

POLIMORFIZM GENU *IGF-1* U BYDŁA RASY POLSKA HOLSZTYŃSKO-FRYZYJSKA

Daniel Polasik, Paulina Adamska, Katarzyna Wojdak-Maksymiec,
Marek Kmieć, Arkadiusz Terman

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Streszczenie. Celem niniejszych badań była charakterystyka genetyczna stada krów na podstawie polimorfizmu w regionie promotorowym genu *IGF-1* oraz ustalenie ewentualnych zależności pomiędzy wykrytym polimorfizmem a cechami użytkowości mlecznej. Badaniem objęto 185 krów rasy polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej. Polimorfizm genu *IGF-1* oznaczano metodą ACRS-PCR. W analizowanym stadzie stwierdzono następujące częstości alleli: *T* – 0,43, *C* – 0,57. Porównując obserwowane i oczekiwane częstości genotypów odnotowano, iż badana populacja nie znajdowała się w stanie równowagi genetycznej. Heterozygotyczność analizowanego stada wyniosła 0,64. Analizując cechy użytkowości mlecznej w zależności od poszczególnych genotypów stwierdzono, iż genotyp *CC* w większości przypadków powiązany był z wyższymi wartościami ocenianych cech, jednak różnice te nie zostały potwierdzone statystycznie.

Słowa kluczowe: bydło, insulinopodobny czynnik wzrostu 1, polimorfizm, promotor, użytkowość mleczna

WSTĘP

Wzrost i różnicowanie się gruczołu mlecznego oraz laktogeneza są regulowane hormonalnie. Niewątpliwie składowymi tych procesów są elementy osi somatotropowej, jednak dokładny mechanizm ich działania nie jest jeszcze dobrze poznany [Zych i in. 2005]. Jednym z takich elementów jest insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (*IGF-1*), który syntetyzowany jest głównie w wątrobie w odpowiedzi na wydzielanie hormonu wzrostu. Gen, który koduje *IGF-1* u krów, został zlokalizowany w chromosomie 5 (BTA5). Ekspresja genu *IGF-1* jest regulowana zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji. W promotorze bydłeczego genu *IGF-1* wykryto dwa miejsca polimorficzne: powtórzenie mikrosatelitarne (CA)_n [Kirkpatrick i in. 1992] i tranzycję C/T (SNP) [Ge i in. 1997, 2001].

Ponieważ substytucja C/T zlokalizowana w pozycji 472 pz powiązana jest ze zróżnicowaniem ekspresji genu *IGF-1* [Maj i in. 2008], w niniejszej pracy podjęto próbę okre-

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr inż. Daniel Polasik, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin, e-mail: daniel.polasik@zut.edu.pl

ślenia zależności pomiędzy poszczególnymi genotypami tego genu a cechami produkcyjnymi mleka u krów rasy polska holsztyńska-fryzyjska.

MATERIAŁ I METODY

Material badawczy

Badania przeprowadzono na stadzie krów rasy polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej, liczącym 185 osobników. Zwierzęta utrzymywane były na jednej z ferm zlokalizowanych na terenie woj. zachodniopomorskiego. Warunki utrzymania i żywienia były ujednolicone dla wszystkich zwierząt.

U krów oceniane były następujące cechy użytkowości mlecznej (w I, II, i III laktacji):

- wydajność mleka, kg,
- wydajność tłuszczu w mleku, kg,
- zawartość tłuszczu w mleku, %,
- wydajność białka w mleku, kg,
- zawartość białka w mleku, %,
- wydajność białka i tłuszczu w mleku, kg.

Ponieważ długość laktacji różniła się u poszczególnych zwierząt, dane przeliczone zostały na 305-dniową laktację.

Dane o użytkowości mlecznej krów pochodziły z dokumentacji hodowlanej prowadzonej w ramach oceny użytkowości mlecznej.

Materiałem do izolacji DNA była krew obwodowa uzyskana z żyły szyjnej. Krew pobierana była w ilości ok. 3 ml do probówek próżniowych z czynnikiem antykoagulacyjnym (K₃EDTA). Izolację DNA przeprowadzono używając zestawu *MasterPure*TM DNA Purification Kit for Blood (*Epicentre*) w oparciu na metodzie opisanej przez producenta. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analiz.

Analiza polimorfizmu DNA

Do analizy polimorfizmu genu *IGF-1* wykorzystano metodę ACRS-PCR. PCR przeprowadzono w całkowitej objętości 15 µl zawierającej: ok. 80 ng DNA, 1xPCR bufor, 2.5 mM MgCl₂, 0,2 mM mieszaniny dNTP, 12 pmol startera F i R, 1U polimerazy *Taq* DNA (*Fermentas*), barwnik obciążający, H₂O destylowana (dodawana do uzyskania objętości 15 µl). W celu amplifikacji genu *IGF-1* użyto starterów o następujących sekwencjach:

F 5'– ATT ACA AAG CTG CCT GCC CC – 3'

R 5'– ACC TTA CCC GTA TGA AAG GAA TAT ACG T – 3' [Ge i in. 2001].

Zastosowano następujący profil termiczny:

1. 94° C przez 5 min,
2. 94° C przez 1 min,
3. 64° C przez 45 s,
4. 72° C przez 1 min,
5. 72° C przez 5 min.

Etapy 2.– 4. powtórzono 30 razy.

W wyniku PCR amplifikowany był fragment DNA o długości 249 par zasad (pz), który poddawany był działaniu 2–3U enzymu restrykcyjnego *SnaBI* w temperaturze 37°C przez całą noc. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzany był w 2,5-procentowym żelu agarozowym w buforze TBE z dodatkiem bromku etydyny, w obecności wzorca DNA pUC19/*MspI* (*Fermentas*) przy stałym napięciu 100 V. Fragmenty restrykcyjne odczytywano w świetle UV i archiwizowano używając transiluminatora (*Vilber Lourmat*).

Analiza statystyczna

W celu ustalenia struktury genetycznej badanego stada krów na podstawie polimorfizmu genu *IGF-1* oszacowano:

- częstość występowania poszczególnych alleli i genotypów;
- oczekiwaną (*gene diversity*) i obserwowaną (*heterozygosity*) heterozygotyczność;
- stan równowagi genetycznej na podstawie prawa Hardy’ego-Weinberga (HWE).

Dla badanego genu określono również parametr PIC (*polymorphic information content*).

Niniejsze obliczenia wykonano stosując program PowerMarker v. 3.25 [Liu i Muse 2005].

W celu oszacowania zależności między polimorfizmem *IGF-1/SnaBI* a wybranymi cechami użyteczności mlecznej wykorzystano model wieloczynnikowy mieszany z pakietu GLM (*General Linear Model*) programu Statistica®(ver. 8.0):

- dla laktacji I, II, III:

$$y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + b(\text{HF}) + e_{ijkl}$$

gdzie:

y_{ijklm} – wartość analizowanej cechy,

μ – średnia wartość cechy,

a_i – efekt genotypu,

b_j – efekt ojca,

c_k – efekt roku/sezonu urodzenia krowy,

d_l – efekt roku/sezonu urodzenia krowy,

$b(\text{HF})$ – regresji udziału genów rasy HF na wartość cechy,

e_{ijklm} – błąd,

- dla wszystkich laktacji razem

$$y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + f_m + b(\text{HF}) + e_{ijklm}$$

gdzie:

y_{ijklm} μ a_i b_j c_k d_l $b(\text{HF})$ e_{ijklm} – jak powyżej,

f_m – efekt laktacji.

WYNIKI I DISKUSJA

W analizowanym stadzie stwierdzono obecność 3 genotypów genu *IGF-1* o następujących frekwencjach: *CC* – 0,25, *CT* – 0,64 i *TT* – 0,11. Występowanie powyższych genotypów uwarunkowane było obecnością dwóch alleli, których długości fragmentów

restrykcyjnych, obserwowanych na żelu agarozowym, wynosiły odpowiednio: allel *C* – 249 pz, allel *T* – 223 i 26 pz. Frekwencje alleli w analizowanym stadzie wraz z wynikami otrzymanymi przez innych autorów przedstawia tab. 1.

Tabela 1. Frekwencja alleli genu *IGF-1* w porównaniu z wynikami innych autorów
Table 1. The frequency of *IGF-1* gene alleles in comparison with results of other authors

Rasa (populacja) Breed (population)	Frekwencja alleli Allele frequency		Referencje References
	<i>T</i>	<i>C</i>	
Polska holsztyńsko-fryzyjska (odmiana czarno-biała) Polish Holstein-Fresian (Black-and-White variety)	0,43	0,57	–
Angus	0,64	0,36	Ge i in. [2001]
Polska czerwona (Polish Red)	0,55	0,45	Klauzińska i in. [2004]
Polska czarno-biała (Polish Black-and-White)	0,47	0,53	
Nellore	–	1,00	Curi i in. [2005]
Coachim	0,35	0,65	
Simmental x nellore	0,20	0,80	
Angus x nellore	0,32	0,68	
Polska holsztyńsko-fryzyjska (Polish Holstein-Fresian)	0,48	0,52	Siadkowska i in. [2006]
Jersey	0,68	0,32	Grzelak i in. [2007]
Nellore	0,01	0,99	Massolini Laureano i in. [2009]
Charolais (Coahuila)	0,26	0,74	Reyna i in. [2010]
Charolais (Nuevo Leon)	0,46	0,54	
Beefmaster (Tamaulipas)	0,03	0,97	
Południowoantalijskie czerwone (South Anatolian Red)	0,23	0,77	Akis i in. [2010]
Wschodnioantalijskie czerwone (East Anatolian Red)	0,38	0,62	
Irańskie holsztyńsko-fryzyjskie (Iranian Holstein-Fresian)	0,44	0,56	Mehmannavaz i in. [2010]
Polska holsztyńsko-fryzyjska (odmiana czerwono-biała) Polish Holstein-Fresian (Red-and-White variety)	0,49	0,51	Polasik i in. [2010]

Porównując uzyskaną frekwencję alleli genu *IGF-1* u poszczególnych ras, można stwierdzić, iż jest ona najbardziej zbliżona do obserwowanej u bydła rasy irańskiej holsztyńsko-fryzyjskiej [Mehmannavaz i in. 2010]. Jest ona również podobna do odnotowanej przez innych autorów u polskich ras hf, jak i u bydła rasy charolais (populacja Nuevo Leon) [Klauzińska i in. 2004, Siadkowska i in. 2006, Reyna i in. 2010]. Obydwa allele występowały u wszystkich ras z wyjątkiem nellore, u której zaobserwowano początkowo tylko 1 allel – *C* [Curi i in. 2005]. Dalsze badania na większym stadzie

(300 osobników) wykazały istnienie allela *T* w tej rasie, jednak występował on tylko w genotypie heterozygotycznym *CT*; nie stwierdzono występowania homozygot *TT* [Massolini Laureano i in. 2009].

Wartość parametru PIC wyniosła 0,37, co pozwala na stwierdzenie od którego z rodziców pochodzi dany allel z prawdopodobieństwem 37%. Markery, które posiadają tylko 2 allele, nie nadają się więc do oceny pochodzenia osobników. Należałoby, więc użyć większej ilości tego typu markerów w jednym teście, bądź też zastosować markery mikrosatelitarne. Heterozygotyczność analizowanej populacji wyniosła 0,64, co pozwala stwierdzić, że stado cechowała dość duża zmienność. Oczekiwana heterozygotyczność, określająca prawdopodobieństwo, iż dwa losowo wybrane allele z populacji są różne, wyniosła 0,49.

W analizowanym stadzie krów wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy obserwowaną a oczekiwaną frekwencją genotypów. Na poziomie istotności $P \leq 0,01$ wartość testu χ^2 wyniosła 18,06, co pozwala stwierdzić, iż stan równowagi genetycznej został zachwiany.

Tabela 2 przedstawia ocenione wartości średnie cech użytkowości mlecznej w zależności od genotypu *IGF-1/SnaBI*. Analizując I laktację stwierdzono, iż osobniki o genotypie *CC* cechowały się najwyższą wydajnością tłuszczu i białka (osobno, jak i oddzielnie) oraz ich procentową zawartością w stosunku do krów o genotypie *TT*. Zwierzęta heterozygotyczne cechowała pośrednia wartość cech. W przypadku wydajności mleka najwyższe wartości osiągały osobniki o genotypie *CT*, pośrednie o genotypie *CC*, a najniższe homozygoty *TT*. Różnice te nie zostały jednak potwierdzone statystycznie.

Badając II laktację zaobserwowano, że genotyp *TT* był korzystny dla wydajności mleka, wydajności tłuszczu i wydajności białka (osobno i razem). Z kolei dla wydajności procentowej białka i tłuszczu korzystny był genotyp *CC*. Analiza statystyczna nie potwierdziła tych różnic.

W przypadku III laktacji najwyższą wydajnością i zawartością procentową tłuszczu oraz wydajnością tłuszczu i białka cechowały się osobniki o genotypie *CC*. Genotyp *TT* był powiązany z nieco większą wydajnością mleka oraz wydajnością białka. Zaistniałe różnice nie zostały potwierdzone statystycznie. Zawartość białka była zbliżona u wszystkich osobników.

Analizując wszystkie laktacje razem zaobserwowano, iż genotyp *CC* był korzystny dla wszystkich badanych cech oprócz zawartości białka, dla której nieznacznie wyższe wartości odnotowano u zwierząt o genotypie *TT*. Dla pozostałych cech osobniki o genotypie *TT* osiągały najniższe, bądź też przejściowe (pomiędzy genotypem *CC* a *CT*) wartości cech. Żadna z zanotowanych różnic nie została jednak potwierdzona statystycznie.

Badając polimorfizm *IGF-1/SnaBI*, Hines i in. [1998] oraz Grzelak i in. [2007] również nie odnotowali statystycznie istotnych zależności pomiędzy genotypami *CC*, *CT* i *TT* a cechami produkcyjnymi mleka. Jednakże Siadkowska i in. [2006] w swych badaniach potwierdziła, iż genotyp heterozygotyczny był powiązany z wyższą wydajnością mleka (skorygowaną na zawartość mleka oraz skorygowaną na zawartość tłuszczu), jak również wyższą zawartością białka i tłuszczu w mleku u krów rasy polska holsztyńsko-fryzyjska. Podobne wyniki w odniesieniu do genotypu *CT* zaobserwowali Mehmannaavaz i in. [2010]. Oszacowana wartość hodowlana (EBV) u byków rasy irańska holsztyńsko-fryzyjska dla wydajności mleka i tłuszczu była wyższa u osobników heterozygotycznych w stosunku do homozygot *CC* i *TT*.

Tabela 2. Wartości średnie i odchylenia standardowe (SD) analizowanych cech użytkowości mlecznej w I, II, i III laktacji oraz we wszystkich razem w zależności od genotypów *IGF-1*

Table 2. Mean values of analyzed milk performance traits with standard deviations (SD) in I, II, III lactation as well as all together in relation to *IGF-1* genotypes

Genotyp Genotype	n	Wydajność mleka, kg Milk yield, kg		Wydajność tłuszczu, kg Fat yield, kg		Zawartość tłuszczu, % Fat kontent, %		Wydajność białka, kg Milk yield, kg		Zawartość białka, % Protein kontent, %		Wydajność i białka, kg Fat and protein content, kg	
		średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD
I laktacja – I lactation													
CC	25	5174,60	780,82	206,22	26,77	4,02	0,34	164,03	22,26	3,18	0,20	380,44	59,35
CT	82	5210,47	766,18	202,39	31,21	3,89	0,34	163,74	23,21	3,15	0,18	369,55	53,60
TT	12	4958,43	709,32	187,11	31,24	3,78	0,32	157,88	20,68	3,24	0,27	348,52	44,15
Razem Total	119	5177,52	761,25	201,66	30,52	3,91	0,34	163,21	22,66	3,17	0,20	369,71	54,23
II laktacja – II lactation													
CC	29	5901,46	617,46	235,01	29,94	3,97	0,42	191,66	21,04	3,23	0,21	446,25	65,48
CT	65	5802,08	819,23	227,40	36,97	3,93	0,43	189,13	25,21	3,27	0,18	438,53	72,89
TT	7	6388,98	643,22	250,12	27,39	3,92	0,24	201,76	19,05	3,16	0,07	475,25	44,09
Razem Total	101	5871,29	763,71	231,16	34,78	3,94	0,41	190,73	23,73	3,25	0,19	443,29	69,33
III laktacja – III lactation													
CC	25	6335,70	791,92	251,94	44,13	3,95	0,39	203,88	27,02	3,23	0,17	455,82	69,31
CT	51	6165,19	822,92	238,80	39,57	3,88	0,39	198,80	26,85	3,22	0,16	437,60	63,90
TT	7	6337,03	928,97	241,56	49,85	3,79	0,34	210,54	35,03	3,32	0,12	452,10	82,96
Razem Total	83	6231,04	816,47	242,99	41,74	3,89	0,38	201,32	27,50	3,23	0,16	444,31	66,88
trzy laktacje razem – three lactations together													
CC	79	5808,86	859,37	231,26	38,53	3,98	0,38	186,82	28,36	3,21	0,20	428,45	72,10
CT	198	5650,50	887,71	219,98	38,48	3,90	0,38	181,10	28,96	3,21	0,18	409,72	71,35
TT	26	5714,74	1018,86	218,74	45,91	3,82	0,30	183,87	34,39	3,24	0,20	410,53	80,49
Razem Total	303	5697,36	891,87	222,82	39,36	3,91	0,38	182,82	29,31	3,21	0,19	414,67	72,57

Polimorfizm *IGF-1/SnaBI* analizowany był również u bydła mięsnego, gdzie wykazano zależności pomiędzy poszczególnymi genotypami a cechami wzrostu i tuszy. We wszystkich przypadkach allel *C* korzystnie wpływał na niektóre z analizowanych cech [Ge i in. 2001, Curi i in. 2005, Siadkowska i in. 2006, Reyna i in. 2010].

PODSUMOWANIE

Mimo że gen *IGF-1* jest uznawany jako potencjalny marker cech użytkowości mlecznej bydła, w niniejszych badaniach nie stwierdzono statystycznie istotnych asocjacji pomiędzy polimorfizmem *IGF-1/SnaBI* a cechami użytkowości mlecznej badanego stada. Zauważono jednak tendencję, iż najbardziej korzystny był genotyp *CC*. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę dalszego badania polimorfizmu genu *IGF-1* w kontekście jego praktycznego użycia w hodowli bydła.

PIŚMIENNICTWO

- Akis I., Oztabak K., Gonulalp I., Mengi A., Un C., 2010. IGF-1 and IGF-1R Gene Polymorphisms in East Anatolian Red and South Anatolian Red Cattle Breeds. *Rus. J. Gen.* 46 (4), 439–442.
- Curi R.A., de Oliveira H.N., Silveira A.C., Lopes C.R., 2005. Association between IGF-1, IGF-1R and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livest. Prod. Sci.* 94, 159–167.
- Ge W., Davis M.E., Hines H.C., 1997. Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Anim. Genet.* 28 (2), 155–156.
- Ge W., Davis M.E., Hines H.C., Irvin K.M., Simmen R.C., 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 79, 1757–1762.
- Grzelak T., Kmiec M., Wojdak-Maksymiec K., Kulig H., Kowalewska-Łuczak I., 2007. Polimorfizm genu *IGF-1/SnaBI* w stadzie krów rasy jersey. *Mat. konf. II Polski Kongres Genetyki.* 18–20 września 2007, Warszawa, 76–77.
- Hines H.C., Ge W., Zhao Q., Davis M.E., 1998. Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins. *Anim. Gen.* 29 (1), 69–74.
- Kirkpatrick B.W., 1992. Identification of a conserved microsatellite site in the porcine and bovine insulin-like growth factor-1 gene 5' flank. *Anim. Gen.* 23 (6), 543–548.
- Klauzińska M., Żurkowski M., Siadkowska E., Szymanowska M., Grochowska R., Zwierzchowski L., Klewec J., 2004. Analysis of genetic structure in Polish Red and Polish Black-and-White cattle using twelve marker loci potentially related to milk or meat production traits. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 22 (2), 153–171.
- Liu K., Muse S.V., 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21 (9), 2128–2129.
- Maj A., Snochowski M., Siadkowska E., Rowinska B., Lisowski P., Robakowska-Hyzorek D., Oprzadek J., Grochowska R., Kochman K., Zwierzchowski L., 2008. Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its association with both the IGF-1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle. *Neuroend. Let.* 29 (6), 981–989.
- Massolini Laureano M.M., Otaviano A.R., Ferreira Lima A.L., Costa R.B., Dias Salman A.K., Desidério Sena J.A., Tonhati H., Galvão de Albuquerque L., 2009. Characterization and polymorphism screening of IGF-I and prolactin genes in Nelore heifers. *Ital. J. Anim. Sci.* 8, 277–283.
- Mehmannavaz Y., Amirinia C., Bonyadi M., Torshizi R.V., 2010. Association of IGF-I gene polymorphism with milk production traits and paternal genetic trends in Iranian Holstein bulls. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4 (1), 110–114.
- Polasik D., Górecka E., Wojdak-Maksymiec K., 2010. Association between *IGF-1/SnaBI* polymorphism and milk production traits in Polish Holstein-Friesian cows. *Mat. Konf. III Polski Kongres Genetyki.* 12–15 września 2010, Lublin, 159.
- Reyna X.F., Montoya H.M., Castrellón V.V., Rincón A.M., Bracamonte M.P., Vera W.A., 2010. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genet. Mol. Res.* 9 (2), 875–883.

- Siadkowska E., Zwierzchowski L., Oprądek J., Strzałkowska N., Bagnicka E., Krzyżewski J., 2006. Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Anim. Sci. Pap. Rep. 24 (3), 225–237.
- Zych S., Szatkowska I., Dybus A., 2005. Oś somatotropowa (GH/GHR/IGF-I) i jej rola w kontroli procesu laktacji u bydła. Med. Weter. 61, 857–860.

POLYMORPHISM OF *IGF-1* GENE IN HOLSTEIN-FRESIAN COWS

Abstract. The aim of this study was to estimate genetic characteristics of cows herd based on polymorphism in the promoter region of *IGF-1* gene as well as determine possible relationships between detected polymorphism and milk performance traits. Investigations were carried out on 185 cows of Polish Holstein-Fresian breed, variety black-and-white. Polymorphism of *IGF-1* gene was determined by use ACRS-PCR method. The comparison between the number of observed genotypes and the theoretical number of genotypes showed loss of genetic equilibrium in investigated population. Heterozygosity of analyzed herd was 0.64. Analyzing milk performance traits in relation to individual genotypes it was affirmed that genotype *CC* in most cases was associated with higher values of examined traits, however these differences were not confirmed statistically.

Key words: cattle, insulin-like growth factor-1, milk performance, polymorphism, promoter

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 26.10.2010