

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 5

Issue 4

Különszám

Gödöllő
2009



A HASZNOS ÉLETTARTAM NÖVELÉSÉNEK GENETIKAI LEHETŐSÉGEI TEJELŐ SZARVASMARHA ÁLLOMÁNYOKBAN

¹Berta Attila, ²Czeglédi Levente, ²Radácsi Andrea, ²Béri Béla

¹Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Földművelésügyi Igazgatóság,
6720 Szeged, Deák Ferenc utca 17.

²Debreceni Egyetem, Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma Állattenyésztés-tudományi Intézet,
4032 Debrecen, Böszörményi út 138.

berta71@freestart.hu

Összefoglalás

A hosszú hasznos élettartamra sokáig csak a küllem alapján próbáltak következtetni a kutatók és a tenyésztők. A különböző technológiák és a molekuláris genetikai kutatások fejlődésével ma már számos olyan új eljárás áll rendelkezésünkre, amelyekkel már borjúkorban előre jelezhető egy állat későbbi teljesítménye. Az utóbbi néhány évben több tanulmány számolt be arról, hogy bizonyos genotípusú egyedek hosszabb hasznos élettartammal jellemezhetők, mint más genotípusú társaik. Mivel a selejtezések fő okai nagyrészt a termelési szint csökkenése, illetve szaporodásbiológiai problémák, mint például az újrafogamzás elmaradása, a kutatók olyan géneket vizsgáltak és vizsgálnak, melyek ezekre a tulajdonságokra hatással lehetnek.

A szerzők a hosszú hasznos élettartamot várhatóan befolyásoló gének (proteáz inhibitor: PI, calpastatin: CAST) polimorfizmusait vizsgálták két holstein-fríz tehéncsoportban. Az egyik (1.) tehéncsoportba első laktációs, selejtezésre ítélt egyedek (39), a másik (2.) csoportba legalább 5 lezárt laktációval rendelkező, hosszú hasznos élettartamú állatok (33) kerültek. Az egyedek az ország különböző tejelő szarvasmarha telepeiről kerültek kiválasztásra. A vizsgálathoz PCR-RFLP-módszert alkalmaztak. A csoportok közötti különbségek megállapításához a χ^2 -próbát használták. Összefoglalásként elmondható, hogy sem a PI, sem a CAST gén polimorfizmusait vizsgálva nem találtak statisztigailag igazolható különbséget az 1. laktációban selejtezésre ítélt és a hosszú hasznos élettartammal rendelkező egyedek között. Eredményeiket befolyásolhatta az alacsonyabb elemszám, ezért a vizsgálatok megismétlését javasolják nagyobb állományokban

Kulcsszavak: hasznos élettartam, gén polimorfizmusok, proteáz inhibitor, calpastatin, holstein-fríz



Genetic possibilities of the increase of productive life in milking bovine substances

Abstract

Researchers and breeders tried to deduce the long productive life based on the type only for a long time. Several new procedures like that stand for our provision already today with the development of the different technologies and the molecular genetics researches, with which the later performance of an animal which can be prediction in a calf age already. In the last few years more studies reported that animals with a certain genotype are qualifiable with a longer productive life than their companions with an other genotype.

Since the decrease of the production level, multiplying concerned are the capital reasons of the sorting out, the researchers examined genes that may have an effect on these characteristics. The authors examined the polymorphisms of the genes influencing the long productive life expectedly in two dairy cattle groups. Cattles sentenced culling after the first lactation got into the first group. (39 dairy cattles), Into the second group at least five accomplished lactation cattles (33) they were found. The animals they got from the country's different milking bovine settlements onto a selection. To the examination PCR-RFLP method was applied. To the statement of the differences between the groups the χ^2 test was applied. As a summary can be related, how examining the polymorphisms of gene PI, and CAST they did not find differences which can be justified statistically between dairy cattles sentenced to sorting out after the 1st lactation and others who have long productive life. The lower number of elements may have influenced their results, repeating the examinations is suggested in bigger substances because of this.

Keywords: longevity, gene polimorfisms, proteate inhibitory, calpastatin, Holstein Friesian

Bevezetés

A hosszú hasznos élettartamra sokáig csak a küllem alapján tudtak következtetni a kutatók és a tenyésztők. A különböző technológiák és a molekuláris genetikai kutatások fejlődésével napjainkban már számos olyan új eljárás áll rendelkezésünkre, melyekkel akár borjúkorban előre jelezhető egy állat későbbi teljesítménye. Az utóbbi néhány évben több tanulmány számolt be arról, hogy bizonyos genotípusú egyedek hosszabb hasznos élettartammal jellemezhetők, mint más genotípusú társaik.



Mivel a selejtezések fő okai nagyrészt a termelési szint csökkenése, illetve szaporodásbiológiai problémák, mint például az újrafogamzás elmaradása, a kutatók olyan géneket vizsgáltak és vizsgálnak, melyek ezekre a tulajdonságokra hatással lehetnek.

Irodalmi áttekintés

Khatib és mtsai (2007) az UTMP (*uterine milk protein*) gén expresszióját különböző szövetekben vizsgálva kerestek összefüggést a tejelő tehenek hasznos élettartamával. A gén pontos szerepe még nem teljesen tisztázott, de valószínűleg hatással van a fogamzásra, szabályozza a növekedést és az anya immunrendszerének szupressziójában is szerepet játszik.

Wang és mtsai (2008) a 2 fibrolaszt növekedési faktor (FGF2) és a tejösszetétel, a szomatikus sejttség és a hasznos élettartam közötti összefüggéseket vizsgálták. Eredményeik azt mutatták, hogy a 11646 pozícióban található egyszerű fehérje polimorfizmus (*single nucleotid polimorfizmus*, SNP) hatással volt a vizsgált tulajdonságokra. *Huang és mtsai* (2008) POU1F1 (POU class 1 homeobox 1) gén polimorfizmusai és a tejhozam, valamint a hasznos élettartam között tapasztaltak összefüggést.

Khatib és mtsai (2005) a proteáz inhibitor (PI) gén hatását vizsgálták az észak-amerikai holstein-fríz állományok termelési és funkcionális tulajdonságaira. Megállapították, hogy a gén hatással volt a vizsgált állomány hasznos élettartamára.

García és mtsai (2006) a calpastatin (CAST) génben azonosított két mutáció és a tejhasznú tehenek fertilitása és hosszú hasznos élettartama közötti összefüggéseket vizsgálták. Eredményeik alapján a gén 3 axonjában található 283C>T mutáció van hatással a tejhasznú szarvasmarha hasznos élettartamára. Véleményük szerint a CAST gén kedvező alléljére való szelekció várhatóan nem jár együtt a termelési szint csökkenésével.

Anyag és módszer

A hosszú hasznos élettartamot várhatóan befolyásoló gének (*protease inhibitor*, *calpastatin*) polimorfizmusainak vizsgálatához PCR-RFLP módszert alkalmaztunk. A polimeráz láncreakció (PCR) a genetikai vizsgálatok kiindulópontja, ez a technika a leghatékonyabb módja egy adott DNS-szakasz *in vitro* sokszorosításának.



Egy vagy több DNS szekvencia közel exponenciálisan sokszorosítható egymást követő, szabályozott hőmérsékleten végbemenő reakciók ciklusain keresztül (*Fésűs és mtsai, 2000*). A technikát *Mullis-Faloona (1987)* dolgozta ki.

Ismert mutációk azonosítására az RFLP (*restriction fragment length polymorphism*, restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) a legáltalánosabban használt módszer (*Botstein és mtsai, 1980*). PCR segítségével a kívánt régiót felszaporítják, majd restrikciós endonukleázzal kezelik. A restrikciós enzimek baktériumok által termelt enzimek, amelyek adott szekvenciát felismerve a DNS-t emésztik, vágják. (*Dowling és mtsai, 1990*). Az allélek közötti szekvencia-különbség restrikciós enzim felismerőhelyet hoz létre vagy töröl, így az enzimes emésztést követően minden allél a rá jellemző fragmenthosszt fogja mutatni. Az eltérő hosszúságú fragmentumokat ethidium-bromidos agaróz gélen futtatva (elektroforézis), UV-fény alatt láthatóvá válnak és elkülöníthetők. Az elektroforézis ionos töltésű molekulák elválasztása a felületi töltéssűrűség, a molekulatömeg és az alak alapján (*Fésűs és mtsai, 2000*). A DNS-molekulák egyenáram hatására a pozitív töltés irányába haladnak és hosszuktól függően eltérő távolságban észlelhetők. Az RFLP-módszer előnye, hogy alkalmazásával egyszerűen sok minta vizsgálható (*Aquadro és mtsai, 1992*), hátránya azonban, hogy a vizsgált minták csak két genotípusba sorolhatók. (*Archibald-Haley, 1993*).

Vizsgálatainkhoz mintát gyűjtöttünk

- a) 1. laktációs, selejtezésre ítélt
- b) hosszú hasznos élettartamú (legalább öt lezárt laktációval rendelkező)

egyedektől. A begyűjtött mintákból (vér, szőr) genomiális DNS-t tisztítottunk, majd PCR-RFLP-módszer segítségével határoztuk meg a vizsgálni kívánt gének polimorfizmusait.

A vizsgálatok során összesen 72 holstein-fríz tehén PI és CAST genotípusát állapítottuk meg. Az egyedeket az ország több tejelő szarvasmarha-telepéről választottuk ki. A hosszú hasznos élettartamú csoportba 33 egyed, míg az 1. laktációban selejtezésre ítélt csoportba 39 egyedet soroltunk.

A két csoport (305 napos laktációra vetített) átlagos termelési paraméterei az *1. táblázatban* láthatóak. Az egyedek termelési adatait a Szarvasmarha Információs Rendszerből gyűjtöttük ki.

1. táblázat: A két csoport átlagos termelési paramétere

	Tejmennyiség (kg) (1)	Zsírmennyiség (kg) (2)	Fehérje-mennyiség (kg) (3)
1. laktációs selejt (4)	8013,82	279,54	249,84
hosszú hasznos élettartamú (5)	10680,75	358,94	328,62

Table 1. The average production parameters of the two groups

Milk quantity (1), Fat quantity (2), Protein quantity (3), Dairy cattles who were sentenced to culling after the 1st lactations (4), Dairy cattles with long productive life (5)

A hosszú hasznos élettartamú csoport egyedei átlagosan 7,125 laktációt teljesítettek.

A mintákat az egyedek torkolati vénájából (*vena jugularis*) vettük, állatonként 5ml mennyiségben, EDTA véralvadásgátlót tartalmazó csövekbe. A minták szennyeződésének elkerülése érdekében egyedenként külön injekcióstűt használtunk. A szőrmintákat az állatok farokbojtjából gyűjtöttük, egyedenként 8-10 szőrszálat kitépve, ügyelve a minták átszennyezésének elkerülésére. A mintákat feldolgozásig -20 °C-fokon tároltuk.

A DNS-vizsgálatok elvégzéséhez tiszta genomiális DNS-re van szükség, melyek előkészítése Zsolnai-Orbán, (1999) és a FAO/IAEA (2004) által meghatározott módszerekkel történt.

A PCR-reakciókhoz GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) típusú PCR-készüléket használtunk. A hozzá szükséges vegyszerek bemérése steril fülkében történt. Először a PCR-elegyet mértük össze, majd 9µl PCR-elegyhez 1µl genomiális DNS-t adagoltunk.

Az RFLP-vizsgálathoz 7µl PCR-termékhez 3µl mixet adagoltunk, majd 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük. Az emésztés 3 órán keresztül tartott, ezt követően a mintákat 2%-os agaróz gélen futtatuk, Biocenter PSE gélfuttató kádban. A minták festése ethidium-bromiddal történt, így a különböző fragmentumok UV-fényben láthatóvá váltak.

A két csoport allél-és genotípus-gyakorisági értékei közötti különbségeket χ^2 -próbával ellenőriztük.

Eredmények és értékelés

A proteáz inhibitor (PI) és a calpastatin (CAST) génekben vizsgált SNP-ek esetében tapasztalt allél- és genotípus-gyakorisági értékeket a 2. és a 3. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: A PI gén esetében tapasztalt allél- és genotípus gyakorisági értékek

	Allélgyakoriság (%) (1)		Genotípusgyakoriság (%) (2)		
	C	T	CC	CT	TT
1. laktációs selejt (3)	64,10	35,90	41,03	46,15	12,82
hosszú hasznos élettartamú (4)	69,70	30,30	48,48	42,42	9,09

Table 2. In the case of the PI gene experienced allele and genotype frequency values

allele frequency (1), genotype frequency (2), Dairy cattles who were sentenced to culling after the 1st lactations (3), Dairy cattles with long productive life (4)

A PI gén esetében a C allél gyakorisága volt magasabb, mind az 1. laktáció után selejtezésre ítélt, mind a hosszú hasznos élettartamú csoportban. A két csoport között az allélgyakorisági értékeket vizsgálva statisztikailag is igazolható különbség nem volt kimutatható. ($P < 0,05$). (A számított χ^2 -érték 0,501; ami kisebb, mint a kritikus χ^2 -érték: 3,841).

A genotípus-gyakorisági értékeket vizsgálva megállapítható, hogy az 1. laktációs selejtcsoportban a CT genotípusú, míg a hosszú hasznos élettartamú csoportban a CC-genotípusú egyedek aránya volt magasabb. A TT-genotípusú állatok aránya mindkét csoport esetében 10% körüli értéket mutatott. A genotípus-gyakorisági értékeket vizsgálva a két csoport között statisztikailag is igazolható különbség nem volt kimutatható. ($P < 0,0$). (A számított χ^2 -érték 0,503; ami kisebb, mint a kritikus χ^2 -érték: 3,841).

A calpastatin gén 283C>T mutációját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált állományban (mindkét csoportban) a T-allél gyakorisága volt magasabb. A két csoport között statisztikailag is igazolható különbség nem volt kimutatható. ($P < 0,0$). (A számított χ^2 -érték 0,126; ami kisebb, mint a kritikus χ^2 -érték: 3,841).

3. táblázat: A CAST gén esetében tapasztalt allél- és genotípus gyakorisági értékek

	Allélgyakoriság (%) (1)		Genotípusgyakoriság (%) (2)		
	C	T	CC	CT	TT
1. laktációs selejt (3)	34,62	65,38	7,69	53,85	38,46
hosszú hasznos élettartamú (4)	31,82	68,18	9,10	45,45,	45,45

Table 3. In the case of the CAST gene experienced allele and genotype frequency values

allele frequency (1), genotype frequency (2), Dairy cattles who were sentenced to culling after the 1st lactations (3), Dairy cattles with long productive life (4)



Az allélgyakorisági értékeknek megfelelően mindkét csoportban a CC-genotípusú egyedek aránya volt a legalacsonyabb (7,69% és 9,10%). A heterozigóta (CT-genotípusú) állatok aránya magasabb volt az 1. laktációs selejtcsoportban (53,85%), a hosszú élettartamú egyedek 45,45%-os arányához képest. A hosszú hasznos élettartamú csoportban a TT-genotípusú egyedek aránya megegyezett a heterozigóta egyedek arányával. (Mindkét genotípus 45,45%-45,45%-ban volt jelen.) A két csoport esetében a genotípusok megoszlása azonosnak tekinthető. (A számított χ^2 -érték 0,499; ami kisebb, mint a kritikus χ^2 -érték: 3,841).

Eredményeink nem egyeznek a *García és mtsai* (2006) által közöltekkel, akik összefüggést mutattak ki a CC-genotípus és a hasznos élettartam között. A vizsgálatok eredményei közötti különbséget magyarázhatja a vizsgált populációk nagysága közötti különbség is (*García és mtsai*, 2006 közel 700 egyed genotipizálását végezték el, nekünk azonban jóval kisebb létszámú állomány állt rendelkezésünkre.)

Összefoglalásként elmondható, hogy sem a PI, sem a CAST gén polimorfizmusait vizsgálva nem találtunk különbséget az 1. laktációban selejtezésre ítélt és a hosszú hasznos élettartammal rendelkező egyedek között. Eredményeinket befolyásolhatta az alacsonyabb elemszám is, ezért javasoljuk a vizsgálatok megismétlését nagyobb állományokban.

Irodalomjegyzék

- Aguadro, C.F., Jennings, R.M., Bland, M.M., Laurie, C.H., Langley, C.H.* (1992): Patterns of naturally occurring restriction map variation, dopa decarboxylase activity variation and linkage disequilibrium in the Ddc gene region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 132: 443-452.
- Archibald, A., Haley, C.* (1993): Mapping the complex genomes of animals and man. *Outlook on Agriculture*, 22: 79-84.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W.* (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D.* (1990): Nucleic acids II: restriction site analysis. *Molecular Systematics*. (Eds. D.M. Hillis and C. Moritz). Sunderland, Mass Sinauer Associates, 250-317.
- FAO/IEAE* (2004): FAO Handbook of laboratory Exercise. FAO/IEAE Inter-regional Training course on Molecular Methods in Livestock Genetics and Breeding. Seibersdorf. Austria 18.
- Fésüs I., Komlósi I., Varga L., Zsolnai A.* (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroiinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest



- García, M.D., Michal, J.J., Gaskin, C.T., Reeves, J.J., Ott, T.L., Jiang, Z. (2006):* Significant association of the calpastatin gene with fertility and longevity in dairy cattle. *Animal Genetics*, 37: 293-307.
- Huang, W., Maltecca, C., Khatib, H. (2008):* A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle. *Animal Genetics*, 39: 554-557.
- Khatib, H., Heifetz, E., Dekkers, J.C.M. (2005):* Association of protease inhibitor gene with production traits in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 88: 1208-1213.
- Khatib, H., Schutzkus, V., Chang, Y.M., Rosa, G.J.M. (2007):* Pattern of expression of the uterine milk protein gene and associations with productive life in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 90: 2427-2433.
- Mullis, K.B., Maltecca, C., Tal-Stein, R., Lipkin, E., Khatib, H. (2008):* Association of bovine Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) gene with milk fat and productive life: an example of the ability of candidate pathway strategy to identify quantitative trait genes. *Journal of Dairy Science*, 91: 2475-2480.
- 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.