

## Możliwy związek między genotypami *IGF-1/SnaBI* a wydajnością mleczną krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej

Małgorzata Wasielewska<sup>#</sup>, Iwona Szatkowska

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,  
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających,  
Zakład Cytogenetyki Molekularnej,  
ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin; <sup>#</sup>e-mail: malgorzata.wasielewska@zut.edu.pl

Dobrze znana jest korelacja między polimorfizmami występującymi w genie *IGF-1* a cechami produkcyjnymi u bydła mięsnego. Wpływ insulinopodobnego czynnika wzrostu na wartość cech mlecznych nie została jeszcze wystarczająco dobrze poznana. Celem przeprowadzonych badań była próba opisanego wpływu substytucji *IGF-1/SnaBI* na wybrane parametry mleczności krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Zidentyfikowano występowanie trzech genotypów: *CC*, *CT*, *TT*. Uzyskane wyniki wykazały istnienie korelacji między genotypami *IGF-1/SnaBI* i wydajnością mleczną (najwyższa dla homozygot *CC*, najniższa dla heterozygot *CT*). Nie udało się stwierdzić istnienia związku między badanym genotypem a cechami jakościowymi mleka.

**SŁOWA KLUCZOWE:** krowy, wydajność mleczna, *IGF-1*

Jednym z czynników molekularnych o potencjalnym wpływie na mleczność krów jest gen *IGF-1* (ang. *Insulin-like Growth Factor*), kodujący insulinopodobny czynnik wzrostu 1. Gen ten, zlokalizowany u bydła w piątym chromosomie autosomalnym (BTA5, 73,5 cM), zbudowany jest z sześciu eksonów i pięciu intronów [5]. Wraz z hormonem wzrostu (ang. *Growth Hormone* – GH), IGF-1 należy do osi somatotropowej. Do osi tej, oprócz IGF-1, IGF-2 i GH, zaliczane są również inne czynniki wydzielane przez komórki różnych tkanek, między innymi przez wątrobę, w tym receptor hormonu wzrostu (GHR), białka wiążące hormon wzrostu (GHBP), białka wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFBP) oraz ich receptory [12]. Oś somatotropowa pełni funkcję plejotropową i odgrywa kluczową rolę dla regulacji wielu procesów metabolicznych i fizjologicznych, w tym wzrostu i rozwoju narządów, a jej aktywność kontrolowana jest przez podwzgórze [10]. Elementy osi somatotropowej wpływają na rozwój tkanki gruczołu mlecznego krów. Ekspresja genu *IGF-1* jest najwyższa w czasie późnej ciąży, a najniższa podczas mammogenezy, laktogenezy, galaktopoezy i inwolucji [17]. Połączenie GH z jego receptorem akty-

wuje transkrypcję wielu genów, w tym *IGF-1* [16]. Ekspresja genu *IGF-1* zachodzi przede wszystkim w wątrobie, której komórki syntetyzują niewielkie białko (o długości 70 aminokwasów) – somatomedynę C, zwaną inaczej insulinopodobnym czynnikiem wzrostu [1]. IGF-1 wykazuje działanie endokryne, wydzielany jest przez wątrobę do krwiobiegu, skąd trafia do innych tkanek [15]. W okresie prenatalnym IGF-1 oraz IGF-2 odgrywają ważną rolę w procesie kształtowania narządów wewnętrznych oraz wpływają na wzrost płodu [6]. IGF-2 jest niewielką, bo zaledwie 67-aminokwasową cząsteczką o masie 7471Da i tak samo jak IGF-1 zaliczany jest do somatomedyn [14]. Oba czynniki pełnią kluczową rolę dla wzrostu i rozwoju narządów, choć IGF-2 aktywny jest głównie w życiu płodowym, a później jego rola stopniowo przejmowana jest przez IGF-1. Wraz z hormonem wzrostu, IGF-1 odpowiada za regulację procesów metabolicznych oraz wzrost i rozwój organizmu w okresie postnatalnym. W związku z powyższym, wymienione białka odgrywają kluczową rolę podczas kształtowania się gruczołu mlekcznego, w procesie laktogenezy i wpływają także na płodność [9].

Warto bliżej przyjrzeć się genowi *IGF-1* i jego wpływowi na wydajność mleczną, ze względu na fakt, że znajduje się on w tym samym regionie chromosomu piątego, co przynajmniej 73 *loci* innych genów związanych z ilościowymi cechami mlecznymi i mięsnymi [3]. Celem przeprowadzonych badań była próba opisanie wpływu substytucji *IGF-1/SnaBI* na wybrane parametry mleczności (wydajność mleczna, zawartość białka i tłuszczu w mleku) krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej.

### Material i metody

Badaniami objęto łącznie 735 krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, utrzymywanych w stadzie w województwie opolskim. Krew od zwierząt została pobrana z żyły szyjnej zewnętrznej podczas rutynowych zabiegów weterynaryjnych, następnie umieszczona w próbkach zawierających EDTA. Z pobranych prób wyizolowano materiał DNA przy użyciu zestawu MasterPure Genomic DNA Purification Kit firmy Epicenter Technologies, zgodnie z metodyką dostarczoną przez producenta.

Sekwencje starterów wykorzystanych do amplifikowania zostały zaczerpnięte z pracy Ge i wsp. [4]. Ich sekwencje przedstawiają się następująco: F 5'-ATTACAAAGCTGCTGCCCC-3', R 3'-ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT-5'.

Do przeprowadzenia PCR wykorzystano mieszaninę reakcyjną, w skład której wchodziło około 50 ng matrycy DNA, 0,06 µl polimerazy DreamTaq (ThermoScientific™) o stężeniu 5 U/µl, 1,5 µl 10xDreamTaq Buffer (ThermoScientific™), po 300 µl każdego z nukleotydów o stężeniu 10 µM, po 0,15 µl każdego ze starterów o stężeniu 100 µM. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze ABi Gene 2700. Profil termiczny PCR zamieszczono w tabeli 1.

Efektywność zajścia reakcji oceniono przeprowadzając rozdzielanie elektroforetyczne 4 µl produktu w 1,5% żelu agarozowym (Syngen) z dodatkiem bromku etydyny, w środowisku 1x TBE przez 20 minut pod napięciem 130 V. Otrzymany produkt miał długość 249 pz.

Pozostałe 11 µl próby poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym *SnaBI* (ThermoScientific™), który rozpoznawał region TAC↓GTA. W skład mieszaniny reakcyjnej wcho-

**Tabela 1 – Table 1**

Profil termiczny PCR

PCR temperature profile

Etap Stage		Temperatura Temperature	Czas Time
Denaturacja wstępna Initial denaturation		94°C	5 min
Denaturacja właściwa Denaturation	31 cykli 31 cycles	94°C	60 s
Przyłączanie starterów Primer annealment		62°C	35 s
Wydłużanie Elongation		72°C	60 s
Wydłużanie końcowe Final elongation		72°C	5 min

dziło 0,2 µl enzymu, 2 µl 10x buforu TANGO. Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. Po zakończeniu inkubacji przeprowadzono rozdział elektroforetyczny, w celu obrazowania otrzymanych genotypów. Rozdział przeprowadzono w 3% żelu agarozowym (Syngen) z dodatkiem bromku etydyny, w środowisku 1x TBE przez 40 minut pod napięciem 130 V. Oceny otrzymanych na żelu genotypów dokonano pod lampą UV. Otrzymano następujące układy: dla heterozygot *CT* – 249, 233 i 26 pz; dla homozygot *TT* – 233 i 26 pz, dla genotypu *CC* – 249 pz.

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem odpowiednich pakietów języka R [11]. Macierz wzajemnych relacji addytywnych zbudowano bazując na trzypokoleniowym rodowodzie przy użyciu pakietu kinship2 R. Poniższy model liniowy stworzono z wykorzystaniem funkcji lmeekin dostępnej w pakiecie coxme R:

$$Y = \mu + G + H + YS + \beta_1 A + \beta_2 L + \alpha + e$$

gdzie:

*Y* – fenotypowa wartość danej cechy, $\mu$  – wartość średnia,*G* – efekt stały związany z genotypem danego fenotypu,*H* – efekt stały dla stada,*YS* – efekt stały pory roku, w której wystąpiło wycielenie, $\beta_1 A$  – współczynnik regresji dla wieku krowy, $\beta_2 L$  – współczynnik regresji dla długości trwania laktacji, $\alpha$  – losowy poligenowy element odpowiadający za wszystkie znane powiązania w rodowodzie,*e* – składnik resztowy.

Dla analiz wykonanych równocześnie dla wszystkich trzech laktacji uwzględniono również wartość efektu stałego laktacji. Dla wielokrotnych porównań zastosowano poprawkę Bonferroniego.

## Wyniki i dyskusja

W badanym stadzie zwierząt, przy wykorzystaniu rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym, zidentyfikowano trzy genotypy: *CT*, *TT*, *CC*. W tabeli 2. przedstawiono frekwencje genotypów i alleli w całej populacji.

**Tabela 2 – Table 2**

Frekwencja występowania alleli i genotypów *IGF-1/SnaBI* w badanym stadzie  
Frequency of *IGF-1/SnaBI* alleles and genotypes in the test herd

	Genotypy – Genotype			Allele	
	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CC</i>	C	T
Frekwencja Frequency	0,4832	0,2594	0,2574	0,499	0,501

Z danych przedstawionych w tabeli 2. wynika, że w populacji najczęściej występują osobniki heterozygotyczne *CT* (0,4832). Frekwencje występowania pozostałych dwóch genotypów (*TT* i *CC*) są do siebie bardzo zbliżone i wynoszą odpowiednio 0,2594 oraz 0,2574. Częstość występowania poszczególnych alleli jest odzwierciedleniem frekwencji genotypów. Otrzymane wartości są zbliżone dla obu alleli i wynoszą 0,499 dla allelu C oraz 0,501 dla allelu T.

Wyniki wydajności mlecznej w czasie 305-dniowej laktacji przedstawiono w tabeli 3. W czasie pierwszej laktacji średnia wydajność mleczna wynosiła 9341,87 kg. Różnica między wydajnością najwyższą (genotyp *CC*) a najniższą (genotyp *CT*) wynosiła 1,72%, co stanowiło 159,45 kg mleka. Osobniki o genotypie *TT* charakteryzowały się średnią wydajnością mleczną.

W tabeli 3. przedstawiono też wyniki zawartości tłuszczu i białka w mleku w zależności od genotypu *IGF-1/SnaBI*. Bez względu na genotyp, zarówno w przypadku zawartości białka, jak i tłuszczu, otrzymane wartości były zbliżone.

**Tabela 3 – Table 3**

Wydajność cech mleczności oraz procentowa zawartość tłuszczu i białka w mleku w zależności od genotypu *IGF-1/SnaBI*

Milk yield and percentage content of fat and protein in milk depending on *IGF-1/SnaBI* genotype

Genotyp Genotype	Wydajność mleka za 305 dni laktacji Milk yield during 305-day lactation (kg)		Zawartość tłuszczu Fat content (%)		Zawartość białka Protein content (%)	
	n	średnia mean	n	średnia mean	n	średnia mean
<i>CT</i>	353	9284,51 ±82,67	353	4,11 ±0,02	353	3,38 ±0,01
<i>TT</i>	192	9347,43 ±105,57	192	4,14 ±0,04	192	3,34 ± 0,02
<i>CC</i>	190	9443,96 ±112,67	190	4,13 ±0,04	190	3,34 ± 0,02

Dotychczas niewielu badaczy podjęło się próby oceny wpływu polimorfizmów występujących w genie *IGF-1/SnaBI* na cechy związane z produkcją mleczną. Zdecydowana większość naukowców skupiła swoją uwagę na cechach mięsnych, wzroście i rozwoju krów. Udowodniono istnienie związku między polimorfizmami genu *IGF-1* a takimi cechami, jak wielkość i masa tuszy, zawartość tłuszczu w tuszy, grubość tkanki tłuszczowej, dzienne przyrosty masy, zdatność mięsa do obróbki spożywczej czy rozkład tkanki tłuszczowej [8]. Insulinopodobny czynnik wzrostu wpływa na rozrost mięśni, a także gruczołu mlekowego, co daje podstawy do przypuszczenia, że może mieć on wpływ na produkcję mleka.

Występująca w regionie regulatorowym tranzycja T>C wpływa na cechy produkcyjne zarówno w sposób pośredni, jak i bezpośredni [2]. Wykazano, że heterozygoty (*TC*) charakteryzują się wyższą wydajnością mleczną niż homozygoty (*TT*, *CC*), czego nie potwierdzono w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy. Ponadto wykazano pozytywną korelację między badanym genotypem a cechami jakościowymi mleka: mleko produkowane przez heterozygoty zawierało więcej tłuszczu i białka niż produkowane przez homozygoty. W niniejszym badaniu nie udało się potwierdzić związku polimorfizmu *IGF-1/SnaBI* z zawartością tłuszczu i białka.

W irlandzkiej populacji krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej nie stwierdzono związku między żadnym z pięciu badanych polimorfizmów *IGF-1* a wydajnością mleczną ani zawartością białka w mleku. Potwierdzono jednak wpływ badanych polimorfizmów na zawartość tłuszczu w mleku [16]. Badania na buhajach, polegające na ocenie przekazywanego potencjału produkcyjnego oszacowanego na podstawie wyników wydajności mlecznej córek, wykazały, że na dziesięć przebadanych polimorfizmów występujących w genie *IGF-1* jeden związany był ze wzrostem wydajności mlecznej, dwa – ze wzrostem zawartości białka i jeden – ze wzrostem zawartości tłuszczu w produkowanym mleku [9]. Wykazano również istnienie związku między polimorfizmami występującymi w intronach znajdujących się w genie *IGF-1* a wydajnością mleczną, a także zawartością białka i tłuszczu w mleku [8]. Trzy ze zbadanych mutacji wykazywały negatywny wpływ na wydajność mleczną. W intronie 3 i 6 występowały substytucje A>G, które wpływały na spadek zawartości tłuszczu w mleku. Dodatkowo osobniki, u których zidentyfikowano mutację występującą w intronie 3 charakteryzowały się niższą wydajnością mleczną. Wspomniane polimorfizmy występowały tylko u 0,4% populacji, co może sugerować, że zostały one wyeliminowane na drodze selekcji ukierunkowanej na uzyskanie możliwie najwyższej mleczności.

Oprócz zawartości białka i tłuszczu, polimorfizmy występujące w genie *IGF-1* związane są z proporcjami kwasów tłuszczowych znajdujących się w mleku [7]. Mleko produkowane przez osobniki o genotypie *TT* zawiera więcej nasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast mleko produkowane przez osobniki o genotypie heterozygotycznym *CT* – więcej nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Wyniki uzyskane w prezentowanych badaniach własnych jednoznacznie wskazują, że istnieje związek pomiędzy polimorfizmami występującymi w regionie regulatorowym genu *IGF-1* a wydajnością mleczną krów. Nie udało się natomiast wykazać istnienia związku między genotypami *IGF-1/SnaBI* a cechami jakościowymi mleka (zawartość tłuszczu i białka). Niemniej jednak warto podkreślić, że warianty polimorficzne pojedyn-

czych genów mogą wykazywać nieznaczny wpływ na mleczność, ale w sprzężeniu z innymi genami powyższe zależności mogą rozkładać się korzystniej [13]. W dobie selekcji genomowej, której podstawą jest stosowanie tzw. równań predykcyjnych umożliwiających przypisanie SNP określonej wartości, warto rozpatrzyć wariant *IGF-1/SnaBI* jako mający potencjalne znaczenie.

## PIŚMIENNICTWO

1. ABDOLMOHAMMADI A., ZAMANI P., 2014 – SNP exploring in the middle and terminal regions of the IGF-1 gene and association with production and reproduction traits in Holstein cattle. *Gene* 540 (1), 92-95.
2. BONAKDAR E., RAHMANI H.R., EDRISS M.A., SAYED TABATABAEI B.E., 2010 – IGF-I gene polymorphism, but not its blood concentration, is associated with milk fat and protein in Holstein dairy cows. *Genetics and Molecular Research* 9 (3), 1726-1734.
3. DE LA ROSA REYNA X.F., MONTOYA H.M., CASTERELLÓN V.V., RINCÓN A.M.S., BRACAMONTE M.P., VERA W.A., 2010 – Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genetics and Molecular Research* 9 (2), 875-883.
4. GE W., DAVIS M.E., HINES H.C., 1997 – Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Animal Genetics* 28 (2), 155-156.
5. GROSSE W.M., KAPPES S.M., LAEGRID W.W., KEELE J.W., CHITKO-MCKOWN C.G., HEATON M.P., 1999 – Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and linkage mapping of bovine cytokine genes. *Mammalian Genome* 10 (11), 1062-1069.
6. LI S., LI Y., YU S., DU W., ZHANG L., DAI Y., LIU Y., LI N., 2007 – Expression of insulin-like growth factors systems in cloned cattle dead within hours after birth. *Molecular Reproduction and Development* 74 (4), 397-402.
7. LI C., SUN D., ZHANG S., YANG S., ALIM M., ZHANG Q., LI Y., LIU L., 2016 – Genetic effects of FASN, PPARGC1A, ABCG2 and IGF-1 revealing the association with milk fatty acids in Chinese Holstein cattle population based on a post genome-wide association study. *BMC Genetics* 17, 110-126.
8. MULLEN M.P., BERRY D.P., HOWARD D.J., DISKIN M.G., LYNCH C.O., GIBLIN L., KENNY D.A., MAGEE D.A., MEADE K.G., WATERS S.M., 2011 – Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene are associated with performance in Holstein-Friesian dairy cows. *Frontiers in Genetics* 2 (3), 1-9.
9. MULLEN M.P., LYNCH C.O., WATERS S.M., HOWARD D.J., O'BOYLE P., KENNY D., BUCKLEY F., HORAN B., DISKIN M.G., 2011 – Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and insulin-like growth factor 1 genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows. *Genetics and Molecular Research* 10 (3), 1819-1830.
10. OBREPALSKA-STĘPŁOWSKA A., DURZYŃSKI Ł., GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A., 2005 – Insulinopodobny czynnik wzrostu i białka z nim współpracujące. *Postępy Biochemii* 51 (1), 69-79.
11. R Development Core Team, 2015 – R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, URL (<http://www.R-project.org>).
12. RENAVILLE R., HAMMADI M., PORTETELLE D., 2002 – Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domestic Animal Endocrinology* 23 (1-2), 351-360.

13. SZEWCZUK M., 2017 – Polymorphism in exon 2 encoding the putative ligand binding pocket of the bovine insulin-like growth factor 1 receptor affects milk traits in four different cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 134 (1), 34-42.
14. SZEWCZUK M., ZYCH S., CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA E., 2009 – Ewolucja poglądów na temat insulinopodobnych czynników wzrostu. *Postępy Biochemii* 55 (3), 329-336.
15. WANG Y., PRICE S.E., JIANG H., 2003 – Cloning and characterization of the bovine class 1 and class 2 insulin-like growth factor-I mRNAs. *Domestic Animal Endocrinology* 25 (4), 315-328.
16. WATERS S.M., BERRY D.P., MULLEN M.P., 2012 – Polymorphisms in genes of the somatotrophic axis are independently associated with milk production, udder health, survival and animal size in Holstein-Friesian dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 129 (1), 70-78.
17. ZYCH S., SZATKOWSKA I., DYBUS A., 2005 – Oś somatotropowa (GH/GHR/IGF-1) i jej rola w kontroli procesu laktacji u bydła. *Medycyna Weterynaryjna* 61 (8), 857-860.

Małgorzata Wasielewska, Iwona Szatkowska

### Possible relationship between *IGF-1/SnaBI* genotypes and milk yield of Holstein-Friesian cows

#### Summary

The correlation between polymorphisms in the *IGF-1* gene and production traits in beef cattle is well known. The effect of insulin-like growth factor on the value of milk traits is not yet adequately understood. The aim of the study was to attempt to describe the effect of *IGF-1/SnaBI* substitution on selected milk performance parameters of the Black-and-White variety of Holstein-Friesian cows. Three genotypes were identified: *CC*, *CT* and *TT*. The results showed a correlation between *IGF-1/SnaBI* genotypes and milk yield (highest for *CC* homozygotes and lowest for *CT* heterozygotes). No relationship could be established between the genotype and the quality characteristics of milk.

**KEY WORDS:** cows, milk yield, *IGF-1*