



## Büyüme Hormonu Geni Polimorfizminin Buzağı Doğum Ağırlığı Üzerine Etkisi<sup>#</sup>

Zeynep Sönmez<sup>1</sup>, Memiş Özdemir<sup>1</sup>, Vecihi Aksakal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, 25240 Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup>Gümüşhane Üniversitesi, Kelkit Aydın Doğan M.Y.O, 29600 Kelkit/Gümüşhane, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

<sup>#</sup>27-29 Eylül 2017'de Bayburt / Türkiye'de düzenlenen '1<sup>st</sup> International Organic Agriculture and Biodiversity' kongresinde özet olarak sunulmuştur.

#### Araştırma Makalesi

Geliş 25 Ekim 2017

Kabul 26 Kasım 2017

#### Anahtar Kelimeler:

Sığır büyüme hormonu

Polimorfizm

Doğum ağırlığı

Buzağı

PCR-RFLP

\*Sorumlu Yazar:

E-mail: ozdemirm@atauni.edu.tr

### Ö Z E T

Bu çalışmada amaç, PCR-RFLP metodu kullanılarak elde edilen Sığır Büyüme Hormonu (bGH) geni genotipik yapıları ile 94 baş Holstein Buzağının doğum ağırlığı arasındaki ilişkileri incelemek, sürüye ait genotip ve allel frekansları dağılımını belirleyerek, genetik varyasyonu ortaya koymaktır. Çalışmada, buzağı doğum ağırlığı üzerine bGH geni LL genotipi 41,9 kg, LV 40,8 kg ve VV genotipi ise 42,4 kg olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen genotipik yapılar ile buzağuların doğum ağırlığı özelliği arasındaki ilişkiler istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Buzağı popülasyonunun bGH geni bakımından Hardy-Weinberg genetik denge testine göre dengede olmadığı görülmüştür.

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 5(13): 1781-1784, 2017

### Effect of Growth Hormone Genetic Polymorphism on Calf Birth Weight

### ARTICLE INFO

#### Research Article

Received 25 October 2017

Accepted 26 November 2017

#### Keywords:

Bovine growth hormone

Polymorphism

Birth weight

Calf

PCR-RFLP

\*Corresponding Author:

E-mail: ozdemirm@atauni.edu.tr

### ABSTRACT

The aim of study were to present relationships between birth weight of 94 Holstein calves with genotype structures of each sample's Growth Hormone (GH) determined through PCR-RFLP method and to detect the population's genetic variation by determining the genotype and allel frequency distribution. In the study, according to the analysis result, it was determined that Growth Hormone gene LL genotype was 41.9 kg, LL was 40.8 kg, and VV was 42.2 kg for the birth weight. A significant relationship between birth weight with GH genotypes could not be found. It was seen that the calf population is not stable according to Hardy-Weinberg genetic balance test.

## Giriş

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde, değişen ekonomik koşullar ve giderek artan küreselleşme hızına karşı, tüm dünyada insanların ihtiyaçlarını karşılayabilecek verim özellikleri yönünden çok yönlü ve daha verimli ırklar elde etme amaçlanmaktadır. Çiftlik hayvanlarında verimi etkileyen genetik yapıyı tanımlamada kullanılabilen popülasyonların belirlenebilmesi ve tanımlanmasında, ıslah programlarında kantitatif verim özellikleri kullanılarak ıslah programına alınacak hayvanın belirlenmesinde büyük kolaylıklar sağlayan moleküler düzeyde markırlar kullanılmakta ve tanımlanmaktadır. Markır Destekli Seleksiyon (MAS; Marker Assisted Selection) olarak adlandırılan bu sistemde, çeşitli yetiştirme programlarında kullanılmak üzere farklı moleküler markırlar ve her bir markırın moleküler düzeyde tanımlanmasını sağlayan çeşitli moleküler genetik yöntemler geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam etmektedir. Bu amaçlar doğrultusunda tek genle kalıtılan monojenik karakterleri belirlemek amacıyla linkaj haritaları, çevre ve genlerin ortak tesiri altında kalıtılan çoklu fenotipleri belirlemek amacıyla QTL (Quantitative Trait Locus; Kantitatif Özellik Lokusu) haritaları oluşturulmaktadır (Wang, 2012). Ortak genetik varyantlara sahip çok sayıdaki bireyler ile bu bireylerin kantitatif özellikleri arasındaki ilişkiyi inceleyen GWAS (Genome-wide association studies; Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları) sistemi (Höglund ve ark., 2014), organizmaların genomlarının sekanslanması ve kapsamlı SNP (Single Nucleotide Polymorphism; tek nükleotid polimorfizmleri) verilerinin oluşturulması gibi genotipleme teknolojilerinin ilerlemesi ile tüm genomda genetik ilişkilendirme haritalarının yapılması mümkün olmuş (Klein ve ark., 2005) ve böylece birçok kompleks özelliğin genetiği ile ilgili çalışmaların yapılmasına olanak sağlanmıştır.

Sığır büyüme hormonu (bGH) ön hipofiz bezinde üretilen 22 kDa ağırlığında tek zincirli bir polipeptid hormondur ve 191 amino asitten oluşur. bGH geni in-situ hibridizasyon yöntemi ile sığırlarda 19. kromozom üzerinde tanımlanmış, 5 ekzon ve 4 introndan oluşan yaklaşık 1793 bp uzunluğunda olduğu bildirilmiştir (Fries ve ark. 1993; NCBI, 2017). Günümüzde bGH polimorfizm çalışmaları 5. ekzon üzerinde bulunan 2141. baz (g.2141C>G) pozisyonunda C-G transversiyonu sonucu oluşan L (lösin 127. kodon) ve V (valin 127. kodon) allel polimorfizmine (GenBank accession No. M57764) dayanmakta olup (Zhang ve ark., 1992), ilgili bölge baz farklılığı, AluI (GH-AluI) restriksiyon enzimi tanıma bölgesine rastladığından, PCR-RFLP yöntemi ile kolaylıkla belirlenebilmektedir.

bGH hormonunun meme gelişimi, laktasyon, yaşlanma, büyüme ve metabolizmayı düzenleme, dişi bireylerde ovulasyonu ve seksüel davranışları kontrol etme gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Bauman 1992; Cecim ve ark., 1995; Ge ve ark., 2003). Bu nedenle GH geni çiftlik hayvanlarında süt üretimi, büyüme regülasyonu, karkas ve immun sistemi ile ilgili genetik markör olarak kullanılması için iyi bir aday gen olarak düşünülmektedir (Yao ve ark., 1996; Ge ve ark., 2003).

GH genindeki polimorfizmlerin sığırlarda farklı verim özellikleri ile; süt verimi ve kalitesiyle (Sabour ve ark., 1997; Lagziel ve ark., 1999; Dybus, 2002; Pal ve ark., 2005; Kovacs ve ark., 2006; Zhou ve ark., 2006), büyümeyle (Falaki ve ark., 1996; Unanian ve ark., 2000) ve karkas kompozisyonu ve kalitesiyle (Schlee ve ark., 1994, Taylor ve ark., 1998; Lagziel ve ark., 1999; Grochowska ve ark., 2001) ilişkili olduğu bildirilmiştir. GH, doğum sonrası büyüme ve genel metabolizmanın yanı sıra laktasyonda önemli rol oynadığı için önemlidir (Fedota ve ark., 2014). Mevcut bilgiler, besin kullanımında (Bauman, 1992), meme gelişiminde ve büyümede (Bass ve ark., 1991; Paputungan ve ark., 2015) Büyüme Hormonu'nun çok önemli bir güce sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada amaç, Gümüşhane Kelkit ilçesinde Organik Yetiştirilen Holstein buzağuların Büyüme Hormonu geni polimorfizmini tespit etmek ve tespit edilen genotipler ile doğum ağırlığı verileri arasındaki ilişkileri araştırmaktır.

## Materyal ve Yöntem

Araştırmada, Gümüşhane ili Kelkit ilçesinde faaliyet gösteren Doğan Organik Ürünler A.Ş. işletmesinden aynı yıl ve mevsimde doğan 94 Holstein buzağularına ait bireysel kan örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Genomik DNA, ticari DNA izolasyon kiti (Purgene DNA kiti, Genra Systems, Minnesota, USA) ile elde edilmiştir. Elde edilen DNA'ların kantitatif ve kantitatif kontrolleri Nanodrop (Drop Plate, Cat. No: 12391) spektrofotometri cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

PCR aşamasında, büyüme hormonu (bGH)-AluI için, F: 5'- GTA GGG GAG GGT GGA AAA TG -3 ve R:5' TGA CCCTCA GGT ACG TCT CC -3, primerleri kullanılarak 245-bp'lik DNA bölgesi çoğaltılmıştır. bGH-AluI PCR amplifikasyonu için toplam hacim 30 µl'ye tamamlanacak şekilde her bir primerden ve dNTPmix'ten (D7595: Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 µl, 0.5 ünite Taq DNA polimeraz (D1806: Sigma), 100-200 ng kalıp DNA, 3 µl 10x PCR Buffer (Cat. No: P2192), 1 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> ve ddH<sub>2</sub>O kullanılmıştır. PCR amplifikasyon koşulları; 94°C'de 5dk. 94°C 50s ve 58°C 50s 30 döngü, son uzama sıcaklığı 72°C'de 5 dk ve 1 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır.

Amplifikasyonu gerçekleşen bGH geni her bir 7µl'lik PCR ürününe 2-5 U AluI restriksiyon enzimi eklenerek 37°C'de 12 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon işleminden sonra örnekler %3,0 agaroz jelde 45 Voltta 2,5 saat yürütülerek UV ışığı altında bantlar gözlenmiştir. Her bir buzağıya ait bGH allel gen frekansları sayılarak hesaplanmıştır. Genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı Ki-kare ( $\chi^2$ ) testiyle incelenmiştir. Popülasyona ait doğum ağırlığı verileri ile genotiplerin ilişkilendirilmesi, SPSS 20.0 software programı kullanılarak varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Buzağulara ait bGH genotiplerinin doğum ağırlığı üzerine etkisinin test edilmesinde aşağıda belirtilen matematiksel model kullanılmıştır.

Model:  $Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$  ( $\mu$ : beklenen ortalama,  $a_i$ : i.

genotipin etkisi,  $e_{ij}$ : şansa bağlı hata)

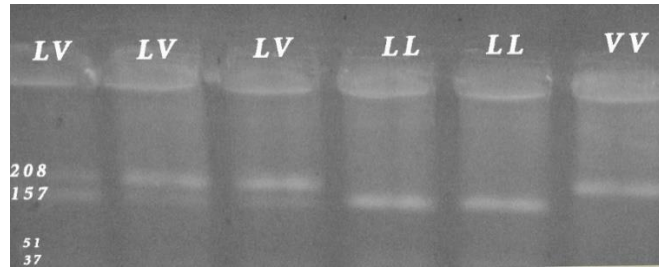
### Bulgular ve Tartışma

bGH geni için toplam 245 bp uzunluğundaki her bir PCR ürünü, AluI restriksiyon enzimi ile kesilerek bant sayılarına göre genotiplendirilmiştir. VV genotipi 208 ve 37 bp, LL genotipi 157, 51 ve 37 bp ve heterozigot LV genotipi 208, 157, 51 ve 37 bp bantlarına göre genotiplendirilmiştir (Şekil 1).

Tablo 1'de görüldüğü gibi, Buzağuların bGH gen bölgesi LL genotipi frekansı 0,59, LV frekansı 0,29 ve VV genotip frekansı 0,12 olarak tespit edilmiştir. Hardy-Weinberg genetik denge testine göre tespit edilen bu genotip frekanslarının dengede olmadığı gözlenmiştir ( $P < 0,05$ ). Sürünün bGH geni polimorfizmi bakımından dengede olmamasının nedeni yapılan örneklemeden veya sürünün henüz yeni bir sürü olmasından kaynaklanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

bGH allel gen frekanslarına bakıldığında, L allel gen frekansının 0,74 ve V allel gen frekansının ise 0,26 olduğu gözlenmiştir. Literatürlere bakıldığında genellikle L allel gen frekansının yüksek olduğu ve bulgularımızla uyum içinde olduğu gözlenmiştir (Dybus ve ark., 2003; Mattos ve ark., 2004; Pal ve ark., 2005; Zhou ve ark., 2006; Kovacs ve ark., 2006; Özdemir 2011; Özdemir, 2015; Echeverri ve ark., 2015; Fontanesi ve ark., 2015).

Buzağı bGH genotipik yapıları ile buzağulara ait doğum ağırlığı verileri arasındaki ilişkileri test etmek amacıyla yapılan Varyans analizi sonucuna göre istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olmadığı görülmüştür ( $P > 0,05$ ). Buzağı bGH geni genotiplerine ait doğum ağırlığı verileri Tablo 2'de sunulmuştur.



Şekil 1 GH geni/AluI polimorfizmine ait genotipler

Tablo 1 Buzağulara ait bGH gen ve genotip frekansları ile H-W Genetik denge test sonuçları

Genotipler	N	Genotip Frekansı	X <sup>2</sup> değeri	Gen Frekansı (%)	
LL	56	0,59	6,1*	L	V
LV	27	0,29			
VV	11	0,12		74	26
Genel	94	1,0			

\* $P < 0,05$

Tablo 2 Buzağuların bGH geni genotiplerine ait doğum ağırlığı verileri

Genotip	N	Ortalama (kg)	Std. Sapma	% 95 Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
LL	56	41,9	2,92	41,16	42,73
LV	27	40,8	2,52	39,78	41,77
VV	11	42,4	2,16	40,91	43,81
Toplam	94	41,7	2,77	41,09	42,23

Buzağı popülasyonuna ait LL, LV ve VV genotiplerinin doğum ağırlık ortalamaları sırasıyla 41,9 kg, 40,8 kg ve 42,4 kg olarak bulunmuştur. Tespit edilen bu ortalama doğum ağırlığı değerleri ile Büyüme Hormonu genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ( $P > 0,05$ ). Ancak, farklı ırklar üzerinde bGH gen polimorfizminin verimle ilişkilendirmeleri yapılmış olan çalışmalarda L allele sahip bireylerin doğum ağırlıkları arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir (Fedota ve ark., 2014). Buzağı büyüme hormonu polimorfizmi ile buzağı ağırlıkları arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla, Japon Siyah ırkı buzağular üzerinde SSCP ve PCR-RFLP yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmada, bGH üzerinde tespit edilen iki polimorfik bölgenin (g.2141C>G ve

g.2277C>T) genotipleri ile buzağı doğum ağırlığı ve 30. Gün ağırlıkları arasında anlamlı ilişkiler olduğu bildirilirken, 60. gün ağırlıkları ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin bulunamadığı bildirilmiştir (Ishida ve ark., 2010).

Sonuç olarak, bölgede mevcut organik yetiştirilen Holstein buzağı popülasyonunda Büyüme Hormonu gen polimorfizmi ortaya konulmuş ve ilgili genotiplerin Doğum ağırlığı verileri ile ilişkileri araştırılmıştır. Buzağı popülasyonuna ait performans verileri üzerine yapılan ilişkilendirme analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, sonraki yapılacak araştırmalarda, daha büyük sürüler üzerinde bGH geni polimorfik yapıları ile hayvanların çeşitli verim yönleri arasındaki ilişkiler araştırılmalı ve

hayvan ıslahı amacıyla kullanılabilirlikleri incelenmelidir.

## Teşekkür

Bu çalışma Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP Proje no: 15.B0323.02.01) Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. Desteklerini esirgemeyen BAP çalışanlarına teşekkürlerimizi sunarız.

## Kaynaklar

- NCBI. 2017 ‘‘https://www.ncbi.nlm.nih.gov’’. The National Center for Biotechnology Information
- Bass JJ, Oldham JM, Hodgkinson SC, Fowke PJ, Sauerwein H, Molan P, Breier BH, Gluckman PD. 1991. Influence of nutrition and bovine growth hormone (GH) on hepatic GH binding, insulin-like growth factor-I and growth of lambs. *J. Endocrinol*, 128(2):181-186.
- Bauman DE. 1992. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. *J Dairy Sci*. 75(12): 3432-51.
- Cecim M, Kerr J, Bartke A. 1995. Effects of bovine growth hormone (bGH) transgene expression or bGH treatment on reproductive functions in female mice. *Biology of Reproduction* 52: 1144-1148.
- Dybus A. 2002. Associations between Leu/Val polymorphism of growth hormone gene and milk production traits in Black-and-White cattle. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 45(5): 421-428.
- Dybus A, Kmiec M, Sobek Z, Wisniewski B. 2003. Associations between polymorphism of the growth hormone gene and production traits of Limousine cattle. *Medycyna Weterynaryjna*, 59(2): 133-136, Abstr.
- Echeverri J, Saldamando CI, Herrera AL. 2015. Genetic structure analysis of a Holstein cow population in Colombia. *Rev Colomb Cienc Pec*; 28: 54-63.
- Falaki M, Gengler N, Sneyers M, Prandi A, Massart S, Formigoni A, Burny, A, Portetelle D, Renaville R., 1996. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.*79(8):1446-1453.
- Fedota OM, Ruban S, Yu Lysenko NG, Kolisnyk AI, Goraichuk IV, Tyzhnenko TV.,2016. SNP L127V of Growth Hormone Gene In Breeding Herd of Aberdeen Angus In Kharkiv Region, Eastern Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety* 2(3): uDC 575.113.1:636.223.1(477.54).
- Fontanesi L, Scotti E, Samore AB, Bagnato A, Russo V. 2015. Association of 20 candidate gene markers with milk production and composition traits in sires of Reggiana breed, a local dairy cattle population. *Livestock Science*, 176: 14-21.
- Fries R, Egen A, Womack JE. 1993. The bovine genome map. *Mammalian Genome*. 4:405.
- Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen CM. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.*, 81: 641–648.
- Grochowska R, Lunden A, Zwierzchowski L, Snochowski M, Oprzadek J. 2001. Association between gene polymorphism of growth hormone and carcass traits in dairy bulls. *Anim. Sci.* 72: 441-447.
- Höglund JK, Sahana G, Brondum RF, Guldbandsen B, Buitenhuis B, Lund MS. 2014. Fine mapping QTL for female fertility on BTA04 and BTA13 in dairy cattle using HD-SNP and sequence data. *BMC Genomics*, 15:790. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/790>.
- Ishida T, Umabayashi A, Tsuruta S, Akashi R, Harada H. 2010. Polymorphisms in growth hormone gene and their associations with calf weight in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 81: 623–629.
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C. 2005. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science*, 308 (5720): 385-389. Doi:10.1126/science.1109557.
- Kovacs K, Volgyi-Csik J, Zsolnai A, Gyorkos I, Fesus L. 2006. Associations between the AluI polymorphism of growth hormone gene and production and reproduction traits in a Hungarian Holstein-Friesian bull dam population. *Archiv für Tierzucht*, 49: 236–249.
- Lagziel A, Lipkin E, Ezra E, Soller M, Weller JI. 1999. An MspI polymorphism at the bovine growth hormone (bGH) gene is linked to a locus affecting milk protein percentage. *Animal Genetics*, 30: 296-299.
- Mattos KK, Del-Lama SN, Martinez ML, Freitas F. 2004. Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls. *Pesq. Agropec. Bras*, 39(2): 147-150.
- Özdemir M. 2011. Determination of allele frequencies of growth hormone AluI polymorphism in Brown Swiss, Holstein, native East Anatolian Red and Turkish Grey breeds. *International Journal of Dairy Technology*. 64(3):350–352.
- Özdemir M, Sönmez Z, Topal M. 2015. Organik yetiştirilen Holstein Irkında bGH/Alu I ve CSN3/Hinf I Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi. 9. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, P838-847, 3-5 Eylül 2015, Konya.
- Pal A, Chakravarty AK, Bhattacharya TK, Sharma A. 2005. Polymorphism of growth hormone gene and its association with expected milk production traits in dairy bulls. *J. Appl. Anim. Res.* 27(1): 29-33.
- Paputungan U, Hakim L, Ciptadi G, Lopian HFN. 2015. Heritabilities Of Body Size By Growth Hormone (GH-Msp1) Genotypes Using PCR-RFLP In Ongole Grade Cattle. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 40(3):138-144.
- Sabour MP, Lin CY, Smith C. 1997. Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 114: 435-442.
- Schlee P, Graml R, Schallenger E, Schams D, Rottmann O, Olbrich BA, Pirchner F. 1994. Growth hormone and insulin like growth factor I: concentration in bulls of various growth hormone genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 497-500.
- Taylor JF, Coutinho LL, Herring KL, Gallagher JDS, Brenneman RA, Burney N, Sanders JO, Turner JW, Smith SB, Miller RK, Savell JW, Davis SK. 1998. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Anim. Genet.* 29: 194-201.
- Unanian MM, Barreto CC, Freitas AR, Cordeiro CMT, Josahkian LA. 2000. Association of growth hormone gene polymorphisms with weight traits in Nelore breed.. *Rev. Bras. Zootec.* 29:1380-1386.
- Wang X. 2012. Identification and Characterization of Candidate Genes for Complex Traits in Cattle. PhD thesis, Chair of Animal Breeding, Technische Universität München.
- Yao J, Aggrey SE, Zadworny D, Hayes JF, Kuhnlein U. 1996. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics*. 144: 1809-1816.
- Zhang HM, Brown DR, Denise SK, Ax RL. 1992. Nucleotide sequence determination of a bovine somatotropin allele. *Animal Genetics* 23 (6): 578.
- Zho G., Zhu Q, Jin HG, Guo SL. 2006. Genetic variation of growth hormone gene and its relationship with milk production traits in China Holstein cows. *Asian-Australasian J. of Anim. Sci.* 19(3): 315-318.