

AUGIMO HORMONO GENO POLIMORFIZMO ĮTAKA BULIŲ REPRODUKCIŪMS SAVYBĖMS

Dalia Kupstaitė, Renata Indriulytė, Natalija Krasnopiorova, Lina Baltrėnaitė, Ilona Miceikienė
Lietuvos veterinarijos akademija, Gyvūnų veisimo ir genetikos katedra, K. Janušausko gyvūnų genetikos laboratorija, Tilžės g.18, Kaunas LT- 47181; tel. (8-37) 36 36 64; el. paštas: genetikalab@lva.lt

Santrauka. Nustatyta, kad augimo hormonas veikia organizmo augimą, vystymąsi, reprodukcines savybes, produktyvumą. Šio darbo tikslas buvo PGR–RFIP metodu iširti augimo hormono geno (GH) įvairovės poveikį galvijų reprodukciniams savybėms. 282 bp galvijų augimo hormono geno fragmentas panaudojus karpymo fermentus suformavo A ir B alelius. Ištyrus 33 buliukų grupę A alelio dažnis buvo 0,682, o B alelio – 0,318. 54,5 proc. tirtos grupės gyvulių buvo AA genotipo, 27,3 proc. – AB genotipo ir 18,2 proc. BB – genotipo. Galvijų augimo hormono geno B alelis susijęs su geresnėmis bulių reprodukciniėmis savybėmis.

Raktažodžiai: augimo hormono genas, reprodukcija, PGR–RFIP, galvijai, polimorfizmas.

THE INFLUENCE OF GENE POLYMORPHISM OF GROWTH HORMONE ON REPRODUCTION TRAITS IN BULLS

Dalia Kupstaitė, Renata Indriulytė, Natalija Krasnopiorova, Lina Baltrėnaitė, Ilona Miceikienė
K. Janušauskas Laboratory of Animal Genetics, Department of Animal Breedings and Genetics, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania, Phone. +370 37 36 36 64; e-mail: genetikalab@lva.lt

Summary. Growth hormone have influence on animal growth, development, reproduction traits and production. The aim of this study was to estimate the influence of gene polymorphism of growth hormone on reproduction traits in bulls by PCR-RFLP method. Digestion with restriction enzyme of 282 bp growth hormone gene region produced two fragments for alleles A and B. After investigation of 33 bulls was estimated, that A allele has 0,682 frequency and B allele – 0,318 frequency. It was shown that 54,5 % of tested animal group had AA genotype, 27,3 % - AB genotype and 18,2 % - BB genotype, respectively. Bovine growth hormone B allele was associated with improved reproduction traits of bulls.

Key words: growth hormone gene, reproduction, PCR – RFLP, cattle, polymorphism.

Įvadas. Gyvulių reprodukcines savybes, kaip visus kitus fenotipinius požymius nulemia genai. Jų paveldėjimo koeficientai yra labai žemi, todėl vykdyti tradicinę selekciją atrenkant ir parenkant gyvulius, norint pagerinti reprodukcines savybes, yra ilgalaikis ir ne visada veiksmingas procesas. Reprodukciniams savybėms vertinti ir sparčiau gerinti atradus molekulinės genetikos metodus pradėti naudoti genetiniai žymenys, tarp jų ir augimo hormono genas. Kadangi pats augimo hormonas daro įtaką daugeliui organizmo savybių, jo polimorfizmas sietinas su daugeliu fenotipinių požymių. Tiriamas šio geno polimorfizmo ryšys su įvairiomis reprodukciniėmis savybėmis, augimo sparta, gyvulio vystimusi. Buvo nustatyta ir augimo hormono geno kai kurių polimorfinių vietų įtaka mėsinėms bei pieninėms savybėms (Yao et al., 1996; Rocha et al., 1992; Malevičiūtė ir kt., 2002).

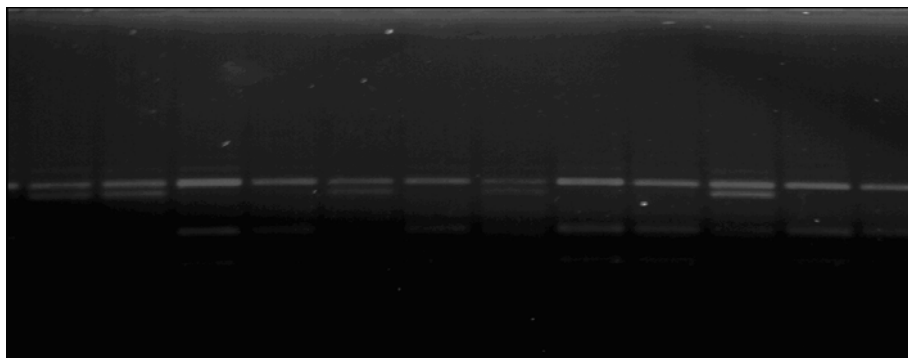
Medžiagos ir metodai. Mėginiai surinkti UAB „Panevėžio veislininkystė“ iš 33 negiminingų buliukų. Plaukai (10–15 vnt.) buvo pašami su svogūnėliais ir dedami į vienkartinius plastikinius maišelius. DNR iš plaukų išskirta greituoju metodu su „Chelex“.

Augimo hormono genas buvo tiriamas PGR–RFIP metodu (polimerazinės grandinės reakcijos–restrikcinių fragmentų ilgio polimorfizmo reakcija). Geno variantams nustatyti PGR reakcijai panaudoti šie pradmenys: pirminis 5' –GTGGGCTTGGGGAGACAGAT–3' ir atvirkštinis 3'5' –GTCCTCACTGCGCATGTTT–3'. PGR reakcija

atlikta 50 µl galutinio tūrio su šiais reagentais: ddH₂O, 10xPCR buferis, 200 µM dNTP, 1,5 µM MgCl₂, 0,6 v.v. Taq polimerazės (MBI „Fermentas“), 0,4 µM kiekvieno pradmenis, 100 ng tiramų galvijų DNR. PGR reakcija vykdyta amplifikatoriuje (AppliedBiosystem; GeneAmp PCR System 2700) tokiu režimu: 94°C temperatūroje 2 min.; 40 ciklų (94°C temperatūroje 45 sek., 60°C temperatūroje 1 min., 72°C temperatūroje 1 min.); 72°C temperatūroje 5 min. Amplifikuotas PGR produktas (282 bp dydžio) sukarpytas panaudojant 10 v.v. *AluI* restrikcinio fermento 37°C temperatūroje. Karpytas PGR produktas elektroforezės būdu frakcionuotas 4 proc. agarozės gelyje 100 V 40 min. Gelis dažytas etidžio bromidu ir analizuotas UV šviesoje (bangos ilgis 300 nm).

Tyrimų rezultatai. Tyrimą atlikome PGR metodu, naudodami specifinius pradmenis, kurie duoda 282 bp PGR produktą. Gene įvykusi mutacija sukuria kirpimo fermentui *AluI* atpažinimo vietą, todėl mutacijai nustatyti galėjome taikyti restrikcinių fragmentų ilgio polimorfizmo tyrimo metodą.

Rasti du skirtingi galvijų GH geno aleliai – A ir B (1 pav.). Ištyrus 33 buliukų grupę A alelio dažnis buvo 0,682, o B alelio – 0,318. 54,5 proc. tirtos grupės gyvulių buvo AA genotipo, 27,3 proc. – AB genotipo ir 18,2 proc. – BB genotipo (1 lentelė).



1 pav. Galvijų GH geno tyrimas. 1, 2, 5, 7, 10 takeliai – A alelis, 3, 6, 8, 9, 11, 12 takeliai – B alelis

1 lentelė. Galvijų GH genotipų ir alelių dažniai

Genotipai	Gyvulių skaičius	Genotipų dažniai	Aleliai	Alelių dažniai
AA	18	0,545	A	0,682
AB	9	0,273	B	0,318
BB	6	0,182		
Iš viso:	33	1		1

Norint įvertinti GH geno įtaką reprodukciniams savybėms, buvo suformuota tokių fenotipinių požymių duomenų bazė: spermos tūris; spermos koncentracija; spermos judrumas. GH geno BB genotipo buliukų spermos rodikliai buvo geresni nei AA ar AB genotipo, tačiau sta-

tistiškai reikšminga įtaka nustatyta tik spermos judrumo rodikliui. BB genotipo buliukų spermos tūris buvo 4,3 ml, spermos koncentracija – 0,98 mlrd/ml; spermos judrumas – 14,6 balo ($p \leq 0,05$) (2 lentelė).

2 lentelė. GH geno įtaka galvijų reprodukciniams savybėms

Genotipas	n	Spermos tūris, ml	Spermos koncentracija, mlrd/ml	Spermos judrumas, balai
AA	18	4,22±0,27	0,89±0,05	11,77±1,3
AB	9	4,07±0,19	0,98±0,06	8,93±0,68 ^a
BB	6	4,3±0,4	0,98±0,05	14,06±1,74 ^b

a, b – vidurkiai, lentelės stulpelyje pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai patikimai skiriasi tarpusavyje ($p \leq 0,05$)

Augimo hormono BB genotipo buliukai greičiau priaugo svorio nei AB ir BB genotipo buliukai. Nuo 3 iki 6 mėn. BB genotipo buliukai priaugo 126,67 kg, AB genotipo – 112,67 kg, o AA genotipo – 108,89 kg. Nuo 6 iki 12 mėn. BB genotipo buliukai priaugo 202,16 kg, AB –

202, o AA – 197,5 kg. BB genotipo buliukai gavo geriausią eksterjero vertinimo balą (14,08), kuris statistiškai reikšmingai viršijo AA genotipo buliukų eksterjero vertinimo rodiklį (3 lentelė).

3 lentelė. GH geno įtaka galvijų brendimui

Genotipas	n	Svoris 3 mėn., kg	Svoris 6 mėn., kg	Svoris 12 mėn., kg	Eksterjero vertinimas balais
AA	18	117,94±3,39	226,83±7,63	424,33±10,43	13,46±0,15 ^a
AB	9	114,89±3,56	227,56±6,49	429,56±6,23	13,62±0,15
BB	6	116,5±7,68	243,17±18,42	445,17±17,89	14,08±0,12 ^b

a, b – vidurkiai, lentelės stulpelyje pažymėti skirtingomis raidėmis, statistiškai patikimai skiriasi tarpusavyje ($p \leq 0,05$)

Aptarimas ir išvados. Augimo hormonas (GH), dar vadinamas somatotropinu, yra proteininis hormonas, sintetuojamas ir sekretuojamas ląstelių, vadinamų somatot-

rofitais, priekinėje hipofizio dalyje (adenohipofizėje) ir reguliuojamas hipotalamuso (pagumburio) (Knorr et al., 1997; Ge et al., 2000; Stasio et al., 2003).

GH genas yra 5q22 26 chromosomoje (Li, 1994). Jis sudarytas iš 191 aminorūgšties, kuri veikia daugelį gyvulio biologinių savybių, tokių kaip laktacija, augimas ir ląstelių diferenciacija (Chikuni et al., 1997). Galvijų genų įvairovės tyrimai parodė, kad GH genas susijęs su mėsos produkcija (Chikuni et al., 1997). Galvijuose kelios šio geno mutacijos buvo rastos 5 egzone, 3 introne ir 3 šoniniame regione. Nustatyta, kad 5 egzone esantys pakitimai veikia mėsos savybes (Stasio et al., 2003). Taip pat yra mokslinės informacijos, kad augimo hormonas gali veikti lytinį brendimą ir sėklidžių funkciją (Lin, 1996).

Galvijų augimo hormono geno polimorfizmo įtaka reprodukciniams savybėms buvo tirta brazilų mokslininkų. Buliams buvo matuotas skrotalinio paviršiaus ilgis, tirta testosterono koncentracija ir sėklidžių augimo greitis. Nors augimo hormonas neturėjo stimuliuojamo efekto sėklidžių funkcijoms prieš subrendimą, bet veikė sėklidžių augimą. Gauti rezultatai parodė, kad augimo hormono polimorfizmo ryšys su skrotaliniu ilgiu ir sėklidžių augimu prieš lytinę brandą galėtų būti naudingas ankstyvai galvijų selekcijai pagal reprodukcinius požymius (MacDonald et al., 1993). Atliekant tyrimus su pelėmis taip pat buvo nustatyta augimo hormono geno polimorfizmo įtaka kūno, kepenų ir sėklidžių svorio padidėjimui (Chatelain et al., 1991). Mokslininkai rado koreliacinius ryšius tarp augimo hormono geno polimorfizmo ir bulių kūno masės (Rocha et al., 1992). Šis faktas paaiškina augimo hormono geno poveikį vyriškų lytinių liaukų išsivystymui. Mūsų tyrimų rezultatai taip pat patvirtina faktą, kad augimo hormonas veikia į gyvulio augimą ir vystimąsi.

Genetinis polimorfizmas apibūdina faktą, kad požymis turi du ar daugiau formų, kurias genetiškai nulemia geno aleliai. Genetinis polimorfizmas labai svarbus taikomojoje srityse, tokiose kaip zootechniniai mokslai. Tyrimais siekiama išsiaiškinti galimas asociacijas tarp genetinių variantų ir charakteringų produkcijai požymių, reprodukcijos efektyvumą ir galvijų adaptacines galimybes nulemiančių požymių.

Apibendrinę tyrimų rezultatus galime pateikti tokias išvadas:

1. Tiriant galvijų augimo hormoną buvo rasti du aleliai – A ir B, taigi genas yra polimorfiškas ir tai sudaro galimybes jį panaudoti kaip genetinį biožymenį galvijų selekcijai.

2. GH geno BB genotipo galvijai buvo didžiausio spermos tūrio, koncentracijos, jų spermos judrumas ir eksterjeris įvertintas geriausiai.

3. Galvijų augimo hormono B alelis susijęs su geresnėmis bulių reprodukciniams savybėmis.

4. Norint augimo hormono geno polimorfizmą panaudoti selekcinėse programose reprodukciniams savybėms gerinti, reikia atlikti šio geno polimorfizmo tyrimus didelėje gyvulių grupėje.

Literatūra

1. Chatelain, P. G.; Sanchez, P. and Saez, J. M. Growth hormone and insulin-like growth factor I treatment increase testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice. *Endocrinology*. 1991. Vol.128. P.

1857-1862.

2. Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Fukumoto Y. and Ozawa S. A simple method for genotyping the bovine growth hormone gene. *Animal Genetics*. 1997. Vol. 28. P. 230
3. Ge W., Davis M. E., Hines H. C. and Irvin K. M. Rapid communication: single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. *Journal of Animal Science*. 2000. Vol. 78. P. 2229–2230.
4. Knorr C., Moser G., Muller E. and Geldermann H. Association of GH gene variants with performance traits in F-2 generations of European wild boar, Pietrain and Meishan pigs. *Animal Genetics*. 1997. Vol. 28. P. 124–128.
5. Li X. Localization of GH gene to bovine chromosome 5q22-26 by in situ hybridization. Liu L. Department of Biology, Beijing Normal University, 1994. 21 (5), 350–355.
6. Lin, T. Insulin-like growth factor-I regulation of the Leydig cells. In: Payne, A. V. H.; Hardy, M. P. and Russell, L. D. (ed). *The Leydig cell*. 1996. P. 477–491.
7. MacDonald, R. D. and Deaver, D. R. Testicular development in bulls treated with recombinant bovine somatotropin. *J. Anim. Sci.* 1993. Vol. 71. P.1540–1545.
8. Malevičiūtė J., Baltrenaitė L., Pečiulaitienė N., Miceikienė I. Genetinių žymeklių panaudojimas gyvulių selekcijoje. *Ūkininko patarėjas*. 2002. Nr.131 (1425).
9. Rocha, J. L.; Baker, J. F.; Womack, J. E.; Sanders, J. O. and Taylor, J. F. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 1992. Vol. 70. 3360–3370.
10. Stasio L. Di., Brugiapaglia A., Destefanis G., Albera A. and Sartore S. GH1 as candidate gene for variability of meat production traits. *J. Anim. Breed. Genet.* 2003. Vol. 120. P. 358–361.
11. Yao, J.; Aggrey, S. E.; Zadworny, D.; Hayes, J. F. and Kuhnlein, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics*. 1996. Vol. 144. P. 1809-1816.

Gauta 2007 11 30

Priimta publikuoti 2008 01 31