

POLIMORFIZEM GENOV ZA β -LAKTOGLOBULIN IN α_{S1} -KAZEIN PAŠKE OVCE *

Ante IVANKOVIĆ^{a)} in Peter DOVČ^{b)}

^{a)} Univ. v Zagrebu, Agronomski fak., Odd. za živinorejo, Svetošimunska 25, HR-10000 Zagreb, Hrvatska, doc., dr.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof., dr.

Delo je prispelo 12. januarja 2004, sprejeto 10. decembra 2004.

Received January 12, 2004, accepted December 10, 2004.

IZVLEČEK

Polimorfizmi genov, ki kodirajo proteine mleka imajo pogosto pomembem vpliv na tehnološke lastnosti mleka. Čeprav so podatki o vplivu alelnih variant laktoproteinskih genov na tehnološke lastnosti mleka pogosto kontradiktorni, v selekcijske vse pogosteje vključujejo tudi informacije o genotipu na laktoproteinskih lokusih, da bi v populacijah povečali frekvenco alel z ugodnim učinkom na tehnološke lastnosti mleka. Glavni proizvod paške ovce je mleko, ki ga večinoma predelajo v paški sir. Izboljšanje tehnoloških lastnosti mleka te pasme bi bistveno pripomoglo k večji ekonomičnosti reje te pasme. Z namenom, da bi ugotovili frekvenco alelov laktoproteinskih genov, ki pomembno vplivajo na predelovalne lastnosti ovčjega mleka, smo v tej raziskavi tipizirali gena za β -laktoglobulin in α_{S1} -kazein štiridesetih živali. Genotipizacijo smo izvedli s pomnoževanjem delov obeh genov z verižno reakcijo s polimerazo in estrikcijo amplifikatov z ustreznimi endonukleazami. Na lokusu za β -laktoglobulina smo našli alela A in B (0,5375; 0,4625), na lokusu za α_{S1} -kazein pa smo določali aleli A in D (0,0875; 0,1340). Glede na podatke v literaturi lahko rečemo, da frekvence alel za β -laktoglobulin in α_{S1} -kazein v populaciji paške ovce niso najugodnejše in da bi z uporabo molekularnih metod frekvenco alel z ugodnimi tehnološkimi lastnostmi lahko sorazmerno hitro povečali. To bi vodilo k izboljšanju ekonomičnosti reje te pasme, katere edini tržno uveljavljeni produkt je paški sir.

Ključne besede: ovce / pasme / paška ovca / mleko / laktoglobulini / kazein / molekularna genetika / polimorfizem genov / Hrvaška

POLYMORPHISMS OF β -LACTOGLOBULIN AND α_{S1} -CASEIN GENES IN THE PAG ISLAND SHEEP †

ABSTRACT

Polymorphisms of lactoprotein genes have a significant effect on technological properties of milk. In spite of the fact that literature data on the impact of lactoprotein variants on cheese making properties are sometimes contradictory, the information about the lactoprotein genotypes becomes important in selection programs in order to improve frequency of favourable alleles for technological properties of milk. The main product of the Pag Island Sheep is milk, which is mainly used for manufacturing of well known Pag Cheese. The improvement of cheese making properties of the Pag Island Sheep milk would contribute significantly to the rentability of the breed. In order to estimate the frequency of alleles contributing to technological properties of milk, we genotyped β -lactoglobulin and α_{S1} -casein loci of 40 Pag Island Sheep. Genotyping was performed using PCR followed by restriction analysis. At the β -lactoglobulin locus alleles A and B (0.5375; 0.4625) were found whereas at the α_{S1} -casein locus genotyping of alleles A in D

* Prispevek je del doktorske disertacije (zagovor 16. marca 2001), mentor izr. prof.dr. Peter Dovč.

† This paper is a part of a dissertation thesis (defense March 16, 2001) supervisor assoc.prof. Peter Dovč, Ph.D.

(0.0875; 0.1340) was performed. According to the literature data, we can conclude that allele frequencies at β -lactoglobulin and α_{s1} -casein locus in the population of Pag Island Sheep are not optimal for cheese making properties of milk. Application of molecular techniques would enable relatively rapid improvement of allelic frequencies towards technologically favourable alleles. This would also improve economical parameters of milk production with Pag Island Sheep breed, which is only known for special Pag cheese.

Key words: sheep / breeds / Pag island sheep / milk / lactoglobulins / casein / molecular genetics / gene polymorphism / Croatia

UVOD

Mleko ovac predstavlja kakovosten vir energije in beljakovin. Ima znatno višjo vsebnost suhe snovi kot kravje mleko. Delež mlečne masti v suhi snovi ovčjega mleka znaša 38,6 %; beljakovin 31,2 %; laktoze 25,1 % in pepela 5,1 %. Kravje mleko ima v primerjavi z ovčjim manj mlečne maščobe (30,8 %), manj proteinov (25,7 %), več laktoze (37,8 %) in več pepela (5,7 %) (Anifantakis, 1985). Mleko ovac vsebuje znatno več (23 %) nižjih maščobnih kislin (kaprilna, kaprinska, laurinska) kot mleko krav (12 %), kar mu daje specifičen okus. Skupna količina beljakovin in njihovo razmerje, sta v mleku ovac bistveno drugačna kot v mleku krav. Delež kazeina v skupnih beljakovinah mleka znaša podobno kot pri kravjem mleku 75-80 %, delež serumskih proteinov pa 20–25 %, zaradi česar ovčje mleko opredelimo kot kazeinsko mleko. Zaradi relativno velikega deleža proteinov mlečnega seruma, pa sirotko uporabljamo tudi za proizvodnjo albuminskih sirov.

Mleko ovac vsebuje, tako kot mleko drugih sesalcev, beljakovine, ki so deloma raztopljene v mleku, deloma pa so prisotne v obliki polidisperznih agregatov – micel. Proteine v ovčjem mleku razvrstimo v dve glavni skupini: kazeine (α_{s1} , α_{s2} , κ , β) in proteine sirotke (α -laktalbumin, β -laktoglobulin). Razmerje med glavnimi kazeinskimi frakcijami v ovčjem mleku je: $\alpha_s:\kappa:\beta = 30:47:7$ (Manfredini in Massari, 1989). Razmerje kazeinov odloča o koagulacijskih lastnostih mleka, zaradi česar ovčje mleko koagulira 1,56 krat hitreje kot kravje mleko, čvrstost sirarskega zrna pa je dvakrat večja. Kazeini se v mleku nahajajo v obliki kazeinskih micel s premerom 20–600 nm, za ohranjanje micel pa je odgovoren κ kazein. Za strukturo kazeinskih molekul so pomembne hidrofobne, vodikove, disulfidne in elektrostatične vezi. Primarna struktura kazeinov je definirana z aminokislinskim zaporedjem in s specifičnimi mesti za post translacijske modifikacije (predvesm fosforilacija in glikozilacija). Na velikost in čvrstost micel pomembno vplivajo polimorfizmi v aminokislinskem zaporedju κ kazeina. Prisi in sod. (1999b) ob primerjavi alelnih variant D in C α_{s1} CN opaža, da imajo največji premer micela mleka z genotipom DD, najmanjši pa micela mleka z genotipom CC.

V teku evolucije, se je v laktoproteinskih genih pojavilo večje število mutacij, ki danes opredeljujejo različne alelne variante laktoproteinskih genov. Pogostnost pojavljanja različnih alelnih tipov se med pasmami razlikuje in zato lahko frekvence alel laktoproteinskih genov uporabljamo kot genetski marker za razlikovanje med pasmami. Opažanja, da so nekatere alelne variante polimorfni laktoproteinov povezane z boljšo izkoristljivostjo mleka v tehnoloških postopkih, še posebej pri proizvodnji sira, so spodbudila raziskovanje polimorfizma laktoproteinov pri ovcah (King, 1969; Shalichev in Tanev, 1972; Arave in sod., 1973; Chianese in sod., 1992). Za večino polimorfizmov so značilne razlike v aminokislinskem zaporedju (Kolde in Braunitzer, 1983; Ferranti in sod., 1995). Razvoj tehnologije rekombinantne DNA in uvedba verižne reakcije s polimerazo (PCR) pa sta omogočila hitro in enostavno genotipizacijo alelnih variant na ravni DNK (Schlee in sod., 1993; Ramunno in sod., 1997; Feligini in sod., 1998; Pilla in sod., 1998; Prinzenberg in Erhardt, 1999). Ti postopki niso odvisni od spola osebka, fiziološkega stanja in okoljskih dejavnikov, tako da danes alelne variante laktoproteinskih genov lahko identificiramo tudi pri moških živalih takoj po rojstvu.

Beta laktoglobulin (β -LG), glavni protein sirotke, je sestavljen iz zaporedja 162 aminokislin. V mleku se nahaja v obliki stabilnega dimera. Za prežvekovalce je značilen en sam lokus, ki kodira različne alele β -LG, medtem ko pri neprežvekovalcih lahko najdemo dva (konj), pri mačkah celo tri lokuse za β -LG (β -LG I, β -LG II in β -LG III). V ovčjem mleku lahko najdemo tri alelne variante β -LG (A, B in C). Varianta A se od variante B razlikuje po aminokislinski substituciji Tyr²⁰→His²⁰ (Kolde in Braunitzer, 1983), razliko med variantama A in C pa opredeljuje aminokislinska substitucija Arg¹⁴⁸→Gln¹⁴⁸ (Erhardt in sod., 1989). Alel C so našli predvsem v nemški, madžarski in španski populaciji merino ovac (Erhardt in sod., 1989).

Za alfa-s1 kazein (α_{s1} -CN) ovce je znanih pet alelnih variant, ki jih označujemo s črkami A, B, C, D (Ferranti in sod., 1995) in E (Chianese in sod., 1996). Slednjo so našli le pri italijanskih pasmah ovac. V ovčjem mleku je za α_{s1} -CN značilen dolžinski polimorfizem: dolgo varianto tvori 199 aminokislin in predstavlja $\approx 80\%$ α_{s1} -CN, krajšo pa tvori 191 aminokislin in se od dolge variante razlikuje po deleciji med aminokisljinami 141 in 148 (Ferranti in sod., 1995). Varianta C se od variante A razlikuje po substituciji Ser¹³→Pro¹³ kar povzroča tudi izgubo fosforilacijskega mesta na poziciji 12 v proteinski verigi, SerP¹²→Ser¹² (Ferranti in sod., 1995). Za varianto D je značilna substitucija SerP⁶⁸→Asn⁶⁸ kar povzroča eliminacijo fosforilacijskih mest na pozicijah Ser⁶⁴ in Ser⁶⁶, prav tako pri tej varianti Ser⁴¹ ni fosforiliran (Ferranti in sod., 1995). Varianta E, ki so jo odkrili pri nekaterih italijanskih pasmah ovac še ni podrobno proučena (Chianese in sod., 1996).

Navedbe o povezavi med različnimi alelnimi variantami β -LG ter kakovostjo in količino mleka, učinkovitostjo proizvodnje sira in drugimi tehnološkimi lastnostmi, so pogosto kontradiktorne. Nekateri raziskave (Bolla in sod., 1989; Garzon in Martinez, 1992; Portolano in sod., 1996) kažejo na ugoden vpliv alelne variante β -LG B na vsebnost proteinov v mleku, ne pa tudi na sirarski izplen. Anton s sod. (1998) ni ugotovil povezave med β -LG B in prej navedenimi lastnostmi mleka. Prisi in sod. (1999a) so ugotovil, da ima mleko ovac z genotipom β -LG AA več suhe snovi in masti kot mleko z genotipom β -LG AB ($P < 0.01$). Mleko genotipa AB ima primernejše razmerje med kazeinom in mlečno maščobo ($P < 0.01$) kot varianta AA. Kukovics s sod. (1999b) je potrdil značilno povezavo med genotipom β -LG in sestavo mleka. Prisi in sod. (1999a) so ugotovili, da je količina proizvedenega sira iz kilograma mleka največja pri genotipu AA ($P < 0.01$), srednja pri genotipu BB ($P < 0.01$), ter najmanjša pri genotipu AB. Moioli s sod. (1995) ugotavlja, da ima alelna varianta β -LG A pozitiven učinek na tehnološke lastnosti mleka, medtem ko varianta β -LG B pozitivno vpliva na količino mleka. Kukovics s sod. (1999a) je ugotovil, da je v sirarstvu najprimernejši genotip β -LG BB. Kukovics s sod. (1999c) opaža močno povezavo genotipa β -LG s številom somatskih celic v mleku, pomemben vpliv na to lastnost pa ima tudi pasma.

V številnih poskusih so proučevali povezavo med genetskimi variantami α_{s1} -CN in β -LG ter kvantitativnimi in kvalitativnimi lastnostmi mleka, ki so pomembne v predelavi mleka, posebno v sirarski proizvodnji. Bolla in sod. (1989) je ugotovil da je varianta α_{s1} -CN D povezana z nižjo vsebnostjo mlečne maščobe in beljakovin v mleku, medtem ko je Piredda s sod. (1993) ugotovil povezavo iste variante z nizkim deležem kazeina v mleku ter slabimi koagulacijskimi sposobnostmi. Prisi in sod. (1999b) so ugotovili, da ima mleko z genotipom α_{s1} -CN CC večji delež kazeina kot mleko z genotipoma CD in DD. Alelna varianta CC ima širše razmerje med beljakovinami in mlečno maščobo ter manjši premer kazeinskih micel. Najpomembnejše so razlike med genotipi v procesu sirjenja (Prisi in sod., 1995; Prisi in sod., 1999b); mleko z genotipom α_{s1} -CN CC je zaradi boljših tehnoloških lastnosti primernejše za predelavo (hitrost sirjenja, čvrstost sirarskega zrna, izplen pri proizvodnji sira) kot mleko genotipa DD, medtem ko je mleko genotipa CD po tehnoloških lastnostih med variantama CC in DD.

Otok Pag, s površino 294 km², je bil stoletja prebivališče posebne pasme ovac, ki se je odlikovala po dobri prilagojenosti okoljskim razmeram na tem otoku in je po njem dobila tudi ime 'paška ovca'. Klimatski in ekološki pogoji na otoku, skromna prehrana, pomanjkanje vode in zavetij pred vetrom, so oblikovali paško ovco v skromno, vzdržljivo in odporno žival. Do sredine XIX. stoletja paške ovce niso oplemenjevali z drugimi, produktivnejšimi pasmami. Merinizacija ovac na otoku Pagu se je pričela leta 1870 z uvozom 'Merino Negretti' ovnov in ustanovitvijo 'vzorčnih čred' ki so bile namenjene izboljšanju proizvodnih lastnosti (Pavlinić, 1936). Cilj križanja je bilo izboljšanje kakovosti volne in povečanje telesnega okvirja. Rezultat oplemenjevanja z Merino Negretti ovni, kasneje pa tudi z bergamaško ovco, se je odražal samo v izboljšani kvaliteti volne, medtem ko sta mlečnost in velikost telesnega okvirja ostali na prejšnji ravni (Jardas, 1951). Danes so na zunanosti paške ovce opazni sledovi bergamaške kot tudi Merino Negretti pasme.

Paška ovca je skladne telesne zgradbe in srednje velikega formata. Večina ovac je bele barve, pojav črnih ali pigmentiranih živali je dokaj redek. Glava je srednje velika, ravnega nosnega profila, medtem ko je pri ovnih profil lahko rahlo konveksen. Ovce so praviloma brez rogov, medtem ko imajo ovni dobro razvite rogove. Greben je izražen, hrbtina linija je pravilna, rep je dolg. Paška ovca ima čvrste in močne noge s pravilnimi parklji. Telo ovce je pokrito z zaprtim do polzaprtim runom mešane volne, na kateri je opazna sled merinizacije. Velikost populacije paške ovce znaša okoli 25.000 živali. Stanje populacije je stabilno, ker je reja te pasme donosna, predvsem zaradi predelave mleka v sir (Paški sir) in prireje mesa (Paška jagnjetina).

Detekcija alelnih variant proteinov mleka

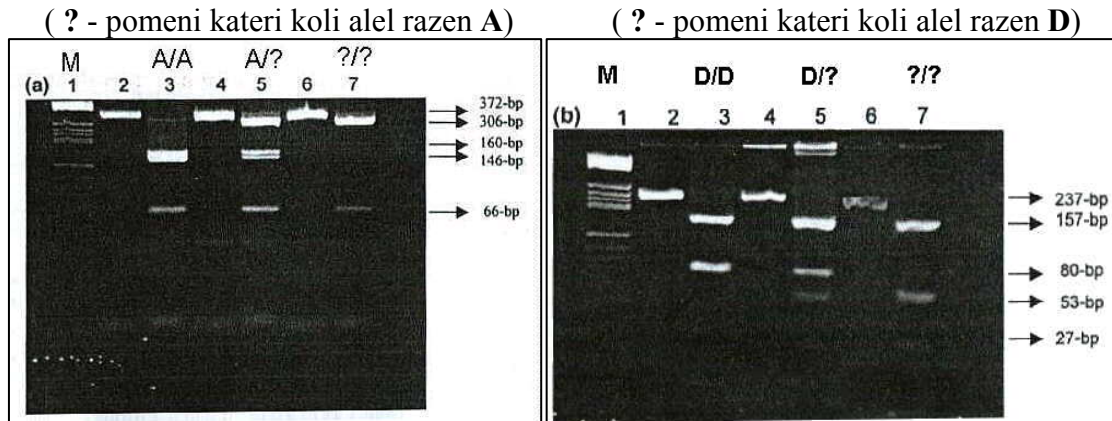
Alelne variante proteinov mleka so odkrili z visoko ločljivimi elektroforetskimi tehnikami, ob uporabi različnih metod za izolacijo proteinov iz mleka. Velika pomanjkljivost rutinske tipizacije na ravni beljakovin je bila nezmožnost direktnega tipiziranja plemenjakov, kar je oteževalo selekcijo. Razvoj PCR metodologije je omogočil določanje genotipov živali ne oziraje se na spol, starost in fiziološko stanje živali.

Schlee s sod. (1993) je opisal možnost za tipizacijo alelnih variant A in B β -LG z uporabo PCR metodologije. Prvi korak je amplifikacija 236 bp dolge regije, ki vsebuje del introna I in ekson II gena za β -LG pri ovci z uporabo ustreznih začetnih oligonukleotidov (OLG1, OLG2). Sledi restrikcija fragmenta z endonukleazo *RsaI*. Homozigote AA prepoznamo po fragmentih velikosti 148 in 66 bp, homozigote BB po fragmentu velikosti 214, heterozigote pa po treh fragmentih (214, 148 in 66 bp).

Feligini s sod. (1998) je za razlikovanje med variantama β -LG A in B uporabil mutacijo (T \leftrightarrow C) znotraj eksona II. Z uporabo ustreznih začetnih oligonukleotidov (LBG1, LBG2) je amplificiral 120 bp dolgo zaporedje, znotraj katerega se nahaja mutacijsko mesto, ki je hkrati tudi restrikcijsko mesto za *RsaI* pri varianti A. Tako *RsaI* cepi PCR fragment alelne variante β -LG A na tri fragmente (66, 37 in 17 bp), medtem ko da PCR fragment variante β -LG B po cepitvi le dva fragmenta (103 in 17bp). Kratek fragment, dolg 17 bp, se pojavlja v obeh alelnih variantah, kar predstavlja kontrolo delovanja restrikcijskega encima. Razen dveh glavnih alelnih variant (β -LG A in β -LG B) se precej redkeje pojavlja še tretja alelna varianta β -LG C. Prinzenberg in Erhardt (1999) sta uvedla metodo, ki omogoča PCR identifikacijo variante β -LG C. Najprej je treba pomnožiti 245 bp dolg fragment, ki vsebuje ekson V in intron V (nukleotidno mesto 4589-4834), nakar sledi cepitev produkta z endonukleazama *MspI* ali *AluI*.

Tudi za identifikacijo alelnih variant α_{s1} -CN so na voljo postopki, ki temeljijo na uporabi PCR metodologije. Ramunno s sod. (1997) je prvi opisal možnost določanja 'Welsh' variante α_{s1} -CN ovac na ravni DNA. Način za določanje variant A in D α_{s1} -CN pri ovcah pa je opisal Pilla s sod. (1998). Identifikacija A variante α_{s1} -CN temelji na amplifikaciji 372 bp dolgega fragmenta

gena za α_{s1} -CN ki vsebuje polimorfni ekson III. Sledi restrikcija z *Mbo*II in določitev genotipa na elektroforeznem gelu. Za homozigote A/A so značilni trije fragmenti (160, 146 in 66 bp), za heterozigote A/ne-A štiri (306, 160, 146 in 66 bp), homozigot brez alelna variante A pa daje dva fragmenta (306 in 66 bp).



Slika 1. Identifikacija alelna variante α_{s1} -CN A in α_{s1} -CN D (Pilla in sod., 1998).
Figure 1. Genotyping of the ovine α_{s1} -CN A and α_{s1} -CN D (Pilla *et al.*, 1998).

Varianto α_{s1} -CN D lahko določimo s pomočjo 237 bp dolgega fragmenta, ki vsebuje polimorfni ekson IX. Amplificiran fragment gena je treba cepiti z *Mae*III, nakar lahko elektroforetsko določimo genotipe. Homozigot D/D prepoznamo po dveh fragmentih (157 in 80 bp), heterozigot D/ne-D po štirih fragmentih (157, 80, 53 in 27 bp), homozigot brez alelna variante D pa po treh fragmentih (157, 53 in 27 bp).

MATERIAL IN METODE DE LA

V juniju 1999 leta smo zbrali 40 krvnih vzorcev paške ovce. Jedrno DNA smo izolirali po standardni metodi (Ausubel in sod., 1987). V reagenčno posodico z 200 μ l krvi smo dodali 800 μ l TE pufru, pretresli, centrifugirali 30 s pri 20.000 x g, odlili supernatant ter postopek še dvakrat ponovili. V reagenčno posodico smo dodali 200 μ l pufru za lizo celic in 8 μ l proteinaze K, sledila je inkubacija v vodni kopeli na 58 $^{\circ}$ C (dve uri). Po inkubaciji je sledila ekstrakcija z 220 μ l PCI (fenol:kloroform:izoamilalkohol v razmerju 25:24:1), centrifugiranje pri 20000 x g (10 min), nato smo odpipetirali zgornjo fazo v novo reagenčno posodico. Dodali smo 150 μ l mešanice kloroforma in izoamilalkohola (razmerje 24:1), centrifugirali pri 20000 x g 10 min in zgornjo fazo odpipetirali v novo reagenčno posodico. Po dodatku 2,5 volumna 96 % etanola (ohlajenega na -20 $^{\circ}$ C) smo vzorce shranili čez noč na -20 $^{\circ}$ C. Nato smo vzorce centrifugirali pri 20000 x g (10 min), odlili supernatant, dodali 100 μ l 70 % etanola (ohlajenega na -20 $^{\circ}$ C) ter centrifugirali (1 min/20000xg). Postopek smo ponovili. Nato smo odpipetirali etanol, posušili pelet do voskaste konzistence ter ga raztopili v 30 μ l Milli Q vode in shranili na 4 $^{\circ}$ C.

Uspešnost izolacije DNK smo preverili na 1 % gelu v 1xTBE puferu (20 minut / 120V). Na gel smo nanесли 2 μ l aplikacijskega pufru in 1,5 μ l raztopljenе DNK.

PCR-RFLP analiza polimorfizmov genov za α_{s1} kazein in β -laktoglobulin

Z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v verižni reakciji s polimerazo smo pomnožili fragmente kodogenih regij laktoproteinskih genov ki kodirajo α_{s1} -CN in β -LG.

Začetni oligonukleotidi so navedeni v preglednici 1, prav tako tudi temperatura prileganja (T_A °C) in koncentracija $MgCl_2$.

Tako dobljene PCR produkte smo cepili z ustreznimi restrikcijskimi endonukleazami. V preglednici 2 so navedeni uporabljeni restrikcijski encimi in njihova cepitvena mesta.

Preglednica 1. Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za amplifikacijo dela genov α_{s1} -CN in β -LG paške ovce

Table 1. The primers used for amplification of α_{s1} -CN and β -LG gene fragments in Pag island sheep

Začetni oligonukleotidi Primers		Nukleotidna zaporedja zečetnih oligonukleotidov Nucleotide sequence primers	T_A °C	$MgCl_2$	Referenca Reference
β -LG	LBG 1	5'-CAACTCAAGGTCCTCTCCA-3'	54 °C	2,0 mM	(Feligini in sod., 1998)
	LBG 2	5'-CTTCAGCTCCTCCACGTACA-3'			
α_{s1} -CN	AS1-1	5'-GGTGTCAAATTTAGCTGTTAAA-3'	53 °C	1,5 mM	(Pilla in sod., 1998)
	AS1-2	5'-GCCCTCTTCTCTAAAAAGGTTT-3'			
	AS1-3	5'-CAACATATTTTAAATAAATTGACAAT-3'			
	AS1-4	5'-AATTAACATAAAAAATGGCATAACGTC-3'			

Pri določanju variant β -LG smo inkubirali 15 μ l PCR produkta 3 ure, na 37 °C s 25 enotami restrikcijske endonukleaze *RsaI*. Pri določanju variant α_{s1} -CN smo inkubirali 15 μ l PCR produkta 3 ure, na 37 °C z restrikcijsko endonukleazo *MboII* (alel A) in z restrikcijsko endonukleazo *MaeIII* (alel D). Rezultate encimatske cepitve smo analizirali na 3 % agaroznem gelu, skupaj z velikostnim standardom (100 bp DNA Ladder, Gibco BRL).

Preglednica 2. Restrikcijske endonukleaze uporabljene za detekcijo alel α_{s1} -CN in β -LG

Table 2. The restriction enzyme used for detection of α_{s1} -CN and β -LG alleles

Restrikcijska endonukleaza Restriction enzyme		Cepitveno mesto Restriction site
<i>MaeIII</i>	BOEHRINGER MANNHEIM GmbH	\downarrow GTNAC CANTG \uparrow
<i>MboII</i>	PROMEGA	GAAGA (N) \downarrow CTTCT (N) \uparrow
<i>RsaI</i>	PROMEGA	GT \downarrow AC CA \uparrow TG

Frekvence alelnih variant, opaženo (H_o) in pričakovano heterozigotnost (H_e), informativno vrednost lokusa (PIC), verjetnost izključitve napačnega roditelja (E_p) in oceno frekvenc ničelnih alelov (F_e) smo izračunali s programskim paketom CERVUS (Marshall in sod., 1998).

REZULTATI IN DISKUSIJA

Z metodo PCR-RFLP smo izvedli genotipizacijo 40 ovac na lokusih za β -LG i α_{s1} -CN. Rezultati analize obeh lokusov so prikazani v preglednici 3.

V našem sistemu smo identificirali dve alelni varianti β -LG, A in B. Našli smo devet homozigotov AA, 25 heterozigotov AB in šest homozigotov BB. Alelne variante β -LG C nismo

našli v proučevanem vzorcu. Testiranje distribucije genotipov ($\chi^2 = 1,71$) kaže, da opazovane frekvence ne odstopajo značilno od pričakovanih frekvenc.

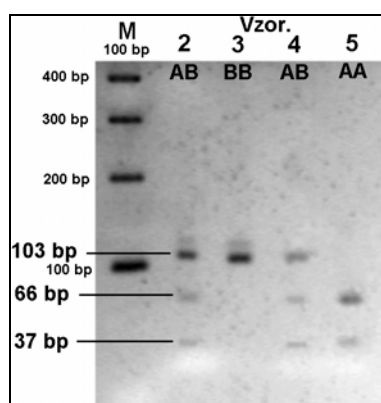
Genotip AA smo identificirali po fragmentih dolžine 66, 37 in 17 bp, genotip AB po fragmentih 103, 66, 37 in 17 bp, genotip BB pa po fragmentih 103 in 17 bp. Na sliki 2 je prikazanih nekaj genotipov vzorcev paške ovce.

Preglednica 3. Porazdelitev frekvenc genotipova i alela laktoproteina β -LG i α_{s1} -CN paške ovce (opazovana heterozigotnost, Ho; pričakovana heterozigotnost, He; informativna vrednost lokusov, PIC; verjetnost izključitve, Ep; ocena frekvence ničelnih alel, Fe)

Table 3. Distribution of β -LG and α_{s1} CN genotypes and gene frequencies of Pag sheep (observed heterozygosity, Ho; expected heterozygosity, He; polymorphism information content, PIC; exclusion probability, Ep; estimate null allele frequency, Fe)

	Genotip Genotyp	Alel Allele	Ho	He	PIC	Ep	Fe	
β -LG	AA 9	A	0,625	0,503	0,374	0,187	-0,1139	
	AB 25	0,5375 \pm 0,0557						
	BB 6	B						0,4625
α_{s1} -CN	AA 1	A	0,350	0,361	0,327	0,185	+0,0119	
	AD 1	0,0875 \pm 0,0447						
	A- 4	D						0,1250 \pm 0,0523
	D- 9	-						0,7875 \pm 0,0647
	-- 25							

$^{-}$ = alelne variante B, C in E na lokusu za α_{s1} -CN / $^{-}$ = allelic variants B, C and E at α_{s1} -CN locus



Slika 2. Genotipi β -LG štirih vzorcev paške ovce.

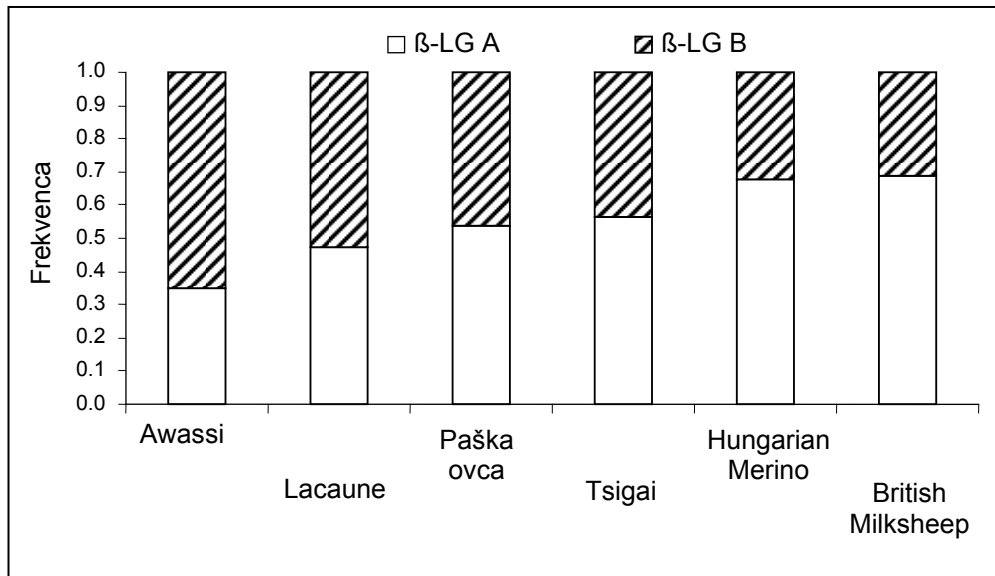
Figure 2. Genotypes at the β -LG locus of the four Pag island sheep.

Z metodo PCR-RFLP smo določili frekvence alelnih variant α_{s1} -CN A in D v populaciji paške ovce. Pri 15 od 40 testiranih ovac smo našli alelne variante α_{s1} -CN (A in D), v preostalih 25 vzorcih pa ti dve varianti nista bili navzoči. V vzorcu smo našli 14 heterozigotnih živali in eno homozigotno AA žival. Najpogosteje zastopan heterozigot je genotip D-ki se je pojavil pri devetih vzorcih, sledi mu A-pri štirih vzorcih (- pomeni kateri koli drug alel α_{s1} -CN, razen že prisotnega). Med preiskanimi živalmi smo našli le eno heterozigotno žival z genotipom AD. Test distribucije genotipov ($\chi^2 = 2,7916$) kaže, da odstopanje opazovanih frekvenc genotipov od pričakovanih ni signifikantno.

Ocenjene frekvence alelov skupaj z rezultati predhodnih raziskav o korelaciji med alelnimi variantami in kvalitativnimi in kvantitativnimi lastnostmi mleka odpirajo možnosti za selekcijo v smeri izboljšanja proizvodnih parametrov mleka za proizvodnjo "paškega sira", ki je edini tržno uveljavljen proizvod paške ovce. Določene frekvence alelnih variant β -LG A in B paške ovce (0,5375; 0,4625) kažejo na odstopanje od frekvenc nekaterih izrazito mlečnih pasem ovac. Frekvence β -LG variant "British Milkshoop" in "Hungarian Merino" ki jih je ocenil Anton s sod. (1999) imajo znatno višjo frekvenco alela A (0,6857; 0,6767). Pasma "Awasi" ima nižjo frekvenco alela A (0,3478), medtem ko imata

madžarski populaciji pasem Tsigai in Lacaune (0,5650; 0,4730) podobne frekvence β -LG A kot paška ovca. Zastopanost frekvenc alel β -LG je prikazana na sliki 3.

Nekatere raziskave kažejo (Moioli in sod., 1995; Prisi in sod., 1999a), da je v sirarstvu bolj zaželena alelna varianta β -LG A, ker vpliva na boljšo izkoristljivost mleka in boljšo kakovost sira. Glede na to, da se večina mleka paške ovce predela v "paški sir", bi bila bolj zaželena večja zastopanost alelne variante β -LG A. Mlečni pasmi ovac "British Milkssheep" in "Hungarian Merino" (Anton in sod., 1999) imata mleko, ki je zaradi visoke frekvence alela A primernejše za sirarsko proizvodnjo, mleko paške ovce pa ima zaradi nizke frekvence tega ugodnega alela po vsej verjetnosti manj ugodne tehnološke lastnosti.



Slika 3. Frekvence alelnih variant β -LG nekaterih populacij ovac.

Figure 3. Frequencies β -LG alleles of different breeds sheep.

Oceni frekvenc alelnih variant α_{s1} -CN A in D ne odstopata znatno od frekvenc populacij, navedenih v literaturi. Frekvenca alele A je nizka pri vseh proučevanih pasmah, pri paški ovci pa je nekoliko višja. Varianta D je v populaciji paške ovce zastopana z nižjo frekvenco kot pri sardinijski ovci, kar je ugodno, saj je varianta D v sirarstvu nezaželena. Frekvence alelnih variant α_{s1} -CN nekaterih populacij ovac so prikazane v preglednici 4. Varianta D je povezana z nižjo vsebnostjo mlečne masti in proteinov (Bolla in sod., 1989), nižjo vsebnostjo kazeina in s slabšimi lastnostmi sirarskega zrna (Piredda in sod., 1993). Prisi s sod. (1999b) meni, da je najprimernejši genotip za proizvodnjo sira genotip CC.

Preglednica 4. Frekvenca alelnih variant α_{s1} CN nekaterih populacij ovac

Table 4. Frequencies of α_{s1} CN alleles in different sheep breeds

Populacije Breeds	Frekvence alelov / Alele frequencies					Avtorji Authors
	A	B	C	D	E	
Paška ovca Pag Island Sheep	0,087	?	?	0,130	?	ta študija / this study
Manchega	0,055	0,345	0,600	-	-	López Gálvarez in sod., 1999
Segureña	0,020	0,090	0,890	-	-	López Gálvarez in sod., 1999
Sarda sheep	0,070	0,175	0,485	0,250	0,020	Prisi in sod., 1999

Na osnovi ugotovljenih frekvenc lahko rečemo, da v populaciji paške ovce po vsej verjetnosti razmerje alelnih variant proučevanih laktoproteinov ni najugodnejše za tehnološke lastnosti mleka. Ker uporaba PCR-RFLP metodologije omogoča identifikacijo polimorfni variant tudi pri moških živalih, bi z učinkovito selekcijo na ugodne genotipe laktoproteinskih genov dokaj hitro spremenili frekvence alelov laktoproteinskih genov v korist genotipov z ugodnimi lastnostmi na tehnološke lastnosti mleka. Uporaba opisane metodologije, bi v okviru ustreznega rejskega programa, lahko kmalu pokazala tudi ekonomsko korist zaradi pričakovanega izboljšanja kvalitete osnovne surovine za proizvodnjo paškega sira.

LITERATURA

- Anifantakis, E.M. Comparison of the physico-chemical properties of ewes and cows milk. *Bulletin International Dairy Federation*, 202(1985), 42–53.
- Anton, I./ Zsolnai, A./ Kukovics, S./ Molnár, A./ Fésüs, L. Genetic polymorphisms of milk proteins in Hungarian dairy sheep breeds and crosses. V: *FAO Proceedings of the workshop, Budapest, 1997-11/12-29/02*. Rome, REU Technical Series, 1998, 224–226.
- Anton, I./ Zsolnai, A./ Fésüs, L./ Kukovics, S./ Molnár, A. Survey of β -lactoglobulin and α_{s1} -casein polymorphism in Hungarian dairy sheep breeds and crosses at DNA level. *Archiv für Tierzucht*, 42(1999), 387–392.
- Arave, C.W./ Gillet, T.A./ Price, D.A./ Matthews, D.H. Polymorphisms in caseins of sheep milk. *Journal of Animal Science*, 36(1973), 241–244.
- Ausubel, F.M./ Brent, R./ Kingston, R.E./ Moore, D.D./ Seidman, G.G./ Smith, J.A./ Struhl, R. *Current protocols in molecular biology*. Green Publishin Associates and Wiley-Interscience, New York, 1987.
- Bolla, P./ Caroli, A./ Mezzelani, A./ Rizzi, R./ Pagnacco, G./ Fraghi, A./ Casu, S. Milk protein markers and production in sheep. *Animal Genetics*, 20(1989)Suppl. 1, 78.
- Chianese, L./ Mauriello, R./ Moio, L./ Intorcica, N./ Addeo, F. Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. *Journal of Dairy Research*, 59(1992), 39–47.
- Chianese, L./ Garro, G./ Mauriello, R./ Laezza, P./ Ferranti, P./ Addeo, F. Occurrence of five α_{s1} -casein variants in ovine milk. *Journal of Dairy Research*, 63(1996), 49–59.
- Erhardt, G. Evidence for a third allele at the β -Lg lokus of sheep and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics*, 20(1989), 197–204.
- Feligini, M./ Parma, P./ Aleandri, R./ Greppi, G.F./ Enne, G. PCR-RFLP test for direct determination of β -lactoglobulin genotype in sheep. *Animal Genetics*, 29(1998), 473–474.
- Ferranti, P./ Malorni, A./ Nitti, G./ Laezza P./ Pizzano, R./ Chianese, L./ Addeo, F. Primary structure of ovine α_{s1} -caseins: localization of phosphorylation sites and characterization of genetic variants A, C and D. *Journal of Dairy Research*, 62(1995), 281–296.
- Garzon, A.I./ Martinez, J. Beta-lactoglobulins (β -Lg) in Manchega sheep breed: Relationship with milk technological idnexes in handcraft manufacture of Manchego cheese. *Animal Genetics*, 23(1992)Suppl. 1, 106.
- Jardas, F. Dosadašnji rad i iskustva oko merinizacije u NR Hrvatskoj. *Stočarstvo*, 5(1951), 97–114.
- King, J.W.B. The distribution of sheep β -lactoglobulins. *Animal Production*, 11(1969), 53.
- Kolde, H.J./ Braunitzer, G. The primary ctructure of ovine β -Lg. *Milchwissenschaft*, 38(1983), 70–72.
- Kukovics, S./ Daróczy, L./ Kovács, P./ Molnár, A./ Anton, I./ Zsolnai, A./ Fésüs, L./ Ábrahám, M. The effect of β -lactoglobulin genotype on cheese yield. V: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, 1998-09/10-26/01*. Wageningen, EAAP Publication, 95(1999a), 524–527.
- Kukovics, S./ Molnár, A./ Anton, I./ Zsolnai, A./ Fésüs, L./ Ábrahám, M. The effect of β -lactoglobulin genotypes on milk composition of various sheep breeds. V: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, 1998-09/10-26/01*. Wageningen, EAAP Publication, 95(1999b), 539–542.
- Kukovics, S./ Molnár, A./ Ábrahám, M./ Anton, I./ Zsolnai, A./ Fésüs, L. The effect of sheep genotype on the somatic cell counts of milk. V: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, 1998-09/10-26/01*. Wageningen, EAAP Publication, 95(1999c), 443–446.
- López Gálvez, G./ Chianese, L./ Addeo, F./ Amigo, L./ Ramos, M. Polymorphism of α_{s1} -caseins ina the of two Spanish ovine breeds. *Milchwissenschaft*, 54(1999), 17–19.
- Manfredini, M./ Massari, M. Small ruminant milk. Technological aspects: storage and processing. *Option Mediteraneennes*, 6(1989), 191–198.
- Marshall, T.C./ Slate, J./ Kruuk, L./ Pemberton, J.M. Statistical confidence for likelihood based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7(1998), 639–655.

- Moioli, B./ Pilla, F./ Rando, A./ Tripaldi, C. Possible exploitation of DNA polymorphisms as genetic markers to improve milk production traits in sheep and goats. V: Proceedings of the 46th Annual meeting of European Association for Animal Production, Prague, 1995-09-04/07. Wageningen, Wageningen Pers, 1995, 229.
- Pavlinić, P. Paška ovca. Veterinarski arhiv, 6(1936), 276–296.
- Pilla, F./ Bevilacqua, C./ Leroux, C./ Fraghi, A./ Martin, P. Genotyping of α -s1 casein in sheep. *Animal Genetics*, 29(1998), 472–473.
- Piredda, G./ Papoff, C.M./ Sanna, S.R./ Campus, R.L. Influence of α s1-casein genotype on the physicochemical and lactodynamographic characteristics of milk. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 44(1993), 135–143.
- Portolano, B./ Giaccone, P./ Todaro, M./ Di Stasio, L./ Fiandra, P. Effect of β -lactoglobulin on milk composition and cheese yield in sheep. *Animal Genetics*, 27(1996)Suppl. 2, 119.
- Prinzenberg, E.M./ Erhardt, G. Molecular genetic characterization of ovine β -lactoglobulin C allele and detection by PCR-RFLP. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 116(1999), 9–14.
- Prisi, A./ Fraghi, G./ Piredda, G./ Leone, P. Influence of sheep AA, AB and BB β -lactoglobulin genotypes on milk composition and cheese yield. V: Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, 1998-09/10-26/01. Wageningen, EAAP Publication, 95(1999a), 553–555.
- Prisi, A./ Piredda, G./ Di Salvo, R./ Papoff, C.M./ Pintus, S. Influence of ovine α s1-casein genotype on milk composition and cheeseyielding capacity. V: Proceedings of the IDF/ CIRVAL Seminar: Production and utilization of ewe and goat milk, Crete, 1995-10-19/21. Bruxelles, International Dairy Federation, 1995, 179–183.
- Prisi, A./ Piredda, G./ Papoff, C.M./ Di Salvo, R./ Pintus, S./ Garro, G./ Ferranti, P./ Chianese, L. Effects of sheep α s1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. *Journal of Dairy Research*, 66(1999b), 409–419.
- Ramunno, L./ Cosenza, G./ Rando, A./ Macciotta, N.P.P./ Pappalardo, L./ Masina, P. Identification of Carriers of the Welsh CASA1 variant using an allele-specific PCR method. *Animal Genetics*, 28(1997), 154–155.
- Schlee, P./ Krause, I./ Rottmann, O. Genotyping of ovine β -lactoglobulin alleles A and B using the polymerase chain reaction. *Archiv für Tierzucht*, 36(1993), 519–523.
- Shalichev, J./ Tanev, G. Isolation, Purification and Determination of Some Chemical and Physicochemical Characteristics of Sheep Alpha s-Casein. *Journal of Dairy Science*, 56(1972), 171–176.