

THE ANALYSIS OF MICROSATELLITES RELATING TO POLLEDNESS IN BEEF CATTLE

ANALÝZA MIKROSATELITŮ SE VZTAHEM K BEZROHOSTI U MASNÉHO SKOTU

Kaplanová K., Knoll A.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: kkaplanova@seznam.cz, knoll@mendelu.cz

ABSTRACT

This work deal with studying of microsatellites (BM6438, TGLA49, BMS2142 a IDVGA46) relating to polledness and to scurs in families of beef cattle and studying of genetic linkage of the alleles to the polled phenotype or to the scurs. Polled condition of cattle is an autosomal dominant trait controled by the polled locus which is localised in the centromeric region of bovine chromosome 1 between microsatellites RP42-218J17_MS1 and BM6438. The absence of horns is complicated because of presence of scurs whose expression is sex-influenced. The scurs locus has been mapped on the bovine chromosome 19 between microsatellites BMS2142 and IDVGA46. The causative genes of polledness and of scurs remain unknown. This present study is aimed to analysed 2 breeds (Simmental – 77 animals from database of DNA samples of ÚMFGZ of MZLU in Brno, and Charolais – 47 animals from T-farm in Verušičky) with 5 families of different number of members. Microsatellite analysis involved multiplex PCR amplifying of microsatellites loci, detection of fluorescent labeled fragments (alleles) by laser, making of genotypes of the animals indicating polledness, horns or scurs. In families 1, 2 and 5 it was found linkage between alleles of microsatellites BM6438, TGLA49 and polled condition and linkage between alleles of microsatellite BMS2142 and scurs. This linkage was confirm by significant association between genotype and phenotype of polledness or scurs. The alleles of microsatellites (linked with phenotypes) were different and this is the evidence of different mutations across the families, probably from different breeds of cattle.

Key words: polledness, scurs, microsatellites, beef cattle

ÚVOD

Již od 19. století se některá plemena šlechtí na genetickou bezrohost (aberdeen angus, galloway, shorthorn či hereford), ovšem donedávna nebyla této vlastnosti věnována příliš velká pozornost, naopak, jak uvádí Dvořák (2006), geneticky bezrohá zvířata byla vyřazována z důvodu snadnější fixace zvířat rohatých a případného dalšího zpracování rohů. Se změnou technologie ustájení z vazného na volné, zvýšením koncentrace zvířat, rozšířením chovu masného skotu, potřebou manipulace a transportu zvířat se bezrohost stala významnou, neboť rohatá zvířata jsou nebezpečná lidem i ostatním ve skupině. Do budoucna se předpokládá, že se tomuto trendu ubrání pouze skotský náhorní skot či uherský stepní skot (Štráfelda, 2005).

Na fenotypovém projevu bezrohosti/rohatosti se podílí tzv. 3-lokusový model, v němž jsou geny pro bezrohost, volné či africké rohy děděny nezávisle na sobě, ovšem jsou ve vzájemné interakci (Prayaga, 2007). Patrně nejdůležitějším lokusem je lokus bezrohosti, jež je hypostatický vůči lokusu nepravých rohů, konkrétně dominantní alela *P* genu bezrohosti je hypostatická vůči dominantní alele *Sc* genu nepravých rohů. Na projev nepravých rohů má však do značné míry vliv pohlaví zvířete. Lokus afrických rohů je pak epistatický vůči lokusu bezrohosti, ale i zde se na fenotypu podílí pohlaví zvířete stejně jako u nepravých rohů (Brenneman *et al.*, 1996).

Bezrohost je dominantní vlastnost, je tedy možné selektovat bezrohá zvířata dle fenotypu, ovšem jeho určování je komplikováno výskytem volných rohů. Navíc stále vzrůstá potřeba molekulárně-genetických testů, jimiž je možné odlišit genotyp heterozygotní od homozygotního, i když jen s určitou pravděpodobností. Příčinný gen bezrohosti však není stále znám; z toho důvodu jsou tyto testy nepřímé, založené na DNA markerech, jež jsou s touto vlastností v asociaci. Nejčastěji takto používanými markery jsou dnes mikrosatelity, jejichž analýza je vázána na testování v rodinách.

MATERIÁL A METODIKA

K analýze mikrosatelitů byly vybrány 2 populace - soubor 77 zvířat plemene masný simentál; vzorky byly použity z archívů DNA na ÚMFGZ, MZLU v Brně; druhým souborem 47 zvířat plemene charolais, která pocházela z chovu T-farma Verušičky - telata po býku JOCK Z CUNKOVA P (ZCH 556) a jejich matky; z archívů DNA byl použit vzorek býka JOCK Z CUNKOVA P (ZCH 556). Odběr vzorků zvířat souboru charolais byl proveden stěrem bukální sliznice zvířete sterilním kartáčkem Cytobrush® Plus firmy Medscand® Medical. DNA byla izolována pomocí kitu JETQUICK Blood & Cell Culture DNA Spin Kit od firmy Genomed. V rámci těchto 2 souborů bylo sestaveno celkem 5 rodin – viz.Tab.1.

Tab.1 Počty jedinců a jejich fenotyp v jednotlivých rodinách, včetně netestovaných matek

		Býk	Matky		Netestované matky			Potomstvo	
R1	Počet	1	8		10			23 (býci)	
	Fenotyp	1 P	1 R	6 P	1 N*	3 R	3 P	4 N*	7 R 14 P 2 V
R2	Počet	1	7		3			10 (býci)	
	Fenotyp	1 P	7 P		2 P	1 N*		4 P	5 V 1 N*
R3	Počet	1	3		2			5 (býci)	
	Fenotyp	1 V	3 R		2 P			3 P	2 V
R4	Počet	1	2		-			2 (býci)	
	Fenotyp	1 P	2 P		-			1 P	1 V
R5	Počet	1	19		4			23 (jalovice)	
	Fenotyp	1 P	19 R		4 R			6 R	14P 3 N*

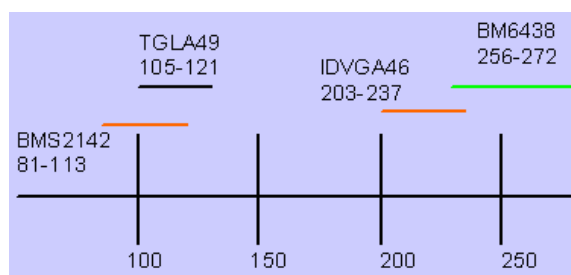
P – bezrohost, R – rohatost, v – volné, nepravé rohy, *N – neznámý fenotyp

Pro analýzu byly vybrány mikrosatelity na BTA1 - BM6438 a TGLA49, a na BTA19 - BMS2142 a IDVGA46, pro jejich vazbu s lokusem bezrohosti, resp. volných rohů. Fragmenty genomové DNA vybraných 4 mikrosatelitů byly získány amplifikací při PCR, která byla provedena jako multiplex. Sekvence primerů jednotlivých mikrosatelitů jsou uvedeny v Tab.2.

Tab.2 Velikost a sekvence primerů jednotlivých mikrosatelitů

primer	sekvence	publikace
BM6438A	TTGAGCACAGACACAGACTGG	Bishop <i>et al.</i> , 1994
BM6438B	ACTGAATGCCTCCTTTGTGC	
TGLA49A	GGCAGGACTTCACTCTTTTCA	Georges <i>et al.</i> , 1992
TGLA49B	AGAAAAGGAATAATGAGACAGATTA	
IDVGA46A	AAATCCTTTCAAGTATGTTTCA	Mezzelani <i>et al.</i> , 1995
IDVGA46B	ACTCACTCCAGTATTCTTGCTG	
BMS2142A	AAGCAGGTTGATGATCTTACCC	Stone <i>et al.</i> , 1995
BMS2142B	GTCGGCACTGAAAATGATTATG	

Velikost známých fragmentů jednotlivých mikrosatelitů a použitá fluorescenční barva je uvedena na Obr.1.



Obr.1 Grafické znázornění velikosti MS a fluorescenčních barev použitých ke značení přímých primerů (VIC, NED, PET) (převzato z Civaňová *et al.*, 2008)

Reagencie použité při PCR byly následující: H₂O, GeneAmp® 10X PCR Buffer I (vč. 2,5 nM Mg²⁺, Applied Biosystems), dNTPs (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, 200 μM každý, Fermantas), primery (A (přímý), B (zpětný), 10 pmol/μl každý, Generi-Biotech, v koncentraci

0,24 – 1,32 nM), AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (10 U/μl, Applied Biosystems); celkový objem 6,25 μl . Pro PCR byly zvoleny podmínky: 95°C/15 min, 30x (95°C/40 s, 62°C/60 s, 72°C/60 s), 72°C/30 min, 4°C/∞, cykly: GeneAmp 9600 (Applied Biosystems).

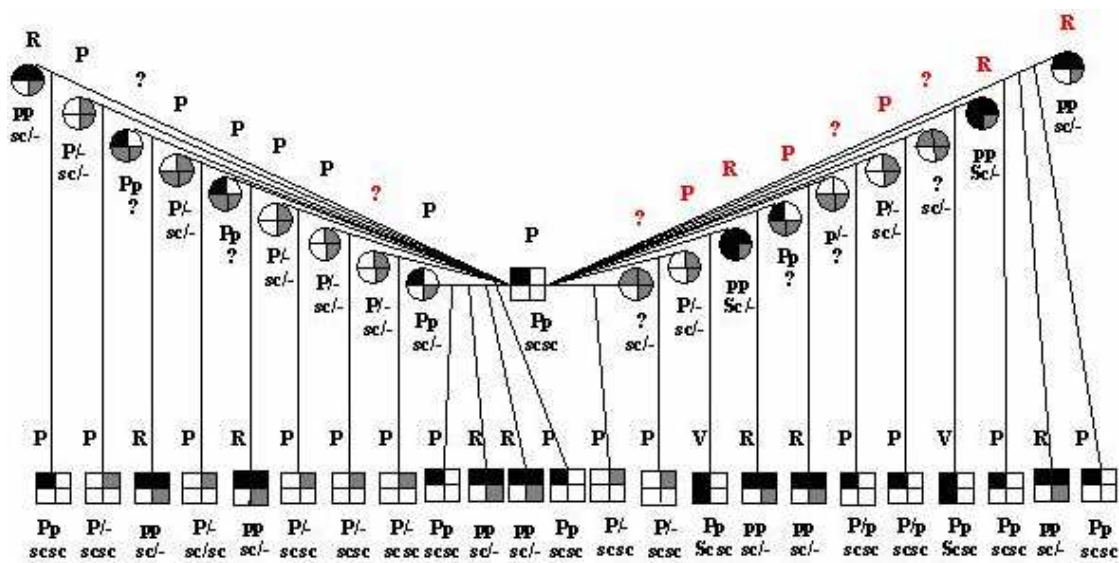
Reakční směs pro fragmentační analýzu obsahovala: GeneScan™ –500 LIZ® Size Standard*(Applied Biosystems), PCR produkt, Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems). Výsledná reakční směs byla 5 min denurována při 95°C a následně zchlazena 5 min na ledu. Fragmentační analýza vzorků byla provedena 4-kapilárovým automatickým genetickým analyzátozem ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). Výsledky genotypování mikrosatelitů byly vyhodnoceny pomocí softwaru GeneMapper v. 3.5 (Applied Biosystems).

Pro výpočet asociace genotypu s fenotypem byl použit program SAS 9.1.3 (2004).

VÝSLEDKY A DISKUZE

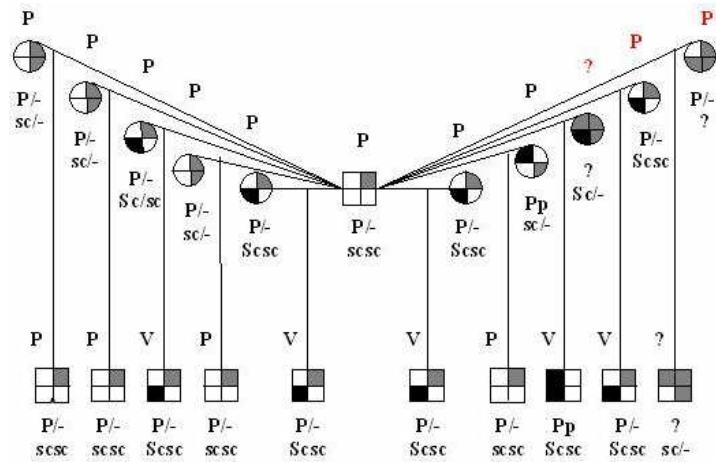
Výsledné genotypy zvířat jsou zaneseny do grafického znázornění jednotlivých rodin (Obr.2-6) – dle provedené analýzy a dle fenotypu zvířat (je-li znám) lze v některých případech odvodit, zda se jedná o heterozygotního či homozygotního jedince, a to jak v lokusu bezrohosti, tak i v lokusu nepravých rohů. V rámci jednotlivých rodin se vyskytují alely ve vazbě s bezrohostí, resp. volnými rohy.

Rodina 1 (ZSI 155 P)*



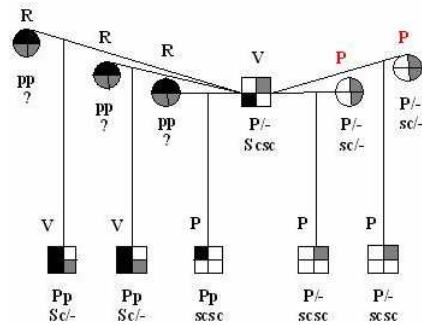
Obr.2 Grafické znázornění rodiny 1 (ZSI 155 P)

Rodina 2 (ZSI 188 P)*



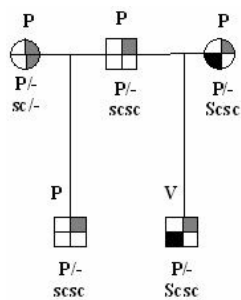
Obr.3 Grafické znázornění rodiny 2 (ZSI 188 P)

Rodina 3 (ZSI 259 V)*



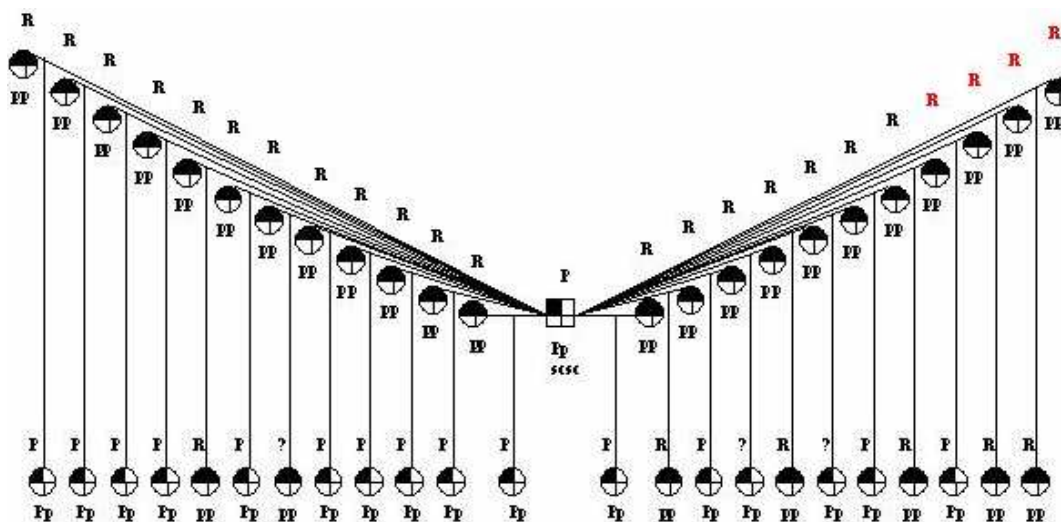
Obr.4 Grafické znázornění rodiny 3 (ZSI 259 V)

Rodina 4 (ZSI 140 P)*



Obr.5 Grafické znázornění rodiny 4 (ZSI 140 P)

Rodina 5 (ZCH 556 P)* - typický příklad testačního připařování



Obr.6 Grafické znázornění rodiny 5 (ZCH 556 P)

* nad jednotlivými zvířaty jsou znázorněny jejich fenotypy (? - neznámý fenotyp, resp. genotyp, P – bezrohost, R – rohatost, V – volné rohy), pod symbolem zvířete jsou znázorněny odvozené genotypy; červeně jsou označeni netestovaní jedinci; černá výplň horní poloviny kruhu či čtverce značí počet alel p na lokusu bezrohosti, ve spodní polovině pak značí přítomnost alely Sc na lokusu nepravých rohů; šedá výplň značí nemožnost odvození alely

Shrnutí rodin

Při sestavování rodokmenů je výraznou překážkou, kromě nesprávně uvedeného původu, i označování fenotypu bezrohosti/rohatosti/volných rohů. Běžně bývá fenotyp označen u většiny plemenných býků, ovšem u krav je fenotypová evidence nedostatečná. Evidence fenotypu je navíc komplikována přítomností volných rohů. Volné rohy sice většinou nedorůstají velikosti pravých rohů, ovšem farmáři rozlišují volné rohy od pravých především podle jejich pohyblivosti (Asai *et al.*, 2004). Brenneman *et al.*(1996) uvádí, že u některých zvířat může dojít k osifikaci základny volného rohu a ten je pak pevně přichycen, což je hlavním důvodem nesprávné klasifikace zvířete jako rohatého a následného zkreslení výsledků testování.

V rodinách 1, 2 a 5 se shodně vyskytla alela 257 spojená s bezrohostí, přestože Schmutz *et al.* (1995) uvádí, že alely mikrosatelitu BM6438 segregovaly s bezrohým fenotypem shodně v rodinách, ne však mezi rodinami a dále, že v případě TGLA49 byla alela velikosti 114 bp spojena s bezrohostí ve všech rodinách a vyskytla se pouze jedna kráva a její tele s alelou 114 a s rohy. V rodinách jsou však ve vazbě s bezrohostí alely 114, 110 a 112. Schmutz *et al.* (1995) prováděli analýzu rodní plemene charolais, což znamená, že ani v plemeni charolais (rodina 5) se nevyskytuje pouze jediná alela TGLA49 ve vazbě s bezrohostí, neboť zde se ve vazbě vyskytla alela 112.

Statistickou analýzou v programu SAS pro asociaci genotypů s rohatostí, bezrohostí a volnými rohy byla zjištěna statistická průkaznost mezi genotypem 112/114 (TGLA49) a bezrohostí u rodiny 5 (charolais), což potvrzuje pravděpodobnou asociaci alely 112 od otce

s lokusem bezrohosti dle analýzy rodokmenů. V rodině 2 byla zjištěna statistická průkaznost asociace genotypu 99/109 s volnými rohy, což také potvrzuje předchozí analýzu.

Výskyt různých alel ve vazbě s bezrohostí naznačuje potvrzení teorie, že mutovaná alela vznikla několikrát nebo byla do plemene vnesena z několika různých zdrojů, jak prezentuje Schmutz *et al.* (1995). Je však třeba brát v potaz i možnou příbuznost býků a výskyt bezrohosti u některého ze společných předků, viz. alela 257, jež se shodně nachází ve vazbě s bezrohostí mezi rodinami. V databázi plemenných býků se u býků ZSI 155 P a ZSI 188 P společný předek nevyskytuje, jsou však zde uvedeny pouze 2 generace a tento předek může být z některé generace předchozí. Shodnost alely ve vazbě s bezrohostí mezi rodinami různých plemen lze pak vysvětlit náhodnou mutací či vnesením alely do plemene z jiného, které se podílelo se na šlechtění simentála i charolais (např. shorthorn). Celkem 3 ze sledovaných býků měli navíc ve svém 2-generačním rodokmenu bezrohého předka a bezrohost tedy v těchto rodinách nevznikla nově; nepřítomnost takového předka u býků ZSI 155 P a ZCH 556 P však může znamenat pouze nekompletní evidenci u krav.

ZÁVĚR

Cílem práce byla analýza mikrosatelitů se vztahem k bezrohosti, rohatosti a volným rohům, provést tuto analýzu v rodinách (včetně stanovení genotypů) a nalézt v těchto rodinách vazbu některé alely k bezrohosti či volným rohům. Provedená analýza 4 mikrosatelitů (BM6438, TGLA49, BMS2142 a IDVGA46) vedla ke stanovení pravděpodobných genotypů zvířat, a to jak v lokusu bezrohosti, tak i v lokusu nepravých rohů. Jejich určení však bylo komplikováno především nekompletní evidencí fenotypu zvířat. Vyskytly se i alely ve vazbě s bezrohostí, resp. s volnými rohy, a to ve 3 rodinách shodně alela 257 (BM6438), dále alely 110, 112, 114 (TGLA49) ve vazbě s bezrohostí, a alela 109 (BMS2142) ve vazbě s volnými rohy. Asociace alely 112 a 109 s daným fenotypem byla potvrzena jako statisticky průkazná. Rozdílnost těchto alel ve vazbě s fenotypem pak potvrzuje skutečnost, že v různých rodinách se vyskytují různé mutace, pravděpodobně i vnesené z jiných plemen.

Úspěšné šlechtění bezrohého skotu je tedy založeno na evidenci fenotypu zvířat, především na rozlišení pravých a volných rohů, stejně jako analýza rodokmenů molekulárně-genetickými testy pro rozlišení zvířat s homozygotním a heterozygotním genotypem. Alespoň do doby, než bude objeven příčinný gen bezrohosti, příčinná mutace a vyvinut genetický test s přesnou predikcí genotypu.

LITERATURA

ASAI, M., BERRYERE, T.G., SCHMUTZ, S.M. The scurs locus in cattle maps to bovine chromosome 19. *Animal Genetics*, 2004, vol. 35, p. 34-39.

BISHOP, M.D., KAPPES, S.M., KEELE, J.W., STONE, R.T., SUNDEN, S.L., HAWKINS, G.A., TOLDO, S.S., FRIES, R., GROSZ, M.D., YOO, J., BEATTIE, C.W. A genetic linkage map of the bovine genome. *Genetics*, 1994, vol. 196, p. 619-639.

BRENNEMAN, R.A., DAVIS, S.K., SANDERS, J.O., BURNS, B.M., WHEELER, T.C., TURNER, J.W., TAYLOR, J.F. The polled locus maps to BTA1 in a *Bos indicus* x *Bos taurus* cross. *The Journal of Heredity*, 1996, vol. 87, no. 2, p. 156-160.

CIVÁŇOVÁ, K., KAPLANOVÁ, K., ŘÍHA, J. Genetic polledness in Simmental cattle in the Czech Republic. In ŘEHOUT, V. *Biotechnology 2008*. České Budějovice: Scientific Pedagogical Publishing, 2008, p. 63-66. ISBN 80-85645-58-0.

DVOŘÁK, J. Bezrohost a genetika - pro chovatele masného skotu. *Zpravodaj ČSCHMS*, 2006, vol. 13, no. 3, p. 26-29.

GEORGES, M., MASSEY, J.M. Polymorphic DNA markers in Bovidae. Patent, WO9213102, 1992.

MEZZELANI, A., ZHANG, Y., REDAELLI, L., CASTIGLIONI, B., LEONE, P., WILLIAMS, J.L., TOLDO, S.S., WIGGER, G., FRIES, R., FERRETTI, L. Chromosomal localization & molecular characterization of 53 cosmid-derived bovine microsatellites. *Mammalian Genome*, 1995, vol. 6, p. 629-35. In ASAI, M., BERRYERE, T.G., SCHMUTZ, S.M. The scurs locus in cattle maps to bovine chromosome 19. *Animal Genetics*, 2004, vol. 35, p. 34-39.

PRAYAGA, K.C. Genetic options to replace dehorning in beef cattle – a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2007, vol. 58, p. 1-8.

SAS Institute Inc. 2004. SAS 9.1.3. Cary, NC.

SCHMUTZ, S.M., MARQUESS, F.L.S., BERRYERE, T.G., MOKER, J.S. DNA marker assisted selection of the polled condition in Charolais cattle. *Mammalian Genome*, 1995, vol. 6, p. 710-713.

STONE, R.T., PULIDO, J.C., DUYK, G.M., KAPPES, S.M., KEELE, J.W., BEATTIE, C.W. A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mammalian Genome*, 1995, vol. 6, p. 714-724. In ASAI, M., BERRYERE, T.G., SCHMUTZ, S.M. The scurs locus in cattle maps to bovine chromosome 19. *Animal Genetics*, 2004, vol. 35, p. 34-39.

ŠTRÁFELDA, J. Geny velkého účinku: šlechtění snadno a rychle? *Genotyp*, 2005, no.1, p. 7-9.