

ПОЛИМОРФИЗЪМ И АЛЕЛНИ ЧЕСТОТИ НА БЕТА КАЗЕИН (CSN2) ПРИ РАЗЛИЧНИ ПОРОДИ ГОВЕДА В БЪЛГАРИЯ

Д. Йорданова*, Т. Ангелова*, Ж. Кръстанов*, Г. Калайджиев*, В. Карабашев*,
С. Лалева*, Н. Облаков**, М. Касандро***

*Земеделски институт – Стара Загора, България

**Свободен научен консултант

***Университет в Падуа – Италия

РЕЗЮМЕ

Редица научни изследвания за установяване полиморфизма на бета казеина (CSN2) – един от основните млечни протеини, доказват наличието на 13 варианта. Автори посочват, че наличието на този ген намалява серумния холестерол и концентрацията на липиди, които играят важна роля в превенцията на сърдечно-съдови заболявания (Kaminski et al., 2007).

Целта на настоящото проучване е да се установи полиморфизмът на млечните протеини на CSN2 при различни породи говеда, отглеждани в България.

Анализирани бяха общо 427 тъканни проби от крави от различни породи – Българско кафяво говедо, Българско черношарено говедо, Късорого родопско говедо и Искърско говедо. Честотата на алелите и генотипите на млечните протеини са определени посредством PCR-RFLP анализ в лабораторията на Университета в Падуа, Италия.

Установени са две алелни честоти – А и В, на CSN2, като при всички породи обектът на нашето изследване – алел А, се характеризира с по-голяма честота, в сравнение с алел В.

Установени са три генотипа на CSN2 – АА, АВ и ВВ. Хомозиготният генотип АА се отличава от останалите два, установени от нас, генотипа с най-високо процентно съотношение.

При комерсиалните породи, обект на изследването, се установи наличието на хомозиготен ВВ генотип.

Ключови думи: полиморфизъм, млечен протеин, алелна честота, CSN2

POLYMORPHISM AND ALLELIC FREQUENCY OF CSN2 IN DIFFERENT CATTLE BREEDS IN BULGARIA

D. Yordanova, T. Angelova*, J. Krastanov*, G. Kalaydzhev*, V. Karabashev*, S. Laleva*,
N. Oblakov**, M. Cassandro****

**Agricultural Institute – Stara Zagora*

***Free Scientific Advisor*

****University of Padua – Italy*

ABSTRACT

Several scientific researches for the definition of the polymorphism of the beta casein (CSN2) – one of the main milk proteins, prove the presence of 13 variants. The authors indicate that the presence of this gene reduces the serum cholesterol and the concentration of lipids, which has an important role in the prevention of cardiovascular diseases. (Kaminski et al., 2007).

The target of the present research is to determine the polymorphism of milk proteins of CSN2 for different cattle breeds, raised in Bulgaria.

A total of 427 tissue samples were analyzed from cows of different breeds – Bulgarian brown cattle, Bulgarian black-multicoloured cattle, Short-horn Rhodope cattle and Iskar cattle. The allelic and gene frequency of milk proteins have been defined through PCR-RFLP analysis in the laboratory of the University of Padua, Italy. Two allelic frequencies are determined – A и B, of CSN2; for all frequencies the object of analysis – allele A, is characterized by bigger frequency, compared to allele B.

Three genotypes of CSN2 have been defined – AA, AB и BB. The homozygous genotype AA differs from the other two found by us genotypes, having the highest percentage.

For the commercial breeds, which are subject to this analysis, has been determined a presence of homozygous BB genotype.

Key words: polymorphism, milk protein, allelic frequency, CSN2

Редица научни изследвания за установяване полиморфизма на бета казеина (CSN2) – един от основните млечни протеини, доказват наличието на 13 варианта. Вариантите A1 и A2 на CSN2 се откриват в много млечни породи говеда, като нивото им зависи от породата. Автори посочват, че наличието на този ген намалява серумния холестерол и концентрацията на липиди, които играят важна роля в превенцията на сърдечно-съдови заболявания (Kaminski et al., 2007).

В изследване, проведено от Hanusova et al. (2010), е установена алелната честота на A1 и A2 гена на CSN2. Авторите посочват, че честотата на алелите A1 и A2 е съответно – 0,54 и 0,46.

Kaminski et al. (2007) посочват по-висока честота на A1 алела при Холщайн – 0,66, докато Manga et al. (2006) посочват много пониска честота на този алел – 0,286, и много малка част на хомозиготни животни.

Целта на изследване, проведено от Olenski et al. (2011) с 650 бици от породата Холщайн в Полша, е да се открият алелните и генотипни честоти на варианти на CSN2 и връзката им с млечната продуктивност. Авторският колектив посочва наличието на два алела със съответната честота – A1 и A2 (0,33 и 0,67).

Подобно изследване е проведено от Vārv et al. (2009) с естонски млечни крави от три породи – Естонско червено, Естонски холщайн и Естонско местно говедо. Установена е статистически значима генотипна диференци-

ация е Естонско червено и местното говедо, и Естонския холщайн. Алел A2 на CSN2 се наблюдава по-често при Холщайн и естонските местни говеда, отколкото при Естонското червено. Авторите заключават, че изследваните генетични варианти на млечните протеини влияят върху млечността и състава на млякото, което от своя страна може да има полезни последствия за човешкото здраве.

Целта на настоящото проучване е да се установи полиморфизмът на млечните протеини на CSN2 при различни породи говеда, отглеждани в България.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Данни: Анализирани бяха общо 427 тъканни проби от крави от различни породи – Българско кафяво говедо, Българско черношарено говедо, Късорого родопско говедо и Искърско говедо. Тъканните проби бяха взети чрез иновативна технология с помощта на специализирани клещи с марки, с контейнер с изсушител.

Лабораторен анализ: Честотата на алелите и генотипите на млечните протеини са определени посредством PCR-RFLP анализ в лабораторията на Университета в Падуа, Италия. ДНК беше пречиствана посредством Maxwell®16 Tissue ДНК комплект за пречистване (Promega), в съответствие с инструкциите на производителя. ДНК концен-

трацията се определя чрез Qubit® флуорометър (Invitrogen).

Използвани бяха следните PCR условия при анализа: първоначално денатуриране при 98 °C в продължение на 30 секунди, последвано от 40 цикъла на 98 °C в продължение на 7 секунди, 64 °C в продължение на 15 сек и 72 °C в продължение на 20 секунди, с финална подпомагаща стъпка при 72 °C, в продължение на 7 минути. PCR продуктите се пречистваха с Agencourt Purification AMPure System (Beckman Coulter) и реакцията на секвениране се извършваше с помощта на GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit за Dye Terminator Cycle Sequencing, следвайки инструкциите на производителя. Agencourt CleanSEQ система за пречистване (Beckman Coulter) се използваше за пречистване на продуктите при секвенирането. Секвенирането се извършваше посредством Genetic SEQ8000 система за анализ (Beckman Coulter), а определянето на единичния нуклеотиден полиморфизъм (SNP) се извършваше със софтуер за генетичен анализ v.9.00 (Beckman Coulter).

За анализ на получените данни се използва софтуерният продукт Systat 13, а графичната обработка на данните се извърши посредством Excel.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

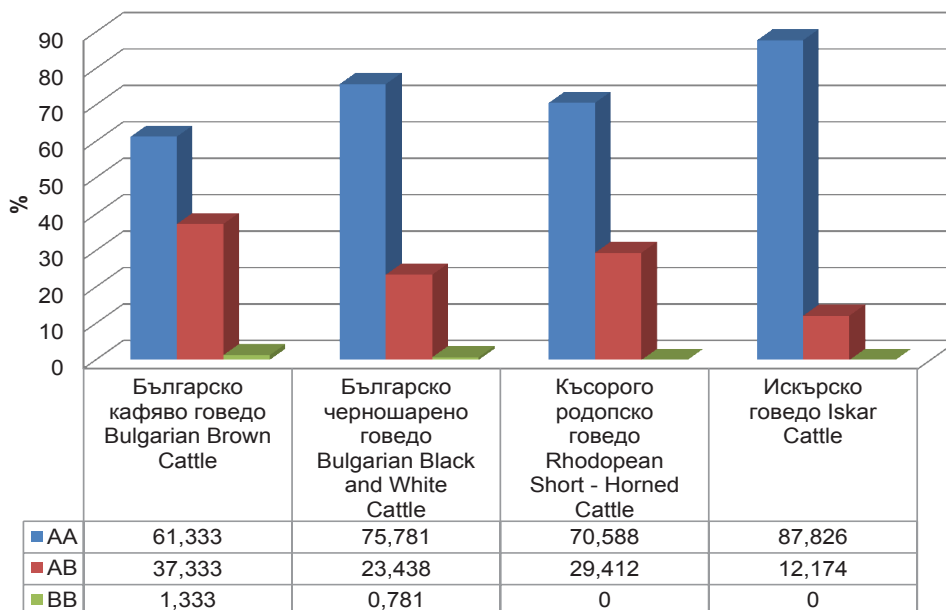
В табл. 1 са представени резултатите от алелните честоти на CSN2 при различни породи говеда в България. Установени са два алела – А и В, на CSN2. От таблицата се вижда, че при всички породи, обект на нашето изследване, алел А се отличава с по-голяма

честота, в сравнение с алел В. Подобен резултат е получен от Gurkan, E. (2011) при изследване, проведено с крави от породата Черношарено говедо, за установяване алелните честоти на CSN2. При животните от Искърската порода е отчетена най-висока честота на А алела – 0,939, и най-ниска честота на В алела – 0,061. При две от породите, обект на нашето изследване – Българско черношарено и Късорого родопско говедо, установихме много близки стойности както за честотата на А алела – 0,875 и 0,853, така и за В алела – 0,125 и 0,147, съответно. При кравите от породата Българско кафяво говедо се отчете резултат за наличието на В алела – 0,20, близък до този, посочен от Mariani, P. (1997). Авторът отбелязва, че честотата на В алела при Италианското кафяво говедо драстично намалява в периода 1968–1996 година и от 0,28 достига до 0,21. Тази тенденция трябва да се наблюдава внимателно с оглед ефекта на наличието на В алела върху технологичните свойства на млякото.

На фиг. 1 са представени резултатите от полиморфизма на CSN2 при различни породи говеда, отглеждани в България. Вижда се, че CSN2 се характеризира с три генотипа – АА, АВ и ВВ. Впечатление прави, че хомозиготният генотип АА се отличава от останалите два, установени от нас, генотипа с най-високо процентно съотношение. Основна част от животните от породата Искърското говедо, следвани от тези от породата Българско черношарено говедо, са с този генотип. По ниски резултати отчетохме при останалите две породи, обект на нашето изследване – Българско кафяво и Късорого родопско говедо – 61,333% и 70,588%, съответно. В изследване, проведете

Таблица 1. Алелна честота на бета казеин (CSN2) при различни породи говеда в България
Table 1. Allelic frequency of CSN2 in different cattle breeds in Bulgaria

Алелна честота / Allelic frequency	A	B
Българско кафяво говедо / Bulgarian Brown Cattle	0,800	0,200
Българско черношарено говедо / Bulgarian Black and White Cattle	0,875	0,125
Късорого родопско говедо / Rhodopean Short - Horned Cattle	0,853	0,147
Искърско говедо / Iskar Cattle	0,939	0,061



Фиг. 1. Полиморфизъм на бета казеин (CSN2) при различни породи говеда в България
Fig 1. Polymorphism of CSN2 in different cattle breeds in Bulgaria

но от Университета в Мюнхен за установяване на ефекта на млечните протеинови локуси при 1809 крави от породата Кафяво говедо, се посочва наличието на три алела на бета-казеина – А, В и С, и съответно 6 генотипа – АА, АВ, АС, ВВ, ВС и СС (Graml et. al, 2003). При комерсиални и автохтонни породи крави, отглеждани в България, Angelova et al. (2014) установяват също три алела и наличието на 6 генотипа, но при CSN3. Животните с генотип АА и АВ са основната част, а тези с генотип СС са само 4 броя.

Най-висок процент на хетерозиготни животни при втория генотип, описващ CSN2 – АВ, установихме при крави от породата Българско кафяво говедо – 37,333%. С близки стойности в процентно съотношение са животните от две породи, обект на това проучване – Късорого родопско говедо и Българско черношарено говедо – 29,412% и 23,438%, съответно.

Интерес представляват резултатите за другия, установен от нас, генотип – ВВ. Този генотип не се среща при автохтонните породи говеда – Късорого родопско и Искърско говедо. При две от широко използваните породи говеда – Българско кафяво говедо и Българско черношарено говедо, се установи

наличието на този хомозиготен генотип – ВВ, но в много ниско процентно съотношение – 1,333% и 0,781%, съответно. Chessa et. all, (2013) посочват, че хомозиготните животни с генотип ВВ от породата Италианско кафяво също са с много по-нисък процент – 0,07%.

ИЗВОДИ

- Установени са две алелни честоти – А и В, на CSN2, като при всички породи, обект на нашето изследване, алел А се характеризира с по-голяма честота, в сравнение с алел В.
- Установени са три генотипа на CSN2 – АА, АВ и ВВ. Хомозиготният генотип АА се отличава от останалите два, установени от нас, с най-високо процентно съотношение.
- При комерсиалните породи, обект на изследването, се установи наличието на хомозиготен ВВ генотип.

ЛИТЕРАТУРА

Angelova, T., D. Yordanova, V. Karabashev, G. Kalaydjiev, S. Laleva, M. Cassandro, J. Krastanov, Y.

Popova, N. Oblakov, 2014. Polymorphisme et frequence alleques de la caseine kappa (CSN3) dans les races bovines en Bulgarie. Polymorphism and allelic frequency of kappa-casein (CSN3) in different cattle breeds in Bulgaria. *Renc. Rech. Ruminants*, 2014, 21, 266.

Chessa, S., O. Bulgari, A. Rossoni, G. Ceriotti, A. Caroli, 2013. Bovine β -casein: Detection of two single nucleotide polymorphisms by bidirectional allele specific polymerase chain reaction (BAS-PCR) and monitoring of their variation. *Open Journal of Animal Sciences*. Vol.3, No.1, 36-41

Graml, G., F. Pirchner, 2003. Effects of milk protein loci on content of their proteins. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 46 (2003) 4, 331-340

Gurcan Eser Kemal, 2011. Association between milk protein polymorphism and milk production traits in Black and White dairy cattle in Turkey. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(6), pp. 1044-1048

Hanusova, E., J. Huba, M. Oravcova, P. Polak, I. Vrtkova, 2010. Genetic variants of beta – casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. *Slovak J. Anim. Sci.*, 43, (2): 63-66

Kaminski, S., Cieslinka, A., Kostyra, E., 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*, 2007, vol. 48, no. 3, pp. 189-198

Laugesen, M., Elliott, R., 2003. Ischaemic heart disease type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. *New Zealand Medicine Journal*, 2003, vol. 116, pp. 1-19

Manga, I., Říha, J., dvo Řák, J., 2006. Comparison of influence markers CSN3 and CSN2 on milk performance traits in Czech Spotted and Holstein cattle tested at first, fifth and higher lactation. *Acta fytotechnica and zootechnica*, vol. 9, supplement, pp. 13-15

Mariani, P., 1997. Contenuto di caseina, varianti genetiche ed attitudine tecnologico-casearia del latte delle vacche di razza bruna nella produzione del formaggio grana. *La razza Bruna italiana*, 2, 8-14.

McLachlan, C.N., 2001. Beta-casein A1, ischemic heart diseases, mortality and other illnesses. *Med Hypotheses*, 56, p. 262-272

Oleński, K., A. Cieslińska, T. Suchocki, J. Szyda, S. Kamiński, 2011. Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports* vol. 30 (2012) no. 1, 5-12

Värv, S., A. Belousova, E. Sild, H. Viinalass, 2009. Genetic diversity in milk proteins among Estonian dairy cattle. *Veterinarija ir Zootechnika (Vet Med Zoot)*. T. 48 (70).