

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 4

Issue 2

Különszám

Gödöllő
2008



AZ MC1R GÉN POLIMORFIZMUSAINAK SZEREPE A SZARVASMARHA SZŐRSZÍNÉNEK KIALAKÍTÁSÁBAN

Radácsi Andrea, Béri Béla, Czeglédi Levente

Debreceni Egyetem, Agrár-és Műszaki Tudományok Centruma, Mezőgazdaságtudományi Kar,
Állattenyésztéstudományi Intézet, 4032 Debrecen, Böszörményi u. 138.

radacsia@agr.unideb.hu

Összefoglalás

Az állatok színe, speciális jegyei az állattenyésztésben igen nagy szerepet játszottak, különösen a fajták kialakításának idején. A különböző állatfajokra jellemző szőrszín-változatok genetikai hátterének megismerésére az utóbbi években jelentős kutatói törekvés irányul. Az egyes szarvasmarhafajták szőrszínének kialakításáért felelős génekről – a többi állatfajhoz képest – még viszonylag keveset tudunk. A legtöbb *szarvasmarha szőrszín-változat kialakításában* az MC1R játszik szerepet, ezért számos vizsgálat folyt a génnel kapcsolatban. Az utóbbi években egyre több szarvasmarhafajta MC1R genotípusait azonosítják a kutatók és ezen információk felhasználhatóak a termékek nyomonkövethetőségének vizsgálatára is. Az alkalmazott PCR-RFLP módszer segítségével a szarvasmarha MC1R lókuszt három alléljét (E^D , E^+ , e) sikerült elkülönítenünk. Meghatároztuk négy Magyarországon tenyésztett szarvasmarhafajta (*magyar szürke, magyartarka, charolais, holstein-fríz*) MC1R genotípusait. Várakozásainknak megfelelően, a domináns E^D allélt (mely fekete szőrzetet alakít ki) csak a holstein-fríz fajtában tudtuk kimutatni. A magyartarka és a charolais fajtákban a recesszív allél (e) rögzülését tapasztaltuk, a vad-típusú allél (E^+) pedig kizárólag a magyar szürke fajtában volt jelen.

Kulcsszavak: MC1R, szőrszín, szarvasmarha, PCR-RFLP

Role of MC1R polymorphisms in forming coat colour of cattle

Abstract

Colour and special marks of animals had always played a significant role in animal breeding, especially at the time of forming breeds. Recently, there has been a sustained research effort to unfold the genetic background of coat colour varieties characteristic to the different animal species. However, comparing to other animal species, quite less is known about the genes responsible for determining the different coat colour varieties of cattle breeds. In cattle, *MC1R gene* has been subject of several studies in order to elucidate the *biology of coat colour*. Recently, an increasing number of publications have been reporting MC1R genotypes of cattle breeds. This information can be used for product traceability. Using PCR-RFLP method, we identified three alleles (E^D , E^+ , e) of the MC1R locus. MC1R genotypes of four cattle breeds popular in Hungary (*Hungarian Grey, Hungarian Simmental, Charolais, Holstein*) were determined. Due to our previous expectations, the E^D allele (forming black coat colour) was present only in the Holstein breed. The recessive allele (e) was fixed in the Hungarian Simmental and the Charolais breeds, while the wild-type allele (E^+) was identified only in the Hungarian Grey.

Keywords: MC1R, coat colour, cattle, PCR-RFLP



Irodalmi áttekintés

Az állatok színe, speciális jegyei az állattenyésztésben igen nagy szerepet játszottak, különösen a fajták kialakításának idején. A hobbitenyésztésben ez ma is rendkívül széles körben érvényes.

A vadon élő állatok színe rendszerint barnásszürke, ún. vadszín. Ez a szín biztosítja az állat számára a mimikri révén a legjobb védelmet. A háziásítással sok fajban lépett fel színmutáció, amit az ember a kiválogatással igyekezett megőrizni. A háziállatfajták szelekciójával az ősök eredeti, többnyire nem változatos, a környezethez alkalmazkodó, legfeljebb a téli-nyári változatban létező vad színei gyakran eltűntek (Zöldág, 2004).

A különböző állatfajokra jellemző szőrszín-változatok genetikai hátterének megismerésére az utóbbi években jelentős kutatói törekvés irányul. Az egyes szarvasmarha fajták szőrszínének kialakításáért felelős génekről – a többi állatfajhoz képest - még viszonylag keveset tudunk. Ez valószínűleg összefügg azzal, hogy a szarvasmarhánál, a lóval ellentétben, a szín az utolsó évszázadban - a fajták kialakulása után- rendkívül alárendelt szerepet játszik. *Kantanen és mtsai* (2000) felhívják a figyelmet arra, hogy a törzskönyvekben meghatározott hagyományos szőrszín-típusok megőrzése és fenntartása kiemelkedő fontosságú a veszélyeztetett hagyományos háziállatfajták génmegőrzése szempontjából.

A pigmenttermelési folyamat elején a melanoszómaokban a pigmentsejtekhez melanocita stimuláló hormon receptorok (MSHR) kapcsolódnak. Az MSH receptor szinonim elnevezése a melanocortin-1-receptor gén (MC1R). A pigmentsejtek már az embrionális fejlődés során, a szöveti differenciálódás különböző szakaszaiban eloszlanak az egyes szövetekben. A melanociták differenciálódása az embrionális velőcső őssejtjeiből történik, ugyanezen sejtcsoportok a látó-és hallószerv agyi központjainak, illetve az érfali szövetek kifejlődéséhez is hozzájárulnak. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy az albinizmos pigmenthiány, vagy más pigmenttermeléshez kötődő zavarok idegrendszeri rendellenességekkel is együtt járhatnak (*Klungland és Vage*, 2003; *Zöldág*, 2003).

A melanocitákban alapvetően kétféle pigment termelődik: a fekete vagy barnás színű eumelanin, illetve a vöröses vagy sárga feomelanin. A fekete a sötétebb, míg a vörös a világosabb színek kialakulásáért felelős. Szintézisük eltérő anyagcsereúton zajlik (*Prota*, 1992). *Olson* (1998) kutatási eredményei is megerősítik, hogy a háziállatok kültakarójának színét alapvetően a kétféle pigment kombinálódása, eloszlása, kiterjedése, hígulása vagy a termelődés hiánya határozza meg. Az eumelanin és a feomelanin termelődését a tirozináz enzim aktivitása befolyásolja, amelynek működését az MSH receptor szabályozza.



Alacsonyabb tirozináz aktivitás a feomelanin, míg magasabb tirozináz aktivitás eumelanin termelődéséhez vezet. Az MSH receptort az Extension lókuszt kódolja. Az eumelanin termelődését a tirozináz mellett más enzimek is, így a TYRP1 (tirozináz-szerű fehérje) és a dopakrómtautomeráz (DCT vagy más néven TYRP2) is szabályozzák (Klungland és Vage, 2003).

Az emlősök pigmentációját szabályozó gének subcelluláris, celluláris, szöveti és környezeti szinten hatnak (Sulaimon és Kitchell, 2003).

Melanocortin-1-receptor (MC1R)

A legtöbb szarvasmarha szőrszín-változat kialakításában az MC1R játszik szerepet, ezért számos vizsgálat folyt a génnel kapcsolatban. A gén pontos helyét Werth és mtsai (1996) határozták meg a 18. kromoszómán. Szarvasmarhában az első vizsgálatok (Klungland és mtsai, 1995; Jörg és mtsai, 1996) egy domináns fekete: E^D (L99P) és egy recesszív vörös: e (310delG) allélról számoltak be. E mutációk nélküli bármely kódoló szekvenciát a vad-típusú allélnak (E^+) tekintették, ami a legtöbb vörös, vörösesbarna vagy fekete variánsok kombinációjának kialakításáért felelős (Olson, 1998). Az allélek dominanciasora a következő: $E^D > E^+ > e$.

A termékek nyomonkövethetőségének vizsgálatához egyre több kutató javasolja a szőrszín meghatározásában szerepet játszó gének alaposabb megismerését. Maudet és Taberlet (2002) eredetvédett francia sajtok esetében vizsgálták a nem megengedett, de esetlegesen bekevert holstein tej jelenlétét az MC1R allélek felhasználásával. Russo és mtsai (2007) szintén a tejtermékek eredetvédelme érdekében határozták meg öt olasz tejhasznú fajta MC1R genotípusait. Az egyes szarvasmarhafajtákra jellemző MC1R genotípusok meghatározásával és más, a szőrszín kialakításában szerepet játszó gének polimorfizmusainak vizsgálatával olyan géntesztek dolgozhatók ki, melyek eredményesen alkalmazhatóak a termékek eredetvédelme érdekében. Vizsgálataink célja négy, Magyarországon tenyésztett szarvasmarhafajta (magyar szürke, magyartarka, holstein-fríz, charolais) MC1R genotípusainak meghatározása.

Anyag és módszer

A genotipizáláshoz összesen 120 egyedről (fajtánként 30) gyűjtöttünk vérmintákat. A vérminta-vétel az állatok torkolati vénájából (*vena jugularis*) történt, 5 ml mennyiségben egyedenként, EDTA véralvadásgátlót tartalmazó csövekbe. A mintákat feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A vérből genomi DNS-t Zsolnai és Orbán (1999) módszere alapján tisztítottunk.



PCR kondíciók

18 µl PCR mixhez [9,4µl desztillált víz, 2µl (0,2 mM) dNTP (Pharmacia Biotech, USA), 0,2µl GoTaq Flexi DNA Polymerase (5u/µl, Promega, Medison, USA), 4µl (5x) puffer (Promega, Medison, USA), 2µl (25 mM) MgCl₂ (Promega, Medison, USA), 0,2µl-0,2µl forward, ill. reverse primer (10 pmol/µl, Invitrogen Corporation, California, USA)] 2µl genomiális DNS (50-100 ng/µl) adagoltunk (1. táblázat).

1. táblázat: Az alkalmazott primerek szekvenciája

Alkalmazott primerek szekvenciája (Crepaldi és mtsai, 2003)	
MC1R-M1 (forward)	5' AAG AAC CGC AAC CTG CAC T 3'
MC1R-M2 (reverse)	5' GCT ATG AAG AGG CCA ACG AG 3'

Table 1. Sequences of the primers used in the experiments

PCR kondíciók: 95°C 2 perc, 95°C 30 mp, 61°C 30 mp, 72°C 30 mp, 72°C 5 perc, 10°C ∞, 35 ciklus.

A PCR reakciókhoz GeneAmp PCR Sytem 9700 (Applied Biosystems) típusú PCR készüléket használtunk. A vegyszerek bemérése steril fülke alatt történt.

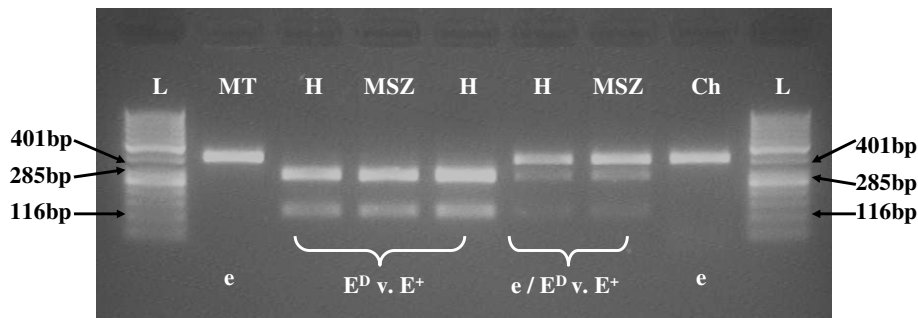
A PCR eredményeként egy 401 bp hosszúságú terméket kaptunk, mely a restrikciós enzimek felismerő helyét tartalmazza. A PCR-termék emésztése MspI és MspAII restrikciós enzimekkel (Promega, Medison, USA) történt. AZ RFLP vizsgálathoz 7µl PCR-termékhez 3 µl mixet (1,4µl dH₂O, 1,0µl 10x puffer, 0,1µl BSA, 0,5µl (10u/µl) enzim) adtunk, majd 37°C-os vízfürdőben 3 órán keresztül emésztettük. Ezt követően a mintákat 2%-os agaróz gélen futtattuk, Biocenter PSE gélfuttató kádban. A minták festése ethidium-bromiddal történt, így a különböző fragmentumok UV fényben láthatóvá válnak.

Eredmények és értékelés

Az alkalmazott PCR-RFLP módszer segítségével a szarvasmarha MC1R lókuszt három alléljét sikerült elkülönítenünk: a) a domináns **E^D** allélt, mely fekete szőrzetet alakít ki, b) a recesszív **e** allélt, mely homozigóta állapotban vörös szőrzetet eredményez és c) a vad-típusú **E⁺** allélt, mely más, a szőrzet kialakításában szerepet játszó gének hatásától függően változatos színű kültakarót eredményez.



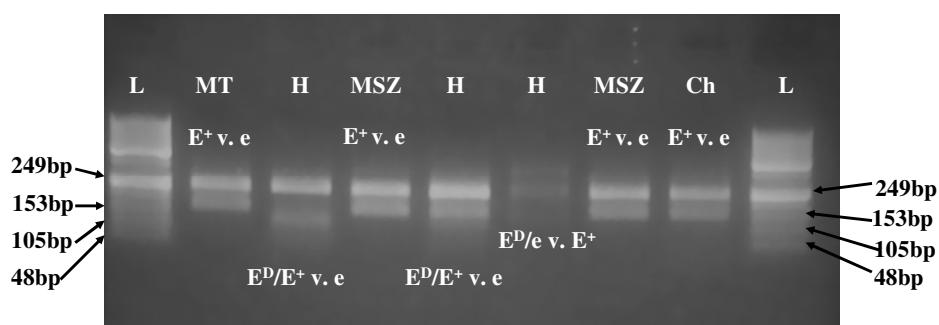
A recesszív (e) allél jelenléte esetén G deléció van a 310 pozícióban. Az Msp1 enzim felismerő helye nincs jelen, ezért az enzim nem vág és 401 bp hosszúságú fragmentet kapunk. Amennyiben nincs jelen ez a mutáció (vagyis E^+ vagy E^D allél van jelen), akkor 285 és 116 bp hosszúságú fragmenteket kapunk (1. kép).



1. kép: Msp1 emésztés gélképe L: 50 bp DNS létra, MT: magyartarka, H: holstein-fríz, MSZ: magyar szürke, Ch: Charolais, e: recesszív allél (vörös szín), E^D : domináns allél (fekete szín), E^+ : vad-típusú allél (változatos szín)

Picture 1. Results of digestion with Msp1 enzyme L: 50 bp DNA ladder, MT: Hungarian Simmental, H: Holstein, MSZ: Hungarian Grey, Ch: Charolais, e: recessive allele (red colour), E^D : dominant allele (black colour), E^+ : wild-type allele (various colours)

Az E^D allél T/C helyettesítést jelent 296 pozícióban. Az MspA1I enzim segítségével az E^D allél különíthető el a vad-típusú (E^+) és a recesszív (e) allélektől. E^D allél jelenléte esetén 249, 105 és 48 bp hosszúságú fragmenteket kapunk, míg az E^+ vagy a e allél jelenlétét 249 és 153 bp hosszúságú fragmentek jelzik (2. kép).



2. kép: MspA1 emésztés gélképe L: 50 bp DNS létra, MT: magyartarka, H: holstein-fríz, MSZ: magyar szürke, Li: limuzin, e: recesszív allél (vörös szín), E^D : domináns allél (fekete szín), E^+ : vad-típusú allél (változatos szín)

Picture 2. Results of digestion with MspA1I enzyme L: 50 bp DNA ladder, MT: Hungarian Simmental, H: Holstein, MSZ: Hungarian Grey, Ch: Charolais, e: recessive allele (red colour), E^D : dominant allele (black colour), E^+ : wild-type allele (various colours)



A vizsgált szarvasmarhafajták közül a várakozásainknak megfelelően kizárólag a fekete-tarka szőrszínű holstein-fríz esetében tudtuk kimutatni a domináns (E^D) allélt. Eredményeink megerősítik a korábbi vizsgálatok (Jörg és mtsai, 1996; Rouzaud és mtsai, 2000; Maudet és Taberlet, 2002; Crepaldi és mtsai, 2003; Rolando és Di Stasio, 2005; Russo és mtsai, 2007) megállapításait. Mindegyik vizsgált holstein-fríz egyed fekete-tarka szőrszínű volt, vagyis legalább egy E^D alléllal rendelkezett.

Ugyanakkor az is ismert tény, hogy a recesszív (e) allél jelen van a fajtában. Russo és mtsai (2007) 0,11 allélgyakorisági értékkel mutatták ki az olasz holstein állományban. Az általunk vizsgált (kisebb létszámú) állományban kisebb gyakorisággal (0,02) fordult elő a recesszív allél (2. táblázat).

2. táblázat: A vizsgált fajták MC1R allélgyakorisági értékei

Fajta(1)	Szőrszín(2)	Vizsgált elemszám(3)	MC1R allélek gyakorisága(4)		
			E^D	e	E^+
magyar szürke(5)	szürke(9)	30	-	-	1,00
magyartarka(6)	vörös-tarka(10)	30	-	1,00	-
holstein-fríz(7)	fekete-tarka(11)	30	0,98	0,02	-
charolais(8)	krémszínű(12)	30	-	1,00	-

Table 2. MC1R allele frequencies of the different cattle breeds

1: breed, 2: coat colour, 3: number of analysed samples, 4: allele frequencies, 5: Hungarian Grey, 6: Hungarian Simmental, 7: Holstein, 8: Charolais, 9: grey, 10: red and white, 11: black and white, 12: cream-coloured

A magyartarka fajtában a recesszív allél (e) rögzülését tapasztaltuk. Az olasz szimmentáli esetében Crepaldi és mtsai (2003) és Maudet és Taberlet (2002) is az e allél fixálódást jelentették, Russo és mtsai (2007) azonban 0,029 allélgyakorisági értékkel a vad-típusú (E^+) allélt is kimutatták. A vörös szín hígult változatával rendelkező charolais fajtában szintén csak a recesszív (e) volt kimutatható.

A vad-típusú allélt (E^+) a hazai tenyésztésű fajták közül csak a magyar szürke fajtában tudtuk kimutatni. Több kutatócsoport is vizsgálta a magyar szürke rokonsági körébe tartozó fajták (piemonti, chianina, romagnola) MC1R genotípusait. A felsorolt fajták kültakarójának színe nagymértékben hasonló a magyar szürkééhez, igaz a romagnola és a chianina esetében e színváltozat hígult változatait találjuk. Rolando és Di Stasio (2005) az E^+ allél fixálódását jelentette a piemonti fajtában, ugyanakkor Russo és mtsai (2007) 0,08 allélgyakorisági értékkel kimutatták a recesszív allél jelenlétét is.



Irodalomjegyzék

- Crepaldi, P., Marilli, M., Meggiolaro, D., Fornarelli, F., Renieri, C., Milanesi, E., Ajmone-Marsan, P.* (2003): The MC1R gene polymorphism in some cattle breeds raised in Italy. *Pigment Cell Res.*, 16. 578.
- Jörg, H., Fries, H.R., Meijerink, E., Strazinger, G.F.* (1996): Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mamm. Genome*, 7. 317-318.
- Kantanen, J., Olsaker, I., Brusgaard, K., Eythorsdottir, E., Holm, L-E., Lien, S., Danell, B., Adalsteinsson, S.* (2000): Frequencies of genes for coat colour and horns in Nordic cattle breeds. *Gen. Sel. Evol.*, 32. 561-576.
- Klungland, H., Vage, D.I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S., Lien S.* (1995): The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome*, 6. 636-639.
- Klungland, H., Vage, D. I.* (2003): Pigmentary switches in domestic animal species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 994. 331-338.
- Maudet, C., Taberlet, P.* (2002): Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin 1 receptor (MC1R) gene polymorphism. *J. Dairy Sci.*, 85. 707-715.
- Olson, T.A.* (1998): Genetics of colour variation. R. Fries, A. Ruvinsky (eds), *The Genetics of Cattle*. CABI Publishing, Wallingford, 33-53.
- Prota, G.* (1992): Melanins and melanogenesis. New York: Academic Press, 1-290.
- Rolando, A., Di Stasio, L.* (2005): MC1R gene analysis applied to breed traceability of beef. Short communication. *Ital. J. Anim. Sci.*, 5. 87-91.
- Rouzaud, F., Martin, J., Gallet, P.F., Delourm, D., Goulemot- Leger, Amigues, Y., Menissier, F., Leveziel, H., Julien, R., Oulmouden, A.* (2000): A first genotyping assay French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (MC1R). *Gen. Sel. Evol.*, 32. 511-520.
- Russo, V., Fontanesi, L., Scotti, E., Tazzoli, M., Dall'Olio, S., Davoli, R.* (2007): Analysis of melanocortin 1 receptor (MC1R) gene polymorphisms in some cattle breeds: their usefulness and application for breed traceability and authentication of Parmeggiano Reggiano cheese. *Ital. J. Anim. Sci.*, 6. 257-272.
- Sulaimon, S.S., Kitchell, B.E.* (2003): Review article. The biology of melanocytes. *Vet. Derm.*, 14. 57-65.
- Zöldág, L.* (2003): A kültakaró pigmentációs zavarainak genetikai alapjai. *Magy. Állatorv. Lapja*, 9. 561-571.



- Zöldág, L. (2004): A kültakaró színöröklése háziállatokban 1. A pigmentképződés. *Kistermelők Lapja*, 4. 37.
- Zsolnai, A., Orbán, L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*, 7. 1462-1468.
- Werth, L.A., Hawkins, G.A., Eggen, A., Petit, E., Elduque, C., Kreigesmann, B., Bishop, M.D. (1996): Rapid Communication: Melanocyte Stimulating Hormone Receptor (MC1R) maps to bovine chromosome 18. *J. Anim. Sci.*, 74. 262.