

Barbara CIOCH, *Ewa CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, Ewa CHOCIŁOWICZ,
Małgorzata SZEWCZUK

ZWIĄZEK POLIMORFIZMU KAPPA-KAZEINY (CASK) Z WYDAJNOŚCIĄ I SKŁADEM MLEKA KRÓW RASY POLSKIEJ HOLSZTYŃSKO-FRYZYJSKIEJ ODMIANY CZARNO-BIAŁEJ

ASSOCIATION BETWEEN KAPPA-CASEIN (CASK) POLYMORPHISM AND YIELD AND COMPOSITION OF MILK OF HOLSTEIN-FRESIAN BLACK-AND- WHITE COWS

Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 10, 71-460 Szczecin

Abstract. The study involved 859 Polish Holstein-Fresian var. Black-and-White cows. The kappa-casein (CASK) genotypes were determined using PCR (Polymerase Chain Reaction) method. It was found that allele of CASK^A had occurred more frequently than allele of CASK^B in all analyzed lactations of Polish Holstein-Fresian cows. It was also found that cows with the CASK AA genotype had a higher milk yield than cows with CASK BB genotype. The differences were significant ($P \leq 0.01$) in the second lactation. The highest milk protein content and fat content for the three analyzed lactations were recorded for the CASK BB genotype. The differences were significant ($P \leq 0.01$, $P \leq 0.05$) in the second lactation and the third lactations. Milk with a higher contents protein in cows with CASK BB genotype is a better material in technological usefulness.

Słowa kluczowe: białka mleka, kappa-kazeina, phf, polimorfizm, wydajność mleka.
Key words: kappa-casein, milk proteins, milk yield, PHF, polymorphism.

WSTĘP

Białko jest składnikiem mleka, które odgrywa najważniejszą rolę w jego przetwórstwie. Dwie grupy białek determinują cechy mleka i przydatność technologiczną: cztery frakcje kazein (CSN1S1, CSN1S2, CSN2 and CASK) i białka serwatki (BLG and LALBA).

Polimorfizm białek mleka i ich warianty genetyczne są determinowane przez wiele alleli, czyli obecność dwóch lub więcej alleli w jednym *locus* (Litwińczuk i in. 2003). W ten sposób tworzone są warianty genetyczne, które różnią się sekwencją aminokwasową. Zmiany te mają istotny wpływ na skład i właściwości mleka jako surowca.

Najczęściej wyróżnia się trzy warianty CASK: AA, AB i BB. Mleko pochodzące od krów o genotypie CASK BB ma wyższą zawartość białka całkowitego i kazeiny (Barłowska i in. 2000). Co więcej, allel CASK^B zwiększa zawartość tłuszczu, poprawia stabilność miceli kazeinowych i zwiększa wydajność sera (Jacob i Puhani 1992, Kamiński 1994).

*Adres do korespondencji – Corresponding author: dr hab. Ewa Czerniawska-Piątkowska, Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 10, 71-460 Szczecin, e-mail: ewa.czerniawska-piatkowska@zut.edu.pl

Badania nad polimorfizmem białek mleka są na tyle wiarygodne, że można wprowadzić do praktyki hodowlanej genetyczne warianty białek mleka jako parametr selekcyjny. CASK jest białkiem, którego warianty polimorficzne związane są z wydajnością i składem mleka krów, stąd celowość prowadzenia badań nad tym białkiem. Wiele stacji zajmujących się inseminacją bydła mlecznego w Europie, w Polsce, a także w Ameryce Północnej umieszcza genotypy (CSN2, CASK, BLG) każdego buhaja jako marker genetyczny w katalogach buhajów (Ziemiński i in. 2005, Litwińczuk i in. 2006).

Kappa-kazeina jest frakcją białek mleka, która wzbudza największe zainteresowanie, ponieważ jej warianty genetyczne związane są z wydajnością mleczną i przydatnością mleka w produkcji serów (Litwińczuk i in. 2006).

Celem pracy było ustalenie frekwencji genów i genotypów determinujących warianty kappa-kazeiny u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej oraz ustalenie związku między cechami mleczności (wydajnością mleczną, wydajnością białka i tłuszczu, zawartością białka i tłuszczu) a polimorfizmem w *locus* genu kappa-kazeiny (CASK).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 859 krowach rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Krew do badań pobrano z żyły szyjnej zewnętrznej do probówek próżniowych zawierających antykoagulant EDTA, wykorzystując zestaw *MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit* firmy *Epicentre Technologies*. Genotypy kappa-kazeiny (CASK) oznaczono metodą PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragments Length Polymorphism) wg metodyki Kamińskiego (1993). Uzyskane fragmenty DNA trawiono za pomocą enzymu restrykcyjnego *HindIII* (a ↓ agctt) firmy Fermentas. Fragmenty restrykcyjne rozdzielono elektroforetycznie w 2-procentowym żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy w obecności buforu 1*TBE i zwizualizowano w transiluminatorze firmy Vilber Lourmant.

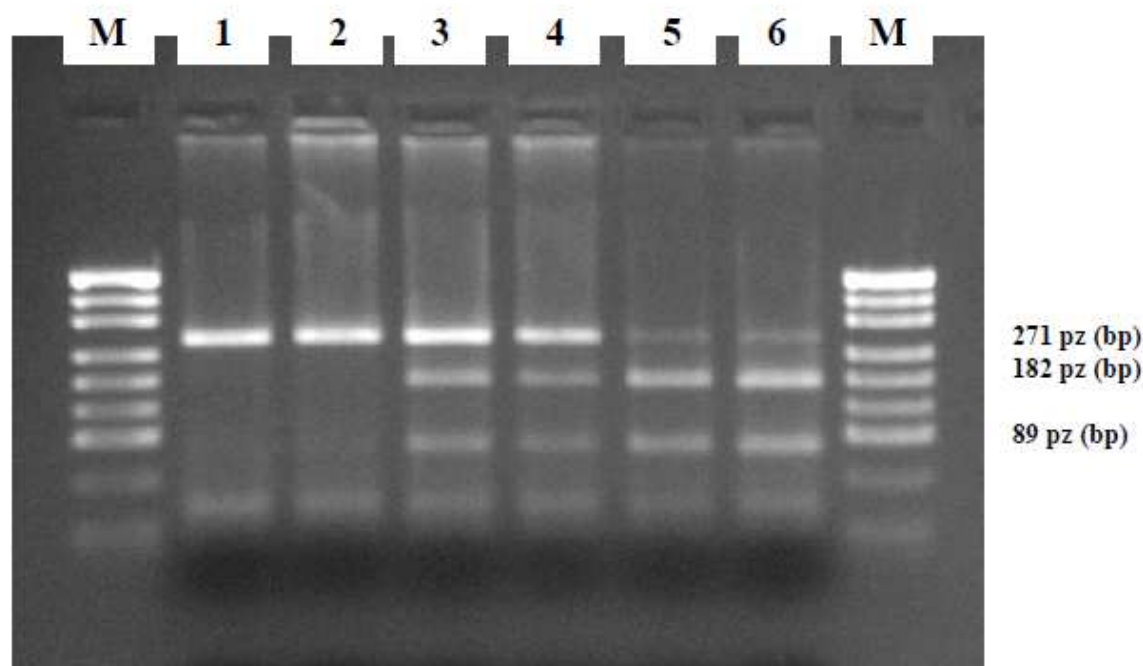
Analizę wydajności mlecznej przeprowadzono na podstawie wyników oceny użyteczności mlecznej metodą A4, uwzględniając wydajność mleka, tłuszczu i białka (w kilogramach) oraz procentową zawartość w mleku tłuszczu i białka.

Dane poddano analizie statystycznej, obliczając średnie wartości (\bar{x}), odchylenie standardowe (S). Różnice istotne statystycznie określono za pomocą testu Duncana, wykorzystując program Statistica®9 PL (StatSoft, Inc 2010).

WYNIKI I DYSKUSJA

Na rysunku 1 przedstawiono uzyskany obraz elektroforetyczny rozseparowanych fragmentów restrykcyjnych *CASK/HindIII*. Uzyskano specyficzne produkty reakcji PCR o długości 271 par zasad (pz). W badanym stadzie bydła mlecznego stwierdzono obecność dwóch alleli genu kappa-kazeiny ($CASK^A$ i $CASK^B$) oraz trzech genotypów (AA, AB i BB) (rys. 1).

W badaniach własnych stwierdzono zdecydowaną przewagę allelu A nad allelem B we wszystkich analizowanych laktacjach. Frekwencja allelu $CSN3^A$ była najwyższa w pierwszej laktacji (0,831), dla allelu $CSN3^B$ wynosiła (0,169). Podobne wyniki uzyskali Litwińczuk i in. (2006), Botaro i in. (2009) oraz Molee i in. (2011).



M – marker wielkości DNA (pUC19/*Msp*); tory 1, 2 – genotyp AA; tory 3, 4 – genotyp AB; tory 5, 6 – genotyp BB; pz – par zasad.
 M – DNA size marker (pUC19/*Msp*); lanes 1, 2 – genotype AA; lanes 3, 4 – genotype AB; lanes 5, 6 – genotype BB; bp – base pair.

Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział fragmentów restrykcyjnych CASK/*HindIII* genu kappa-kazeiny bydła
 Fig. 1. Electrophoretic restriction fragments CASK/*HindIII* of bovine kappa-casein gene

W badaniach Botaro i in. (2009) frekwencja genotypów AA, AB i BB kappa-kazeiny wynosiła odpowiednio 66,83, 31,84 i 1,33% dla bydła rasy holsztyńskiej oraz 71,38, 27,90 i 0,72% dla bydła rasy Girolando. Allel A występował częściej niż allel B w przypadku obu ras, zarówno holsztyńskiej (A = 0,827 i B = 0,173), jak i Girolando (A = 0,853 i B = 0,147). Analizując krowy o różnym udziale genów rasy hf: G1 \leq 87,5% i G2 $>$ 87,5% zaobserwowano wyższą frekwencję allelu A w obu grupach: G1 (A = 0,755 i B = 0,208) i G2 (A = 0,771 i B = 0,180) – (Molee i in. 2011). Anggraeni i in. (2010), badając krowy rasy holsztyńsko-fryzyskiej z regionów zachodniej Jawy stwierdzili, że allel CASK^A występował częściej (0,64) niż allel CASK^B (0,36). Doosti i in. (2011) odnotowali również, że allel A występował częściej niż allel B u rasy holsztyńskiej i rodzimej irańskiej. U bydła holsztyńskiego frekwencja alleli wyniosła: A = 59% i B = 41%, natomiast u drugiej rasy odpowiednio – 81 i 19%.

Przeprowadzone badania wykazały (tab. 1), że genotyp CASK AA występował najczęściej. Najwyższą frekwencję genotypu CASK AA zaobserwowano w grupie pierwiastek (69%). Wyniki wcześniejszych badań Sitkowskiej i in. (2008) oraz Botaro i in. (2009) są podobne. Z drugiej strony wyniki badań Micińskiego i in. (2008) oraz Anggraeni i in. (2010) pokazują, że to genotyp heterozygotyczny CASK AB występował najczęściej (odpowiednio 56,25 i 65%). W niniejszym badaniu genotyp CASK BB występował z najniższą frekwencją we wszystkich analizowanych laktacjach (tab. 1), co znajduje potwierdzenie w badaniach Sitkowskiej i in. (2008), Micińskiego i in. (2008) oraz Botaro i in. (2009).

Tabela 1. Frekwencja alleli i genotypów polimorficznych kappa-kazeiny u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej

Table 1. Kappa-casein alleles and genotypes frequencies in PHF cows

Laktacja Lactation	Genotypy Genotypes	Liczba genotypów Number of genotypes	Frekwencja Frequency	
			genotypu genotype	genu gene
I	AA	231	0,691	A = 0,831 B = 0,169
	AB	95	0,280	
	BB	13	0,028	
II	AA	190	0,667	A = 0,817 B = 0,183
	AB	84	0,299	
	BB	10	0,034	
III	AA	154	0,652	A = 0,807 B = 0,193
	AB	73	0,311	
	BB	9	0,037	

Wyniki wskazują tendencję wzrostu wydajności mlecznej krów o genotypie CASK AA (tab. 2).

Tabela 2. Wydajność mleka i jego skład w zależności od genotypu CASK w laktacjach 305-dniowych

Table 2. Milk yield and composition depending on CASK genotype in 305-day lactations

Laktacja Lactation	Genotypy CASK Genotypes CASK	I			II			III		
		AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB
Cecha – Trait										
Mleko, kg Milk, kg	\bar{x} s	6572,0 812,0	6329,3 101,4	6299,8 1524,5	7560,2 ^A 1237,4	7126,0 ^A 1225,1	7054,7 1229,0	7001,1 1183,1	7138,1 1153,8	6983,0 1185,2
Tłuszcz, kg Fat, kg	\bar{x} s	270,1 45,1	259,0 6,1	260,2 47,8	331,1 63,1	314,3 61,9	313,2 62,0	294,0 54,0	299,9 53,9	295,4 54,0
Białko, kg Protein, kg	\bar{x} s	222,8 32,4	216,5 3,2	216,7 39,6	263,1 49,5	248,7 48,3	248,3 48,5	229,6 42,4	235,4 42,2	234,6 38,9
Tłuszcz, % Fat, %	\bar{x} s	4,11 0,38	4,09 0,06	4,13 0,32	4,38 ^A 0,38	4,41 0,39	4,44 ^A 0,39	4,20 0,28	4,20 0,29	4,23 0,32
Białko, % Protein, %	\bar{x} s	3,39 0,19	3,42 0,02	3,44 0,16	3,48 0,29	3,49 0,29	3,52 0,29	3,28 ^a 0,24	3,30 0,24	3,36 ^a 0,25

A – różnica istotna na poziomie $P \leq 0,01$ – A – statistically significant difference at $P \leq 0,01$.

a – różnica istotna na poziomie $P \leq 0,05$ – a – statistically significant difference at $P \leq 0,05$.

Najwyższą wydajność uzyskano od krów o genotypie CASK AA w drugiej laktacji (7560,2 kg) i różniła się ona istotnie na poziomie ($P \leq 0,01$) od heterozygot CASK AB (7126,0 kg). Podobne wyniki uzyskali Miciński i in. (2008), analizując zależność między genotypem kappa-kazeiny a wydajnością krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Najniższą wydajnością we wszystkich trzech laktacjach cechowały się krowy homozygoty CSN3 BB. Heterozygoty CSN3 AB wykazywały wydajność na poziomie pośrednim. Rezultaty innych badań także potwierdzają uzyskane wyniki – zwierzęta o genotypie AA charakteryzowały się najwyższą

wydajnością mleka – Litwińczuk i in. (1996), Strzałkowska i in. (2002), Miciński i in. (2008), Sitkowska i in. (2008). Według Walawskiego i in. (1994), Tsiaras i in. (2005) oraz Ziemińskiego i in. (2005) to genotyp AB był związany z najwyższą wydajnością mleka.

Krowy o genotypie CASK AA charakteryzowały się największą wydajnością tłuszczu i białka w pierwszej (odpowiednio 270,1 i 222,8 kg) i drugiej laktacji (odpowiednio 331,1 i 263,1 kg). Jednak w trzeciej laktacji krowy o genotypie AB charakteryzowały się największą wydajnością tłuszczu i białka (odpowiednio 299,9 i 235,4 kg).

W badaniach Litwińczuka i in. (2006) podobnie najwyższą wydajność tłuszczu i białka stwierdzono u krów o genotypie AA (odpowiednio 203,4 i 160,0 kg). Inne wyniki uzyskali Strzałkowska i in. (2002). Najwyższą wydajność tłuszczu uzyskano w grupie krów o genotypie BB (27,7 kg). Wykazano różnice istotne statystycznie ($P \leq 0,01$) pomiędzy analizowanymi genotypami (AA, AB i BB). Z badań Ziemińskiego i in. (2005) wynika, że najwyższą wydajnością tłuszczu i białka charakteryzowały się krowy o genotypie AB (odpowiednio 297,0 kg i 224,2 kg). Także Tsiaras i in. (2005) podają, że heterozygoty AB produkowały o 21 kg białka więcej, przy wyższej o 0,08% jego zawartości w porównaniu do homozygot AA. Podobne zależności obserwowano w przypadku tłuszczu mleka – krowy o genotypie AB produkowały o 24 kg tłuszczu więcej przy wyższej jego zawartości (o 0,04%) niż krowy o genotypie AA.

Analizując zawartość tłuszczu w mleku (tab. 2) wykazano istotne różnice pomiędzy genotypami kappa-kazeiny: BB (4,44%) i AA (4,38%) w drugiej laktacji ($P \leq 0,01$). Najwyższą zawartość białka stwierdzono u krów o genotypie BB we wszystkich analizowanych laktacjach (tab. 2). Różnice między genotypami AA (3,28%) i BB (3,36%) okazały się istotne ($P \leq 0,05$) w trzeciej laktacji. Podobne wyniki uzyskali Ziemiński i in. (2005). Cytowani autorzy najwyższą zawartość białka (3,36%) i tłuszczu (4,39%) odnotowali u krów z genotypem BB. Otrzymane wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach innych autorów, m.in.: Barłowskiej i in. (2000), Strzałkowskiej i in. (2002), Feleńczaka i in. (2006) oraz Micińskiego i in. (2007).

Natomiast Litwińczuk i in. (1996) podają, że największą procentową zawartością tłuszczu charakteryzowało się mleko krów heterozygot AB, w porównaniu z homozygotami BB ($P \leq 0,05$). Najwyższy udział składników podstawowych dla heterozygotycznego genotypu AB u krów rasy hf uzyskali Molee i in. (2011), odpowiednio 3,75% tłuszczu i 3,19% białka. Podobne wyniki otrzymali Sitkowska i in. (2008). U cytowanych autorów heterozygoty AB cechowały się największą procentową zawartością tłuszczu (4,34%) i białka (3,26%). Natomiast Feleńczak i in. (2006) dla genotypu CASK AB stwierdzili pośrednie zawartości białka, a i genotypy BB i AB uważają za korzystniejsze dla tej cechy.

WNIOSKI

Stwierdzono, że krowy z genotypem CASK AA charakteryzowały się najwyższą wydajnością mleka. W zakresie tej cechy obserwowano między genotypami różnice istotne ($P \leq 0,01$) w drugiej laktacji. Genotyp CASK BB związany był z najwyższą zawartością tłuszczu i białka we wszystkich analizowanych laktacjach. W drugiej i trzeciej laktacji różnice zostały potwierdzone statystycznie ($P \leq 0,01$ i $P \leq 0,05$). Biorąc pod uwagę wyższą zawartość białka w mleku krów o genotypie BB można uznać, że stanowi surowiec bardziej przydatny do produkcji serów w aspekcie technologicznym i ekonomicznym.

PIŚMIENICTWO

- 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.
- Barłowska J., Litwińczuk Z., Król J., Pietras U.** 2000. Związek wariantów genetycznych białek mleka z jego cechami fizyko-chemicznymi i zdrowotnością wymienia krów. *Zesz. Nauk. Prz. Hod.* 51, 333–340.
- Botaro B.G., De Lima Y.R., Cortinhas C.S., Silva L.P., Renno F.P., Santos M.V.** 2009. Effect of kappa casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. *Rev. Bras. Zootech.* 38, 2447–2454.
- Dosti 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). *Afr. J. Biotech.* 10 (25), 4957–4960.
- Feleńczak A., Fertig A., Gardzina E., Ormian M., Trela J.** 2006. Technological traits of milk of simmental cows as related to κ -casein polymorphism. *Ann. Anim. Sci.* 6 (1), 37–43.
- Jacob E., Puhán Z.** 1992. Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins- a review. *Int. Dairy J.* 2, 157–178.
- Kamiński S.** 1993. Identyfikacja genotypu kappa-kazeiny u buhajów przy pomocy metody PCR-RFLP. ART. Olsztyn (praca doktorska).
- Kamiński S.** 1994. Gen kappa-kazeiny – możliwości wykorzystania w selekcji bydła. *Prz. Hod.* 3, 8–10.
- Litwińczuk A., Barłowska J., Florek M., Asarabowska A.** 1996. Związek między polimorfizmem białek mleka a produktywnością krów. *Ann. UMCS, Sec. E, Agric.* 14, 59–63.
- Litwińczuk A., Barłowska J., Król J., Kędzierska-Matysek M.** 2003. Polimorfizm białek mleka u krów ras mlecznych i mięsnych z regionu środkowowschodniej Polski. *Prz. Hod.* 71, 10–13.
- Litwińczuk A., Barłowska J., Król J., Litwińczuk Z.** 2006. Białka polimorficzne mleka jako markery cech użytkowych bydła mlecznego i mięsnego. *Med. Weter.* 62 (1), 6–10.
- Miciński J., Klupczyński J., Mordas W., Zabłotna R.** 2007. Yield and composition of milk from jersey cows as dependent on the genetic variants of milk proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 57 (3A), 95–99.
- Miciński J., Pogorzelska J., Barański W.** 2008. Parametry użytkowe pierwiastek rasy hf w zależności od genetycznych wariantów wybranych białek mleka. *Med. Weter.* 64 (9), 1136–1140.
- 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. *Anim. Sci. J.* 82, 512–516.
- Sitkowska B., Neja W., Wiśniewska E.** 2008. Relations between kappa-casein polymorphism (CSN3) and milk performance traits in heifer cows. *J. Cent. Eur. Agric.* 9 (4), 641–644.
- StatSoft, Inc** 2010. Statistica (data analysis software system), version 9. www.statsoft.com.
- Strzałkowska N., Krzyżewski J., Ryniewicz Z., Zwierzchowski L.** 2002. Effects of κ -casein and β -lactoglobulin loci polymorphism, cow's age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black-and-White cattle. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 20 (1), 21–35.
- Tsiaras A.M., Bargouli G.G., Banos G., Boscós C.M.** 2005. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 88, 327–334.
- Walawski K., Sowiński G., Czarnik U., Zabołewicz T.** 1994. β -lactoglobulin and κ -casein polymorphism in relation to production traits and technological properties of milk in the herd of Polish Black and White cows. *Gen. Pol.* 35 (1–2), 93–108.
- Ziemiński R., Juszcak J., Czarnik U., Ćwikła A., Zabołewicz T., Walawski K.** 2005. Związek między polimorfizmem białek mleka i zróżnicowaniem wydajności oraz składu mleka krów utrzymywanych w stadzie bydła rasy czarno-białej kombinatu rolnego Kietrz. *Acta Sci. Pol., Zootech.* 4 (1), 163–170.