

POLIMORFIZM β -LAKTOGLOBULINY U OWIEC*

Aldona Kawęcka¹, Anna Radko²

¹Instytut Zootechniki — Państwowy Instytut Badawczy, Dział Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich, 32-083 Balice k. Krakowa

²Instytut Zootechniki — Państwowy Instytut Badawczy, Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

Celem pracy było badanie polimorfizmu β -laktoglobuliny metodą PCR-RFLP u użytkowanych mlecznie owiec. Materiał do badań stanowiły próbki krwi uzyskane od macierek polskiej owcy górskiej (34 szt.) i owcy wschodniofryzyskiej (31 szt.). Metoda PCR-RFLP pozwoliła na precyzyjną identyfikację polimorfizmu β -LGB w badanym materiale. W wyniku łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) otrzymywano produkt DNA o wielkości 103 par zasad. Enzym RsaI ciął otrzymany produkt na fragmenty: przy genotypie AA w procesie elektroforezy uzyskano dwa prążki o wielkości 66 i 37 par zasad, przy BB prążek o 103 parach zasad, natomiast u heterozygot obserwowano wszystkie trzy prążki. W obu grupach stwierdzono trzy genotypy β -LGB (AA, AB i BB), a frekwencja ich występowania zróżnicowana była w zależności od rasy. Ponad połowa osobników w populacji owcy górskiej posiadała genotyp AB, natomiast u owcy fryzyskiej występował on u przeszło 60% osobników. W populacji owcy górskiej homozygoty AA i BB występowały z tą samą częstością. Tylko jedna maciorka rasy fryzyskiej charakteryzowała się genotypem BB. Zastosowanie testu χ^2 pozwoliło stwierdzić, że obie populacje owiec znajdowały się, w rozumieniu prawa Hardy-Weinberga, w stanie równowagi genetycznej. Uzyskane wyniki pozwoliły określić rozkład genotypów i alleli w populacji użytkowanej mlecznie owcy górskiej i mlecznej owcy wschodniofryzyskiej. Dalszym etapem przedstawionych badań będzie poszukiwanie zależności między określonymi genotypami a parametrami użyteczności mlecznej. Rozpoznanie polimorfizmu β -laktoglobuliny może poszerzyć wiedzę na temat możliwości wykorzystania genów białek mleka jako potencjalnych markerów cech użyteczności mlecznej u owiec.

β -laktoglobulina (β -LGB) jest głównym białkiem serwatkowym mleka przeżuwaczy, zbudowanym ze 162 aminokwasów. Jej rola biologiczna nie jest do końca poznana; prawdopodobnie uczestniczy ona w transporcie witaminy A i innych niskocząsteczkowych związków. Locus genu β -laktoglobuliny znajduje się u owiec na 3. chromosomie, a jej genetyczny polimorfizm warunkują trzy allele — A, B i C. Dwa pierwsze zidentyfikowano u wszystkich badanych pod tym kątem ras owiec, natomiast allel C tylko u merynosa (Erhardt, 1989).

* Praca wykonana w ramach działalności statutowej IZ-PIB, temat nr 3114.1.

Zagadnienie polimorfizmu białek mleka (β -laktoglobuliny i kazeiny) opisano dość dokładnie u bydła mlecznego. W wielu przypadkach dowiedziono, że genetycznie uwarunkowana różnorodność tych białek związana była z wydajnością mleka i jego składników. Geny białek mleka mogą być zatem rozpatrywane jako markery QTL w zakresie cech mleczności, a tym samym mogą zostać wykorzystane w konstruowaniu programów selekcyjnych.

Badania nad polimorfizmem genetycznym β -laktoglobuliny mleka u owiec prowadzono do tej pory głównie u mlecznych ras, hodowanych w krajach śródziemnomorskich. Wyniki tych badań nie są jednak jednoznaczne. Wielu autorów sugeruje przewagę określonych genotypów lub też brak zależności między nimi a użytkowością mleczną. Garzon i Martinez (1992) stwierdzili, że genotyp *BB* β -*LGB* związany był z wyższą wydajnością mleka, podczas gdy owce o genotypach *AA* i *AB* produkowały mleko o wyższej zawartości białka i kazeiny. Lopez-Galvez i in. (1993), analizując związek między polimorfizmem a przydatnością mleka do produkcji serów, uzyskali wyższą wydajność masy serowej od owiec z genotypem *AA* β -laktoglobuliny. Natomiast Di Stasio i in. (1997) stwierdzili, że z genotypem β -*LGB* *BB* związana była wyższa zawartość białka, a tym samym uzyskanego skrzepu.

W odniesieniu do krajowych ras owiec, wykorzystywanych do produkcji mleka, zagadnienie polimorfizmu pozostaje praktycznie nierozpoznane. Badaniami polimorfizmu β -*LGB* mleka u merynosa polskiego i jego mieszańców z rasami plennymi zajmowali się m.in. Piwczyński i in. (2002) oraz Mroczkowski i in. (2004), którzy również stwierdzili zróżnicowanie cech użytkowości mlecznej w zależności od genotypu β -*LGB*.

Celem pracy było badanie polimorfizmu β -*LGB* metodą PCR-RFLP u użytkowanych mlecznie ras: polskiej owcy górskiej (POG) i owcy wschodniofryzjskiej (FR).

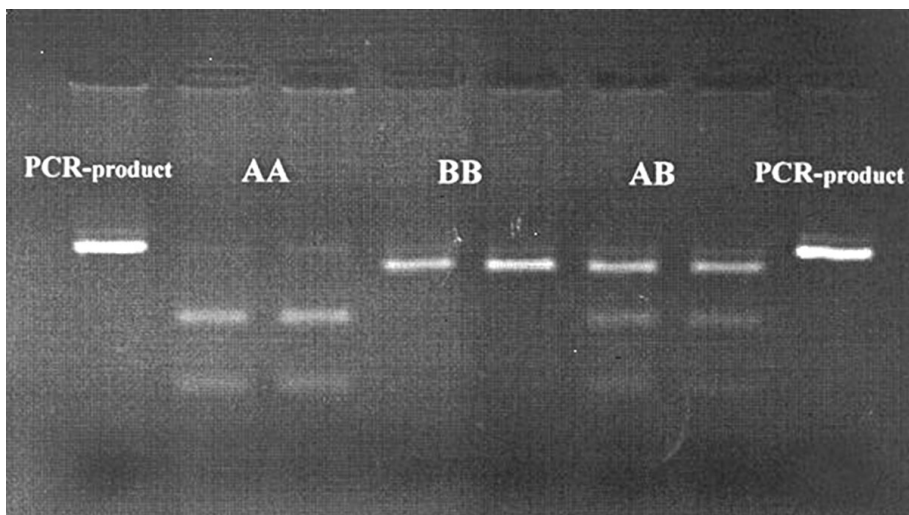
Material i metody

Material do badań stanowiły próbki krwi uzyskane od owiec rasy fryzjskiej (31 szt.) i polskiej owcy górskiej (34 szt.). Genomowy DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej przy zastosowaniu proteiny K, według metody przedstawionej przez Kawasaki (1990). Genotyp β -*LGB* określano metodą PCR-RFLP. Amplifikację wyizolowanego DNA wykonano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Reakcję PCR wykonano w 25 μ l mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 10 \times Buffer PCR, $MgCl_2$ (15 mM), nukleotydy dNTP (2 mM), polimerazę AmpliTaq Gold (5U/ μ l) oraz sekwencje starterowe LGB1: 5'— CAA CTC AAG GTC CCT CTC CA-3' i LGB2: 5'— CTT CAG CTC CTC CAC GTA CA-3' (lit). Mieszaninę reakcyjną poddano procesowi termicznemu: 15 min wstępnej denaturacji genomowego DNA w temp. 95°C, następnie 31 cykli obejmujących denaturację w temp. 94°C przez 45 s, przyłączanie starterów do matrycy w temp. 64°C w ciągu 45 s, wydłużanie starterów w 72°C przez minutę i końcowe wydłużanie starterów

w temp. 72°C w czasie 60 min. Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu amplifikatora GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems). Trawienie 10 μ l produktu amplifikacji przeprowadzono przy użyciu enzymu restrykcyjnego RsaI (2U/ μ l), w temperaturze 37°C przez 2,5 godziny. Otrzymane produkty trawienia poddano rozdziałowi elektroforetycznemu. Elektroforezę strawionego produktu wykonano w 3% żelu agarozowym: Agarose for Routine Use — NuSive GTG agarose (1:3). Wyniki rozdziału elektroforetycznego analizowano w promieniach UV na transiluminatorze. Zgodność rzeczywistego rozkładu genotypów w badanych grupach owiec z rozkładem teoretycznym sprawdzono za pomocą testu χ^2 , pakiet statystyczny SAS.

Wyniki

Metoda PCR-RFLP pozwoliła na precyzyjną identyfikację polimorfizmu β -LGB w badanym materiale. W wyniku reakcji PCR otrzymywano produkt DNA o wielkości 103 par zasad. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych związany jest z występowaniem różnic w sekwencjach nukleotydowych, będących wynikiem punktowych mutacji w obrębie genu. Mutacja ta powoduje powstawanie miejsca restrykcyjnego, rozpoznawanego przez enzym RsaI, który tnie otrzymany produkt DNA na dwa fragmenty o wielkości 66 i 37 par zasad. Przy genotypie AA w procesie elektroforezy otrzymano dwa prążki o wielkości 66 i 37 par zasad, przy BB prążek o 103 parach zasad, natomiast u heterozygot zaobserwowano wszystkie trzy prążki (fot. 1).



Fot. 1. Elektroforeza produktów PCR-RFLP w żelu agarozowym
Fig. 1. Electrophoresis of PCR-RFLP products in agarose gel

W obu grupach owiec stwierdzono występowanie trzech genotypów *AA*, *AB* i *BB*. Ponad połowa osobników w populacji owcy górskiej i przeszło 60% u owiec fryzyskich posiadało genotyp *AB*. W populacji owcy górskiej homozygoty *AA* i *BB* występowały z tą samą częstością. Tylko jedna maciorka rasy fryzyskiej charakteryzowała się genotypem *BB*. Wyliczona wartość testu χ^2 okazała się nieistotna statystycznie, zarówno dla populacji owcy górskiej, jak i owcy fryzyskiej ($P < 0,05$) (tab. 1).

Tabela 1. Rozkład genotypów β -laktoglobuliny
Table 1. Distribution of β -lactoglobulin genotypes

Rasa Breed	Genotyp Genotype	Liczebność obserwowana Observed number	Liczebność oczekiwana Expected number	Frekwencja genotypów Frequency of genotypes	Wartość testu χ^2 χ^2 test value
Polska owca górska Polish Mountain sheep	<i>AA</i>	8	8,5	23,5	0,1176
	<i>AB</i>	18	17	53	
	<i>BB</i>	8	8,5	23,5	
Owca fryzyska Friesian sheep	<i>AA</i>	10	13,5	32,3	5,435
	<i>AB</i>	20	13,9	64,5	
	<i>BB</i>	1	3,58	3,2	

Omówienie wyników

Zastosowanie testu χ^2 pozwoliło porównać obserwowane częstości genotypów z wartościami oczekiwanymi. Porównanie to wykazało brak istotnych różnic między tymi rozkładami, co pozwoliło stwierdzić, że badane populacje owiec (FR i POG) znajdowały się, w rozumieniu prawa Hardy-Weinberga, w stanie równowagi genetycznej.

Przeprowadzone badania wykazały, że w obu badanych rasach owiec przewagę stanowiły osobniki o genotypie heterozygotycznym β -*LGB*. Podobną sytuację zaobserwowali Piwczyński i in. (2002) u merynosa polskiego i mieszańców po trykach fińskich, romanowskich i Booroola czy Cubric-Curik i in. (2002) u owiec Pag. Analizując polimorfizm β -*LGB* u owiec użytkowanych mlecznie na Węgrzech, Anton i in. (1998) zaobserwowali niewielką przewagę heterozygot tylko u cygaja i owiec Lacaune. W przypadku owiec Awassi i mieszańców z merynosem frekwencja genotypów *AB* była nieco mniejsza niż *AA*. Natomiast u pozostałych badanych grup (merynosa węgierskiego, brytyjskiej owcy mlecznej, mieszańców F_1 po merynosie i owcach Langhe czy Pleven) genotyp *AA* występował z frekwencją praktycznie dwukrotnie większą niż *AB*. We wspomnianych grupach zaobserwowano niskie, nie przekraczające 15%, frekwencje genotypów β -*LGB* *BB*. Niespełna 5% frekwencję homozygot *BB* stwierdzili Piwczyński i in. (2002) u owiec fińskich, a u mieszańców F_1 po trykach tej rasy z merynosem nie

stwierdzono osobników o tym genotypie. Podobnie niskie wartości dla frekwencji homozygot *BB* podaje Erhardt (1989) dla merynosa niemieckiego, Black Razka i czarnogłówki. W badanym przez tego autora stadzie owcy fryzyjskiej tylko jeden osobnik posiadał genotyp *BB*. Podobny wynik uzyskano w badaniach własnych. Niska frekwencja występowania tego genotypu spowodowana była niską częstością allelu *B* w populacji tych owiec, co wydaje się być typowe dla tej rasy (Schmoll i in., 1999). Dane zawarte w tabeli 2 wskazują na duże zróżnicowanie frekwencji alleli β -*LGB* u mlecznych ras owiec.

Tabela 2. Frekwencja alleli β -laktoglobuliny u mlecznie użytkowanych ras owiec
Table 2. Allele frequencies of β -lactoglobulin in sheep utilized for milk

Rasa Breed	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	Autorzy Authors
Altamura	48	0,625	0,375	Dario i in. (2005)
Barbaresca-Siciliana	62	0,62	0,38	Chiofalo i Micari (1987)
Comisana	250	0,50	0,50	Chiofalo i Micari (1987)
Churra	901	0,325	0,625	Barillet i in. (2005)
Lacaune	517	0,627	0,373	Barillet i in. (2005)
Latxa	234	0,47	0,53	Recio i in. (1997)
Fryzyjska	89	0,77	0,23	Erhardt (1989)
Friesian				
Fryzyjska	839	0,82	0,18	Schmoll i in. (1999)
Friesian				
Manchega	238	0,32	0,68	Lopez-Galvez i in. (1993)
Manech	222	0,473	0,527	Barillet i in. (2005)
Massa	54	0,53	0,47	Russo i in. (1981)
Merynos hiszpański	168	0,58	0,42	Barillet i in. (2005)
Spain Merino				
Merynos polski	207	0,498	0,502	Mroczkowski i in. (2004)
Polish Merino				
Pag	248	0,48	0,52	Cubic-Curik i in. (2002)
Sarda	72	0,47	0,54	Russo i in. (1981)
Segurena	50	0,67	0,33	Lopez-Galvez i in. (1993)
Siciliana-Pinzirita	72	0,50	0,50	Chiofalo i Micari (1987)
Polska owca górską	34	0,50	0,50	Badania własne/Own studies
Polish Mountain sheep				
Fryzyjska	31	0,66	0,34	Badania własne/Own studies
Friesian				

Według Cubic-Curik i in. (2002), w większości populacji owiec mlecznych allel *B* występował z większą częstością. Podobne obserwacje poczyniono u irańskich owiec Moghani i Ashary (Elyasi i in., 2004). Przewagę frekwencji tego wariantu zaobserwowano u hiszpańskich rodzimych ras Latxa, Manchega i Churra (Barillet i in., 2005). Allel *A* dominował natomiast w populacji mlecznej rasy Lacaune i wspomnianej już wschodniofryzyjskiej, a także włoskich ras Altamura i Barbaresca. U innych użytkowanych mlecznie w tym kraju owiec ras Comisana

i Pinzirita allele *A* i *B* występowały z tą samą częstością, podobnie jak w populacji polskiej owcy górskiej.

Uzyskane wyniki pokazały rozkład genotypów i alleli w populacji użytkowanej mlecznie owcy górskiej i mlecznej owcy wschodniofryzyskiej. Dalszym etapem przedstawionych badań będzie poszukiwanie zależności między określonymi genotypami a parametrami użytkowości mlecznej. Rozpoznanie polimorfizmu może poszerzyć wiedzę na temat możliwości wykorzystania genów białek mleka jako potencjalnych markerów cech mleczności, a rosnące zainteresowanie mlecznym użytkowaniem owiec w Polsce może być źródłem dodatkowego dochodu w owczarstwie, co skłania do poszukiwań takich zależności.

Piśmiennictwo

- Anton I., Zsolnai A., Kukovics S., Molnar A., Fesus L. (1998). Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian dairy sheep breeds and crosses. *Sheep and Goats Production in Eastern European Countries, Hungary*, REU Technical Series, 50: 224–226.
- Barillet F., Arranz J.-J., Carta A. (2005). Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphism of milk proteins in dairy sheep. *Genet. Sel. Evol.*, 37: 109–123.
- Chiofalo L., Micari P. (1987). Attuali conoscenze sulle varianti delle proteine del latte nelle popolazioni ovine allevate in Sicilia. *Sci. Techn. Latt. Cas.*, 38: 104–114.
- Cubric-Curik V., Feligni M., Lukac-Havranek J., Curik I., Giuseppe E. (2002). Genetic polymorphism of β -lactoglobulin in Native Sheep from Island of Pag. *Food Technol. Biotechnol.*, 40 (1): 75–78.
- Dario C., Carnicell D., Bufano G. (2005). Effect of β -lactoglobulin genotypes on ovine milk composition in altamura breed. *Arch. Zoot.*, 54: 105–108.
- Di Stasio L., Portolano B., Todaro M., Fiandra P., Giaccone P., Finocchiaro R., Alicata M. (1997). Effect of ovine β -Lg phenotype on cheese yield and composition. *Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation*, pp. 325–327.
- Elyasi G., Shodja J., Nassiry M., Tahmasebi A., Pirhary O., Javanmard A. (2004). Polymorphism of β -lactoglobulin gene in Iranian sheep breeds using PCR-RFLP. *The Joint Agriculture and Natural Resources Symposium, Tabriz-Ganja, May 14–16*.
- Erhardt G. (1989). Evidence for third allele at the β -Lg locus of sheep and its occurrence in different breeds. *Anim. Gen.*, 20: 197–204.
- Garzon A., Martinez J. (1992). β -Lg in Manchega sheep breed. Relation with milk technological indexes in handcraft manufacture of Manchego cheese. *XXIII Int. Conf. Anim. Genet., Interlaken*.
- Kawasaki E.S. (1990). *Sample preparation from blood, cell and other fluids. W: „PCR Protocols: A guide to methods and applications”. Academic Press, New York*, pp. 146–152.
- Lopez-Galvez G., Ramos M., Martin-Alvarez P., Juarez M. (1993). Influence of milk protein polymorphism on cheese producing ability in the milk of Manchega ewes breed. *Int. Dairy Fed Seminar., Cork*, pp. 167–173.
- Mroczkowski S., Korman K., Erhardt G., Piwczyński D., Borys B. (2004). Sheep milk polymorphism and its effect on milk performance of Polish Merino. *Arch. Tierz. Dummerstorf*, 47: 114–121.
- Piwczyński D., Borys B., Mroczkowski S., Erhardt G., Jarzynowska A. (2002). Charakterystyka polimorfizmu białek mleka i cech mleczności merynosa polskiego i jego mieszańców z rasami plennymi. *Pr. Mat. Zoot.*, 14: 151–161.
- Recio I., Fernandez-Fournier A., Martin-Alvarez P.J., Ramos M. (1997). β -Lg polymorphism in ovine breeds: influence on cheese making properties and milk composition. *Le Lait*, 77: 259–265.

- Russo V., Davoli R., Migliori L. (1981). Genetic polymorphism in milk proteins in Massa and Sardinian ewes. *Zoot. Nutr. Anim.*, 7: 421–428.
- Schmoll F., Herget I., Hatzipanagiotou A., Tholen E., Wimmers K., Brem G., Schellander K. (1999). Associations of β -lactoglobulin variants with milk production, milk composition and reproductive performance in milk sheep. *Wien. Tierarztl. Mschr.*, 86: 4–5.

Zatwierdzono do druku 28 IX 2006

ALDONA KAWĘCKA, ANNA RADKO

Genetic polymorphism of β -lactoglobulin in sheep

SUMMARY

The aim of the study was to characterize β -lactoglobulin polymorphism using the PCR-RFLP method in Polish Mountain (PM) and East Friesian (EF) sheep utilized for milk. Blood samples collected from PM and EF ewes were analysed. The PCR-RFLP method enabled accurate identification of *B-LGB* polymorphism in the analysed animals. PCR reaction resulted in a DNA product of 103 bp. The PCR product was digested with *RsaI* enzyme, which resulted in two bands of 66 and 37 bp for the *AA* genotype during electrophoresis and a band of 103 bp for the *BB* genotype. All three bands were observed in heterozygotes. Three genotypes (*AA*, *AB* and *BB*) were present in both groups. The heterozygous *AB* genotype was found in over 50% PM sheep and in over 60% EF sheep. Among the PM sheep population, *AA* and *BB* homozygotes occurred with the same frequency. Only one EF ewe had the *BB* genotype. The use of the *chi*² test allowed a conclusion that both sheep populations were in a state of genetic equilibrium in terms of Hardy-Weinberg law. In the next stage of the study, relationships between certain genotypes and milk performance parameters will be investigated. The identification of β -lactoglobulin polymorphism may give insights into the possible use of milk protein genes as potential markers of milk production traits in sheep.

Key words: sheep, β -lactoglobulin, polymorphism, PCR-RFLP