

THE EFFECT OF POLYMORPHISM IN TWO CANDIDATE GENES (*PIT1* AND *DGAT1*) ON THE BODY LIVE WEIGHT OF HOLSTEIN CALVES

VLIV POLYMORFISMU DVOU KANDIDÁTNÍCH GENŮ (*PIT1* A *DGAT1*) NA ŽIVOU HMOTNOST HOLŠTÝNSKÝCH BÝČKŮ

Falta D., Chládek G.

Ústav chovu a šlechtění zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: Falta.Daniel@seznam.cz, Chladek@mendelu.cz

ABSTRACT

The *PIT 1* is a pituitary specific transcription factor that helps regulate the expression of growth hormone (**GH**). Therefore, the Pit-1 gene was chosen to be a candidate gene for growth traits in beef cattle. Detecting genetic variations in the Pit-1 gene and relating them to growth traits could be helpful in development of marker-assisted selection (**MAS**) programs in animal breeding. The *DGAT1* encodes diacylglycerol *O*-acyltransferase, a microsomal enzyme that catalyzes the final step of triglyceride synthesis. It has been associated with milk fat content and higher intramuscular fat content (IMF) in muscles. The aim of this study was to compare body live weight of animals with different genotype of candidate genes *PIT1* and *DGAT1*. Eighty-three male calves of Holstein breed were used in our experiment. DNA samples were obtained from blood. Statistically no significant ($P < 0,05$) differences for genotypes between consistently old groups of Holstein calves were founded for body live weight.

Keywords: calves, live body weight, *DGAT1*, *PIT1*, candidate gene

ABSTRAKT

Gen *PIT1* má důležitou funkci při regulaci genů kódujících hypofyzární hormony a je regulačním faktorem pro růstový hormon (GH). Z tohoto důvodu je vhodným kandidátním genem, jehož genetická variabilita by mohla být využita při MAS (markery asistované selekci) a vhodným markero selekčním kritériem ve šlechtitelských programech hospodářských zvířat. Gen *DGAT1* kóduje diacylglycerol *O*-acyltransferázu, mikrozomální enzym, který katalyzuje finální krok syntézy triglyceridů a bývá asociován s obsahem tuku v mléce a vyšším obsahem intramuskulárního tuku v mase. Cílem této práce bylo detekovat genotypy kandidátních genů *PIT1* a *DGAT1*, zjistit frekvence genotypů a alel a vyhodnotit možné asociace mezi variabilitou těchto genů a živou hmotností u 83 telat-býčků holštýnského plemene. Vzorky DNA byly izolovány z krve telat. Statistická analýza neprokázala žádné průkazné rozdíly v živé hmotnosti telat ($P < 0,05$) mezi genotypy kandidátních genů *PIT1* a *DGAT1*.

Klíčová slova: telata, tělesná hmotnost, *DGAT1*, *PIT1*, kandidátní gen

ÚVOD

PIT1 gen má důležitou funkci při regulaci genů kódujících hypofyzární hormony. Je specifický, adenohypofyzární, pozitivní a regulační faktor pro růstový hormon (GH). Na základě zatím známých funkcí hypofyzárně-specifického *PIT1* transkripčního faktoru je možné konstatovat, že se jedná o důležitý faktor zúčastňující se růstu a reprodukce jedince, a proto je vhodným kandidátním genem, jehož genetická variabilita by mohla být využita při MAS (markery asistované selekci) a vhodným markero selekčním kritériem ve šlechtitelských programech hospodářských zvířat (Tambasco *et al.*, 2003).

Polymorfismus genu *PIT1* bývá asociován s produkčními znaky u prasat a skotu. U prasat byla nalezena souvislost tohoto genu s hmotností při odstavu, průměrným denním přírůstkem (Yu *et al.*, 1995), tloušťkou hřbetního tuku (Yu *et al.*, 1995; Stančková *et al.*, 1999), porodní hmotností (Yu *et al.*, 1996), a poměru libové svaloviny a tuku (Stančková *et al.*, 1999). U skotu bylo zjištěno, že gen *PIT1* je asociován s živou hmotností a se složkami mléka (Renaville *et al.*, 1997).

Genotyp AA bývá méně frekventovanější než genotypy AB a BB. U genotypu AA nebo AB byly pozorovány průkazně vyšší hodnoty pro produkci mléka, bílkovin a větší hranatost těla, zatímco genotyp BB byl asociován s osvalením zvířat (Woolard *et al.*, 1994).

Gen *DGATI* kóduje diacylglycerol O- transferázu, která je mikrozomálním enzymem, jenž katalyzuje finální krok syntézy triglyceridů. Je lokalizován na 14. bovinním chromozomu a bývá spojován s obsahem tuku v mléce. Tím se diacylglycerol O- transferáza stala kandidátním genem pro obsah tuku v mléce. Navíc je u skotu asociována s tučněním a s vyšším obsahem intramuskulárního tuku v mase (Grisart, 2002; Winter, 2002), i když přímý důkaz nebyl ještě nalezen (Thaller, 2003). Dosud nebyla publikována žádná studie, která by se zabývala vztahem polymorfismu v genu *DGATI* a růstem zvířat.

Cílem práce bylo detekovat genotypy kandidátních genů *PIT1* a *DGATI*, zjistit frekvence genotypů a alel a vyhodnotit možné asociace mezi variabilitou těchto genů a živou hmotností 83 telat-býčků holštýnského plemene.

MATERIÁL A METODIKA

Cílem této práce bylo detekovat genotypy kandidátních genů *PIT1* a *DGATI* a zhodnotit jejich vliv variability na růst telat vyjádřeným hmotností v různém věku. Do pokusu bylo zařazeno celkem 83 telat býčků holštýnského plemene ze ŠZP Žabčice. Stáří telat se pohybovalo v rozmezí od narození do 241 dní věku. Průměrná hmotnost při narození byla 39,3 kg a hmotnost nejtěžšího sledovaného telete na konci pokusu byla 316 kg. Telata byla v průběhu experimentu ustájena za shodných podmínek ve skupinovém kotci. Krmná dávka telat do hmotnosti zhruba 150 kg byla založena na bázi starterové směsi, bílkovinného koncentrátu a mléka, telata převyšující tuto hmotnost byla přeřazena na krmnou dávku sestávající se z kukuřičné siláže, senáže a částečně i bílkovinného koncentrátu. Průběžně byla telata vážena po 14 dnech a v průběhu pokusu byla telatům odebrána krev z podocasní žíly

(v. caudalis mediana) do zkumavek na K₃EDTA a v laboratoři molekulární genetiky na MZLU byl stanoven genotyp kandidátního genu *PIT1* a *DGAT1*.

Pro účely zhodnocení vlivu genotypu kandidátních genů *PIT1* a *DGAT1* byla telata zařazena do čtyř skupin dle věku telat. (**Tab.1**).

Tab.1 Rozdělení telat do skupin dle věku

Skupina	Věk (dny)	Počet vážení	$\bar{x}$ (dny)	Sx	Vx
I.	do 59	27	21,2	6,87	0,32
II.	60-119	61	66,8	18,22	0,27
III.	120-179	41	123,0	25,88	0,21
IV.	180 a více	34	181,3	28,14	0,15

K detekci genotypu genu *PIT1* bylo použito metody PCR-RFLP a podmínky cyklování byly následující: k amplifikaci daného úseku DNA bylo použito primerů se sekvencemi 5'-AAA CCA TCA TCT CCC TTC TT-3' a 5'-AAT GTA CAA TGT GCC TTC TGA G-3' navrženými dle Woolard *et al.* (1994). Byl získán PCR produkt očekávané délky 451 bp, jehož kvalita byla ověřena na 2 % agarózovém gelu. Štěpení bylo provedeno pomocí restriční endonukleázy *HinfI* při 37°C a kontrola byla provedena na 2 % agarózovém gelu.

Detekce genotypu genu *DGAT1* proběhla rovněž z izolované DNA z krve telat. Byl použit komerční kit QIAMP BLOOD KIT a polymorfismus byl detekován metodou AS PCR navržený Winter *et al.* (2002). Získané fragmenty byly děleny elektroforeticky ve 4% agarózovém gelu.

Naměřené hmotnosti telat v jednotlivých skupinách byly statisticky popsány a rozdíly hmotností genotypů obou genů byly testovány GLM procedurou s regresí na věk telat v programu SAS/STAT verze 8.02.

VÝSLEDKY A DISKUZE

U genu *PIT1* byl získán PCR produkt očekávané délky (451 bp). *Alela A* neměla žádné polymorfnní místo na rozdíl od *alely B*, kde úsek 451 bp byl rozštěpen na 2 fragmenty o délkách 244 bp a 207 bp (**Obr. 1**). Frekvence genotypů u námi sledovaného souboru telat (n=83) byly následující: genotyp AA 7,2 %, genotyp AB 45,8 % a genotyp BB 47,0 %. Frekvence alel byly 0,30 pro *alelu A* a 0,70 pro *alelu B* (**Tab. 2**).

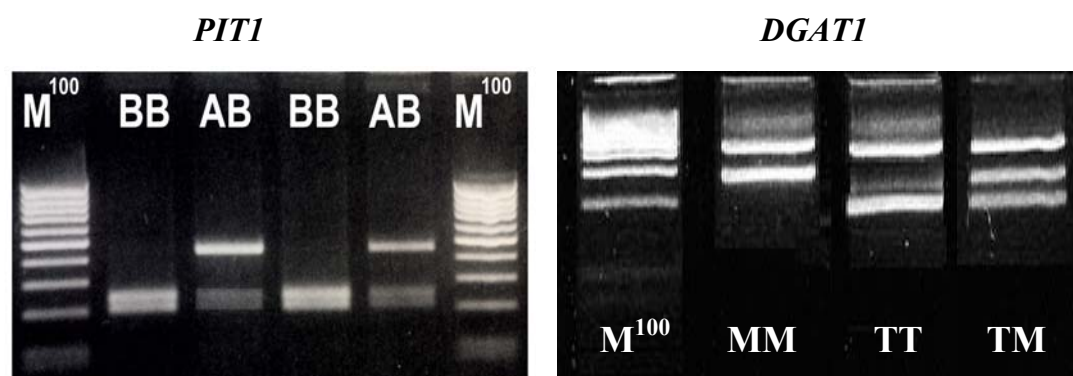
K podobnému výsledku frekvencí alel dospěli Woolard *et al.* (1994), kteří ve většině případů nestejnorodé populace 195 Holštýnských krav a 19 býků zaznamenali alelické frekvence 0,15 pro *alelu A* a 0,85 pro *alelu B*.

Nižší frekvenci alely A detekovali také Moody *et al.* (1995), kteří zjistili genotyp 103 čistokrevných zvířat různých plemen skotu. Zjištěné frekvence pro *alelu A* byly následující:

pro plemeno Aberdeen Angus (n=19) 0,45, Holštýnské (n=17) 0,26 , Hereford (n=45) 0,21, Gelbvieh (n=17) 0,18 a pro plemeno Brahman (n=5) 0,10.

U genu *DGAT1* je pro obě alely charakteristický proužek o délce 372 bp. U genotypu MM se vyskytuje navíc fragment 238 bp a u genotypu TT fragment 174 bp (**Obr. 1**). Frekvence genotypů u námi sledovaného souboru telat byly následující: genotyp MM 49,4 %, genotyp TM 37,3 % a genotyp TT 13,3 %. Frekvence alel byly 0,68 pro *alelu M* a 0,32 pro *alelu T* (**Tab. 2**). Frekvence genotypů a alel jsou v souladu s pracemi autorů Thaler *et al.* (2002), kteří rovněž uvádějí vyšší zastoupení *alely M* v populaci holštýnského skotu v Evropě.

Obr.1 Výsledné produkty štěpení obou genů



Tab. 2 Frekvence genotypů a alel

Gen PIT1

Genotyp	Četnost	N	Alela	Četnost
AA	7,2 %	6	A	0,30
AB	45,8 %	38	B	0,70
BB	47,0 %	39		

Gen DGAT1

Genotyp	Četnost	N	Alela	Četnost
MM	49,4 %	41	T	0,68
TM	37,3 %	31	M	0,32
TT	13,3 %	11		

Vyhodnocení asociací genotypu obou genů a živé hmotnosti je patrné z tabulek (**Tab. 3** a **Tab. 4**). Telata v I. skupině (tj. ve stáří do 59 dní) dosahovala průměrné hmotnosti 54,7 kg. V této skupině se vyskytoval pouze jediný případ genotypu AA v genu *PIT1* a telata s genotypem AB resp. BB dosáhla průměrné hmotnosti 53,6 kg resp. 55,4 kg. Je zde patrná mírně vyšší hmotnost telat genotypu BB. Podobné výsledky pro gen *PIT1* publikovali i Faltá *et al.* (2005). Pokud jde o gen *DGAT1*, nejvyšší hmotnosti dosáhla telata genotypu TT, ale tento genotyp zde byl zastoupen pouze ve dvou případech. Skupina II (ve věku 60-119 dní) dosahovala průměrné hmotnosti 101,4 kg. V této skupině je patrná mírná tendence k vyšší hmotnosti pro genotyp BB a MM. U III. skupiny telat (ve věku 120-179 dní) byla zjištěna průměrná hmotnost 155,6 kg. Nejvyšší hmotnosti zde dosahovali heterozygoti s genotypem AB a TM. Ve skupině IV. (telata starší než 180 dní) s průměrnou hmotností 240,6 kg byla nejvyšší hmotnost zaznamenána u genotypu AA, zastoupeného pouze třemi telaty a u genotypu TT.

Ačkoli jsou ve skupinách patrné rozdíly mezi živou hmotností telat různých genotypů, statistická analýza GLM procedurou s regresí na věk telat neprokázala průkazné rozdíly ($P < 0,05$) mezi genotypy kandidátních genů *PIT1* a *DGAT1*. Důležitým faktem je i to, že hodnota objasněné variance (tj. vlivy působící na ukazatel hmotnosti, v našem případě věk) byla 96%.

Tab. 3 Vliv variability genu *PIT1* na hmotnost telat v určitém věku

Skupina	$\bar{x}$ (kg)	S _x	V _x	Počet vážení			Průměrná hmotnost			P
				AA	AB	BB	AA	AB	BB	
I.	54,7	17,11	0,07	1	11	15	57,0 ¹⁾	53,6	55,4	NS
II.	101,4	192,3	0,13	4	28	29	100,4	100,8	102,1	NS
III.	155,6	306,3	0,11	3	19	19	158,2	163,1	148,8	NS
IV.	240,6	1336	0,15	3	20	11	247,5	242,8	235,0	NS

¹⁾ n = 1

Tab. 4 Vliv variability genu *DGAT1* na hmotnost telat v určitém věku

Skupina	$\bar{x}$ (kg)	S _x	V _x	Počet vážení			Průměrná hmotnost			P
				MM	TM	TT	MM	TM	TT	
I.	54,7	17,11	0,07	14	11	2	55,1	53,6	58,5	NS
II.	101,4	192,3	0,13	28	28	5	103,7	99,7	97,8	NS
III.	155,6	306,3	0,11	22	15	4	155,6	157,0	152,4	NS
IV.	240,6	1336	0,15	18	8	8	241,0	236,8	244,2	NS

ZÁVĚR

Podařilo se nám zjistit genotypy obou genů u všech sledovaných telat (n=83) a výsledné frekvence genotypů a alel jsou v souladu s výsledky udávanými ostatními autory. Statistická analýza neprokázala žádné rozdíly v živé hmotnosti telat ($P < 0,05$) mezi genotypy kandidátních genů *PIT1* a *DGAT1*.

This project was supported by FRVŠ MŠMT 2453/2005.

LITERATURA

FALTA D., HURTA A. (2005): Detection of the candidate gene PIT1 and its influence on the body live weight of holstein bulls, Conference „Genetics and Animal Breeding“, Přerov 2005

GRISART *et al.* (2002): Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A trait nucleotide in affecting milk yield and composition, *Genome Research* 12 (2), 222-231

MOODY *et al.* (1995): Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene and assignment of PIT1 to bovine chromosome 1, *Animal Genetics*, 26, 45-47

RENAVILLE *et al.* (1997): PIT 1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls, *J. Dairy Sci.* 80, 3431.

SAS/STAT (2002): User's Guide, Version 8.02.

STANČEKOVÁ *et al.* (1999): Effect of genetic variability of the porcine pituitary specific transcription factor PIT1, *Anim. Genet.* 30, 313-315.

TAMBASCO *et al.* (2003): Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses, *J. Anim. Breed. Genet.* 120, 51-56.

THALER *et al.* (2002): DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle, *Animal Genetics*, 34, 354-357

THALER *et al.* (2003): Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds, *J. Anim. Sci.* 81, 1911-1918.

WINTER *et al.* (2002): Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content, Dostupné 20.2.2004 z www.pnas.org, vol.99, no 4,

WOOLLARD *et al.* (1994): Rapid Communication: *HinfI* Polymorphism at the Bovine PIT1 Locus, *J. Anim. Sci.* 72, 3267.

YU *et al.* (1995): Association of PIT1 Polymorphisms with Growth and Carcass Traits in Pigs, *J. Anim. Sci.* 73, 1282-1288.

YU *et al.* (1996): PIT1 fenotypes are associated with birth weight in three unrelated pig ressource families, *J. Anim. Sci.* 74 (Suppl. 1), 122.