

איתור גנים כמותיים בבקר לחלב באמצעות סמנים גנטיים

מ. רון¹, מ. בנדל¹, א. פלדמסר¹, ה. אוחרמנקו¹, א. עזרא², י. ולר¹
¹יחידה לגנטיקה של בע"ח, מכון וולקני ²התאחדות מגדלי בקר

מבוא

מאז ביות בעלי-חיים חקלאיים הטיפוח התבסס על בחירת פרטים מצטיינים כהורים לדורות הבאים, בבקר לחלב, מערך הטיפוח הוא מורכב במיוחד מפני שהתכונות הכלכליות מתבטאות רק בנקבות שמספר צאצאיהן הוא קטן מאד ומפני שאורך הדור הוא גדול. תכנית הטיפוח הנוכחית מעלה את הרמה הגנטית של עדר הבקר בכ-1% לשנה. עם ההתקדמות בגנטיקה מולקולרית נוספים אמצעים לסלקציה של תכונות כלכליות בבקר ברמת הדא. אמצעים אלה מאפשרים סלקציה מדויקת יותר תוך קיצור משך הדור.

רוב התכונות בעלות חשיבות כלכלית בבקר הן תכונות כמותיות הנשלטות על ידי מספר רב של גנים. שיטת הטיפוח הנהוגה מתעלמת מקיומם של גנים ספציפיים המבקרים את תכונות הייצור. התכונות הגנטיות של כל פרט נקבעות על ידי רצף הדנא הנמצא בכל תא. שינויים קטנים ברצף זה מביאים להבדלים גנטיים בין פרטים שחלקם בא לידי ביטוי ביצרנות של בע"ח. ניתן לאמוד את השפעתם של גנים בודדים על ידי איתור תאחיוה בין סמן גנטי לגן במבנה משפחתי. מבנה נסיוני של בתי-סב (Granddaughter design) הוצע לחיפוש גן כמותי אחוז לסמן גנטי. במבנה זה בנים של אב הטרואיגוטי לסמן הגנטי נבדקים לסמן הגנטי, בעוד שהתכונות הכמותיות מנותחות על הנכדות של האבות הטרואיגוטיים המקוריים. מבנה ניסויי נוסף הוא מודל של בתי-אב (Daughter Design), שבו בנות לאב הטרואיגוטי נבחות לסמן הגנטי ולתכונות הכמותיות (להסבר נוסף ראה משק הבקר והחלב 7:247).

עד הזמן האחרון לא ניתן היה ליישם שיטות אלה בבקר בגלל היעדר סמנים גנטיים מתפצלים באוכלוסיות הקיימות. סמנים גנטיים מסוג מיקרוסטרליטים בנויים מרצף קצר של 4-1 נוקלאוטידים החוזר על עצמו מספר רב

של פעמים. רצפים אלה נמצאו מפוזרים בגנום, כשמספרם בבקר נאמד ב-25,000 שהם כ-1% מהגנום. רצפים אלה נמצאו פולימורפיים ביותר בגלל השוני הקיים בין פרטים במספר העותקים של הרצף החוזר. כל מספר של הרצף החוזר נחשב "אלל". לדוגמה, פרט אחד מכיל רק את האלל המכיל 10 חזרות של הרצף CA (הומוזיגוט) ופרט אחר מכיל אללים שונים המכילים 8 ו-13 חזרות של הרצף CA (הטרואיגוט). לסמנים אלה מספר רב של אללים באוכלוסיה (בין 3 ל-20 בדרך כלל) והם בעלי שיעור הטרואיגוטיות גבוה של כ-70%. על ידי שימוש בשיטת PCR ניתן להכפיל את מקטע הדנא של המיקרוסטליט פי מליון ויותר ולזהות שינויים זעירים בין האללים השונים על ידי הרצה בג'ל אקרילאמיד. לסיכום, המיקרוסטליטים הינם אתרים רב-אלליים, בעלי שכיחות רבה, פיזור נרחב בגנום ושיעור הטרואיגוטיות גבוה. תכונות אלה מקנות למיקרוסטליטים יתרונות על פני כל סמן גנטי ידוע אחר למטרת איתור גנים בעלי השפעה כלכלית באוכלוסיה מסחרית של בקר לחלב.

ערך כלכלי של סלקציה בעזרת סמנים

זיהוי גנטי מהימן של חומר רבייה יהווה אמצעי בקרה הכרחי בשוק העולמי העתידי. סלקציה ברמת הדנא של הפרט/עובר למספר רב של גנים המשפיעים על הייצור ועמידות למחלות הוא בעל ערך רב לעומת המוצר הקיים בשוק העולמי לחומר רבייה. זיהוי העוברים הנושאים את הגנים בעלי ערך כלכלי גבוה יאפשר לייצא מוצר בעל ערך גנטי ייחודי תוך שמירת זכויות המטפח. "סלקציה בעזרת סמנים גנטיים" (Marker-Assisted Selection) עשויה להביא להאצת ההתקדמות הגנטית על ידי הגדלת עוצמת הסלקציה, קיצור אורך הדור והגדלת הדיוק בהערכות גנטיות. פיתוח חומר רבייה (זרמה, עוברים, עגלות) בעל גוטיפ ידוע

לאדם, חולדה ועכבר. נוצרה תשתית של סמנים גנטיים המאפשרת חיפוש שיטתי של גנים בעזרת סמנים בבקר. כחברים בארגון העוסק במיפוי גנטי של בקר אנו מפתחים סמנים וממפים אותם על הכרומוסום, וכך יש לנו גישה למידע העדכני של סמנים גנטיים. תוצאות ראשונות בגילוי גנים כמותיים בבקר התבססו על שיטות רדיואקטיביות לקביעת הגוטיפ של עשרות ומאות סמנים. כיום עקב המודעות להקף הבדיקות הכרוכות בחיפוש אחר גנים כמותיים ובמיפוי עדין שלהם מצטיידות קבוצות המחקר במיכשור מתקדם המסוגל לקרוא אותות פלואורסנטיים לקביעת הגוטיפ של מספר רב של סמנים בוזמנית. מועצת החלב והתאחדות מגדלי בקר רכשו עבור המעבדה שלנו מיכשור של חברת Applied BioSystems המיועד לבדיקת סמנים גנטיים לחיפוש אחר גנים כמותיים באוכלוסית הבקר הישראלית.

מבנה נסיוני לחיפוש גן כמותי

1. קיבלנו קשיות זרמה מארה"ב של 17 פרים נפוצים עם 16–295 בנים. הפקנו דנא לכל המשפחות. מבנה זה של בתי-סב מאפשר לחפש את הגן הכמותי ביעילות גבוהה. נבחרו 65 סמנים מיקרוסטיליטים פולימורפיים והם נבדקו על 17 האבות האמריקאיים. שיעור ההטרוזיגוטיות היה כ-70%. 26 סמנים גנטיים נבדקו במשפחות שבהם האב נמצא הטרוזיגוטי. נבדקו כ-8 משפחות לכל סמן עם כ-530 בנים אינפורמטיביים. בתוך כל אב הטרוזיגוטי מוינו הבנים לשתי קבוצות לפי הורשת האלל האבהי של הסמן הגנטי לצורך אנליזה סטטיסטית.

2. בגלל המספר המצומצם של פרים הנבחנו בארץ, מיפוי שיטתי יבוצע במבנה של בתי-אב. באוכלוסייה הישראלית הנוכחית נמצאות אלפי בנות עם רשומות ל-7 פרים: בוטה, פירט, פצפון, גולית, מפי, גנדי ותמים. בנוסף, בנות הפר סינבד ייכללו במדגם למרות שרק בימים אלה מגיעות בנותיו לביקורת חלב. האבות, היוחסין שלהם ומספר הבנות של פרות

לרשימת סמנים הקובעים את הייצור, עמידות למחלות, ויוחסין עשוי להיות בעל ערך רב ובר-תחרות בשוק העולמי לחומר רבייה.

בשונה מחידושים חקלאיים אחרים, ההתקדמות הגנטית היא נצחית ומצטברת. כיון שהתעשייה כל כך גדולה בבקר לחלב, גם לשינוי קטן תהיה השפעה כלכלית ניכרת. כיום ישנם כ-110,000 פרות חלב בישראל וייצור החלב הוא מעל 10,000 ליטר לפרה. ההתקדמות הגנטית השנתית היא כ-100 ק"ג חלב-מושווה מחיר (חמ"מ) לפרה לשנה, או 1% לשנה. הערך הכלכלי המוסף של ליטר נוסף מוערך ב-\$0.1. התועלת הכלכלית הצפויה מסלקציה בעזרת סמנים היא ב-3 מישורים:

1. הגדלת דיוק בקביעת אבהות יגדיל את שיעור ההתקדמות הגנטית ב-5%.
 2. סלקציה מלווה-בסמנים יכולה להגדיל את שיעור ההתקדמות הגנטית ב-20%.
 3. הגדלת הערך הגנטי של הבקר הישראלי ישפר באופן מובהק את הסיכויים למכירת חומר רבייה לארצות אחרות.
- להגדלת ההתקדמות הגנטית ב-25% באוכלוסייה הכללית יהיה ערך נומינלי של \$250,000. אך הערך המצטבר של תוספת גנטית זאת לאופק רווח של 20 שנה יהיה לפחות \$7,500,000. ב-1992 בלבד ארה"ב ייצאה מעל 5,000,000 מנות זרמת בקר הולשטיין בערך של \$41,000,000 במחיר ממוצע של \$8 למנת זרמה. ישראל כיום מייצאת בהקף מצומצם. בשנת 1994 ישראל ייצאה 100,000 מנות זרמה במחיר כולל של \$400,000. באמצעות פיתוח ייחודי של חומר גנטי על ידי סלקציה מלווה-בסמנים, אנו מעריכים שהייצוא יוכל לגדול ל-1,000,000 מנות בשנה, במחיר ממוצע של \$10 למנה, אשר יביא להכנסה שנתית של \$10,000,000, אשר 90% ממנה מהווה רווח.

בדיקת סמנים גנטיים

כיום ידועים למעלה מ-1,000 סמנים גנטיים מסוג מיקרוסטיליטים הממופים על כל 30 הכרומוסומים בבקר, יותר מכל יונק אחר פרט

מדגם מעורב לשתי פרות. כמו כן, ניתן לדחות קביעת אבהות אם הפרה אינה נושאת אף אלל של האב. בחרנו בסמן CSSM66 אשר מצאנו שהוא נמצא בתאחיזה גנטית לגן המשפיע על אחוז השומן באוכלוסיה האמריקאית. התוצאות מוצגות בטבלה 2.

טבלה 2. מספר פרות עם חלב מעורבב, ופרות שאינן בנות לפר המדווח.

שם הפר	עוצמה (%) לזיהוי גנטי	מס' פרות		מס' לא בנות	מס' גנוטיפים
		מס' %	מס' %		
מפי	53	21	9	15	6
גנדי	58	11	5	11	5
בוטח	39	8	4	14	7
פירט	42	11	7	14	9
תמים	37	9	4	13	6
פצפון	58	8	4	10	5
גולית	34	20	8	16	6
סה"כ	46	88	6	93	6

1 כולל טעויות של מבקר החלב והמעבדה שלנו.

האומדנים לעירבוב בחלב של הדוגמאות (6%) ולמספר הפרות שאינן בנות (6%) הם מוטים כלפי מטה ובפועל הינם גבוהים יותר מהסיבות הבאות: 1. נבדק רק סמן גנטי יחיד בעל עוצמה ממוצעת של 46% לזיהוי פרה שאינה בת; 2. קיום אלל שלישי שהוא עדות לעירבוב עשוי להופיע רק בחלק מהסמנים הנבדקים; 3. היינו זהירים בקביעת גנוטיפ "מעורבב" או "זר". אנחנו "ננקה" את המדגם מדוגמאות אלה. פעולה זאת תתעדכן בבדיקה של 10 הסמנים הגנטיים הראשונים. לפי כך, טעויות של המעבדה הגנטית, של מבקר החלב, של הזיהוי הגנטי ושל עירבוב בין פרות לא ישפיעו על חיפוש הגן הכמותי באוכלוסיה הישראלית.

איתור גנים באוכלוסיה האמריקאית והישראלית

באוכלוסיה האמריקאית נסרקו 26 סמנים גנטיים. איתרנו 6 גנים המשפיעים על תכונות בעלות ערך כלכלי בבקר (ייצור חלב, שומן וחלבון וכמות תאים סומטיים בחלב). 3 גנים

בביקורת חלב מוצגים בטבלה 1. כל הפרים הם כעת מתחת לגיל 14 ולהם לפחות 3,000 בנות חולבות, פרט לסינבד אשר יגיעו למספר הזה בתוך שנה. לכל אחד מפרים אלה יש אב שונה, פרט לפצפון וגולית שהם בני גיוס. לשני פרים, בוטח ותמים, יש אב-אם משותף. פרחח הוא האב של בוטח ואב-האם של סינבד. לסיכום, ל-8 הפרים יש 13 פרים שונים כאב ואב-אם.

טבלה 1. מספר הבנות לפר בקבוצות אחוז חלבון גבוה (H) ונמוך (L).

שם הפר	L	H	סה"כ
מפי	167	151	318
גנדי	157	134	291
בוטח	166	160	326
פירט	152	138	290
תמים	174	173	347
פצפון	167	148	315
גולית	152	147	299
סה"כ	1135	1051	2186

התכונות לעיבוד הם: חלב, שומן וחלבון, אחוזי השומן והחלבון, תאים סומטיים, פוריות נקבית, אריכות חיים, קושי ומוות בהמלטה כתכונות אם, תאומים, ו-17 תכונות שיפוט גופני. נאספו דוגמאות חלב לפי רשימה של כ-200 בנות בקיבוצים, הטובות והגדועות באחוז חלבון, לכל אב חוץ מסינבד. בפועל נאספו 2186 דוגמאות חלב מבנות שבעת הפרים שהם כ-78% מהרשימה המקורית (טבלה 1). דוגמת החלב נלקחה מהדוגם של מערכת החליבה אשר מתרוקן אך לא נשטף בין פרות עוקבות. לפי כך, קיימת אפשרות לערבוב של חלב בין פרות.

בקרה של המדגם הישראלי

בדקנו את כל אוכלוסית המדגם באמצעות סמן גנטי יחיד פולימורפי המכיל 11 אללים, אשר יאפשר לבדוק בעוצמה סבירה (46%) קיום עירבוב חלב בדוגמה וזיהוי גנטי ודאי של הפרה כבת לפר המדווח. לכל פרה צריכים להופיע לא יותר משני אללים, האלל האבהי והאלל האמהי. לכן, הופעת 3 אללים מעידה על

האחו, לעומת אחיותיהן שאינן נושאות אותו. התפלגות שתי קבוצות הבנות מוצגת בציור 2. המובהקות בבנות גנדי היא 1 למאה אלף. חשוב לציין, שהמדגם הנוכחי מתבסס על קבוצות קיצון לאחוז חלבון, כך שהאנליזה על אחוז השומן היא בבחינת מדגם בעל פחות עוצמה של קבוצות קיצון. למרות זאת התקבלה השפעה מובהקת. למרות התפצלות אותם האללים של CSSM66 ב-6 משפחות נוספות, לא נמצאה השפעה מובהקת. לכן, ההשפעה נובעת מגן אחר הנמצא בתאחיזה לסמן, ולא השפעה ישירה של הסמן. מציאנו שהגן הכמותי נמצא 0-10 יחידות מפה מהסמן הגנטי CSSM66, כלומר הסמן נמצא קרוב מאד לגן.

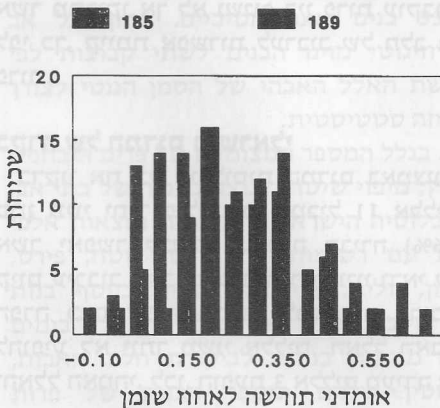
מסקנות

1. נמצא גן המשפיע על אחוז השומן באוכלוסיות בקר מסחריות באמריקה ובישראל. השפעת הגן דומה בשתי האוכלוסיות ובמובהקות סטטיסטית גבוהה. זה הגן הראשון בבעלי-חיים מסחריים, שנמצא מוכח בשתי אוכלוסיות שונות.
2. לגן הזה אין ערך כלכלי שולי באינדקס הטיפוח הישראלי.
3. יש סיכוי גבוה לאיתור גנים ולשילובם בטיפוח בקר בחיפוש שיטתי של סמנים בכל הגנום.

ברמת מובהקות סטטיסטית של $p < 0.003$ ו- $p < 0.05$. כל אחד מהגנים נמצא מובהק במספר משפחות פרים (אבות ובנים) של האוכלוסיה האמריקאית. הסמנים הגנטיים שנמצאו בתאחיזה לגנים הם: MGTG7, TGLA57, ARO26, TGLA263, UWCA9 ו-CSSM66. שכיחות האללים האבהיים לסמן הגנטי CSSM66 במשפחה אמריקאית כפונקציה של הערך הגנטי של הבנים ל-% שומן מוצגת בציור 1. ניתן להבחין בהתפלגות בהבדל בין שתי קבוצות הבנים שקיבלו אללים שונים מהאב. מובהקות ההשפעה של גן כמותי המתפצל במשפחה זאת ואחוז לסמן היא בשיעור $p < 10^{-7}$ וההשפעה היא 0.13% שומן. הגן משפיע על מחצית סטיית התקן הפנוטיפית לאחוז השומן המסבירה 20% מהשונויות הגנטיות, או 10% מהשונויות הפנוטיפיות.

1498 בנות של 7 פרים ישראליים נבדקו לסמן CSSM66. באנליזה של הגן הכמותי נמצא גן מתפצל במשפחה של הפר גנדי המשפיע על אחוז שומן; הוא מקטין את כמות החלב והחלבון ומוסיף כמות שומן. תוצאות דומות התקבלו לגבי שתי משפחות באוכלוסיה האמריקאית. בנות הפר גנדי הנושאות אלל מסויים של הסמן הגנטי, הנמצא בתאחיזה לגן הכמותי, מעלות את אחוז השומן ב-9 מאיות

איור 2. התפלגות תוך-משפחתית בבנות הפר גנדי של הסמן CSSM66.



איור 1. התפלגות תוך-משפחתית בארה"ב של הסמן CSSM66.

