

Naudan maidontuotantogeenien alkiodiagnostiikka

Sirja Viitala, Jaana Peippo, Mervi Rätty, Jouni Virta, Tuula-Marjatta Hamama, Juha-Pekka Seppänen, Johanna Jokinen, Asko Mäki-Tanila ja Johanna Vilkki

MTT, Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, Kotieläintuotannon tutkimus, 31600 Jokioinen.
etunimi.sukunimi@mtt.fi

Johdanto

MTT:ssä on kartoitettu kotieläinten jalostuksellisesti tärkeisiin ominaisuuksiin vaikuttavia kromosomialueita vuodesta 1993. Naudan geenikartoituksen ensimmäinen vaihe saatiin päätökseen vuonna 2000. Naudan perimästä on tunnistettu useita maidon tuotantoon, terveyteen ja hedelmällisyyteen vaikuttavia alueita. Muita kotieläimistä kartoitettuja ominaisuuksia ovat sian siittiöiden liikkumattomuus-syndrooma sekä useat kanan munien tuotantoon ja laatuun liittyvät ominaisuudet. Alueita hienokartoitetaan vaikutuksen taustalla olevien geenien tunnistamiseksi – ensimmäiset naudan maidontuotantoon vaikuttavat geenimuutokset on jo löydetty.

Kartoitettuja geneja voidaan hyödyntää tehostamaan jalostusta markkeriavusteisella valinnalla. Yhdestä eläimestä voidaan tuottaa paljon perimältään valikoituja jälkeläisiä yhdistämällä alkioituotanto ja alkiodiagnostiikka. Alkiot huuhdellaan hormonikäsittelyistä (superovuloituista) luovuttajista viikon kuluttua siemennyksestä. Hyvälaatuisista alkioista leikataan näytepala sukupuolen määrittämistä ja valittaviin ominaisuuksiin kytkeytyneiden geenimerkkien analysointia varten. Analyysituloksen perusteella haluttuja ominaisuuksia perineet alkiot siirretään vastaanottajaan. Tulevaisuuden jalostusta silmälläpitäen alkiodiagnostiikkaa on kehitetty ja testattu MTT:ssä ASMO-alkionsiirtoydinkarjassa.

Naudan geenikartoitus

Naudan geenikartoituksen ensimmäinen vaihe saatiin päätökseen vuonna 2000 (Viitala ym, 2003; Schulman ym, 2003). Naudan koko perimästä rakennettiin molekyyligeneettisten DNA-merkkien avulla kartta. Karttaa hyödyntämällä naudan perimästä on tunnistettu useita maidontuotantoon, terveyteen ja hedelmällisyyteen vaikuttavaa kromosomialuetta (QTL, quantitative trait loci).

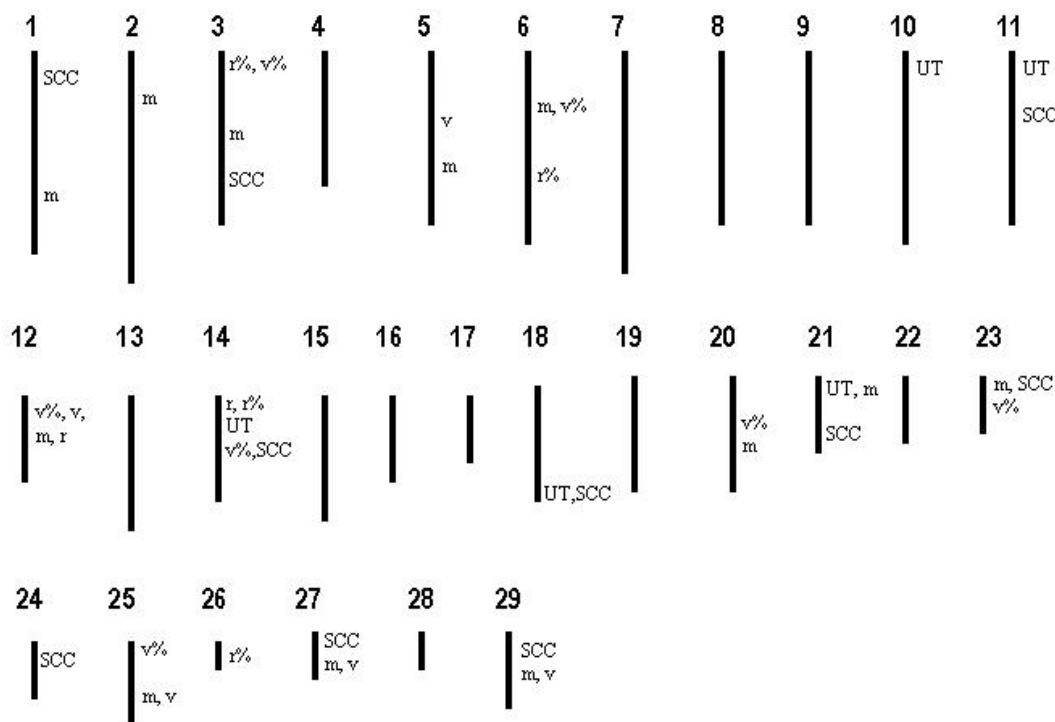
Perinteisesti geenikartoitus perustuu risteytyksiin. Naudan geenikartoituksessa on kustannustehokkaampaa käyttää olemassa olevaa jalostuspopulaatiota. Mallit jotka hyödyntävät olemassa olevia populaatioita, soveltuvat risteytyksiä paremmin suurille ja hitaasti lisääntyville eläimille. Pojantyörmällin mukaisessa tutkimusaineistossa on jalostusarvosteltuja keinosiemennyssonneja – isiä ja niiden poikia. Haluttujen kromosomien (tässä tapauksessa koko kromosomiston) DNA-karttamerkkien periytymistä seurataan isiltä pojille. Tietoa siitä mitä alueita poika on isänsä kromosomipareista perinyt käytetään etsittäessä yhteyttä kromosomialueiden ja tutkittavien ominaisuuksien väliltä. Kussakin tarkasteltavassa kromosomikohdassa jokaisen isän pojat voidaan luokitella kahteen ryhmään sen mukaan mitä ne ovat isältään perineet. Näiden kahden ryhmän välisiä fenotyyppejä eroja tarkastellaan tilastollisesti. Analyysissä käytettävät poikien fenotyypit ovat niiden tyttärien tietojen perusteella laskettuja jalostusarvoja.

Markkereita on 10 – 20 cM:n välein. Tällaisessa kartoituksessa käytetyillä menetelmillä ei saavuteta riittävää tarkkuutta, jotta tuloksia voitaisiin tehokkaasti hyödyntää jalostuksen apuvälineenä. Tarkkuus ei myöskään riitä yksittäisten geenien tunnistamiseksi. Paras karttamerkki markkeriavusteiseen valintaan (MAS; marker assisted selection) olisikin itse vaikuttavasta geenistä tunnistettu muutos. Tästä syystä markkereita haetaan ja paikannetaan edelleen karttojen erotuskyvyn parantamiseksi.

Hienokartoituksen tavoitteena on rajata ominaisuuksien taustalla vaikuttavien geenien sijainti mahdollisimman lyhyelle kromosomialueelle. Kartoitus edellyttää lisäaineiston keräämistä ja markkerikartan huomattavaa tihentämistä. Hienokartoituksessa käytetään uusimpia genomiikan ja tilastotieteen menetelmiä. Menetelmien vaatiman suuren aineiston ja työmäärän vuoksi tutkimukset toteutetaan kansainvälisenä yhteistyönä kuten EU-projekti EURIBDIS (naudan maidontuotantoon vaikuttavien geenialueiden hienokartoitus) vuosina 1998-2001. MTT koordinoi lokakuussa 2002 aloitettua EU-projektia MASTITIS RESISTANCE, jonka tavoitteena on tuottaa uusia valintatyökaluja eurooppalaisen lypsykarjan utaretulehdusalttiuden vähentämiseksi.

Geenikartoitustuloksia

Kartoituksen ensimmäisessä vaiheessa käytiin läpi naudan koko perimä. Kartoituksessa käytettiin 24 ayrshiresonnin pojista koostuvaa noin 900 sonnin aineistoa. Jokaisesta kromosomista analysoitiin tasaisin välimatkoin sijaitsevia DNA-karttamerkkejä. Sen jälkeen selvitettiin tilastollisin menetelmin eri ominaisuuksiin: 5 maidontuotanto-, 4 terveys- ja 3 hedelmällisyysominaisuuteen liittyvän vaihtelun assosioituminen karttamerkkien vaihteluun. Tutkimuksessa löytyi kymmeniä QTL-alueita, jotka vaikuttavat yhteen tai useampaan ominaisuuteen (kuva1).



Kuva 1. Ayrshiren perimän (29 kromosomiparia) kartoituksessa löytyneitä QTL-alueita. Numeroidut palkit kuvaavat kromosomi pareja. Kuvassa esitetyt ominaisuudet: m = maidontuotos, v = valkuaisutuotos, r = rasvatuotos, v% = valkuaispitoisuus, r% = rasvapitoisuus, UT = utaretulehdus, SCC = somaattinen soluluku.

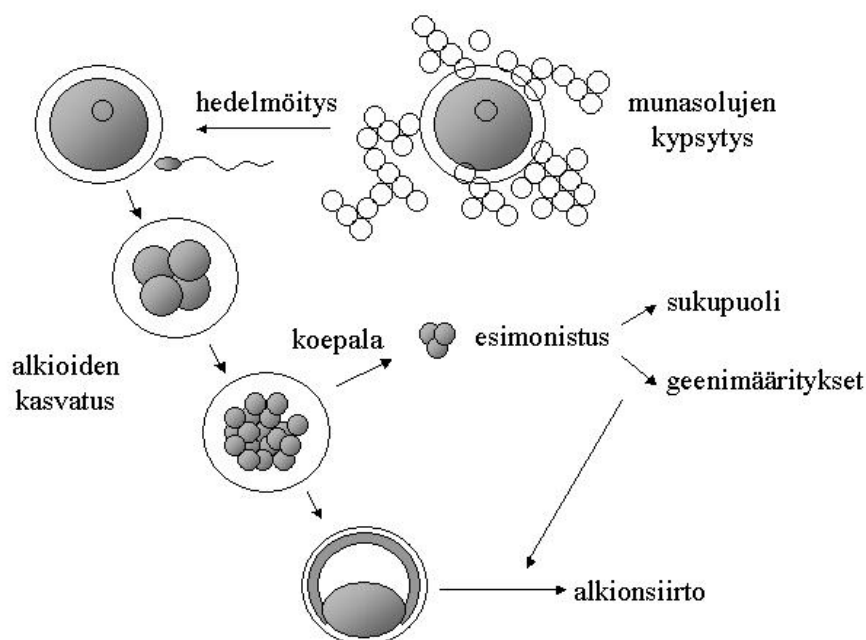
Hienokartoitus aloitettiin lupaavimmista maidontuotanto-ominaisuuksiin vaikuttavista QTL-alueista. Kartoituksen kautta päädyttiin kahteen kandidaattigeeniin kromosomissa 20. Molemmat geenit liittyvät maitorauhasen kehitykseen sekä laktaatioon. Geeni B:n koodaaman valkuaisaineen tiedetään säätelevän maitorauhasen tiineyden aikaista kehitystä ja maidon eri komponenttien tuotantoa laktaation aikana. Geeni A:lla puolestaan on merkittävä rooli maitorauhasen kehityksessä ennen tiineyttä. Tavoitteena oli löytää kandidaattigeeneistä sekvenssimuuntelua joka selittäisi havaitut vaikutukset tarkastelluissa ominaisuuksissa.

Geenien proteiinia koodaavat sekvenssit selvitettiin ja molemmista geneistä löydettiin sekvenssimuuntelua. Löydettyjä sekvenssimuutosten yhteyttä maidontuotanto-ominaisuuksien vaihteluun selvitettiin tilastollisin menetelmin suomalaisessa Ayrshire-populaatioissa. Tulosten mukaan molemmat geenit vaikuttavat maidontuotanto-ominaisuuksiin – toinen mahdollisesti veden määrään maidossa ja toinen kokonaistuotokseen.

Geenitiedon hyödyntäminen jalostusohjelmissa – markkeriavusteinen valinta

Hienokartoituksen tuloksia (ominaisuuteen kytkeytyvien kromosomialueiden markkereita tai tunnistettuja geenejä) voidaan soveltaa jalostusohjelmissa. Markkereita käyttämällä valinta voidaan kohdistaa suoraan ominaisuuden perinnölliseen osaan ilman häiritseviä ympäristövaikutuksia. Toisaalta markkeriavusteinen valinta nopeuttaa jalostusta siksi, että se voidaan tehdä ominaisuuden ilmenemisestä (sukupuolesta, kehitysvaiheesta ym.) riippumatta. Esimerkiksi sonneja voidaan valita maidontuotanto-ominaisuuksien suhteen jo alkiona, kun normaalisti pitää odottaa sonnien tyttärien tuotostietoja.

MTT:ssä on kehitetty menetelmiä, joilla alkioden tehokas geneettinen valinta on mahdollista (Virta ym, 2002). Yhdestä eläimestä voidaan tuottaa paljon perimältään valikoituja jälkeläisiä yhdistämällä alkioituotanto ja alkiodiagnostiikka (kuva 2). Valituilta yksilöiltä huuhdellaan alkioita ja/tai munasoluja. Munasolut kypsytetään ja hedelmöitetään laboratoriossa. Siirtokelpoisiksi kasvatetuista alkiosta leikataan näytepala sukupuolen ja valittaviin ominaisuuksiin kytkeytyneiden markkereiden analysointia varten. Geneettisesti määritetyistä alkiosta haluttuja ominaisuuksia perineet siirretään vastaanottajiin.



Kuva 2. Alkiodiagnostiikka alkioituotannossa.

Alkiodiagnostiikka ASMO-ydinkarjassa – tuloksia

MTT:ssä kehitettyjä alkiodiagnostisia menetelmiä on testattu onnistuneesti ASMO-ydinkarjassa. Vuosina 2002-2003 analysoitiin sukupuolen ja maidontuotantogeenien suhteen yhteensä 145 alkioita, näistä geneettinen määrittäminen onnistui 137 tapauksessa (94%). Siirrettäväksi valittiin hyvälaatuisia naarasalkioita. Määritetyistä alkiosta 55 siirrettiin vastaanottajiin ja näistä 14 johti tiineyteen. Joulukuuhun 2003 mennessä vasikoista 10 oli syntynyt ja ne kaikki olivat naaraita. Vasikoista otettujen kontrollinäytteiden perusteella alkioden maitogeenimäärityksen onnistuivat 100%:sti (taulukko 1).

Taulukko 1. Alkiodiagnostisen menetelmän testaus ASMO-ydinkarjassa. Alkiosta tehdyt määrytykset tarkastettiin syntyneistä vasikoista otetuista kontrollinäytteistä. Sekä sukupuolen että maitogeenien määrytykset ovat onnistuneet 100%:sti. Molemmista geeneistä on kaksi vaihtoehtoista muotoa (alleeli 10 ja 20). Yksilöllä, jonka genotyyppi on 1020, on toisessa vastinkromosomissa alleeli 10 ja toisessa alleeli 20. Homotsygooteilla yksilöillä (1010 ja 2020) on vastinkromosomeissaan identtiset alleelit.

Diagnoosi alkiosta				Kontrolli				
Alkio Nro	Sukupuoli	GeeniA	GeeniB	Syntynyt	Nimi	Sukupuoli	GeeniA	GeeniB
555	Naaras	1010	1020	13.07.2003	Suvikki	Naaras	1010	1020
638	Naaras	1010	1020	19.07.2003	Suoma	Naaras	1010	1020
639	Naaras	1010	1020	28.07.2003	Saima	Naaras	1010	1020
668	Naaras	1010	1020	03.08.2003	Seela	Naaras	1010	1020
885+889	Naaras	1010	2020	08.11.2003	Sähkö	Naaras	1010	2020
1101	Naaras	1010	2020	12.11.2003	Solja	Naaras	1010	2020
1120	Naaras	1020	1020	19.11.2003	Seira	Naaras	1020	1020
1122	Naaras	1020	1010	21.11.2003	Suomu	Naaras	1020	1010
1124	Naaras	1020	2020	22.11.2003	Saipas	Naaras	1020	2020
1131	Naaras	1020	2020	24.11.2003	Susku	Naaras	1020	2020
10015	Naaras	1010	1010					

Johtopäätökset

MTT:ssä on onnistuttu yhdistämään geenikartoituksen tuloksia ja alkioteknologista osaamista. ASMO-ydinkarjassa oli sukupuolen määrytyksen lisäksi mukana kaksi maidontuotantoon vaikuttavaa geeniä. Menetelmä geneettisiä määrytyksiä varten on osoittautunut luotettavaksi. Aineisto on kuitenkin vielä pieni ja tavoitteena onkin siirtää ainakin 100 tutkittua alkiota menetelmän luotettavuuden ja alkioiden tiinehdyttävyyden selvittämiseksi.

Tähän mennessä geenikartoituksella tunnistettuja, naudan jalostuksellisesti merkittäviin ominaisuuksiin vaikuttavia geenejä on vähän, mutta tiedon lisääntyessä alkiosta voidaan määrittää iso joukko esimerkiksi lehmien terveyteen vaikuttavia perintötekijöitä ja valita sairauksille vastustuskykyisemmät alkiot.

Menetelmää on kehitetty ja kehitetään edelleen. Seuraavana päämääränä on lisätä menetelmään naudan utaretulehdusalttiuteen vaikuttavien kromosomialueiden markkereita. Lisäksi tavoitteena on kehittää alkioiden pakastusmenetelmää niin, että geenimääritetyt alkiot voidaan pakastaa näytteenoton jälkeen odottamaan sopivaa vastaanottajaa.

Kirjallisuus

Viitala, S., Schulman, N., De Koning, D.-J., Elo, K., Kinos, R., Virta, A., Virta, J., Mäki-Tanila, A. & Vilkki, J. 2003. Quantitative trait loci affecting milk production traits in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Journal of dairy science* 86, 5: 1828-1836.

Schulman, N.F., Viitala, S.M., De Koning, D.J., Mäki-Tanila, A. & Vilkki, J.H. 2003. Quantitative trait loci for health traits in Finnish Ayrshire cattle. *Journal of dairy science* (hyväksytty julkaistavaksi).

Virta, J., Markola, J., Peippo, J., Markkula, M. & Vilkki, J. 2002. Sex determination of bovine embryo blastomeres by fluorogenic probes. *Theriogenology* 57, 9: 2229-2236.