

Możliwości wykorzystania polimorfizmu genu laktoferyny w selekcji krów odpornych na zapalenie wymienia*

Grażyna Sender¹, Jolanta Oprządek¹, Adrianna Pawlik¹,
Piotr Urtnowski¹, Dariusz Kubasik²

¹Institut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu,
ul. Postępu 1, 05-552 Magdalena

²Ośrodek Hodowli Zarodowej „Garzyn” Sp. z o.o.
Garzyn, ul. Leszczyńska 34, 64-120 Krzemieniewo

Poszukując markerów mastitis zbadano możliwości wykorzystania polimorfizmu genu laktoferyny w selekcji krów odpornych na zapalenie wymienia. W tym celu przeanalizowano próby krwi pobrane od 698 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Z leukocytów krwi badanych zwierząt wyizolowano DNA, które posłużyło następnie do badania polimorfizmu genu laktoferyny. Badanie polimorfizmu prowadzono metodą PCR – RFLP. Obliczenia wykonano za pomocą programu SAS z wykorzystaniem procedury GLM. W modelu badającym wpływ genotypu na liczbę komórek somatycznych uwzględniono także wpływ laktacji, dnia laktacji, wydajności mleka w dniu badania, stada i sezonu badania. Wyniki badań wskazują, że krowy nosicielki allelu B laktoferyny są bardziej odporne na zapalenie wymienia niż pozostałe zwierzęta i charakteryzują się niższą liczbą komórek somatycznych w mleku. Zastosowanie polimorfizmu genu laktoferyny jako markera mastitis mogłoby pozwolić na wybieranie do hodowli zwierząt rzadziej chorujących na zapalenie wymienia.

SŁOWA KLUCZOWE: bydło mleczne / mastitis / laktoferyna / polimorfizm

Ze względu na wagę ekonomiczną problemu, zespoły badawcze na całym świecie próbują odkryć łatwą do zastosowania, a przede wszystkim efektywną metodę zapobiegania mastitis. Do tej pory nie udało się tego osiągnąć za pomocą tradycyjnych metod leczenia i poprawy warunków higienicznych pozyskiwania mleka. Zabiegi zmierzające do ograniczenia występowania zapalenia wymienia u krów mlecznych są długotrwałe i kosztowne, ponadto nie przynoszą spodziewanych rezultatów.

Udowodniony antagonizm genetyczny pomiędzy wydajnością mleka i stanem zdrowotnym wymienia, polegający na pogarszaniu stanu zdrowia wymienia w efekcie prowadzenia selekcji na wzrost wydajności mleka, sprawia, że od wielu lat sytuacja ulega systema-

* Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N311 311535

tycznemu pogarszaniu. Podatność czy też odporność na zapalenie wymienia krów mlecznych ma podłoże genetyczne (a więc może być dziedziczna) i zależy od wielu genów. Jest jednak cechą nisko odziedziczną, co w znacznym stopniu utrudnia tradycyjną selekcję krów opartą na fenotypie. Selekcję tę ogranicza ponadto słabe zdefiniowanie cechy (trudno jest zdefiniować i zmierzyć odporność) oraz brak możliwości wykorzystania danych dotyczących występowania przypadków klinicznych mastitis (problem ten występuje w większości krajów, także w Polsce).

Obecnie głównym zadaniem naukowców jest poszukiwanie takiego narzędzia, które pozwoli na poprawę stanu zdrowia wymienia krów przy równoczesnym utrzymaniu wysokiej produkcji mleka, będącej warunkiem opłacalności hodowli krów mlecznych. Nadzieję na uzyskanie poprawy stanu zdrowia wymienia daje selekcja wspomagana markerami (MAS). MAS wykorzystuje markery genetyczne do wybrania zwierząt mniej podatnych na zapalenie wymienia [9, 11, 13]. W przypadku cech ilościowych, słabo zdefiniowanych, związanych z rozrodem lub ujawniających się tylko u jednej płci (a taką cechą jest zapalenie wymienia występujące tylko u krów), daje ona teoretyczną możliwość osiągnięcia założonego celu genetycznego w szybkim czasie i przy niskich nakładach finansowych. W dalszej perspektywie zastosowanie MAS mogłoby pozwolić na wyeliminowanie niepożądanego skutku tradycyjnej selekcji – obniżenia zmienności genetycznej, które wynika z zawężenia puli alleli występujących w populacji. Prawdopodobnie w przyszłości możliwa będzie charakterystyka zwierzęcia pod względem wielu różnych alleli, co pozwoli na zachowanie różnorodności genetycznej zwierząt przy równoczesnym utrzymaniu wysokiej skali produkcji.

Celem badań było określenie możliwości zastosowania polimorfizmu genu laktoferyny w selekcji krów odpornych na zapalenie wymienia.

Material i metody

Badania przeprowadzono w stadzie krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, liczącym 698 zwierząt. Zwierzęta utrzymywane były na jednej z ferm krów mlecznych zlokalizowanej na terenie woj. lubuskiego. Warunki utrzymania i żywienia były ujednolicone dla wszystkich zwierząt.

Materiałem do izolacji DNA była krew obwodowa uzyskana z żyły szyjnej. Krew pobierana była w ilości 7,5 ml do probówek próżniowych, zawierających 1,6 mg środka antykoagulacyjnego (K-EDTA). DNA izolowano zgodnie z metodyką podaną przez Kanai i wsp. [4]. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analiz.

W badaniach do amplifikacji fragmentu genu laktoferyny zastosowano metodę PCR „touch down”. PCR „touch down” jest odmianą reakcji PCR, w której, poprzez zmiany temperatury na etapie wydłużania fragmentu DNA, zapobiega się występowaniu w produkcie reakcji dużych ilości niepożądanych odcinków nici. Odcinki takie mogą pojawić się podczas reakcji, w związku z błędnym działaniem starterów reakcji [2]. W wyniku PCR amplifikowany był fragment DNA o długości 301 par zasad (pz), który poddawany był działaniu enzymu restrykcyjnego *EcoRI* w temperaturze 37°C przez 3 godziny. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzany był w 2-procentowym żelu agarozowym w buforze TBE z dodatkiem bromku etydy, w obecności wzorca DNA pUC19/*MspI* (Fer-

mentas), przy stałym napięciu 100 V. Fragmenty restrykcyjne o długości 200 i 101 pz odczytywano w świetle UV i archiwizowano.

W celu ustalenia struktury genetycznej badanego stada krów na podstawie polimorfizmu genu laktoferyny oszacowano:

- częstość występowania poszczególnych alleli i genotypów;
- współczynnik polimorfizmu i heterozygotyczność;
- zgodność z prawem Hardy’ego-Weinberga (HWE).

Baza danych obejmowała informacje zootechniczne dotyczące każdego zwierzęcia, takie jak: numer, data urodzenia, data wycielenia i kontroli użytkowości mlecznej, rodowód zwierzęcia, wyniki kontroli użytkowości mlecznej (dzienna wydajność mleka, procent i wydajność tłuszczu oraz białka), liczba komórek somatycznych.

Analizę statystyczną, dotyczącą wpływu badanych czynników na liczbę komórek somatycznych, przeprowadzono przy użyciu procedury GLM pakietu SAS. Za pomocą analizy wariancji przeprowadzono ocenę zależności między liczbą komórek somatycznych (LKS) a genotypem genu laktoferyny. Ze względu na brak rozkładu normalnego LKS, zmienną tę poddano logarytmowaniu dziesiętnemu (LLKS).

Zastosowano następujący model statystyczny:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + E_j + L_k + \beta(x_{ijkl} - \bar{x}) + e_{ijkl}$$

gdzie:

Y_{ijkl} – logarytm liczby komórek somatycznych,

μ – średnia populacji,

A_i – wpływ genotypu genu laktoferyny ($i = 1, 2, 3$),

E_j – wpływ roku i sezonu badania ($j = 1, \dots, 23$),

L_k – wpływ laktacji ($k = 1, \dots, 6$),

$\beta(x_{ijkl} - \bar{x})$ – regresja na wydajność mleka

e_{ijkl} – błąd losowy

Wyniki i dyskusja

W badanej populacji zwierząt przeciętna wydajność mleka w laktacji 305-dniowej wynosiła 9662 kg, tłuszczu – 367 kg (3,85%), a białka – 323 kg (3,36%) – tabela 1. Przeciętna liczba komórek somatycznych w mleku wynosiła 531 tys./ml. Krowy były zasuszone średnio przez 55 dni. Wiek pierwszego wycielenia jałówek wynosił 794 dni, długość okresu międzywycieleniowego – 450 dni, a międzyciążowego – 181 dni. Ciąża trwała średnio 279 dni, a pełna laktacja – 342 dni. Krowy w stadzie przeciętnie użytkowane były przez 894 dni. Okres usługi wyniósł 88 dni, a okres spoczynku – 112 dni. Analiza przyczyn brakowania wykazała, że najwyższy procent brakowań stwierdzono w laktacji czwartej i dalszych (18,3). Na uwagę zasługuje fakt, że po pierwszej laktacji ze stada zostało wybrakowanych aż 17,4% pierwiastek. Najczęstszą przyczyną brakowania była jałowość (49,9%), na drugim miejscu uplasowały się choroby wymienia (16,7%). Brakowanie spowodowane niską wydajnością wynosiło 9,3%.

Tabela 1 – Table 1

Wydajność badanego stada krów mlecznych

Milk yield of the tested dairy herd

| Cecha Trait | \bar{x} | Sd |
|--|-----------|------|
| Wydajność mleka – 305 dni (kg) Milk yield – 305 days (kg) | 9662 | 1947 |
| Zawartość tłuszczu (%) Fat content (%) | 3,85 | 0,36 |
| Zawartość białka (kg) Protein content (kg) | 3,36 | 0,20 |

W analizowanym stadzie stwierdzono obecność 3 genotypów genu laktoferyny o następujących frekwencjach: *AA* – 0,54, *AB* – 0,38 i *BB* – 0,08 (tab. 2). Występowanie tych genotypów uwarunkowane było obecnością dwóch alleli, których długości fragmentów restrykcyjnych, obserwowanych na żelu agarozowym, wynosiły odpowiednio: allel A – 301 pz, allel B – 200 i 101 pz. Genotyp *AA* genu laktoferyny występował w połowie badanej populacji krów, natomiast częstość genotypu *BB* była bardzo niewielka – występował u około 8% badanych zwierząt. We wcześniejszych badaniach Sender i wsp. [10, 12, 14] stwierdzono, że krowy o genotypie *BB* laktoferyny są najmniej podatne na mastitis. Wśród badanych zwierząt, podobnie jak w populacji analizowanej wcześniej, krowy z genotypem *BB* laktoferyny występowały dość rzadko. Niska częstość genotypu *BB* w populacji krów mlecznych może ograniczać możliwości statystycznego udowodnienia powiązania allelu B z mniejszą podatnością krów na mastitis. Powodem niewielkiej częstości tego allelu może być jego jednoczesne powiązanie z niską wydajnością mleka u krów. Prawdopodobna jest stopniowa eliminacja allelu B podczas długotrwałej selekcji w kierunku wysokiej wydajności mleka.

Tabela 2 – Table 2

Częstość genotypów laktoferyny

Frequency of lactoferrin genotypes

| Genotyp Genotype | Liczba krów Number of cows | Częstość Frequency |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------|
| <i>AA</i> | 257 | 0,54 |
| <i>AB</i> | 181 | 0,38 |
| <i>BB</i> | 37 | 0,08 |

Częstość poszczególnych genotypów genu laktoferyny w badanej populacji jest podobna do stwierdzonej przez Wojdak-Maksymiec i wsp. [16]. Autorzy ci odnotowali częstość genotypu *AA* wynoszącą 0,379, *BB* – 0,0242, natomiast *AB* – 0,5968, czyli większą liczbę heterozygot w stosunku do homozygot *AA* niż w badaniach własnych.

W tabeli 3 przedstawiono obserwowaną w badanej populacji częstość alleli genu laktoferyny. Częstość występowania allelu B jest o około 3,81 razy mniejsza niż allelu A. W dotychczasowych badaniach, dotyczących polimorfizmu w intronie szóstym, stwierdzano podobną częstość alleli genu laktoferyny [11, 12, 15, 16]. W obecnych badaniach stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy oczekiwanym rozkładem alleli w analizowa-

Tabela 3 – Table 3

Częstość alleli genu laktoferyny w badanej populacji oraz wyniki testu na równowagę Hardy’ego-Weinberga
Frequency of lactoferrin alleles in the examined population and Hardy-Weinberg test results

| Allele | Częstość Frequency | Chi ² | Stopnie swobody Degrees of freedom | Prawdopodobieństwo Probability | |
|--------|-----------------------|------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------------|
| | | | | Chi-test | wartość oczekiwana expected value |
| A | 0,732 | 0,42 | 1 | 0,5175 | 0,4931 |
| B | 0,268 | | | | |

nej populacji a ich rozkładem rzeczywistym (tab. 3). W badanej populacji, brak zgodności z prawem Hardy’ego-Weinberga mógł być spowodowany długotrwałą selekcją ukierunkowaną na cechy produkcyjne.

W tabeli 4 przedstawiono wyniki dotyczące związku genotypu laktoferyny z liczbą komórek somatycznych, świadcząca o stanie zdrowia wymienia badanych krów. Najwyższą liczbę komórek somatycznych stwierdzono u krów z genotypem *AA* laktoferyny, istotnie ($p < 0,05$) wyższą niż w mleku heterozygot. Pomiedzy genotypami *BB* i *AB* nie odnotowano różnic istotnych statystycznie ($p < 0,07$). Heterozygoty *AB* i homozygoty *BB* charakteryzowała niższa wartość komórek somatycznych.

Tabela 4 – Table 4

Liczba komórek somatycznych (wartość logarytmiczna) w zależności od genotypu laktoferyny

Somatic cell count (logarithmic value) depending on lactoferrin genotype

| Genotyp laktoferyny Lactoferrin genotype | Liczba prób Number of samples | LSM | Se |
|---|----------------------------------|-------------------|------|
| <i>AA</i> | 7854 | 5,71 ^a | 0,03 |
| <i>AB</i> | 5854 | 5,65 ^a | 0,03 |
| <i>BB</i> | 1064 | 5,62 | 0,05 |

LSM – średnia najmniejszych kwadratów – Least Square Mean

Se – błąd standardowy – standard error

a – różnice statystycznie istotne przy $p < 0,05$ – statistically significant differences at $p < 0,05$

Na podstawie przedstawionych wyników do hodowli można polecać krowy o genotypie *BB* i *AB*, ponieważ charakteryzują się lepszym zdrowiem wymienia. Niestety, krowy o genotypie *BB*, jak już wcześniej wspomniano, występują dość rzadko; w badanej populacji było ich tylko 37, tj. 8%.

Nieco inną tendencję uzyskano we wcześniejszych badaniach, gdzie genotypowi laktoferyny *AB* odpowiadał najwyższy średni LLKS, a genotypowi *BB* – najniższy [12]. W badaniach Wojdak-Maksymiec i wsp. [16] najniższy średni LLKS posiadały zwierzęta o genotypie laktoferyny *AA*, następnie – *BB*, natomiast najwyższym LLKS charakteryzowały się zwierzęta o genotypie *AB*. Należy podkreślić, że wcześniejsze badania dotyczące polimorfizmu w intronie 6 genu laktoferyny opierały się na niższej, w stosunku do badań własnych, liczbie osobników.

Oprócz badanego polimorfizmu, występującego w intronie 6, istnieją również inne formy polimorficzne genu laktoferyny. Polimorfizm tego genu został stwierdzony dotychczas zarówno w obrębie regulatorowym, jak i w obrębie sekwencji kodujących i intronów tego genu [3, 5, 6, 15]. Polimorfizmy genu wykryte w promotorze mają prawdopodobnie wpływ na jego ekspresję. Stwierdzono, że polimorfizm w pozycji +32 (C/G) wywiera istotny wpływ na poziom białka i jego procentową zawartość w mleku, natomiast nie jest istotny dla liczby komórek somatycznych [3]. Kamiński i wsp. [3] sugerują, że allel G zmniejsza ekspresję laktoferyny, co w efekcie objawia się niższą liczbą komórek somatycznych, natomiast allel C wzmacnia ekspresję laktoferyny, powodując wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej i wzrost liczby komórek somatycznych w mleku.

Najnowsze wyniki badań Bahar i wsp. [1] dowodzą, że polimorfizmy zlokalizowane w regionie promotorowym genu laktoferyny mają wpływ na zawartość tego białka w mleku

Bardzo ważną rolę laktoferyny jest jej współdziałanie z lizozymem w niszczeniu ścian komórek bakteryjnych, co może zwiększać wrażliwość bakterii na niektóre antybiotyki. W niektórych przypadkach pozwala ona na 2-krotne obniżenie stężenia terapeutycznego antybiotyku. W normalnym mleku krowim znajduje się niewielka ilość laktoferyny – około 0,1 mg w 1 ml lub mniej. Stężenie laktoferyny w wydzielinie z zasuszanego wymienia jest wielokrotnie wyższe i wynosi około 20 mg/ml, a często nawet więcej. W mleku krowy cierpiącej na zapalenie wymienia koncentracja laktoferyny jest wyższa niż w mleku od krowy zdrowej – wynosi około 0,3-2,3 mg/ml.

W przypadku słabo zdefiniowanych cech, do których należy również odporność na mastitis, trudno jest wskazać geny kandydujące kontrolujące zmienność cechy, gdyż jest ona uzależniona od wielu czynników (mechanizmy fizjologiczne, patogen *etc.*). Pomimo trudności, od niedawna podejmowane są próby odnalezienia genetycznych markerów mastitis [7, 8].

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania genu bydłczej laktoferyny jako genu kandydującego lub markera podatności krów na zapalenie wymienia, lecz konieczne jest poszukiwanie związku innych form polimorficznych tego genu z występowaniem mastitis.

PIŚMIENNICTWO

1. BAHAR B., O'HALLORAN F., CALLANAN M. J., MCPARLAND S., GIBLIN L., SWEENEY T., 2011 – Bovine lactoferrin (LTF) gene promoter haplotypes have different basal transcriptional activities. *Animal Genetics* 42, 270-279.
2. DON R.H., COX P.T., WAINWRIGHT B.J., BAKER K., MATTICK J.S., 1991 – “Touch-down” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19, 14, 100.
3. KAMIŃSKI S., OLEŃSKI K., BRYM P., MALEWSKI T., SAZANOV A.A., 2006 – Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the lactoferrin gene and its associations with milk performance traits in Polish Holstein-Friesian cows. *Russian Journal of Genetics* 42, 8, 924-927.
4. KANAI N., FUJII T., SAITO K., TOKOYAMA T., 1994 – Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtained clotted blood. *Journal of Clinical Pathology* 47, 1043-1044.

5. LI G-H., ZHANG Y., SUN D-X., LI N., 2004 – Study on the polymorphism of bovine lactoferrin gene and its relationship with mastitis. *Animal Biotechnology* 15, 67-76.
6. MARTIN-BURRIEL I, OSTA R., BARENDSE W., ZARAGOZA P., 1997 – New polymorphism and linkage mapping of the bovine lactotransferin gene. *Mammalian Genome* 8, Brief Data Reports 704-705.
7. OGOREVC J., KUNEJ T., DOVČ P., 2008 – An integrated map of cattle candidate genes for mastitis: a step forward to new genetic markers. *Acta Agriculturae Slovenica* 2, 85-91.
8. OGOREVC J, KUNEJ T, RAZPET A, DOVC P., 2009 – Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics* 40(6), 832-851. Epub 2009 Jun 8.
9. PAWLIK A., SENDER G., KORWIN-KOSSAKOWSKA A., 2009 – Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance – a review. *Animal Science Papers and Reports* 27 (4) 263-271.
10. SENDER G., DYMNICKA M., KORWIN-KOSSAKOWSKA A., GRALAK B., ARKUSZEWSKA E., ŁOZICKI A., 2007 – Związek polimorfizmu genu laktoferyny z wydajnością mleka. *Roczniki Naukowe PTZ*, t. 3, nr 4, 97-101.
11. SENDER G., GALAL ABDEL HAMEED K., KORWIN-KOSSAKOWSKA A., 2007 – Wykorzystanie markerów genetycznych w programie zwalczania mastitis. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, Supplement 23, 77-80.
12. SENDER G., KORWIN-KOSSAKOWSKA A., GALAL ABDEL HAMEID K., PRUSAK B., 2006 – Ocena wpływu wybranych genów na występowanie mastitis u krów. *Medycyna Weterynaryjna* 62 (5), 563-565.
13. SENDER G., KORWIN-KOSSAKOWSKA A., STĘPIŃSKA U., 2003 – Wykorzystanie markerów genetycznych w programie zwalczania mastitis. *Medycyna Weterynaryjna* 59 (10), 853-856.
14. SENDER G., PAWLIK A., KORWIN-KOSSAKOWSKA A., GALAL ABDEL HAMEID K., SOBCZYŃSKA M., OPRZĄDEK J., PRUSAK B., 2010 – Association of the bovine lactoferrin polymorphism with occurrence of mastitis. *Milchwissenschaft* 65 (3), 242-245.
15. SEYFERT H.M., KUEHN C., 1994 – Characterisation of a first bovine lactoferrin gene variant, based on *EcoRI* polymorphism. *Animal Genetics* 25, 54.
16. WOJDAK-MAKSYMIEC K., KMIĘC M., ZIEMAK J., 2006 – Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Veterinary Medicine* 51, 14-20.

Grażyna Sender, Jolanta Oprządek, Adrianna Pawlik,
Piotr Urtnowski, Dariusz Kubasik

Bovine lactoferrin gene polymorphism applicability in the selection of cows resistant to mastitis

Summary

Lactoferrin gene polymorphism was analysed in order to test its usefulness for marker-assisted selection of cows resistant to mastitis. 698 blood samples obtained from Polish Holstein-Friesian cows were examined. DNA was extracted from blood leukocytes and used for polymorphism study, conducted with PCR – RFLP method. Statistical analysis was performed with the use of GLM

procedure (SAS software). Effects of lactation, days in milk, milk yield, herd and season were included in the statistical model for associations between genotype and somatic cell count. Cows carrying allele B of lactoferrin gene were more resistant to the infection than other animals and had a lower somatic cell count in milk. Application of lactoferrin gene variants as genetic markers can facilitate selection of cows less prone to mammary gland infections.

KEY WORDS: dairy cattle / mastitis / lactoferrin / polymorphism