

A kutatás célja, a munkatervben vállalt kutatási program ismertetése

Szarvasmarha esetében a húсок márványozottságát az izmon belül, az izomrostok között elhelyezkedő ún. intramuszkuláris faggyú okozza. A márványozott húсок ízletesebbek, porhanyósabbak és számos országban, ahol a sült marhahús (steak) fogyasztásnak nagy hagyománya van, ez a húsminőség egyik fontos ismérve. Az Egyesült Államokban például a marhahúсок minősítésének egyik meghatározó eleme a márványozottság.

Ezzel magyarázható, hogy éveken át számos QTL (mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókus) vizsgálat tűzte ki céljául (Riquet és mtsai, 1999; Farnir és mtsai, 2002) az intramuszkuláris faggyútartalmat szabályozó gén felkutatását ill. feltérképezését. Barendse (1999) a thyroglobulint (TG) kódoló gént, amely a 14. kromoszómán helyezkedik el (Coppieters és mtsai, 1998; Winter és mtsai, 2002), a vizsgált tulajdonság egyik fő szabályozójaként tartotta számon. A thyroglobulin tulajdonképpen egy glükoprotein, mely a zsír metabolizmusában is szerepet játszó pajzsmirigy hormonok prekursorának tekinthető.

Az utóbbi években a diacilglicerol O-aciltranszferázt (DGAT1) kódoló gén esetében egy lizin/alanin polimorfizmust mutattak ki, mely jelentős hatással bír a tehéntej zsírtartalmára (Grisart és mtsai, 2002; Winter és mtsai, 2002; Kühn és mtsai, 2004; Sanders és mtsai, 2006). Az enzim a trigliceridek szintézisének utolsó lépését katalizálja, ezáltal a tejszír arányát befolyásolja.

Német kutatók (Thaller és mtsai, 2003) a TG és az izomzat intramuszkuláris faggyútartalma között kerestek összefüggést holstein-fríz és charolais fajtákkal végzett kísérletben. Megállapították, a TG elsősorban a rostélyos, (*m. longissimus dorsi*) intramuszkuláris faggyú tartalmával hozható kapcsolatba. Moore és mtsai (2003) hasonló következtetésekre jutottak.

Vizsgálatunkban célul tűztük ki annak elemzését, hogy -hazai körülmények között- van-e pozitív hatása a DGAT1 és a TG gén egyes alléljeinek a tehéntej zsírtartalmára, ill. az intramuszkuláris faggyútartalomra, különböző szarvasmarha fajták esetében.

A tárgykörben kidolgozott módszerek, eljárások

A PCR amplifikáció során a Winter és mtsai (DGAT1 gén), ill. a Barendse (TG gén) által leírt primerek nem hozták teljes mértékben a várt eredményt, ezért részben módosított, részben új tervezésű, a szakirodalomban közölt DNS-szekvenciák alapján tervezett primereket használtunk:

DGAT1 polimorfizmus:

forward primer: 5'-(T)₃₀CGC TTG CTC GTA GCT TTG G-3'

reverse primer: 5'-CAC CGC GGT AGG TCA GGT TGT C-3'

TG polimorfizmus:

forward primer: 5' GGGGATGACTACGAGTATGACTG 3'

reverse primer: 5' GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGTA 3'

Megfelelő eredményeket a polimeráz láncreakció körülményeinek (a denaturálásnak, a primerek feltapadásának és a láncépítés hőmérsékletének), illetve a ciklusok számának többszöri változtatásával sikerült elérni.

A következő PCR reakciókörülményeket használtuk:

DGAT1 polimorfizmus:

94°C 5 min.; 92°C 15 sec., 62°C 1 min., 72°C 15 sec., ciklusszám: 32;

TG polimorfizmus:

94°C 1 min.; 94°C 30 sec., 55°C 1 min., 72°C 15 sec., ciklusszám: 30; 72°C 10 min.

A reakciókomponensek koncentrációja 10 µl PCR térfogatra vetítve a következő: 200 µM dNTP, 0.2 µM primer, 0.25 U DyNAzyme. A DNS sokszorosítást követően a mintákat három óráig, 37 °C-on CfrI ill. PvuII restrikciós enzimmel történő emésztésnek vetettük alá. Végül, az ethidium bromiddal jelölt termékek azonosítását, 4%-os Meta-Phor® agaróz (FCM, Rockland, ME, USA) gélen végeztük.

A módszert és a kapott eredményeket 2008-ban (az OTKA támogatás feltüntetésével) publikáltuk {Anton és mtsai, Acta Vet. Hungarica, 56(2):181-186}.

A vizsgálat részletei

2006-ban és 2007- ben összesen 300 holstein fríz tehénből vérmintát vettünk, a vérmintákból izoláltuk az állatok DNS-ét, majd pedig – az előbbieken ismertetett módszerrel- meghatároztuk az állatok DGAT1 genotípusát. A vérmintákat a DNS kivonásáig -20°C-on tároltuk. Regisztráltuk az állatok laktációs adatait, a tej zsírtartalmát és számításokat végeztünk, az egyes genotípusok és a rendelkezésünkre álló adatok közötti összefüggések vizsgálatára. A TG gén és a hús márványozottsága (intramuszkuláris faggyú aránya) közötti kapcsolat vizsgálatára kiválasztottunk 30 vörös angus, 15 limousin, 15 charolais és 30 magyar tarka bikát. Az állatok vágósúlyra való hízlalása után, megtörtént azok levágása, kicsontozása és húsminták (rostélyos és fehérpecsenye) vétele. Az állatokból vágás előtt vért vettünk, majd pedig laborunkban -az előbbieken közölt módszer segítségével- meghatároztuk azok TG genotípusát. A vérmintákat -ebben az esetben is- a DNS izolálásáig -20°C-on tároltuk. A húsmintákból intézetünkben szabvány szerint (gravimetriás módszerrel, Soxhlet extrakcióval, éter felhasználással) meghatároztuk az intramuszkuláris faggyú mennyiségét.

Az elért eredmények és értékelésük

Adataink elemzését SPSS 15 for Windows szoftverrel végeztük. Az általános lineáris modell módszerét (GLM) használtuk mindkét polimorfizmus vizsgálatára. A DGAT1 polimorfizmus vizsgálatánál a farm, a tehének születési éve és a teljesített laktációk száma, míg a TG polimorfizmus esetében a fajta és a genotípus szerepeltek fix hatásokként.

A DGAT1 polimorfizmus esetében a várt és a számított genotípus-frekvenciák közt nem volt szignifikáns különbség. A számított χ^2 érték 1,941 volt, ami a populáción belül a Hardy-Weinberg egyensúly fennállását jelezte.

Az 1. Táblázatban a várt és a számított DGAT1 genotípusok megoszlását mutatjuk be a vizsgált holstein-fríz populációkban:

1. Táblázat

AA/AA	AA/GC	GC/GC	χ^2	p
73.2 % (71.6 %)	22.0 % (26 %)	4.8 % (2.4 %)	1.941	0.379

Zárójelben a várt értékeket közöljük (df=2)

A 2. Táblázatban a DGAT1 genotípusok hatását mutatjuk be a 305 napos laktáció fő paramétereire

2. Táblázat: A 305 napos laktációs adatok legkisebb négyzetes átlaga és sztenderd hibája magyar holstein-fríz állományokban

DGAT1 genotípusok (n=300)	tejhozam (kg)	tejzsír %	LSM±SE zsír kg	fehérje %	fehérje kg
AA/AA* (n=213)	4172,3±534.2a	3,90±0,11a	284,40±11,92a	3,32±0,05a	240,5±10,7a
AA/GC (n=71)	4626,4±684,9b	3,75±0,13b	294,52±14,42a	3,25±0,06b	254,7±12,9ab
GC/GC** (n=16)	4640,2±1405,3ab	3,74±0,25ab	310,31±24,47b	3,35±0,12ab	278,7±24,8b
Variancia [¶] (%)	3.0	1.7	0.8	1.7	2.3

*lizint kódoló genotípus; **alanint kódoló genotípus; a-b oszlopon belül a különböző betűvel jelzett értékek ($P \leq 0,05$) valószínűségi szinten különböznek; [¶] a DGAT1 gén hatása a teljes fenotípus variancián belül

A táblázatból kitűnik, hogy a DGAT1 gén hatása a laktáció fő paramétereinél -a teljes fenotípus variancián belül- nem emelkedett egyetlen esetben sem 3% fölé. A 305 napos tej-, zsír- és fehérjehozam a GC homozigóta teheneknél volt a legmagasabb. A tejhozam és a fehérje % esetében, a GC/GC állatok alacsony számának és az éppen ezért magas sztenderd hibának köszönhetően, nem volt szignifikáns különbség kimutatható az AA/AA és az AA/GC genotípusú tehenek átlagaihoz képest.

Nyilvánvalóan negatív korreláció áll fenn a tejzsír százalék és a tejhozam között, ezért egyértelmű, hogy a tejzsír százalékot illetően az AA/AA genotípuscsoporttól a GC/GC csoport felé haladva csökkenő tendenciát tapasztaltunk. Strzalkowska és mtsai (2005) hasonló eredményeket kaptak lengyel fekete-tarka szarvasmarha fajtában. A tejzsír és a tejfehérje hozam esetében az AA/AA és a GC/GC genotípusú állatok átlagai között talált különbség szignifikánsnak bizonyult. A kapott adatok tendenciáive megegyezik a Spelman és mtsai (2002) által talált eredményekkel. A magyar és az új-zélandi holstein-fríz populációk között megfigyelhető különbségek valószínűleg a két országban kidolgozott eltérő szelekciós célokra vezethető vissza.

A TG polimorfizmus esetében a várt és a számított genotípus-frekvenciák közt nem volt szignifikáns különbség. A kiszámított χ^2 érték 0,347 volt, ami a populáción belül a Hardy-Weinberg egyensúly fennállását jelezte.

A 3. Táblázatban a várt és a számított TG genotípusok megoszlását mutatjuk be a vizsgált húsmarha populációkban:

3. Táblázat

CC	TC	TT	χ^2	p
66.6 % (65.6 %)	28.3 % (30.8 %)	5.0 % (3.6 %)	0.347	0.841

Zárójelben a várt értékeket közöljük (df=2)

A 4. Táblázatban a TG genotípusok hatását mutatjuk be a rostélyos (m. longissimus dorsi) faggyútartalmára a vizsgált húsmarha populációkban

4. Táblázat

TG genotípusok (n=90)	LSM±SE
	A m. longissimus dorsi faggyútartalma (%)
CC (n=59)	11.723±0.777a
TC (n=26)	14.345±1.000b
TT (n=5)	17.040±2.102b

a-b oszlopon belül a különböző betűvel jelzett értékek ($P \leq 0,05$) valószínűségi szinten különböznek

A rostélyos zsírtartalmát a fajtajelleg szignifikánsan meghatározta ($p=0,024$) A TG genotípus által okozott becsült variancia értékek a következők voltak: 1,8% (vörös angus), 0,1% (charolais), 22% (limousin), 19,5 % (magyartarka). A TT genotípusú állatok rostélyosának zsírtartalma volt a legmagasabb, a heterozigóta genotípus alacsonyabb és a homozigóta CC genotípus a legalacsonyabb értékekkel rendelkezett. A CC genotípuscsoport és a TC ill. a TT genotípust hordozó állatok eredményei között szignifikáns ($p<0,05$) különbséget tapasztaltunk. A bemutatott zsírszázalékok jóval magasabbak a Thaller és mtsai (2003) által német holstein-fríz és charolais fajtákban tapasztalt értékeknél. A kísérletben szereplő -viszonylag alacsony- állatlétszám nem teszi lehetővé, hogy a TG gén intramuszkuláris zsírtartalomra gyakorolt hatását illetően végső konklúzió születhessen, azonban egy, nagyobb állatlétszámmal végrehajtott kísérlet is nagy valószínűséggel hasonló eredményekhez vezetne.

A kutatási téma további lehetséges irányai, az eredmények felhasználásának, hasznosításának lehetőségei

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a DGAT1 gén esetében, magyar holstein-fríz fajtában a 305 napos tej-, zsír- és fehérjehozam a GC homozigóta teheneknél volt a legmagasabb. A TG gén tekintetében -húsmarha fajtákban- a TT genotípusú állatok rostélyosának zsírtartalma volt a legmagasabb, lényegesen meghaladta a másik két csoport eredményét. Vizsgálataink során tehát nyilvánvalóvá vált, hogy magasabb tejhozam elérésének céljából előnyös a GC allélra szelektálni, az intramuszkuláris faggyútartalom növelése érdekében pedig előnyös a T allélt választani, így jelentős gazdasági haszon érhető el. Az eredmények ismeretében mindenképpen indokoltnak tartjuk a vizsgálatok elvégzését más, hazánkban tenyésztett szarvasmarha fajta esetében is.

A kutatás eddigi eredményeinek publikálása folyamatban van, közleményünk jelenleg elbírálás alatt áll a Journal of Animal Breeding and Genetics c. folyóiratban.

Felhasznált irodalom

- Anton, I., Kovács, K., Fésüs, L., Várhegyi, J., Lehel, L., Hajda, Z., Polgár, J. P., Szabó, F. and Zsolnai, A. (2008) Effect of DGAT1 and TG gene polymorphisms on the intramuscular fat and milk production traits in different cattle breeds in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 56(2), 181-186.
- Barendse, W.J. (1999) Assessing lipid metabolism. Patent. International publication Number: WO 99/23248. World International Property Organization.
- Bennewitz, J., Reinsch, N., Paul, S., Looft, C., Kaupe, B., Weimann, C., Erhardt, G., Thaller, G., Kühn, C., Schwerin, M., Thomsen, H., Reinhardt, F., Reents, R., Kalm, E. (2004): The DGAT1 mutation is not solely responsible for the milk production Quantitative Trait Locus on the bovine chromosome 14. *J. Anim Science* 87: 431-442.
- Coppieters, W., Riquet, J., Arranz, J., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Nezer, C., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Georges, M. (1998): A QTL with major effect on milk yield and composition maps to the bovine chromosome 14. *Mamm. Genome* 9: 540-544.

- Farnir, F., Coppieters, W., Arrantz, J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Mni, M. (2000): Extensive genome-wide LD in cattle. *Genome Res.* 10: 220-227.
- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M., Snell, R. (2002): Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research* 12, 222-231.
- Kühn, C., Thaller, G., Winter, A., Bininda-Emonds, O. R. P., Kaupe, B., Erhardt, G., Bennewitz, J., Schwerin, M. and Fries, R. (2004): Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in Cattle. *Genetics* 167: 1873-1881.
- Moore, S., Li, C., Basarab, J., Snelling, W., Kneeland, J., Murdoch, B., Hansen, C., Benkel, B. (2003): Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos Taurus*. *J. Anim. Science*, 81: 1919-1925.
- Riquet, J., Coppieters, W., Cambisano, N., Arrantz, J., Berzi, P., Davis, B., Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Mni, M., Simon, P., Taylor, J., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Womack, J., Georges, M. (1999): Identity by descent fine mapping of QTL in outbreed populations: Application to milk production in dairy cattle. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 9252-9257.
- Sanders, K., Bennewitz, J., Reinsch, N., Thaller, G., Prinzenberg, E-M., Kühn, C., Kalm, E. (2006): Characterization of the DGAT1 Mutations and the CSN1S1 Promoter in the German Angeln Dairy Cattle Population. *J. Dairy Sci.* 89: 3164-3174.
- Soxhlet, F. (1879): Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Polytechnisches J. (Dingler's)*, 232, 461-465.
- Spelman, R., Ford, C., McElhinney P., Gregory, G., Snell, R. (2002): Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *J. Anim. Science*, 85: 3514-3517.
- Strzalkowska, N., Siadkowska, E., Sloniewski, K., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, L. (2005): Effect of the DGAT1 gene polymorphism on milk production traits in Black-and-White (Friesian) cows. *Animal Science Papers and Reports*, vol. 23, 3:189-197.
- Thaller, G., Kramer, W., Winter, A., Kaupe, B., Erhardt, G., Fries, R. (2003): Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *J. Anim. Sci.* 81:1911-1918.
- Thaller, G., Kühn, C., Winter, A., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., Zühlke, H., Fries, R. (2003): DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, 34: 354-357.

Winter, A., Kramer, W., Werner, F., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J., Thaller, G., Fries, R.(2002): Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-Co A: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. Proc.of the Nat. Acad.of Science of the USA 99, 9300-5.