

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE LEPTIN GENE POLYMORPHISM AND REPRODUCTION INDICES IN POLISH COLD BLOOD MARES

ZWIĄZEK POLIMORFIZMU GENU LEPTYNY ZE WSKAŹNIKAMI ROZRODU KLACZY RASY POLSKI KOŃ ZIMNOKRWISTY

Marta BOHACZYK^{1*}, Ewa WIŚNIEWSKA, Sławomir MROCZKOWSKI

¹University of Technology and Life Sciences, Bydgoszcz, Faculty of Animal Breeding and Biology, Department of Genetics and General Animal Breeding, Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz, Poland, bohaczyk@utp.edu.pl

ABSTRACT

The objective of the research was to analyze the relationship between leptin genotypes and reproduction indices in cold blood mares. The statistical analysis was conducted on 65 mares from a stud farm in Nowe Jankowice. Based on reproductive outcomes we calculated basic reproduction indices. The leptin polymorphism was determined using the PCR-RFLP method. In the examined population, A and B allele frequencies were identical (0.50). Three genotypic forms of the leptin gene were found to occur: AB, AA, and BB. The most frequently noted form was heterozygotic AB (frequency of 0.47), whereas homozygotic AA and BB occurred with equal frequency of 0.26. The most favourable results for the majority of the other reproduction indices were observed in the AB heterozygotic mare group, whereas the least favourable in the AA mares. The said differences were not statistically significant. No significant effect of the leptin genotype on the reproduction traits in mares was found.

The research was funded as part of the “Doctor’s Dissertation Grants 2008/2009 – ZPORR” – ZPORR activity 2.6, project Z/2.04/II/2.6/20/09

KEYWORDS: cold blood horses, reproduction traits, leptin gene

STRESZCZENIE

Celem badań była analiza zależności pomiędzy genotypami leptyny a wskaźnikami rozplodu klaczy zimnokrwistych. Analizę statystyczną wykonano na 65 klaczach pochodzących ze Stadniny Koni Nowe Jankowice. Na podstawie wyników rozrodu obliczono podstawowe wskaźniki rozplodowe. Polimorfizm leptyny określono metodą PCR-RFLP. W badanej populacji frekwencja alleli A i B była jednakowa (0,50). Zaobserwowano występowanie trzech form genotypowych leptyny: AB, AA i BB. Najczęściej identyfikowano formę heterozygotyczną AB (frekwencja 0,47), formy

homozygotyczne AA i BB występowały jednakowo często (0,26). Najkorzystniejszy poziom większości pozostałych wskaźników rozplodowych obserwowano w grupie klaczy heterozygotycznych AB, najmniej korzystny stwierdzono u klaczy AA. Wymienione różnice nie były statystycznie istotne. Nie stwierdzono istotnego wpływu genotypu leptyny na poziom cech rozplodowych klaczy.

Badania finansowane były w ramach projektu „Stypendia dla doktorantów 2008/2009 – ZPORR” – działania 2.6 ZPORR, nr projektu Z/2.04/II/2.6/20/09

SŁOWA KLUCZOWE: konie zimnokrwiste, cechy rozplodowe, gen leptyny

STRESZCZENIE SZCZEGÓŁOWE

Podjęto badania nad poziomem zależności między polimorfizmem genu leptyny a poziomem wskaźników rozplodu klaczy zimnokrwistych.

Badaniami objęto 65 klaczy rasy polski koń zimnokrwisty utrzymywanych w Stadninie Koni Nowe Jankowice, w tym 40 klaczy wieloródek (mających w karierze hodowlanej co najmniej 3 sezony rozrodzce) i 25 klaczy pierwiastek. Na podstawie udostępnionych przez Stadninę danych dotyczących rozplodu określono dla badanych klaczy wiek pierwszego zażrebiecia oraz wiek pierwszego wyżrebiecia, określono średnią długość ciąży, średnią długość okresu międzywyżrebieciowego oraz średnią długość okresu międzyciążowego. Oszacowano też poziom wskaźników rozplodowych: wskaźnika żrebnosci, wskaźnika płodności, wskaźnika poronień, wskaźnika martwych urodzeń, wskaźnika resorpcji, wskaźnika strat ciąży, wskaźnika jałowien. Obliczono podstawowe miary położenia i zmienności cech rozplodowych – średnią arytmetyczną (\bar{x}) oraz błąd standardowy (SE) oraz wykorzystano oszacowane wskaźniki do oceny wartości cech rozplodowych klaczy w zależności genotypu leptyny. Źródło kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) stanowiła pełna krew obwodowa pobrana z żyły jarzmowej. Oznaczanie genotypów leptyny przeprowadzono w oparciu o metodę PCR-RFLP. Dane liczbowe opracowano statystycznie, obliczając frekwencję poszczególnych genów i genotypów w badanej populacji. Zależności między genotypami leptyny a wskaźnikiem płodności oraz średnią długością ciąży oszacowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Dla pozostałych cech (nie wykazujących rozkładu normalnego) zastosowano test χ^2 . Obliczenia wykonano w pakiecie statystycznym Statistica 8.0.

Nie wykazano statystycznie istotnego wpływu genotypu leptyny na poziom żadnej z badanych cech rozplodowych. Najkorzystniejszy poziom większości wskaźników rozplodu obserwowano u klaczy o genotypie AB leptyny – charakteryzowały się one najwyższym wskaźnikiem płodności (82,35%) oraz najniższym poziomem wskaźników martwych urodzeń (5,20%), resorpcji (2,50%) i strat ciąży (9,50%) w porównaniu z klaczami o genotypach homozygotycznych AA i BB. Klacze o genotypie AA cechowały się najwyższą żrebnoscią (98,50%) oraz najniższym poziomem wskaźnika jałowien (1,63%). Najniższy poziom większości wymienionych wskaźników rozrodu stwierdzono natomiast dla klaczy homozygotycznych AA.

Wszystkie wymienione różnice nie były jednak statystycznie istotne. Uzyskane wyniki ze względu na liczebność analizowanej populacji należy traktować jako wstępne, wymagające potwierdzenia na większym materiale.

INTRODUCTION

Among the farm livestock, the reproduction performance of horses is relatively low, and therefore the costs of breeding are considerable in their case. Despite an increasing level of husbandry and veterinary care, every year the number of mares becoming sterile is higher, foaling indices and the number of reared foals decrease, due chiefly to miscarriages, still births, and perinatal mortality. Apart from negligence in attending animals, poor organization of the reproduction season, and infection-related causes of low foaling, a considerable part in this is played by unfavourable hereditary changes in the genotype – mutations of chromosomes as well as single genes. Improvement of reproduction indices for mares leads to considerable cost reductions, therefore it is vital to determine which factors influence these indices [5, 6]. One of the protein factors which may significantly influence reproduction results in females is leptin [3, 4, 7]. It is a protein composed of 146 amino acids, which are the product of the so called obesity gene (Ob). Its receptors were identified at all points along the pituitary-gonadal axis in people and in mice, proving its participation in regulation of reproduction processes. Among other things, leptin has an effect on energy balance [3], which is a key factor both in the process of achieving sexual maturity as well as in regulating reproduction functions in adult animals [7]. The objective of this research was to examine the relationship between the leptin genotype and the reproduction indices in Polish cold blood mares from the stud farm in Nowe Jankowice.

MATERIAL AND METHODS

The research was based on 65 Polish cold blood mares maintained at the stud farm in Nowe Jankowice, including 40 multiparas (which had completed at least 3 reproduction seasons) and 25 primiparas. Based on the data concerning reproduction, made available by the stud farm [9] we were able to determine the age at which examined mares were foaled for the first time and had their first foaling, as well as the mean pregnancy duration, mean period between foalings, and mean period between pregnancies. Furthermore, we estimated reproduction indices: foal index, reproduction index, miscarriage index, still birth index, resorption index, pregnancy loss index, sterile index. We calculated the basic location and variability measures of reproduction traits – arithmetic mean (\bar{x}) and standard error (SE), and used the estimated indices to assess the values of reproduction traits in mares, depending on the leptin genotype. The source for the deoxyribonucleic acid (DNA) was peripheral blood taken from the zygomatic vein. Leptin genotypes were determined based on the PCR-RFLP method. In the PCR reaction two starters were utilized [2], limiting the gene strand with the length of 1700 base pairs (bp), including a partial fragments of exon II and exon III, divided with an intron II. Restriction analysis was conducted by means of the TaqI enzyme, which was digesting the

amplified gene strand, resulting in restriction strands of 961 and 739 pz for the AA genotype, 961, 739, 668, and 293 bp for the AB genotype, and 739, 668, and 293 bp for the BB genotype. Analysed polymorphism site was localised in intron II of leptin gene.

Numerical data were worked out statistically, by calculating the frequency of each gene and genotype in the examined population. The relationships between the leptin genotypes and reproduction indices, and the mean pregnancy duration were estimated by means of the single factor analysis of variance (ANOVA). For the other traits (those without normal distribution) we used the χ^2 . The calculations were made using the Statistica package [8].

RESULTS AND DISCUSSION

Frequencies of allele and leptin gene genotypes observed in the examined horse population are presented in Table 1.

Table 1. Allele and leptin gene genotypes frequencies in the examined population
Tabela 1. Frekwencje alleli oraz genotypów genu leptyny w badanej populacji

Allele Allel	Allele frequency Frekwencja alleli	Genotype Genotyp	Genotype frequency Frekwencja genotypów
A	0.50	AB	0.47
		AA	0.26
B	0.50	BB	0.26

The analysis of variance and the χ^2 test that we carried out did not show any statistically significant effect of the leptin genotype on the level of any of the examined reproduction traits (Table 2).

The results of the reproduction traits analysis are presented in Table 3. In all examined genotypic groups a similar values were found for the mean pregnancy duration, mean period between pregnancies, and mean period between foalings. Whereas differences were observed for the age at which a mare was foaled

Table 2. Effect of LEP genotype on the reproduction indices (respectively: results of ANOVA or χ^2 test)
 Tabela 2. Wpływ genotypu LEP na wskaźniki rozrodu (odpowiednio: wyniki ANOVA lub testu χ^2)

		Reproduction indices / Wskaźniki rozrodu												
Factor Czynnik		Age when foaled first time (days) / Wiek pierwszego zażebienia (dni)	Age at first foaling (days) Wiek pierwszego wyżebienia (dni)	Mean pregnancy duration (days) Średnia długość ciąży (dni)	Mean period between pregnancies (days) Średni okres międzyciążowy (dni)	Mean period between foalings (days) / Średni okres międzywyżebieniowy (dni)	Foal index (%) Wskaźnik żrebności (%)	Fertility index (%) Wskaźnik płodności (%)	Miscarriage index (%) Wskaźnik poronień (%)	Still birth index (%) Wskaźnik martwych urodzeń (%)	Resorption index (%) Wskaźnik resorpcji (%)	Pregnancy loss index (%) Wskaźnik strat ciąż (%)	Sterile index (%) Wskaźnik jałowień (%)	
LEP genotype genotyp LEP	ANOVA ($F_{emp.}$)	-	-	0.037 ^{NS}	-	-	-	0.729 ^{NS}	-	-	-	-	-	
	χ^2 test	1.805 ^{NS}	1.805 ^{NS}	-	1.633 ^{NS}	1.633 ^{NS}	0.000 ^{NS}	-	0.093 ^{NS}	0.502 ^{NS}	1.046 ^{NS}	3.771 ^{NS}	1.975 ^{NS}	

NS – no significant effect / brak istotnego wpływu

for the first time, and consequently the age of the first foaling. It was established that, as compared to the other groups, the first to be effectively mated (1140.82 days) and the first to foal (1473.65 days) were the mares with the AA leptin genotype, although the differences were statistically insignificant. Analyzing the remaining reproduction indices, we established that they were the most favourable in mares with the AB leptin genotype: they were characterized by the highest fertility index (82.35%), and the lowest still birth (5.20%), resorption (2.50%), and pregnancy loss (9.50%) indices, in comparison with the mares with homozygotic AA and AB genotypes. Mares with the AA genotype were characterized by the highest foaling rate (98.50%) and the lowest sterile index (1.63%). The lowest level of the majority of the said reproduction indices was noted for homozygotic AA mares, in which the lowest level of the miscarriage index (1.67%) was indeed observed, but their other basic reproduction indices were at a less favourable level. However, none of the listed differences were statistically significant. The obtained results, due to the number of animals in the analyzed population, are to be treated only as initial, still requiring confirmation based on a larger material.

The leptin polymorphism in mares, including a small population of cold blood mares from the stud farm in Nowe Jankowice, had already been examined by Kęszka [5]. She arrived at a conclusion that the mean pregnancy durations for mares with AB, AA, as well as BB leptin genotypes were all similar. The shortest period between pregnancies and foalings were observed in homozygotic AA mares (88.02 and 416.27 days respectively), the remaining analyzed reproduction indices were usually the most favourable in the mare group with the AB leptin genotype. Nevertheless, as in the authors own research, Kęszka did not find any connection between the leptin genotype and the reproduction indices in stud mares.

Table 3. Mean values for mare reproduction indices depending on the leptin genotype (\pm SE)

Tabela 3. Średnie wartości wskaźników rozrodu klaczy w zależności genotypu leptyny (\pm SE)

Reproduction indices		LEP genotype / Genotyp LEP		
		AB	AA	BB
Wskaźniki rozrodu				
all examined mares, n = 65; wszystkie badane klacze, n = 65				
Age when foaled first time (days)	n	31	17	17
	\bar{x}	1185.10	1140.82	1182.59
Wiek pierwszego zażrebienia (dni)	SE	37.41	28.51	37.43
Age at first foaling (days)	n	31	17	17
	\bar{x}	1518.07	1473.65	1516.65
Wiek pierwszego wyżrebienia (dni)	SE	37.68	29.31	38.22

Mean pregnancy duration (days)	n	20	8	12
	\bar{x}	332.45	332.43	333.50
Średnia długość ciąży (dni)	SE	2.84	2.82	2.92
multiparous, n = 40; wieloródki, n = 40				
Mean period between pregnancies (days)	n	20	8	12
	\bar{x}	109.59	110.27	109.32
Średni okres międzyciążowy (dni)	SE	17.61	48.71	35.01
Mean period between foalings (days)	n	20	8	12
	\bar{x}	441.98	441.60	442.95
Średni okres międzywyżrebieniowy (dni)	SE	18.72	49.97	35.12
Foal index (%)	n	20	8	12
	\bar{x}	91.05	98.50	88.92
Wskaźnik żrebności (%)	SE	2.86	1.50	4.97
Fertility index (%)	n	20	8	12
	\bar{x}	82.35	79.50	74.83
Wskaźnik płodności (%)	SE	3.91	4.87	5.34
Miscarriage index (%)	n	20	8	12
	\bar{x}	1.85	2.50	1.67
Wskaźnik poronień (%)	SE	1.28	2.50	1.67
Still birth index (%)	n	20	8	12
	\bar{x}	5.20	10.00	6.17
Wskaźnik martwych urodzeń (%)	SE	2.19	5.30	3.27
Resorption index (%)	n	20	8	12
	\bar{x}	2.50	6.63	6.25
Wskaźnik resorpcji (%)	SE	1.82	4.51	4.49
Pregnancy loss index (%)	n	20	8	12
	\bar{x}	9.50	19.13	14.08
Wskaźnik strat ciąż (%)	SE	3.22	4.89	5.68
Sterile index (%)	n	20	8	12
	\bar{x}	8.95	1.63	11.17
Wskaźnik jałowień (%)	SE	2.86	1.63	4.97

CONCLUSION

In summing up, there are not significant effect of the leptin genotype on the level of the examined reproduction traits, but aforesaid studies should be continued on larger population of Polish cold blood mares in order to look relationships between a specific polymorphism and horse reproduction traits.

REFERENCES

- [1] Auwerx J., Steals B., Leptin, *Lancet*. (1998) 351: 737-742.
- [2] Borowiec-Chłopek Ż., Pikuła R., Polymorphism of leptin gene (LEP/TaqI) in horses according to their breed and utility type (Brief Report). *Archiv für Tierzucht*. (2008) 51, 3: 295-297.
- [3] Cartmill J. A., Leptin in horses: influences of body condition, gender, insulin insensitivity, feeding, and dexamethasone, A PhD Dissertation, typescript, Louisiana State University. (2004): 2-4.
- [4] Ferreira-Dias G., Claudino F., Carvalho H., Agricola R., Alpoim-Moreira J., Robalo Silva J., Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status, *Domestic Animal Endocrinology*. (2005) 29: 203-213.
- [5] Kęszka A., Próba określenia zależności pomiędzy polimorfizmem w genie leptyny i wybranych białek krwi a wskaźnikami rozrodu klaczy stadnych. Praca doktorska, maszynopis, AR Szczecin (2006).
- [6] Kosiniak-Kamysz K., Wierzbowski S., *Rozród koni*, Kraków (2004).
- [7] Madeja Z., Piasecka A., Lechniak D., Świtoński M., Leptyna – polimorfizm genetyczny i rola w rozrodzie. *Medycyna Weterynaryjna*. (2002), 58(8): 572-576.
- [8] Statsoft ® Polska (2008). STATISTICA 8.0 PL. www.statsoft.pl
- [9] Wykaz wyźrebień oraz wykonania planu pokryć 2000-2008. *Stadnina Koni Nowe Jankowice Sp. z o.o.*