

Związek wariantów genetycznych β -laktoglobuliny i κ -kazeiny z wydajnością i składem chemicznym mleka krów czterech ras*

Anna Wolanciuk

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Katedra Towaroznawstwa i Przetwórstwa Surowców Zwierzęcych,
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin; e-mail: anna.wolanciuk@up.lublin.pl

Celem pracy było ustalenie polimorfizmu β -laktoglobuliny i κ -kazeiny u krów 4 ras, w tym dwóch reprezentujących typ mleczny (polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej i jersey) i dwóch lokalnych (polska czerwona i białogrzbieta) oraz ocena związków wariantów genetycznych tych frakcji białek z wydajnością i składem chemicznym mleka. W obrębie β -laktoglobuliny u wszystkich 4 ocenianych ras zidentyfikowano dwa allele (A i B). U rasy polskiej czerwonej zdecydowanie dominował wariant B (frekwencja 0,73), natomiast w rasie jersey zaobserwowano wyższą częstotliwość allelu A (0,62). U krów ras polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej i białogrzbietaj frekwencje alleli A i B były zbliżone do proporcji 1:1. Dla κ -kazeiny stwierdzono również występowanie dwóch alleli (A i B). Najwyższą frekwencję wariantu B κ -kazeiny wykazano u krów rasy jersey (0,74) i stosunkowo wysoką u ras lokalnych, tzn. polskiej czerwonej i białogrzbietaj (powyżej 0,4). U rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej częstotliwość występowania tego allelu była zdecydowanie niższa (0,28). Obecność allelu A β -laktoglobuliny (BLG) była związana z istotnie wyższą wydajnością ($p \leq 0,01$), zawartością białka ($p \leq 0,01$) i suchej masy ($p \leq 0,05$). Krowy o genotypie AA BLG produkowały o 4,21 kg więcej mleka o wyższej zawartości w nim suchej masy (o 0,62 p.p.), w tym białka (o 0,28 p.p.), w porównaniu do homozygot BB BLG. W odniesieniu do genu κ -kazeiny (CSN3) stwierdzono, że zwierzęta posiadające allel A również produkowały istotnie ($p \leq 0,05$) więcej mleka, jednak o niższej koncentracji składników suchej masy ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$). Homozygoty BB produkowały bowiem o 2,9-4,32 kg mniej mleka, jednak o wyższej zawartości suchej masy (o 0,29-1,33 p.p.), w tym tłuszczu (o 0,12-0,52 p.p.) i białka (o 0,13-0,51 p.p.) w porównaniu do homozygot AA CSN3. Allel B CSN3 łączył się również z wyższą zawartością kazeiny w mleku.

SŁOWA KLUCZOWE: rasa krów / polimorfizm β -laktoglobuliny (BLG) i κ -kazeiny (CSN3) / skład mleka

Wśród białek mleka wykazujących polimorfizm genetyczny można wyróżnić cztery frakcje kazeinowe (α S1, α S2, β i κ) i dwie serwatkowe (α -laktoalbumina i β -laktoglobulina).

*Skrót pracy doktorskiej

U bydła *loci* kazeiny są zlokalizowane na chromosomie 6 (6/BTA 6q31-33) i łącznie zajmują odcinek DNA o długości 200 kb [26]. Geny te są uporządkowane w kolejności: CSN1S1, CSN2, CSN1S2, CSN3 i kodują odpowiednio α 1-kazeinę, β -kazeinę, α 2-kazeinę i κ -kazeinę. Są one ściśle ze sobą powiązane, tworząc klaster [10]. β -laktoglobulina jest kodowana przez gen BLG zlokalizowany na chromosomie 11 (11q28), który składa się z 7 eksonów, a poznana jego długość wynosi ok. 6700 pz [29]. Gen LALBA kodujący α -laktoalbuminę położony jest na chromosomie 5 (BTA5q12-13), składa się z 4 eksonów i ma długość 3061 pz [6]. Spośród wszystkich frakcji białek mleka jedynie formy polimorficzne dwóch z nich, tzn. kappa-kazeiny i beta-laktoglobuliny, uważane są za markery genetyczne cech ilościowych [25, 37]. Największe znaczenie w technologii mleczarskiej przypisuje się κ -kazeinie (CSN3), gdzie najczęściej występują dwa allele – A i B. Różnice między nimi wywołane są dwiema mutacjami punktowymi, polegającymi na podstawieniu treoniny przez izoleucynę w pozycji 136 łańcucha polipeptydowego oraz kwasu asparaginowego przez alaninę w pozycji 148 [14, 31]. Wielu autorów [4, 6, 7] wskazuje, że krowy z allelem B genu CSN3 produkują mleko o wyższej zawartości białka, w tym kazeiny, które szybciej koaguluje pod wpływem podpuszczki, a jego skrzep jest bardziej zwięzły. Pod względem form polimorficznych najbardziej zróżnicowanym białkiem jest jednak β -laktoglobulina, przy czym najczęściej identyfikowanymi allelami są A i B [25]. Różnica między wariantami A i B polega na tym, że allel A w pozycji 64 sekwencji aminokwasowej zawiera kwas asparaginowy, natomiast B – glicynę. Z kolei w pozycji 118 w wariantcie A występuje walina, zaś w przypadku B – alanina [19]. Frakcja ta, obok κ -kazeiny, budzi wśród badaczy największe zainteresowanie.

Obecnie w Polsce użytkowanych mlecznie jest 12 ras krów, przy czym około 90% aktywnego pogłowia stanowią krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. W kilku stadach utrzymywane są również krowy rasy jersey. W porównaniu z dużymi rasami mlecznymi, krowy rasy jersey produkują tyle samo mleka na 100 kg masy ciała, ale o 30-50% więcej tłuszczu i 20-30% więcej białka [33]. Pozyskiwane od nich mleko, dzięki wysokiej koncentracji składników suchej masy, jest cennym surowcem dla przemysłu mleczarskiego. Obok ras wysoko produkcyjnych, w Polsce użytkowane są również lokalne rasy bydła, m.in. polska czerwona i biało-żółta. Krowy tych ras cechują się niższą produktywnością, ale za to są doskonale przystosowane do lokalnych warunków klimatycznych i tradycyjnych systemów chowu, wykazując przy tym wiele zalet, m.in. odporność na choroby, długowieczność czy wysoką płodność [20].

Celem podjętych badań było ustalenie polimorfizmu β -laktoglobuliny i κ -kazeiny u krów 4 ras, w tym dwóch reprezentujących typ jednostronnie mleczny (polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej i jersey) i dwóch ras lokalnych (polska czerwona i biało-żółta) oraz ocena związków wariantów genetycznych tych frakcji białek z wydajnością dobową i składem chemicznym mleka.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły próbki krwi i mleka. W celu określenia polimorfizmu β -laktoglobuliny i κ -kazeiny pobrano jednorazowo próbki krwi obwodowej z żyły szyjnej zewnętrznej od 213 krów, w tym 63 rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany

czarno-białej (PHF HO) i po 50 rasy jersey (JE), polskiej czerwonej (RP) i białogrzbiętej (BG). Próbki krwi pobrano do probówek próżniowych zawierających jako antykoagulant K_3 EDTA. DNA wyizolowano z krwi przy wykorzystaniu zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit firmy QIAGEN.

Genotypy β -laktoglobuliny (BLG) oznaczono metodą PCR-RFLP według Medrano i Aquilar-Cordova [21], a kappa-kazeiny (CSN3) według Medrano i Aquilar-Cordova [22].

Na podstawie uzyskanych wyników określono liczebność genotypów β -laktoglobuliny i κ -kazeiny oraz częstość występowania alleli i genotypów według Hardy-Weinberga. Dla stwierdzenia czy badana populacja pozostawała w stanie równowagi genetycznej sprawdzano zgodność otrzymanych wyników z wartością oczekiwaną testem χ^2 [35].

Od każdej krowy, u której oznaczono genotypy β -laktoglobuliny i κ -kazeiny pobrano również próbki mleka z całego doju. Pobierano je w czasie próbnych udojów (metoda AT4) w dwóch sezonach produkcyjnych: wiosenno-letnim (maj – lipiec) i jesienno-zimowym (listopad – marzec). Liczbę komórek somatycznych (LKS) w mleku oznaczano aparatem Somacount 150 firmy Bentley, w celu wyeliminowania próbek mleka o LKS powyżej 400 tys./ml. W mleku oznaczano: zawartość tłuszczu, białka, laktozy i suchej masy aparatem Infrared Milk Analyzer firmy Bentley oraz zawartość kazeiny zgodnie metodą AOAC [1]. Do oceny związków wariantów genetycznych β -laktoglobuliny ze składem chemicznym wykorzystano 675 próbek mleka, w tym 210 od krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, 144 – jersey, 181 – polskiej czerwonej i 140 – białogrzbiętej. W przypadku takich analiz dla wariantów genetycznych κ -kazeiny przeanalizowano 737 próbek mleka, w tym 206 od krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, 188 – jersey, 181 – polskiej czerwonej i 162 – białogrzbiętej.

Dane dotyczące wydajności dobowej tych krów w miesiącach pobrania próbek mleka pochodziły z dokumentacji hodowlanej (raporty RW-2) prowadzonej przez Polską Federację Hodowców Bydła i Producentów Mleka.

Do obliczeń statystycznych wykorzystano program StatSoft Inc. STATISTICA ver. 6. Analizy dokonano na podstawie Ogólnego Modelu Liniowego (GLM – General Linear Model) – procedura ANOVA dla układów czynnikowych z interakcją. Istotność różnic pomiędzy średnimi wyznaczono testem Tukeya dla różnych liczebności, przy poziomie $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$.

Wyniki i dyskusja

Analiza polimorfizmu genów β -laktoglobuliny i κ -kazeiny wykazała znaczne zróżnicowanie genetyczne pomiędzy ocenianymi rasami krów (tab. 1 i 2). W przypadku β -laktoglobuliny zidentyfikowano obecność trzech genotypów: AA, AB i BB, uwarunkowanych dwoma allelami A i B (tab. 1). U ocenianych ras (z wyjątkiem polskiej czerwonej) przeważały heterozygoty AB, których udział wahał się od 44,44% u rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej do 50% u rasy białogrzbiętej. W rasie polskiej czerwonej dominowały zwierzęta homozygotyczne BB (52%), natomiast homozygoty AA stanowiły zaledwie 6%. U krów rasy białogrzbiętej i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej frekwencja alleli A i B była zbliżona do proporcji 1:1 (odpowiednio: 0,55; 0,45 i 0,48; 0,52),

Tabela 1 – Table 1

Frekwencja alleli kontrolujących polimorfizm β -laktoglobuliny oraz obserwowany i oczekiwany rozkład genotypów u krów ocenianych ras

Frequencies of β -lactoglobulin alleles and observed and expected distribution of genotypes in the analysed cow breeds

Rasa Breed	Genotyp Genotype	Obserwowana liczba krów (szt. (%)) Number of cows observed (head (%))	Frekwencja alleli Allele frequency	Oczekiwana frekwencja genotypów Expected genotype frequencies	Teoretyczna liczba krów Teoretical number of cows	χ^2
PHF HO	AA	16 (25,4)	A=0,48	AA=0,2268	14,29	0,5690
	AB	28 (44,4)	B=0,52	AB=0,4989	31,00	
	BB	19 (30,2)		BB=0,2744	17,85	
JE	AA	19 (38)	A=0,62	AA=0,3844	19,22	0,0174
	AB	24 (48)	B=0,38	AB=0,4712	23,56	
	BB	7 (14)		BB=0,1444	7,22	
RP	AA	3 (6)	A=0,27	AA=0,0729	3,65	0,0000
	AB	21 (42)	B=0,73	AB=0,3942	19,71	
	BB	26 (52)		BB=0,5329	26,65	
BG	AA	15 (30)	A=0,55	AA=0,3025	15,13	0,0053
	AB	25 (50)	B=0,45	AB=0,4950	24,75	
	BB	10 (20)		BB=0,2025	10,13	

PHF HO – polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej – Polish Black-and-White Holstein-Friesian

JE – jersey – Jersey

RP – polska czerwona – Polish Red

BG – białogrzbieta – White-backed

natomiast u rasy jersey zdecydowanie dominował allel A (0,62), a u polskiej czerwonej allel B (0,73) – tabela 1. Oner i Elmaci [28], Heidari i wsp. [17] oraz Tsiaras [36] potwierdzają przewagę heterozygot AB w analizowanych populacjach krów. Heidari i wsp. [17] podają, że frekwencja genotypu AB β -laktoglobuliny w stadzie krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej wynosiła 0,54, przy czym częstość występowania allelu A kształtowała się na poziomie 0,53, a allelu B – 0,47. Zatoń-Dobrowolska i wsp. [38], badając polimorficzność genu BLG była czerwonego polskiego, niemieckiego i czeskiego, wskazują na wyższą frekwencję allelu B u tych ras, odpowiednio: 0,81; 0,68 i 0,56. Barłowska i wsp. [5] również wykazali wysoką frekwencję allelu B BLG u krów rasy polskiej czerwonej (0,72), natomiast u rasy białogrzbietaj częstość występowania alleli A i B była jednakowa (0,50).

Przeprowadzona z zastosowaniem testu χ^2 ocena wykazała zachowanie równowagi genetycznej w obrębie BLG u wszystkich analizowanych ras (tab. 1).

W układzie κ -kazeiny stwierdzono występowanie trzech genotypów: AA, AB i BB, uwarunkowanych dwoma allelami A i B (tab. 2). U większości ras (z wyjątkiem jersey) występowała wyższa frekwencja allelu A (od 0,51 u polskiej czerwonej do 0,72 u polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej). W populacji krów rasy jersey stwierdzono natomiast zdecydowanie wyższą częstość występowania allelu B nad A (odpowiednio 0,74 i 0,26). W rasie tej dominowały homozygoty BB (54%), a najmniej takich zwierząt zidentyfikowano w rasie polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (niespełna 5%) – tabela 2.

Tabela 2 – Table 2

Frekwencja alleli kontrolujących polimorfizm κ -kazeiny oraz obserwowany i oczekiwany rozkład genotypów u krów ocenianych ras

Frequencies of κ -casein alleles and observed and expected distribution of genotypes in the analysed cow breeds

Rasa Breed	Genotyp Genotype	Obserwowana liczba krów (szt. (%)) Number of cows observed (head (%))	Frekwencja alleli Allele frequency	Oczekiwana frekwencja genotypów Expected genotype frequencies	Teoretyczna liczba krów Theoretical number of cows	χ^2
PHF HO	AA	31 (49,2)	A=0,72	AA=0,5184	35,44	3,5822
	AB	29 (46,0)	B=0,28	AB=0,4032	23,63	
	BB	3 (4,8)		BB=0,0784	3,94	
JE	AA	3 (6)	A=0,26	AA=0,0680	3,40	0,0824
	AB	20 (40)	B=0,74	AB=0,3848	19,24	
	BB	27 (54)		BB=0,5476	27,38	
RP	AA	13 (26)	A=0,51	AA=0,2601	13,01	0,0000
	AB	25 (50)	B=0,49	AB=0,4998	24,99	
	BB	12 (24)		BB=0,2401	12,01	
BG	AA	17 (34)	A=0,57	AA=0,3249	16,25	0,1884
	AB	23 (46)	B=0,43	AB=0,4902	24,51	
	BB	10 (20)		BB=0,1849	9,25	

PHF HO – polska holsztyńsko-fryzyjska odmiana czarno-białej – Polish Black-and-White Holstein-Friesian

JE – jersey – Jersey

RP – polska czerwona – Polish Red

BG – białogrzbiena – White-backed

Przeprowadzona z zastosowaniem testu χ^2 ocena wykazała równowagę genetyczną w układzie CSN3 u wszystkich analizowanych ras (tab. 2).

Uzyskane wyniki badań własnych znajdują potwierdzenie zarówno w literaturze krajowej, jak i zagranicznej. Botaro i wsp. [8] wykazali, że u bydła rasy holsztyńskiej udział genotypów AA, AB i BB kappa-kazeiny wynosił odpowiednio: 66,83; 31,84 i 1,33%, a u bydła rasy girolando: 71,38; 27,90 i 0,72%. Allel A występował częściej niż B w przypadku obu ras, zarówno holsztyńskiej (0,83), jak i girolando (0,85). Molee i wsp. [26], analizując populacje krów o różnym udziale genów rasy hf (G1 do 87,5% i G2 powyżej 87,5%), zaobserwowali wyższą frekwencję allelu A w obu grupach. Również Anggraeni i wsp. [3], prowadząc badania na krowach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej utrzymywanych w regionie zachodniej Jawy, potwierdzają wyższą częstość występowania allelu A (0,64). Wyniki badań własnych dotyczące polimorfizmu genu CSN3 u rasy jersey korespondują z wynikami uzyskanymi przez Rena i wsp. [32]. Zidentyfikowali oni bowiem tylko dwa genotypy (AB i BB) u tej rasy, co wynikało z niskiej częstotliwości występowania allelu A (0,11). Również Poulsen i wsp. [30] wskazują na niską frekwencję genotypu AA u krów tej rasy (0,04). Genotyp AB CSN3 pojawiał się z częstością 0,33, a BB z częstością 0,63. Zbliżone wyniki jak w badaniach własnych (dotyczące krów rasy polskiej czerwonej) uzyskali Zatoń-Dobrowolska i wsp. [38]. Wykazali, że u krów rasy czeskiej czerwonej frekwencja allelu A wynosiła 0,56. Jann i wsp. [18] stwierdzili jeszcze wyższą częstość występowania allelu A (0,60) u krów rasy polskiej czerwonej. Była ona bowiem prawie dwukrotnie wyższa od allelu B (0,33).

Tabela 3 – Table 3

Związek wariantów genetycznych β -laktoglobuliny z wydajnością i składem chemicznym mleka krów ocenianych ras
 Relationships between genetic variants of β -lactoglobulin and daily milk yield and chemical composition of milk from the analysed cow breeds

Rasa Breed	Genotyp Genotype	n	Wydajność dobową Daily milk yield (kg)		Tłuszcz Fat (%)		Białko Protein (%)		Kazeina Casein (%)		Laktoza Lactose (%)		Sucha masa Dry matter (%)	
			\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
PHF HO	AA	62	25,61 ^{bb}	5,38	4,35	0,81	3,50	0,52	2,56	0,35	4,79	0,20	13,21	1,17
	AB	78	23,39 ^{aa}	7,18	4,28	0,74	3,41	0,46	2,57	0,42	4,73	0,21	13,14	1,14
	BB	70	21,62 ^a	5,37	4,20	0,57	3,26	0,33	2,64	0,36	4,77	0,21	13,03	0,80
JE	AA	52	21,93	4,94	5,54 ^b	0,82	4,18	0,44	3,05 ^{ab}	0,51	4,81	0,24	15,41 ^b	0,93
	AB	68	21,47	4,26	5,03 ^a	0,81	4,07	0,37	3,00 ^a	0,36	4,80	0,21	14,61 ^a	1,03
	BB	24	19,65	6,14	4,91 ^a	0,90	4,02	0,35	3,19 ^b	0,44	4,79	0,25	14,42 ^a	1,08
RP	AA	8	13,67	6,02	4,45	0,49	3,46	0,31	2,54	0,39	4,86	0,18	13,45	0,57
	AB	72	13,58	5,15	4,41	0,66	3,42	0,44	2,57	0,42	4,83	0,29	13,39	0,89
	BB	101	12,28	4,76	4,32	0,72	3,43	0,39	2,62	0,38	4,77	0,30	13,30	0,96
BG	AA	42	14,32	3,20	4,17	0,93	3,49	0,55	2,49 ^a	0,43	4,70	0,35	13,05	1,21
	AB	64	13,29	3,11	4,13	0,91	3,43	0,45	2,58 ^{ab}	0,41	4,61	0,39	12,87	1,33
	BB	34	12,07	2,44	3,91	0,93	3,36	0,57	2,65 ^b	0,40	4,59	0,43	12,58	1,38
Łącznie Total	AA	164	20,97 ^b	7,81	4,67	0,88	3,72 ^b	0,51	2,71 ^a	0,44	4,77	0,26	13,87 ^b	1,30
	AB	282	17,39 ^{ab}	7,00	4,46	0,84	3,58 ^b	0,52	2,69 ^a	0,44	4,75	0,27	13,53 ^{ab}	1,18
	BB	229	16,76 ^a	7,77	4,28	0,83	3,44 ^a	0,45	2,75 ^b	0,41	4,74	0,29	13,25 ^a	1,17
Wpływ czynnika Influence of the factor	rasa – breed		***		***		***		***		***		***	
	genotyp – genotype		*		*		*		*		ns		*	
	rasa x genotyp breed x genotype		ns		**		ns		ns		ns		*	

A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$; a, b – różnice istotne przy $p \leq 0,05$. Wpływ czynnika: * – przy $p \leq 0,05$; ** – przy $p \leq 0,01$; *** – przy $p \leq 0,001$; ns – nie stwierdzono

A, B – differences significant at $p \leq 0,01$; a, b – differences significant at $p \leq 0,05$. Influence of the factor: * – at $p \leq 0,05$; ** – at $p \leq 0,01$; *** – at $p \leq 0,001$; ns – not found

PHF HO – polska holsztyńsko-fryzyska odmiana czarno-białej – Polish Black-and-White Holstein-Friesian; JE – jersey – Jersey; RP – polska czerwona – Polish Red; BG – biało-grzbieta – White-backed

Tabela 4 – Table 4
Związek wariantów genetycznych κ -kazeiny z wydajnością i składem chemicznym mleka krów ocenianych ras
Relationships between genetic variants of κ -casein and daily milk yield and chemical composition of milk from the analysed cow breeds

Rasa Breed	Genotyp Genotype	n	Wydajność dobową Daily milk yield (kg)			Tłuszcz Fat (%)			Białko Protein (%)			Kazeina Casein (%)			Laktoza Lactose (%)			Sucha masa Dry matter (%)		
			\bar{x}	SD		\bar{x}	SD		\bar{x}	SD		\bar{x}	SD		\bar{x}	SD		\bar{x}	SD	
PHF HO	AA	104	24,13 ^B	6,21	4,26 ^a	0,80	3,37 ^a	0,38	2,63 ^a	0,45	4,80	0,20	12,91 ^a	1,16						
	AB	90	22,51 ^{AB}	6,98	4,31 ^a	0,88	3,50 ^{ab}	0,44	2,70 ^{ab}	0,42	4,73	0,22	13,21 ^{ab}	0,88						
	BB	12	19,81 ^A	4,54	4,40 ^b	0,60	3,74 ^b	0,41	2,82 ^b	0,34	4,73	0,13	13,35 ^b	1,37						
JE	AA	12	22,45	5,06	5,09 ^a	0,68	4,03	0,39	3,01	0,38	4,77	0,30	14,61	1,18						
	AB	80	21,12	4,34	5,06 ^a	0,91	4,09	0,38	3,07	0,44	4,79	0,24	14,75	0,89						
	BB	96	19,91	4,59	5,21 ^b	0,77	4,16	0,35	3,11	0,42	4,83	0,21	14,90	0,94						
RP	AA	42	14,86 ^B	5,64	4,24 ^a	0,67	3,38 ^b	0,37	2,47	0,41	4,89 ^b	0,27	13,13	0,93						
	AB	91	13,20 ^{AB}	5,08	4,44 ^{ab}	0,75	3,47 ^a	0,42	2,58	0,39	4,76 ^a	0,31	13,46	0,95						
	BB	48	11,96 ^A	4,53	4,52 ^b	0,64	3,59 ^a	0,39	2,69	0,39	4,76 ^a	0,26	13,52	0,77						
BG	AA	52	14,20 ^C	4,35	3,79 ^a	0,78	3,21 ^A	0,43	2,35 ^A	0,38	4,63 ^A	0,33	12,52 ^A	1,01						
	AB	75	12,45 ^B	4,06	4,18 ^{ab}	1,07	3,54 ^B	0,51	2,44 ^B	0,39	4,59 ^A	0,41	13,05 ^B	1,40						
	BB	35	10,91 ^A	4,24	4,31 ^b	0,66	3,72 ^B	0,49	2,78 ^B	0,36	4,92 ^B	0,26	13,85 ^C	0,87						
Łącznie Total	AA	210	19,73 ^b	7,40	4,21 ^A	0,70	3,41 ^A	0,44	2,60 ^B	0,42	4,78 ^{ab}	0,26	12,97 ^A	1,02						
	AB	336	17,41 ^b	7,57	4,49 ^A	0,92	3,64 ^B	0,52	2,71 ^{ab}	0,44	4,73 ^a	0,29	13,60 ^A	1,30						
	BB	191	16,26 ^a	5,85	4,81 ^B	0,85	3,86 ^C	0,49	2,89 ^b	0,45	4,82 ^b	0,23	14,21 ^B	1,20						
Wpływ czynnika Influence of the factor	rasa – breed		***		***		***		***		**		***							
	genotyp – genotype		*		*		*		*		*		*							
	rasa x genotyp breed x genotype		**		ns		**		***		ns		**							

A, B, C – różnice istotne przy $p \leq 0,05$. Wpływ czynnika: * – przy $p \leq 0,05$; ** – przy $p \leq 0,01$; *** – przy $p \leq 0,001$; ns – nie stwierdzono
A, B, C – differences significant at $p \leq 0,05$; a, b – differences significant at $p \leq 0,01$; A, B, C – differences significant at $p \leq 0,001$; ns – not found
PHF HO – polska holsztyńska odmiana czarno-biała; RP – polska czerwoną – Jersey; JE – Jersey – Jersey – White Holstein-Friesian; BG – biało-grzbieta – White-backed

Barłowska i wsp. [5] oceniając populację krów rasy białogrzbietej stwierdzili, że frekwencja allelu B κ -CN kształtowała się na poziomie 0,35. O wysokiej frekwencji allelu B u krów ras lokalnych donoszą również Caroli i wsp. [11]. Analizując polimorfizm w obrębie genu CSN3 u lokalnej włoskiej rasy reggiana wykazali frekwencję allelu B na poziomie 0,51.

Z danych zawartych tabeli 3. wynika, że obecność allelu A BLG była związana z istotnie wyższą wydajnością dobową zwierząt ($p \leq 0,01$), zawartością białka ($p \leq 0,01$) i suchej masy ($p \leq 0,05$) w mleku. Krowy o genotypie AA BLG produkowały o 4,21 kg więcej mleka, o wyższej zawartości suchej masy (o 0,62 p.p.), w tym białka (o 0,28 p.p.), w porównaniu do homozygot BB BLG. Analiza wykonana w obrębie poszczególnych ras wykazała podobne zależności, aczkolwiek rzadko potwierdzone statystycznie. Zapewne wynikało to z mniejszej liczebności prób w poszczególnych grupach genetycznych. W przypadku wydajności dobowej różnice te zostały potwierdzone tylko u krów rasy holsztyńsko-fryzyskiej, a zawartości tłuszczu i suchej masy u rasy jersey. Wykazano również, że u krowy rasy jersey i białogrzbietej o genotypie BB BLG produkowały mleko o istotnie ($p \leq 0,05$) wyższej zawartości kazeiny w porównaniu do homozygot AA (odpowiednio o 0,14 i 0,16 p.p.).

W odniesieniu do genu CSN3 zwierzęta posiadające allel A również produkowały istotnie ($p \leq 0,05$) więcej mleka, jednak o niższej koncentracji składników suchej masy ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$) – tabela 4. Wykazano, że homozygoty BB produkowały o 2,9-4,32 kg mniej mleka, jednak o wyższej zawartości suchej masy (o 0,29-1,33 p.p.), w tym tłuszczu (o 0,12-0,52 p.p.) i białka (o 0,13-0,51 p.p.), w porównaniu do homozygot AA CSN3. Allel B CSN3 łączył się również z wyższą zawartością kazeiny w mleku. Zostało to jednak potwierdzone statystycznie tylko w przypadku dwóch ras, tj. holsztyńsko-fryzyskiej i białogrzbietej, gdzie zawartość tego składnika mleka była wyższa w porównaniu do homozygot AA CSN3, odpowiednio o 0,19 i 0,43 p.p.

Wykazano istotne interakcje w układzie rasa x genotyp BLG dla zawartości tłuszczu ($p \leq 0,01$) i suchej masy ($p \leq 0,05$) oraz w układzie rasa x genotyp CSN3 dla wydajności dobowej oraz zawartości białka i suchej masy ($p \leq 0,01$) – tabele 3. i 4.

Dane literaturowe dotyczące związku wariantów genetycznych β -laktoglobuliny z wydajnością mleka oraz jego składem chemicznym nie są jednoznaczne, a często wręcz sprzeczne. Miciński i Klupczyński [24] potwierdzają pozytywny związek genotypu AA BLG z wydajnością mleka. Odmiennie wyniki uzyskali Molina i wsp. [27], którzy stwierdzili, że z wyższą wydajnością mleka związany był genotyp AB BLG. Z kolei Ahmadi i wsp. [2] nie wykazali związku wariantów genetycznych BLG z wydajnością mleka w ocenianej populacji zwierząt. Poszukując związku wariantów genetycznych BLG z zawartością podstawowych składników mleka, wielu autorów łączy wariant B BLG z wyższą zawartością białka i tłuszczu [2, 12]. Molina i wsp. [27] oraz Heck i wsp. [16] wskazują natomiast na pozytywny związek wariantu A BLG z koncentracją białka ogólnego w mleku. Michalcova i wsp. [23] nie zaobserwowali związku pomiędzy polimorficznymi formami BLG a składem chemicznym mleka. Przyczyn znaczących rozbieżności w przytoczonych wynikach badań można się doszukiwać w nieaddytywnym współdziałaniu alleli z różnych *loci* lub być może są one wynikiem interakcji genotypów z czynnikami środowiska. Zdecydowana większość autorów łączy wyższą zawartość kazeiny z genotypem BB BLG. Różnica w zawartości tego składnika sięga ok. +0,1 p.p. w porównaniu do genotypu AA [9, 23].

Wyniki badań dotyczące związków wariantów genetycznych κ -kazeiny (CSN3) z cechami użytkowości mlecznej są bardziej spójne. W większości badań [2, 16] potwierdzono, że allel

A κ -kazeiny (zarówno w układzie homo-, jak i heterozygotycznym) związane jest z wyższą wydajnością mleka. Z kolei obecność allelu B łączona jest z wyższą zawartością białka (w tym kazeiny) w mleku, co czyni go lepszym surowcem w produkcji serowarskiej [4, 5, 8, 15, 34, 36]. Debeljak i wsp. [13], próbując wyjaśnić różnice pomiędzy allelami A i B, twierdzą, że prawdopodobnie dochodzi do regulacji ekspresji genu na poziomie potranslacyjnym. Heterozygoty AB wykazują różną syntezę obu alleli w gruczole mlekowym – więcej białka koduje allel B. Autorzy stwierdzili wyższy poziom mRNA dla allelu B CSN3, co może skutkować wyższą zawartością białka w mleku krów o genotypie BB CSN3. W większości badań wykazano związek polimorfizmu κ -kazeiny głównie z wydajnością mleka i zawartością w nim białka, a także z wydajnością i zawartością tłuszczu. Ahmadi i wsp. [2], poszukując zależności między wariantami genetycznymi κ -kazeiny a wydajnością i wskaźnikami jakościowymi mleka krów holsztyńsko-fryzyjskich, wykazali (podobnie jak w badaniach własnych), że homozygoty AA charakteryzowały się istotnie ($p \leq 0,05$) wyższą jego produkcją, ale o niższej zawartości białka. Podobnych zależności nie wykazano jednak dla zawartości tłuszczu. Z kolei Botaro i wsp. [8] nie stwierdzili związku pomiędzy występowaniem formy polimorficznej genu CSN3 a koncentracją składników suchej masy w mleku pochodzącym od brazylijskich holsztyno-fryzów. Jedynie w przypadku tłuszczu wykazano, że więcej tego składnika zawierało mleko heterozygot AB CSN3 w porównaniu do pozostałych genotypów (odpowiednio: 3,38 vs 3,25 i 3,14%). Również Barłowska i wsp. [5] nie wykazali zależności pomiędzy obecnością form polimorficznych genu CSN3 a składem chemicznym mleka krów rasy polskiej czerwonej. W odniesieniu do krów rasy białogrzbiętej stwierdzili natomiast istotnie ($p \leq 0,05$) wyższą zawartość białka w mleku pozyskanym od zwierząt o genotypach BB i AB CSN3 w porównaniu do AA (odpowiednio: 4,09 i 3,67 vs 3,34%).

Podsumowując można stwierdzić, że ocena polimorfizmu genów β -laktoglobuliny i κ -kazeiny wykazała znaczne zróżnicowanie genetyczne pomiędzy analizowanymi rasami krów. Wykazano również związek wariantów genetycznych tych białek z wydajnością dobową i koncentracją składników mleka. Obecność allelu A BLG była związana z wyższą wydajnością i zawartością tłuszczu i suchej masy w mleku. W odniesieniu do genu CSN3 obecność allelu B związana była z reguły z niższą wydajnością krów, przy jednocześnie wyższej zawartości w mleku suchej masy i białka, w tym kazeiny.

PIŚMIENNICTWO

1. AOAC, 2000 – Official Methods of Analysis. Casein Nitrogen Content of Milk. 998.06. *AOAC International* 32, 52.
2. AHMADI M., MOHAMMADI Y., DARMANI K U H I H., OSFOORI R., QANBARIS., 2008 – Association of milk protein genotypes with production traits and somatic cell count of Holstein cows. *Journal of Biological Sciences* 8, 7, 1231-1235.
3. ANGGRAENI A., SUMANTRI C., FARAJALLAH A., ANDREAS E., 2010 – Kappa-Casein Genotypic Frequencies in Holstein-Friesian Dairy Cattle in West Java Province. *Media Peternakan* 33, 2, 61-67.
4. AZEVEDO A.L.S., NASCIMENTO C.S., STEINBERG R.S., CARVALHO M.R.S., PEIXOTO M.G.C.D., TEODORO R.L., VERNEQUE R.S., GUIMARÃES S.E.F., MACHADO M.A., 2008 – Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research* 7, 3, 623-630.

5. BARŁOWSKA J., LITWIŃCZUK Z., KRÓL J., KĘDZIERSKA-MATYSEK M., 2007 – Relationship between β -lactoglobulin and κ -casein genetic variants and the selected indicators of technological usefulness of milk from polish red and whitebacked cows. *Annals of Animal Science* 1, 43-47.
6. BARŁOWSKA J., WOLANCIUK A., LITWIŃCZUK Z., KRÓL J., 2012 – Milk proteins' polymorphism in various species of animals associated with milk production utility W: Milk Protein (red. Walter L. Hurley), InTech – Open Access Publisher, Chapter 9, 235-264.
7. BITTANTE G., PENASA M., CECCHINATO A., 2012 – Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science* 95, 6843-6870.
8. BOTARO B.G., DE LIMA Y.V.R., CORTINHAS C.S., SILVA L.F.P., RENNO F.P., DOS SANTOS M.V., 2009 – Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38, 12, 2447-2454.
9. BUCHBERGER J., DOVC P., 2000 – Lactoprotein genetic variants in cattle and cheese making ability. *Food Technology and Biotechnology* 38, 2, 91-98.
10. CAROLI A.M., CHESSA S., ERHARDT G.J., 2009 – Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science* 92, 5335-5352 .
11. CAROLI A., CHESSA S., BOLLA P., BUDELLI E., GANDINI G.C., 2004 – Genetic structure of milk protein polymorphisms and effects on milk production traits in a local dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121, 119-127.
12. CELIK S., 2003 – β -lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. *International Dairy Journal* 13, 727-731.
13. DEBELJAK M., SUSNIK S., MARINSEK-LOGAR R., MEDRANO J.F., DOVC P., 2000 – Allelic differences in bovine kappa-CN gene which may regulate gene expression. *Pflügers Archiv* 439, R4-R6.
14. DOOSTI A., ARSHI A., VATANKHAH M., AMJADI P., 2011 – Kappa-casein gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *African Journal of Biotechnology* 10, 25, 4957-4960.
15. FELEŃCZAK A., FERTIG A., GARDZINA E., ORMIAN M., TRELA J., 2006 – Technological traits of milk of simmental cows as related to κ -casein polymorphism. *Annals of Animal Science* 6, 1, 37-43.
16. HECK J.M.L., SCHENNINK A., VAN VALENBERG H.J.F., BOVENHUIS H., VISKER M.H.P.W., VAN ARENDONK J.A.M., VAN HOOIJDONK A.C.M., 2009 – Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science* 92, 1192-1202.
17. HEIDARI M., AZARI M.A., HASANI S., KHANAHMADI A., ZEREHDARAN S., 2009 – Association of genetic variants of β -lactoglobulin gene with milk production in a herd and a superior family of Holstein cattle. *Iranian Journal of Biotechnology* 7, 4, 254-257.
18. JANN O.C., IBEAGHA-AWEMU E. M., ÖZBEYAZ C., ZARAGOZA P., WILLIAMS J. L., AJMONE-MARSAN P., LENSTRA J. A., MOAZAMI GOUDARZI K., ERHARDT G., 2004 – Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. *Genetics Selection Evolution* 36, 243-257.

19. KUČEROVA J., MATĚJČEK A., JANDUROVA O.M., SORENSEN P., NĚMCOVA E., ŠTIPKOVA M., KOTT T., BOUŠKA J., FRELICH J., 2006 – Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science* 51, 6, 241-247.
20. LITWIŃCZUK Z. (red.), 2011 – Ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich i dziko żyjących. Powszechnie Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, ss. 295.
21. MEDRANO J.F., AGUILAR-CORDOVA E., 1990 – Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology* 59, 180-182.
22. MEDRANO J.F., AGUILAR-CORDOVA E., 1990 – Genotyping of bovine kappa-casein *loci* following DNA sequence amplification. *BioTechnology* 8, 144-146.
23. MICHALCOVA A., KRUPOVA Z., BULLA J., 2009 – β -lactoglobulin genetic variants in Simmental breed and its association with compositional properties and rennetability of milk. *Prace i Materiały Zootechniczne* 67, 13-17.
24. MICIŃSKI J., KLUPCZYŃSKI J., 2006 – Correlations between polymorphic variants of milk proteins, and milk yield and chemical composition in Black-and-White and Jersey cows. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* 15, 56, 137-143.
25. MOHAMMADI Y., ASLAMINEJAD A.A., NASSIRI M.R., KOSHKOEI A.E., 2013 – Allelic polymorphism of κ -casein, β -lactoglobulin and leptin genes and their association with milk production traits in Iranian Holstein cattle. *Journal of Cell and Molecular Research* 5, 2, 75-80.
26. MOLEE A., BOONEK L., RUNGSAKINNIN N., 2011 – The effect of beta and kappa casein genes on milk yield and milk composition in different percentages of Holstein in crossbred dairy cattle. *Animal Science Journal* 82, 512-516.
27. MOLINA L.H., KRAMM J., BRITO C., CARRILLO B., PINTO M., FERRANDO A., 2006 – Protein composition of milk from Holstein-Friesian dairy cows and its relationship with the genetic variants A and B of κ -casein and β -lactoglobulin (Part I). *International Journal of Dairy Technology* 56, 3, 183-187.
28. ONER Y., ELMACI C., 2006 – Milk protein polymorphisms in Holstein cattle. *International Journal of Dairy Technology* 59, 3, 180-182.
29. OTAVIANO A.R., TONHATI H., SENA J.A.D., MUNOZ M.F.C., 2005 – Kappa-casein gene study with molecular markers in female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Genetics and Molecular Biology* 28, 2, 237-241.
30. POULSEN N.A., BERTELSEN H.P., JENSEN H.B., GUSTAVSSON F., GLANTZ M., LINDMARK MÅNSSON H., ANDRÉN A., PAULSSON M., BENDIXEN C., BUITENHUIS A.J., LARSEN L.B., 2013 – The occurrence of noncoagulating milk and the association of bovine milk coagulation properties with genetic variants of the caseins in 3 Scandinavian dairy breeds. *Journal of Dairy Science* 96, 4830-4842.
31. REN D., CHEN B., CHEN Y., MIAO S., LIU J., 2013 – The effects of κ -casein polymorphism on the texture and functional properties of mozzarella cheese. *International Dairy Journal* 31, 65-69.
32. REN D.X., MIAO S.Y., CHEN Y.L., ZOU C.X., LIANG X.W., LIU J.X., 2011 – Genotyping of the κ -casein and β -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP. *Journal of Genetics* 90, 1, 1-5.

33. SKRZYPEK R., 1994 – Jersey: Status & Perspectives. *World Jersey Cattle Bureau* 1, 3.
34. SULIMOVA G. E., AHANI AZARI M., ROSTAMZADEH J., MOHAMMAD ABADI M.R., LAZEBNY O.E., 2007 – κ -casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. *Russian Journal of Genetics* 43, 1, 73-79.
35. TAYLOR J.R., 1995 – Wstęp do analizy błędu pomiarowego. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
36. TSIARAS A.M., BARGOULI G.G., BANOS G., BOSCO C.M., 2005 – Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin *loci* on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 88, 327-334.
37. VÄRV S., BELOUSOVA A., SILD E., VIINALASS H., 2009 – Genetic diversity in milk proteins among Estonian dairy cattle. *Veterinary Medicine and Zootechnics* 48, 70, 93-98.
38. ZATOŃ-DOBROWOLSKA M., ČITEK J., FILISTOWICZ A., ŘEHOUT V., SZULC T., 2007 – Genetic distance between the Polish Red, Czech Red and German Red cattle estimated based on selected loci of protein coding genes and DNA microsatellite sequences. *Animal Science Papers and Reports* 25, 1, 45-54.

Anna Wolanciuk

The association of genetic variants of β -lactoglobulin and κ -casein with yield and chemical composition of milk obtained from four breeds of cow

Summary

The aim of the study was to determine κ -casein and β -lactoglobulin polymorphism in cows of four breeds, including two pure dairy breeds (Polish Black-and-White Holstein-Friesian and Jersey) and two local breeds (Polish Red and White-backed) and to evaluate the relationships between the genetic variants of these fractions, yield and chemical milk composition. Two β -lactoglobulin alleles (A and B) were identified in the breeds studied. Allele B was clearly dominant in the Polish Red cows (0.73), while in the Jersey breed a higher frequency of allele A was observed (0.62). The proportion of alleles A and B in the Polish Holstein-Friesian and White-backed cows was close to 1:1. Two alleles (A and B) were also identified for κ -casein. The frequency of allele B was highest in the Jersey cows (0.74), and relatively high in the local breeds, i.e. Polish Red and White-backed (above 0.4). The frequency of this allele was considerably lower in the Holstein-Friesians (0.28). The presence of the allele A BLG was associated with significantly higher milk yield ($p \leq 0.01$), protein content ($p \leq 0.01$) and dry matter ($p \leq 0.05$) content. Cows with the AA BLG genotype produced 4.21 kg more milk with higher content of dry matter (by 0.62 p.p.), including protein (by 0.28 p.p.), compared with the BB BLG homozygotes. Cows with allele A of the CSN3 gene also produced significantly more milk ($p \leq 0.05$), but with lower concentration of dry matter ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$). The BB homozygotes produced 2.9-4.32 kg less milk, but with higher dry matter content (by 0.29-1.33 p.p.), including fat (by 0.12-0.52 p.p.) and protein (by 0.13-0.51 p.p.), compared with the AA CSN3 homozygotes. Allele B CSN3 was also linked to higher casein content in the milk.

KEY WORDS: cow breed / polymorphism of β -lactoglobulin (BLG) and κ -casein (CSN3) / milk composition