- Korwin-Kossakowska A., Kamyczek M., Cieslak D., Pierzchala M., Kuryl J., 2003. Candidate gene markers for reproductive traits in Polish 990 pig line. *J. Anim. Breed. Genet.* 120(3), 181–191.
- Kranis A., Gheyas A.A., Boschiero C., Turner F., Yu L., Smith S., Talbot R., Pirani A., Brew F., Kaiser P., Hocking P.M., Fife M., Salmon N., Fulton J., Strom T.M., Haberer G., Weigend S., Preisinger R., Gholami M., Qanbari S., Simianer H., Watson K.A., Woolliams J.A., Burt D.W., 2013. Development of a high density 600k SNP genotyping array for chicken. *BMC Genomics* 14(1), 59.
- Lan X.Y., Pan C.Y., Chen H., Zhang C.L., Li J.Y., Zhao M., Lei C.Z., Zhang A.L., Zhang L., 2007. An AluI PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat POU1F1 locus and its association with production traits. *Small Rumin. Res.* 73(1–3), 8–12.

- Meseret S., 2016. A review of poultry welfare in conventional production system. *Livest. Res. Rural Dev.* 28(12), # 234.
- Molinski K., Szwaczkowski T., Gornowicz E., Lisowski M., Grajewski B., Dobek A., 2015. New approach for the detection of loci determining duck meat quality. *Europ. Poult. Sci.* 79. DOI: 10.1399/eps.2015.98
- Mucha S., Grajewski B., Gornowicz E., Lisowski M., Radziszewska J., Szwaczkowski T., 2014. Mapping quantitative trait loci affecting some carcass and meat traits in duck (*Anas platyrhynchos*). *J. Appl. Genet.* 55(4), 497–503.
- Mucha S., Mrode R., MacLaren-Lee I., Coffey M., Conington J., 2015. Estimation of genomic breeding values for milk yield in UK dairy goats. *J. Dairy. Sci.* 98(11), 8201–8208.
- Oltenucu P.A., Broom D.M., 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim. Welf.* 19, 39–49.
- Palomares F., Godoy J.A., Piriz A., O'Brien S. J., Johnson W.E., 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 11(10), 2171–2182.
- Prunier A., Heinonen M., Quesnel H., 2010. High physiological demands in intensively raised pigs: Impact on health and welfare. *Animal* 4(6), 886–898.
- Ptak E., Barc, A., Jagusiak W., 2015. Rozwój metod oceny wartości hodowlanej zwierząt na przykładzie bydła mlecznego w ujęciu retrospektywnym. *Przegl. Hod.* 83(2).
- Radko A., 2007. Analiza bioróżnorodności owiec na podstawie markerów mikrosatelitarnych DNA. *Wiad. Zootech.* 4(45), 45–48.
- Reklewski Z., 2005. Hodowla zachowawcza bydła rasy polskiej czerwonej. *Wiad. Zootech.* 2(245), 98–101.
- Ropka-Molik K., Bereta A., Tyra M., Rozycki M., Piorowska K., Szyndler-Nedza M., Szmatola T., 2014. Association of calpastatin gene polymorphisms and meat quality traits in pig. *Meat Sci.* 97(2), 143–150.
- Salamon D., Gutierrez-Gil B., Arranz J.J., Barreta J., Batinic V., Dzidic A., 2014. Genetic diversity and differentiation of 12 eastern Adriatic and western Dinaric native sheep breeds using microsatellites. *Animal* 8(2), 200–207.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12), 5463–5467.
- Seilsuth S., Seo J. H., Kong H. S., Jeon G.J., 2016. Microsatellite analysis of the genetic diversity and population structure in dairy goats in Thailand. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 29(3), 327.
- Seyedabadi H.R., Savar Sofla S., 2017. Microsatellite analysis for parentage verification and genetic characterization of the Turkmen horse population. *Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.* 23(3), 467–471.
- Sharma R., Kishore A., Mukesh M., Ahlawat S., Maitra A., Pandey A.K., Tantia M.S., 2015. Genetic diversity and relationship of Indian cattle inferred from microsatellite and mitochondrial DNA markers. *BMC Genet.* 16, 73–84.
- Slaska B., Zieba G., Rozempolska-Rucinska I., Jezewska-Witkowska G., Jakubczak A., 2010. Evaluation of genetic biodiversity in farm-bred and wild raccoon dogs in Poland. *Folia Biol.* 58 (3–4), 195–199.
- Tsuruta S., Lourenco D.A.L., Misztal I., Lawlor T.J., 2015. Genotype by environment interactions on culling rates and 305-day milk yield of holstein cows in 3 US regions. *J. Dairy Sci.* 98(8), 5796–5805.
- Tsuruta S., Lourenco D.A.L., Misztal I., Lawlor T.J., 2017. Genomic analysis of cow mortality and milk production using a threshold-linear model. *J. Dairy Sci.* 100(9), 7295–7305.
- Velleman S.G., Anderson J.W., Coy C.S., Nestor K.E., 2003. Effect of selection for growth rate on muscle damage during turkey breast muscle development. *Poult. Sci.* 82(7), 1069–1074.

- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Vandeele T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP – a new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21), 4407–4414.
- Williams J.L., 2005. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Rev. Sci. Tech.* 24(1), 379–391.
- Wimmers K., Murani E., Ponsuksili S., Yerle M., Schellander K., 2002. Detection of quantitative trait loci for carcass traits in the pig by using AFLP. *Mamm. Genome* 13(4), 206–210.
- Winter A., Kramer W., Werner F.A.O., Kollers S., Kata S., Durstewitz G., Buitkamp J., Womack J.E., Thaller G., Fries R., 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(14), 9300–9305.
- Xu Q.L., Chen Y.L., Ma R.X., Xue P., 2009. Polymorphism of *DGAT1* associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. *J. Sci. Food Agric.* 89(2), 232–237.
- Yang W.J., Kang X.L., Yang Q.F., Lin Y., Fang M.Y., 2013. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *J Anim. Sci. Biotechnol.* 4(2), 1–6.

MOLECULAR MARKERS USED IN SELECTION OF BREEDING ANIMALS

Summary. Selection plays a crucial role in animal breeding. The oldest and still used methods of selection of animals to further breeding are often based on the phenotypic traits. This approach allows to improve results of breeding in relatively slowly pace and only in narrow degree. More effective way of obtaining progress is involving of molecular techniques and markers into breeding programs. There are many types of molecular markers associated with traits that are important from the viewpoint of the breeders as well as consumers. The most primary molecular markers are based on the proteins but their effectiveness is not sufficient. Therefore polymorphisms present in the genetic material were consider as a better way of enhancing of breeding results. The milestone in molecular biology was developing of PCR technique. Amplification of genetic material open new possibilities in many branches of science but also industry and agriculture. In this way such techniques as RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA, or RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism, were established. Whereas RAPD is mostly used to analysis of genetic diversity between populations, RFLP technique enabled investigating of association between particular alleles and the productive traits. Constant progress in molecular biology brings even more informative methods from polymorphic microsatellite markers up to high-throughput sequencing revealing whole genomes. Microsatellite polymorphism is based on the STR sequences (Short Tandem Repeats) that exhibit considerable variation between individuals, therefore they are great tool to monitoring of genetic structure of breeding population, designing of breeding programs and protecting against the inbreeding depression. Sequencing techniques are focused on the SNP polymorphism (Single Nucleotide Polymorphism), appearing between genomes. Sanger sequencing is limited to analysis of relatively small sequences, whereas NGS techniques allow to screen whole genomes in searching of polymorphic nucleotides involved in expression of desire traits. Results of sequencing are used to designing and development of SNP panels, that enable simultaneous screening of huge number of polymorphic nucleotide. Modern breeding programs are often supplemented by the results of genomic analysis, that brings meaningful insight into genetic background of such traits as meat quality, milk produc-

tion or reproduction traits. Constant development of technology is followed by the decreasing of costs and therefore it seems that breeding programs assisted by molecular markers will be more widely introduced into the common usage.

Key words: selection, molecular polymorphism, molecular markers, NGS, SNP panels