

GENETSKI POLIMORFIZMI PROTEINA KRVI I MLIJEKA NEKIH PASMINA GOVEDA

P. Caput, M. Posavi, M. Kapš, Jasmina Lukač-Havranek, M. Ernoić,
Zlata Gašpert

Sažetak

Proučeni su dosadašnji rezultati istraživanja genetskih polimorfizama proteina krvi i mlijeka koji se odnose na pasmine u Hrvatskoj (simentalsko, istarsko i slavonsko-podolsko govedo). Različite rezultate u frekvencijama za Hb u istarskog goveda i Tf za panonskog podolca u odnosu na dosadašnja istraživanja vjerojatno su i rezultat značajno smanjenog broja ovih životinja.

Frekvencija alela Hb, Tf, kazeina (α_{s1} , α_{s2} , β i k) i β laktoglobulina hrvatskog simentalca slične su frekvencijama u njemačkog Fleckvieh, što upućuje na filogenetsku sličnost. Istraživanje se nastavlja na većem broju životinja i za više polimorfa.

Uvod

U novije vrijeme intenzivno se istražuje polimorfizam proteina mlijeka i krvnog seruma u gotovo svih vrsta domaćih životinja. Glavni razlozi znanstvenom interesu su povezanost frekvencije polimorfa s proizvodnim i reproduktivnim svojstvima. Genetski polimorfizmi koriste se i u filogenetskim studijama za određivanje genetskih distanci pojedinih pasmina, filogenetskih karakteristika, stupnja varijabilnosti, za zaštitu autorskih prava uzgajачa, dokazivanje pedigrea i ustanovljavanje eventualnog gubitka ili ugroženosti nekih gena.

Prema navodima Bodo-a (1990.) unatoč spektakularnom napretku u unapređenju domaćih životinja, pojam zaštite genetskih izvora postaje sve popularniji i kod uzgajачa i kod znanstvenika, a financiranje održavanja nekomercijalnih pasmina dužnost je čitavog društva.

Najbolji primjer centralne brige putem vlade su; Francuska, Austija, Mađarska, a društvene brige Velika Britanija (Rare Breeds Survival Trust). Prva regionalna organizacija u Europi osnovana je u skandinavskim zemljama, a druga je "Dagene", alijansa podunavskih zemalja, čiji je osnivač i Hrvatska (1990.). Aktualna pitanja u istraživanjima za uspješnu zaštitu ugroženih pasmina su:

Dr Pavo Caput, red. prof., mr. Marijan Posavi, asistent, mr. Miroslav Kapš, asistent, dr Jasmina Lukač-Havranek, izv. prof., dipl. ing. Miljenko Ernoić, mladi istraživač na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25; Dr Zlata Gašpert, viši znanstveni suradnik, Zagreb.

1. Argumenti automatskog održavanja obavezne zaštite genetske varijabilnosti domaćih vrsta i pasmina životinja.
2. Teorija zaštite i termini koje će se upotrebljavati u ovom novom području znanosti.
3. Identifikacija i procjena lokalnih pasmina.
4. Klasifikacija mogućih metoda zaštite i stanja varijabilnosti.
5. Razlika između ideja zaštita životinja i očuvanje genetskog materijala populacija.
6. Veza između znanstvenih ustanova i uzgajča (uključujući hobi uzgajče).

Prema navodima Furher-a (1989.) i Bodo-a i sur. (1989.) održavanje genetskih rezervi obnavlja se na dva načina:

- a) Očuvanje u vidu malih stada
- b) Konzerviranje putem biotehničkih metoda. Ovo je sigurna zaštita genetskih rezervi od zaraza, koje mogu ugroziti stada.

Metode su:

1. Konzerviranje sperme
2. Konzerviranje embrija
3. Zamrzavanje neoplođenih jajnih stanica u svrhu kasnije in vitro oplodnje
4. Kloniranje - genom se multiplicira vegetativnim razmnožavanjem.

Maijala (1987.), Bodo i sur. (1989.) posebno ističu prednosti konzerviranja gena "in situ", jer se životinje ne mogu zaboraviti, mogu se upotrijebiti, prilagođavati na okolišne sistematske utjecaje, a produktivne su, pa tako kompenziraju troškove održavanja. Nedostatak ovog načina konzerviranja je nemogućnost održavanja strukture gena (statu quo), a teško je izbjeći i "inbreeding-depression". Genetski status quo može se održati ako se životinjama s alelima, koji su deklarirani kao ugroženi (frekvencija ispod 1%), u planskim parenjima daje prednost.

U Europi se osnivaju nucleus stada ugroženih pasmina goveda koje financira država. Tako Müller (1989.) ističe da je za austrijsku pasminu Waldviertler Blondfieh osnovano nucleus stado od 25 krava i 5 bikova. Osim toga austrijska vlada uzgajčima koji žele držati ovu pasminu daje relativno visoke premije i besplatno spermu za osjemenjivanje krava, pa je interes za držanje ovog goveda velik. Analogni programi počeli su i za Murbodner i Kärntner Blondvieh pasminu.

Prema Gašert (1973., cit. Ford, 1945.) polimorfni se smatra onaj lokus na kojem se pojavljuju dva ili više alela u takvom međusobnom odnosu da se frekvencija najrjeđeg alela ne može smatrati povratnom mutacijom. Da bi jedan lokus bio polimorfan najčešće se smatra da frekvencija najučestalijeg alela ne smije biti veća od 0.95.

Genetski polimorfizam utvrđen je za mnoge proteine, uključujući i enzime, u raznim tjelesnim tekućinama i tkivima. Istraživanje biološki polimorfne tvari u goveda dijele se u pet bitnih skupina. To su antigeni eritrocita (krvne grupe), proteini krvnog seruma, proteini mlijeka, antigeni leukocita i trombocita te enzimi. Polimorfni proteini krvnog seruma su transferin, albumin, postalbumin, amilaza, i α -globulin, dok se polimorfizam hemoglobina i karboanhidraze određuje u hemolizatu. U polimorfne proteine mlijeka ubrajaju se kazeini (α_{s1} -, α_{s2} -, β - i κ -),

β -laktoglobulin, α -laktalbumin i laktotransferin.

Predmet ovog istraživanja je polimorfizam transferina (Tf), hemoglobina (Hb), α_{s1} -, α_{s2} -, β - i kazeina, te β -laktoglobulina u goveda, pa će u daljnjem tekstu biti govora samo o njima. Istraživanje genetskog polimorfizma ovih proteina praktički predstavlja početak sustavnog praćenja frekvencija za pasmine goveda u Hrvatskoj. Ovo je jedan od zadataka u projektu "Genetski polimorfizmi i zbirke gena pasmina domaćih životinja u Hrvatskoj".

Polimorfizam transferina u goveda prvi je opisao Ashton (1957.). Smithies i Hickman (1958.) opisali su način nasljeđivanja transferina kao tipični alelomorfizam bez dominacije. Polimorfizam transferina u europskih pasmina goveda izazivaju četiri alela (TfA, TfD₁, TfD₂ i TfE₂). Ranije nije bilo moguće elektroforetski razdvojiti TfD₁ i TfD₂, već su oba alela smatrana jedinstvenim genom, TfD. Danas se zna da fenotip koji je ranije označavan kao DD zapravo može biti D₁D₁, D₂D₂ ili D₁D₂, fenotip AD može biti AD₁ ili AD₂ a DE može biti D₁E ili D₂E. Tako spomenuta četiri alela mogu međusobnim kombinacijama dati ukupno 10 fenotipova (AA, AD₁, AD₂, D₁D₁, D₂D₂, D₁D₂, D₁E, D₂E, EE, AE).

Frekvencija pojedinih alela ovisna je o pasmini. Najveću frekvenciju imaju aleli TfD₁ i TfD₂, (TfD) u većini pasmina, dok je vrlo niska frekvencija alela TfE karakteristična za sve pasmine (tablica 1.)

Tab. 1. - FREKVENCIJA GENA NA Tf LOKUSU U GOVEDA.
GENE FREQUENCY OF BOVINE Tf

Pasmina - Breed	Frekvencija - Frequency				Autor - Author
	pA	qD1	rD2	sE	
Fleckvieh (Švicarska)	0.191	0.795*		0.013	Krummen (1965.)
Fleckvieh (Austrija)	0.190	0.820*		0.010	Schleger (1967.)
Fleckvieh (Austrija)	0.183	0.313	0.449	0.055	Kramser (1972.)
Fleckvieh (Njemačka)	0.168	0.379	0.417	0.036	Hierl i sur. (1978.)
Simentalac (Hrvatska)	0.357	0.536*		0.106	Gašert (1973.)
Simentalac (Slovenija)	0.179	0.779*		0.042	Böhm (1973.)
Simentalac (Slovenija)	0.148	0.833*		0.019	Senegačnik (1967.)
Istarsko (Hrvatska)	0.254	0.701*		0.045	Böhm (1973.)
Slavonski podolac (Hrv)	0.441	0.506*		0.053	Comberg i sur. (1965.)
Mađarski podolac (Mađ)	0.411	0.526*		0.035	Kovacs i sur. (1972.)

* Frekvencija TfD₁ i TfD₂ izračunata je zajedno kao frekvencija jednog alela - TfD

Genetsku varijabilnost hemoglobina u goveda prvi su otkrili Channes i Serain (1955.). Varijabilnost hemoglobina objasnili su kao genetski polimorfizam koji kontrolira jedan lokus s dva alela. Bengham (1957.) nazvao je ta dva alela HbA i HbB. Dva spomenuta alela daju tri genotipa A/A, A/B i B/B. Zona B je pri elektroforezi brža od zone A. Osim dva navedena alela otkriveni su još HbC, HbD Zambia i HbG (Vella, 1958.; Crockett i sur., 1963.; Carr, 1965.; Efremov i Braend, 1965.; Braend, 1970.). Ovi se aleli ne pojavljuju u europskih pasmina goveda.

Frekvencija alela na Hb lokusu prikazana ja na tablici 2.

Tab. 2. - FREKVENCIJA ALELA NA Hb LOKUSU U GOVEDA
GENE FREQUENCY OF BOVINE Hb

Pasmina - Breed	Frekvencija - Frequency		Autor - Author
	pA	qB	
Fleckvieh (Njemačka)	0.897	0.103	Buschmann i Schmid (1964.)
Fleckvieh (Njemačka)	0.810	0.190	Hierl i sur. (1978.)
Simentalac (Slovenija)	0.872	0.128	Böhm (1973.)
Istarsko govedo (Hrv)	0.958	0.042	Böhm (1973.)
Slavonski podolac (Hrv)	0.951	0.049	Comberg i sur. (1965.)
Mađarski podolac (Mađ)	0.935	0.065	Kovacs i sur (1972.)

Proteini mlijeka dijele se na kazein i proteine sirutke. U kravljem mlijeku na frakciju kazeina otpada 80% dok preostalih 20% čine proteini sirutke. Kazein se dijeli na četiri frakcije: α_{s1} -Cn, α_{s2} -Cn, β -Cn i k-Cn. Proteini sirutke su α -laktalbumin i β laktoglobulin.

Polimorfizam α_{s1} -kazeina (α_{s1} -Cn) otkrili su Thompson i sur. (1962). Elektroforezom su frakciju α_{s1} -kazeina razdvojili na A i B varijantu. Danas su u goveda poznate četiri genetske varijante α_{s1} -kazeina, A, B, C i D.

Na gen lokusu koji kontrolira sintezu α_{s1} -kazeina danas su u goveda poznata četiri različita alela koji određuju primarnu strukturu genetskih varijanti α_{s1} -kazeina; A, D, B i C. Navedena četiri alela (A, B, C i D) nasljeđuju se kodominantno i daju genotipove A/A, A/B, A/C, A/D, B/B, B/C, B/D, C/C, C/D D/D.

Frekvencija gena odgovornih za sintezu varijanti α_{s1} -Cn po pasminama goveda prikazana je na tablici 3. Genetske varijante B i C pojavljuju se u svim pasminama, a varijante A i D prisutne su samo u nekim.

Tab. 3. - FREKVENCIJA GENA NA α_{s1} -KAZEIN LOKUSU GOVEDA
GENE FREQUENCY OF BOVINE α_{s1} -CASEIN

Pasmina - Breed	Frekvencija - Frequency				Autor - Author
	pB	qC	rA	sD	
Fleckvieh Njemačka)	0.90	0.10			Laloux i Erhardt (1990.)
Fleckvieh (Njemačka)	0.92	0.08			Putz i sur. (1991.)
Simentalac (Hrvatska)	0.96	0.04			Lukač-Havranek i sur. (1992.)
Simentalac (Slovenija)	0.81	0.00	0.188*		Böhm (1973.)
Simentalac (Češ. i Slo.)	0.91	0.09			Macha (1986.)
Simentalac (Mađarska)	0.93	0.07			Aschaffenburg (1968.)
Simentalac (Poljska)	0.95	0.05			Leonard-Kluz i sur. (1987,a)

* Elektroforezom je izdvojena samo α s-Cn frakcija.

α_{s2} -kazein predstavlja frakciju kazeina koja je posljednja otkrivena. Polimorfizam α_{s2} -kazeina otkrili su Grosclaude i sur. (1976.). Na lokusu koji kontrolira sintezu α_{s2} -kazeina utvrdili su tri alela, A, B i C, koji se nasljeđuju kodominantno. Četvrta varijanta (D) otkrivena je nešto kasnije (Grosclaude i sur. 1978.). Otkrićem primarne strukture α_{s2} -kazeina (Brignon i sur. (1976., 1977.)) promijenila se nomenklatura proteina mlijeka. Tako se frakcije proteina mlijeka, prije klasificirane kao α_{s2} -, α_{s3} -, α_{s4} -, α_{s5} - i α_{s6} danas svrstavaju u α_{s2} -kazein, a smatra se da se razlikuju samo u stupnju fosforilacije (Lukač - Havranek, 1992.; cit. Eigel i sur., 1984.).

Prema navodima Lukač-Havranek i sur. (1992.) u goveda je, osim nekih francuskih pasmina, prisutna samo varijanta A α_{s2} -kazeina. Ostale varijante otkrivene su samo u jaka i zebu goveda (Grosclaude, 1988.). Pregled frekvencija prikazan je na tablici 4., a broj prikazanih frekvencija ograničen je činjenicom da je u mnogim pasminama utvrđena 100% zastupljenost genetske varijante A, koju mnogi autori u svojim radovima nisu prikazivali.

Tab. 4. - FREKVENCIJA GENA NA α_{s2} -KAZEIN LOKUSU GOVEDA
GENE FREQUENCY OF BOVINE α_{s2} -CASEIN

Pasmina - Breed	Frekvencija - Frequency		Autor - Author
	pA	qD	
Abondance (Francuska)	1		Grosclaude (1988.)
Normande (Francuska)	1		Grosclaude (1988.)
Montbeliarde (Francuska)	0.99	0.01	Grosclaude (1988.)
Vosqienne (Francuska)	0.91	0.09	Grosclaude (1988.)

Polimorfizam β -kazeina prvi je utvrdio Aschaffenburg (1961.). Danas se zna da se na lokusu koji kontrolira sintezu β -kazeina u goveda nalazi 6 alela (A^1 , A^2 , A^3 , B i C i E).

Najučestalije genetske varijante β -kazeina u goveda su A^1 i A^2 . Varijanta A^3 utvrđena je u HF, Rotbunte, Fleckvieh i Normande goveda u niskim frekvencijama. Varijanta B utvrđena je u gotovo svih navedenih pasmina goveda s velikim razlikama u frekvenciji između pojedinih pasmina. β -kazein C pronađen je u niskim frekvencijama u simentalca, smeđeg, Normande, crnošarog francuskog i crvenošarog furlanskog goveda. Varijanta E utvrđena je samo u Piedmont goveda (Italija) u niskoj frekvenciji (Voglino, 1972.).

Tab. 5. - FREKVENCIJA GENA NA β -KAZEIN LOKUSU GOVEDA.
GENE FREQUENCY OF BOVINE β -CASEIN

Pasmina - Breed	Frekvencija - Frequency				Ostali Other	Autor - Author
	pA ¹	qA ²	rB	sC		
Fleckvieh (Njemačka)	0.30	0.59	0.09	0.02	$A^3=0.01$	Laloux i Erhardt (1990.)
Simentalac (Slovenija)	0.88*		0.10	0.02		Böhm (1973)
Simentalac (Hrvatska)	0.175	0.675	0.136	0.014		Lukač-Havranek i sur. (1992.)

* Frekvencija je određena samo za gen $A=A^1+A^2+A^3$

Polimorfizam k-kazeina otkrili su Neelin (1964.), Schmidt (1964.) i Wojchik (1964.). Elektroforezom na škrobnom gelu radvojili su k-Cn na dvije genetske varijante, A i B. Za k-kazein poznate su četiri genetske varijante i to A, B, C i E. Varijante A, B, C i E nasljeđuju se kodominantno.

Varijante k-kazeina C i E otkrivene su u manjem broju pasmina u novije vrijeme (Di Stasio i Merlin, 1979.; Mariani, 1983.; Seibert, 1987.; Erhardt, 1989.; Snój i sur., 1992.; Lukač Havranek i sur., 1992., Erhardt i Senft, 1989.;).

Kao što se vidi na tablici 6. k-kazein A i B pojavljuju se u svim navedenim pasminama. Varijanta A prisutna je u višoj frekvenciji nego varijanta B u svih pasmina osim u Jersey, Brown Swiss i Braunvieh goveda. Varijante C i E zastupljene su u niskim frekvencijama u manjem broju pasmina. Varijanta C utvrđena je u niskoj frekvenciji i u populaciji hrvatskog simentalca (Lukač- Havranek i sur., 1992.,).

Po svim dosadašnjim istraživanjima varijanta C nije otkrivena u iste pasmine gdje i varijanta E, što je vjerojatno posljedica evolucije (Lukač-Havranek i sur., 1992; cit. Erhardt, 1989.). Erhardt (1989.) predlaže podjelu pasmina goveda u tri grupe na osnovi k-kazein genotipa; pasmine s k-kazein A, B, C, pasmine s k-kazein A, B, E i pasmine s k-kazein A, B alelima.

Tab. 6. - FREKVENCIJA GENA NA K-KAZEIN LOKUSU GOVEDA.
GENE FREQUENCY OF BOVINE K-CASEIN

Pasmina - Breed	Frekvencija - Frequency				Autor - Author
	pA	qB	rC	sE	
Fleckvieh (Njemačka)	0.76	0.22	0.02		Erhardt (1989.)
Fleckvieh (Austrija)	0.73	0.27			Mayr i sur. (1992.)
Simentalac (Slovenija)	0.66	0.34			Böhm (1973.)
Simentalac (Hrvatska)	0.62	0.32	0.06		Lukač-Havranek i sur. (1992.)

Buchberger (1989) navodi da je frekvencija alela k-kazein B u Fleckvieh pasmine u Njemačkoj za 5 godina (od 1984 do 1989) pala s 0.30 na 0.22, dok se frekvencija nepoželjnog gena A adekvatno povećala.

Polimorfizam β -laktoglobulina otkrili su Aschaffenburg i Drewry (1955., 1957.). Elektroforezom su razdvojili frakciju β -laktoglobulina na A i B varijantu. U kasnijim istraživanjima (Bell i sur., 1962., 1970., 1981.; Grosclaude i sur., 1966.; Davoli i sur., 1988.; Krause i sur., 1988.; Godovac-Zimmermann i sur., 1990.) pronađene su još mnoge druge varijante tako da je danas poznato 10 genetičkih varijanti β -laktoglobulina (A,B,C,D,Dr,E,F,G,H i W). U svim europskih i sjevernoameričkih goveda prisutne su samo A i B varijanta, dok se D varijanta pojavljuje u manjem broju pasmina (tablica 7.). Varijanta C utvrđena je samo u Jersey goveda, a varijanta W samo u Murnau-Werdenfelser pasmine. Aleli što kontroliraju sintezu β -Lg nasljeđuju se kodominantno prema Mendelovim zakonima.

Kao što se vidi na tablici 7. frekvencije A i B alela kreću se između 0.40 i 0.60. Aleli C i D pojavljuju se u niskim frekvencijama u manjem broju pasmina, a alel W karakterističan je samo za Murnau- Werdenfelser pasminu. Osim navedenih, u

Friesian goveda u Italiji otkrivena je H varijanta β -laktoglobulina. Ostale varijante (E, F i G) utvrđene su samo u jaka i banteg goveda.

Tab. 7. - FREKVENCIJA ALELA NA β -LAKTOGLOBULIN LOKUSU GOVEDA
GENE FREQUENCY OF BOVINE β -LACTOGLOBULIN

Pasma - Breed	Frekvencija - Frequency			Ostali Other	Autor - Author
	pA	qB	sD		
Fleckvieh (Njemačka)	0.47	0.52	0.01		Laloux i Erhardt (1990.)
Fleckvieh (Austrija)	0.50	0.50			Mayr i sur. (1992.)
Simentalac (Slovenija)	0,51	0,49			Böhm (1973.)
Simentalac (Češka i Sl.)	0.52	0.48			Macha (1986.)
Simentalac (Hrvatska)	0.57	0.43			Lukač-Havranek i sur. (1992.)

Naš znanstveni cilj je utvrditi stvarno stanje polimorfizma proteina krvi i mlijeka pasmina goveda u Hrvatskoj, kao temelj za:

a) ustanovljavanje povezanosti frekvencija polimorfa s proizvodnim i reproduktivnim karakteristikama (u izradi je doktorska disertacija).

b) određivanje pasmine čistoće i razlike u odnosu na srodne tipove, sojeve i pasmine kao preduvjet budućem stvaranju zbirke gena pasmina domaćih životinja u Hrvatskoj (poseban projekat istraživanja 4-05-27),

c) inventarizacija stanja geno-fonda goveda u Hrvatskoj i buduće praćenje promjena varijabilnosti (razvijene zemlje proteklih 10 godina provjeravaju stanje frekvencije gena i eventualnu ugroženost nekih).

U ovom radu iznosimo naše dosadašnje rezultate istraživanja polimorfizma hemoglobina i transferina u simentalca, istarskog goveda i slavonskog podolca, te polimorfizam proteina mlijeka u simentalca.

Materijal i metode

Istraživanje je obavljeno na kravama panonskog podolca (27 krava), istarskog goveda (59 krava) i simentalca (71 krava). Uzeti su uzorci krvi iz jugularne vene. Krv se transportirale u prenosnom hladnjaku do laboratorija gdje je serum odvojen od koagulata centrifugiranjem na 3000 g u trajanju od 30 minuta. Nakon centrifugiranja uzorci seruma su duboko smrznuti i do analiza čuvani na -20°C . Za određivanje polimorfizma hemoglobina krv je konzervirana heparinom, a eritrociti su tri puta ispirani fiziološkom otopinom (0.9%) i tri puta centrifugirani na 1500g u trajanju od 15 minuta. Nakon svakog centrifugiranja vakum pumpom isisan je ostatak plazme i fiziološke otopine a eritrociti su duboko smrznuti i do analiza čuvani na -20°C . Polimorfizam transferina određen je u krvnom serumu, a hemoglobina u hemolizatu.

Uzorci mlijeka uzimani su od simentalčkih krava iz muznih kanti i transportirani u prenosnom hladnjaku do laboratorija gdje su duboko smrznuti i čuvani na -20°C do analiza.

Genetske varijante svih istraživanih proteina određene su elektroforezom. Za određivanje polimorfizma transferina upotrebljena je HDF elektroforeza (High

Diagnostic Value) na "cellogel" trakama. Kao pufer upotrijebljena je tris-glicinsalicilna kiselina (Chemetron, Code 02A03-10). Elektroforeza je trajala 40 minuta pri napomu od 300 V. Bojanje je obavljeno Coomassie Brilliant Blue 350R bojom.

Genetske varijante hemoglobina određene su na cellogel trakama u Chemetron tanku. Elektroforeza je trajala 30 minuta pri naponu od 250 V. Tris-glicinski pufer (Chemetron, Code 02A01-10) otopljen je u 1500 ml destilirane vode (pH 9.0) te upotrijebljen kao gel-pufer i kao elektrolit (kontinuirani sistem). Za očitovanje genetskih varijanti hemoglobina nije bilo potrebno bojanje.

Genetske varijante proteina mlijeka određene su poboljšanom metodom izoelektričnog fokusiranja (IEF) na poliakrilamidnom gelu (PAGE) PhastSystemom, kako to opisuju Bovenhis i Verstege (1989.).

Određene frekvencije gena krvnih proteina (hemoglobina i transferina) poslužile su za testiranje razlika između istarskog, panonskog i simentalnog goveda, po pojedinom lokusu. Frekvencije gena krvnih i mliječnih proteina simentalnog goveda uspoređivane su s frekvencijama gena njemačkog simentalca. Za određivanje utjecaja (razlika) pasmina na frekvenciju pojedinog gena poslužio je loglinear model:

$$\log (p)_{ij} = \mu + \lambda^P_i + \lambda^{PG}_{ij}$$

Gdje su:

p - frekvencija pojedinog alela po pasmini

μ - prosjek svih logaritama frekvencija

λ^P_i - utjecaj pasmine

λ^{PG}_{ij} - interakcija utjecaja pasmine i alela

U testiranju razlika između pasmina primjenjuje se nul hipoteza da je pojedini koeficijent λ jednak nuli. Pošto standardizirana vrijednost λ ima približno normalnu distribuciju, nul hipoteza na 5% - tnoj razini signifikantnosti prihvaća se ako je izraz $Z = \lambda/s_\lambda$ manji ili jednak 1.96, gdje je s_λ standardna greška procjene parametra.

Rezultati i rasprava

Na tablici 8 prikazane su frekvencije gena krvnih proteina (hemoglobina i transferina) za istarsko, panonsko-podolsko i simentalno govedo Hrvatske.

Tab. 8. - FREKVENCIJA ALELA HB I TF ZA ISTARSKO, PANONSKOPODOLSKO I SIMENTALSKO GOVEDO
GENE FREQUENCY OF HB AND TF IN ISTRIAN, PANONIAN PODOLIAN AND SIMMENTAL CATTLE

Polimorfi - Polymorphs	Pasmina - Breed		
	Istarsko - Istrian	Panonsko - Panonian	Simentalsko Simmental
n	59	27	71
Hb	A	1.00	0.98
	B	0.00	0.02
Tf	A	0.29	0.33
	D	0.66	0.39
	E	0.05	0.28

Kao što se vidi lokus za Hb u istarskog goveda je monomorfan što nije u skladu s rezultatima Böhma (1973.), koji je utvrdio frekvenciju za HbB od 0.042. Utvrđene razlike u frekvencijama mogu biti rezultat smanjenja broja istarskog goveda. Istraživani uzorak nije mogao biti veći s obzirom da "čistog" istarskog goveda ima svega nekoliko desetaka grla.

Za panonsko govedo utvrđene su slične frekvencije kao u ranijim istraživanjima (Miličić, 1964.; Comberg, 1965.). Slične frekvencije gena na Hb lokusu utvrdili su Kovacs i sur. (1972.) za mađarskog podolca. Za razliku od pasmina podolskog tipa u hrvatskog simentalca frekvencija za HbB znatno je veća.

Frekvencija alela na Tf lokusu za istarsko govedo poklapa se s navodima Böhma (1973.). Međutim, frekvencije alela za panonsko govedo znatno su različite od ranije utvrđenih (Comberg, 1965.). To se naročito odnosi na frekvenciju alela TfE, koja je prema našim istraživanjima pet puta veća od ranije utvrđene. Frekvencije Tf alela u simentalnog slične su frekvencijama u istarskog goveda.

Tab. 9. - LOG-LINEAR ANALIZA RAZLIKE U FREKVNCIJAMA ALELA ZA HB I TF ISTARSKOG, PANONSKO-PODOLSKOG I SIMENTALSKOG GOVEDA
LOG-LINEAR ANALYSIS OF GENE FREQUENCY DIFFERENCE OF HB AND TF IN ISTRIAN, PANONIAN PODOLIAN AND SIMMENTAL CATTLE

Pasmina - Breed	Hb			Tf		
	λ	s	Z	λ	s	Z
Istarsko - Istian	-.791	.487	-1.625	-.124	.126	-.987
Panonsko - Panonian	.005	.322	.011	.293	.103	2.843**
Simentalno - Simmental	.788	.277	2.843**	-.169	.131	-1.287

** P<.01

Na tablici 9 se vidi da su utvrđene razlike u frekvencijama alela na Hb lokusu statistički signifikantne između simentalca i ostalih promatranih pasmina. Frekvencija alela na Tf lokusu statistički je značajno različita (P<01) između panonskog podolca i ostalih analiziranih pasmina.

Tab. 10. - FREKVENCIJA ALELA KRVNIH (HB, TF) I MLIJEČNIH PROTEINA (α_{s1} -, α_{s2} -, β I K-KAZEINA, β -LAKTOGLOBULINA) U HRVATSKOG SIMENTALCA (N=71).
GENE FREQUENCY OF BLOOD (HB, TF) AND MILK PROTEINS (α_{s1} -, α_{s2} -, β - I K-CASEIN, β -LACTOGLOBULIN) IN CROATINA SIMMENTAL (N=71)

Polimorfi Polimorphs	A	Frekvencija - Frequency					
		A1	A2	B	C	D	E
Hb	.87			.13			
Tf	.32					.64	.04
α_{s1} -kazein				.99	.01		
α_{s2} -kazein	1.00			.00			
β -kazein		.12	.75	.11	.02		
k-kazein	.66			.26	.08		
β -Lg	.55			.45			

Na tablici 10 prikazane su frekvencije alela proteina krvi i mlijeka. Svi istraživani proteini su polimorfni osim α_{s2} -kazeina. Frekvencije alela na Hb lokusu gotovo su identične u hrvatskog i slovenskog simentalca, dok je frekvencija HbB alela u njemačkog simentalca (Hierl i sur., 1978.) nešto viša. Frekvencija TfE slična je u hrvatskog simentalca kao i u Švicarskoj (Krummen, 1965.), Austriji (Kramser, 1972.), Njemačkoj (Hierl i sur., 1978.) i Sloveniji (Böhm, 1973.). Frekvencija TfA alela je u hrvatskog simentalca viša, a TfD alela niža nego u navedenim zemljama.

Frekvencije alela na α_{s1} -kazein lokusu slične su u hrvatskog i ostalih populacija simentalca. α_{s2} -kazein lokus monomorfan je u svim populacijama simentalca. Hrvatski simentalac razlikuje se od njemačkog po frekvenciji alela β -Cn¹ i A². Frekvencije alela na k-kazein lokusu slične su u hrvatskog, njemačkog, austrijskog i slovenskog simentalca. Hrvatski simentalac ne razlikuje se po frekvencijama β -Lg alela A i B od njemačkog, austrijskog i slovenskog simentalca. Jedina razlika je pojava trećeg alela (D) u niskog frekvenciji u njemačkog simentalca (Laloux i Erhardt, 1990.).

Log-linear analizom testirane su razlike između hrvatskog i njemačkog simentalca u frekvencijama alela za istraživane polimorfne proteine. Kao što se vidi na tablici 11 nije utvrđena signifikantna razlika ni za jedan lokus, što potvrđuje da su hrvatski i njemački simentalac filogenetski bliski.

Tab. 11. - LOG-LINEAR ANALIZA RAZLIKE U FREKVENCIJAMA ALELA ZA PROTEINE KRVI (Hb, Tf) I MLJEKA (α_{s1} , α_{s2} , β - i k-kazeina, β laktoglobulina) IZMEĐU HRVATSKOG I NJEMAČKOG SIMENTALCA. LOG-LINEAR ANALYSIS OF GENE FREQUENCY DIFFERENCE OF BLOOD (Hb, Tf) AND MILK PROTEINS (α_{s1} , α_{s2} , β - i k-casein, β - lactoglobulin) BETWEEN CROATIAN AND GERMAN SIMMENTAL CATTLE

	Pasmina - Breed					
	Njem. simentalac - Ger. Simmental			Hrv. simentalac - Cro. Simmental		
	λ	s	Z	λ	s	Z
Hb	.074	.096	.768	-.074	.096	-.768
Tf	-.068	.125	-.548	.068	.125	.548
α_{s1} -kazein	.415	.224	1.851	-.415	.224	-1.851
β -kazein	.058	.133	.434	-.058	.133	-.434
k-kazein	-.208	.132	-1.574	.208	.132	1.574
β -Lg	.181	.276	.655	-.185	.276	-.670

Zaključak

Na temelju istraživanja polimorfizama proteina krvi i mlijeka simentalca, istarskog i panonskog podolskog goveda može se zaključiti sljedeće:

- stvarna frekvencija alela Hb istarskog goveda različita je od ranijih istraživanja, a frekvencija alela Tf u granicama je dosadašnjih istraživanja.
- ustanovljene frekvencije Hb panonskog podolca podudaraju se s rezultatima drugih istraživanja za srodne podolske tipove.

Naprotiv, frekvencije Tf znatno su različite.

- frekvencije alela analiziranih polimorfa proteina hrvatskog simentalca, nisu signifikantno različite od frekvencija njemačkog simentalca. Rezultat protvrđuje filogenetsku bliskost.
- za kompletnije i pouzdanije poznavanje sadašnje genetske varijabilnosti naših pasmina goveda i ustanovljavanje eventualnih promjena u frekvencijama ubuduće treba obavljati istraživanje na većem broju životinja i za više polimorfni tvari.

LITERATURA

1. A s c h a f f e n b u r g, R., D r e w r y, J. (1955): Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. *Nature* 176: 218-219.
2. A s c h a f f e n b u r g, R., J. D r e w r t (1957): Genetics of the β -lactoglobulins of cow's milk. *Nature* 180: 376-378.
3. A s c h a f f e n b u r g, R. (1968): Review of the progress of dairy science Section G. Genetics. Genetic variants of milk proteins: their breed distribution. *Journal of Dairy Research* 35: 447-460
4. A s h t o n, G. C. (1957): Serum protein differences in cattle by starch gell electrophoresis. *Nature* 180:917-918.
5. B a n g h a m, A. D. (1957): Distribution of electrophoretically different haemoglobins among some cattle breeds of Great Britain. *Nature, London*, 179:467 - 468.
6. B a n g h a m, A. D. i B. S. B l u m b e r g (1958): Distribution of electrophoretically different haemoglobins among some cattle breeds of Europe and Africa. *Nature, London*, 181:1551-1552.
7. B e l l, K. (1962): One - Dimensional Starch-Gel Electrophoresis of Bovinne Skim-Milk. *Nature, Lond.* 195: 705-706
8. B e l l, K., M c K e n z i e, H. A., M u r p h y, W. H., S h a w, D. C., (1970): β -lactoglobulin (Droughtmaster): A unique protein variant. *Niochim. Biophys. Acta* 214: 427-436
9. B e l l, K., H o p p e, K. E., M c K e n z i e, H. A. (1981): Bovine α -lactalbumin C and α_{S1} -, β -, and k-caseins of Bali (Banteg) cattle, *Bos (Bibos) javanicus*. *Australian Journal of Biological Sciences* 34: 149-159.
10. B e l l, K., M c K e n z i e, H. A., S h a w, D. C., (1981): Bovine β -lactoglobulin E, F and G of Bali (Banteg) cattle, *Bos (Bibos) javanicus*. *Aust. J. Biol. Sci.* 34: 133-147
11. B o d o, I. (1990): Current Status of Conservation of Genetic Resources im Farm Animals. *Krems*.
12. B o d o, I., K o v a c s, J. S e r e g i, E. T a k a c s (1989): Die Anwendung einiger spezieller Methoden der Genkonservierung in Ungarn. *Tierarztl. Usahr.* 76, 285-289., Wien.
13. B ö h m, O. (1973): Blood groups of cattle breeds in Yugoslavia. Final report of the project: "Study of blood groups of cattle breeds in Yugoslavia. Ljubljana.
14. B o v e n h u i s, H. i A. J. M. V e r s t e g e (1989): Improved method for fenotypic milk protein variants by isoelectric focusing using PhastSystem. *Neth. Milk Dairy J.* 43:447.
15. B o v e n h u i s, H. (1991): Direct effects of milk protein genetic variants on milk production traits. The 42nd Annual EAAP- meeting, Berlin 1991.
16. B r a e n d M. (1971.): Haemoglobin variants in cattle. *Anim. Blood Grups biochem. Genet.* 2:15-21.
17. B r i g n o n, G., R i b a d e a u - D u m a s, B., M e r c i e r, J.-C. (1976): Primiers elements de structure primaire des caseines α_2 bovines. *FEBS Lett.* 71:111
18. B r i g n o n, G., R i b a d e a u - D u m a s, B., M e r c i e r, J.-C., P e l i s s i e r, J. - P., D a s, B.C. (1977): Complete amino acid sequence of bovine α_2 -casein. *FEBS Lett.* 76: 274-279
19. B u c h b e r g e r, J. (1989): Welche Milch ist Kasereitauglich. *Der Tierzuchter*, 41: 255-257.
20. C a b a n n e s, R. i C. S e r a i n (1955): Heterogeneite de l'hemoglobine des bovines. Identification electrophoretique de deux hemoglobines bovines. *C. r. Soc. Biol. (Paris)*, 149: 7-10.
21. C a p u t P. (1982): Genetski sastav suvremenog simentalca Hrvatske. *PZS*, 58:83
22. C a p u t, P. (1990): Inital programme for Podolian cattle conservation in Croatia. I. International DAGENE Symposium fur Genkonservierung, Krems.
23. C a p u t, P. i M. P o s a v i (1991): Threatened cattle breeds in Croatia. In *Genetic Conservation of Domestic Livestock*. Ed. L. Alderson, I. Bodo. CAB Interantional. Wallingford. 175-179.

48. Kovacs, Gy (1989): Immunogenetic methods in the maintenance of genetic polymorphisms in small population, Proceeding of the first Workshop, Bugacpuszta.
49. Kramser, P (1972): Biochemischer Polymorphismus und Blutgruppen bei ostereichischen Rinderrassen. Vet. Med. Diss. Tierarztl. Hochschule Wien.
50. Krause, I., Buchberger, J., Weiss, G., Pflügler, M., Klostermeyer, H., (1988): Isoelectric focusing in immobilized pH gradients with carrier ampholytes added for high-resolution phenotyping of bovine β -lactoglobulins: Characterization of a new genetic variant. Electrophoresis, 9: 609-613
51. Krummen, H. (1965): Determination of serum transferrin and haemoglobin types in Susiss cattle breeds. Z. Tierz. Zucht. Biol. 81: 139-166.
52. Laloux, J., Erhardt, G., (1990): Les variants genetiques des lactoproteines dans les races bovines belges. Reflexions sur le taux proteique. Revue de l'Agriculture, 43:781-795
53. Leonard-Kluz, I. A., Gwozdziwicz, A., Cieslar, P., Kolatowa, B., Rey, L., Tomaszkiwicz, A., Wierna, W., Zywozok, H. (1987): Milk protein polymorphism and performance traits of Red and White and Simmental cows in several herds in Bielski and Krosnienski districts. Roczn. Nauk. Zoot. T. 13, z. 2: 17-34
54. Leonard-Kluz, I. A., Gwozdziwicz, A., Straczewski, M., Tomaszkiwicz, A. (1987): Milk protein polymorphism in Black Pied cows in the Experimental Station Kolbacz with regard to their productivity and milk composition. Roczn. Nauk. Zoot. T. 12, z. 1: 105-122
55. Lukač-Havranek Jasmina, I. Ćurik, Dubravka Samaržija, N. Antunac i M. Posavi (1992): Polimorfizam proteina mlijeka u goveda. Stoč. 46:277-306.
56. Lukač-Havranek Jasmina, I. Ćurik, Dubravka Samaržija i N. Antunac (1992 a): Polimorfismi delle proteine del latte della razza Simmental Croatia. Sci.Tec.Lattiero Casearia
57. Macha, J. (1986): Genetical Structure of a Bovine Population from the Aspect of Genetical Polymorphism of Protein in Cow's Milk. Acta univ. agric. (Brno). fac. agron. XXXIV; 2: 253-262
58. Majjala, K. (1987): Possible role of animal gene resource in production natural environment conservation, human pleasure and recreation. FAO, animal production and health, Paper 66, Rome.
59. Mariani, P. (1983): Sulla presenza di una terza k-caseina nel latte di vacche di razza bruna. Sci. Tecn. Latt. -cas. 34, 174-181.
60. Mayr, B., A. Stiglhuber i W. Schlegler (1992): Häufigkeit des A- und B-Allels für k-Kasein bei österreichischen Teststieren der Fasse Fleckvieh, dargestellt mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)-Technik. Wien. Tierarztl. Mschr. 79:65-68.
61. Mayr, B., G. Flenka i W. Schlegler (1992): PCR-Analyse der k-Kaseinpolymorphismen bei Teststieren des österreichischen Braunviehs. Wien. Tierarztl. Mschr. 79: 215-217.
62. Mayr, B., K. Schellander, G. Korber i W. Schlegler (1992) L: PCR-Untersuchungen der β -Laktoglobulinvarianten bei österreichischen Teststieren. Wien. Tierarztl. Mschr. 79:277-279.
64. Miličić, P. (1964): Die Verteilung der Transferin- und Haemoglobintypen im Rinderrassen sowie der Blutkalium und Haemoglobintypen in Schafassen Jugoslaviens. Diss. Tierarztl. Hochsch. Hannover.
64. Müller, S. (1989): Das waldviertler blondrich als modell für die erhaltung seltener rinderrassen in Osterreich. Proceedings of the first workshop, Bugacpuszta.
65. Neelin, J. M. (1964): Variants of k-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. Journal of Dairy Science 47:506-509
66. Putz, M., G. Averdunk, J. Aumann, J. Buchberger (1991): Survey of genetic variants of milk proteins in Bavarian cattle populations and their relation with production traits. The 42nd Annual EAAP-meeting, Berlin 1991.
67. Samaržija, Dubravka, Jasmina Lukač-Havranek, I. Ćurik i N. Antunac (1992): Polimorfizam proteina mlijeka u proizvodnji sira. Mljekarstvo, 12: 319-327.
68. Schlegler, W., G. Mayrhofer, and F. Pirchner (1974): Relationship between heterozygosity as estimated from genetic markers and performance and average effects of marker genes. Anim. Blood Groups Biochem. Genet. (Suppl. 1): 37.
69. Schmidt, D. O. i E. Menzel (1964): Die Haemoglobin-typen als Beweismittel im Abstammungsgutachten beim Rind. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 77:6.

70. Seibert, B., G. Erhardt, B. Senft (1985): Procedure for simultaneous phenotyping of genetic variants in cow's milk by isoelectric focusing. *Anim. Blood Grps. and Biochem. Genet.* 16, 183-191.
71. Seibert, B., G. Erhardt, B. Senft (1987): Detection of a new k-casein variant in cow's milk. *Anim. Genetics* 18, 269-272.
72. Schmidt, D. G. (1964): Starch-gel electrophoresis of k-casein. *Biochim. biophys. Acta* 90: 411-414
73. Smith, C. i S. P. Simpson (1986): The use of genetic polymorphisms in livestock improvement. *J. Anim. Breed. Gen.* 103:205-217.
74. Smithies, O. i C. G. Hickman (1958): Inherited variants in the serum proteins in cattle. *Genetics* 43: 374-385.
75. Thompson, M. P. (1970): Phenotyping Milk Proteins: A Review. *Journal of Dairy Science* 53: 1341-1348
76. Thompson, M. P., Kiddy, C. A., Pepper, L., Zittle, C.A. (1962): Variations in the α s-Casein Fraction of Individual Cow's Milk. *Nature, London.* 195: 1001-1002
77. Threadgill, D. W., J. E. Womack (1990): Genomic analysis of major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Research* 18: 6935-6942.
78. Vanden Berg, G. (1991): Tehnological properties of milk related to genetic polymorphism of k-casein and β -lactoglobulin. The 42nd Annual EAAP-meeting, Berlin 1991.
79. Van Eenennaam, A., Medrano, J. F. (1991): Milk protein polymorphisms in California dairy cattler. *Journal of Dairy Science* 74: 1730-1742.
80. Vella, F. (1958): Haemoglobin types of ox and buffalo. *Nature, Lond.* 181: 564-565.
81. Vogliano, G. F. (1972): A new β -casein variant in Piedmont cattle. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 3: 61-62
82. Waugh, D. F. (1971): *Milk Proteins: Chemistry and Molecular Biology* II McKenzie, H. A. 4-79 Academic Press, Inc. New York.
83. Woychik, J. H. (1964): Polymorphism in k-casein of cow's milk. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 16: 267-271
84. Woychik, J. H. (1965): Phenotyping of k-casein. *Journal of Dairy Science* 48: 496-497

GENETIC BLOOD AND MILK PROTEIN POLYMORPHISMS IN SOME CATTLE BREEDS

Summary

Research was carried out on Simmental, Istrian and Slavonian Podolian cows from Croatia. Haemoglobin and transferrin frequencies in Istrian and Slavonian Podolian were different in similar investigation in previous years. The possible reason for such difference could have been in the decreased number of animals.

Frequencies of Hb, Tf, casein (α_{s1} , α_{s2} , β i k) and β -lactoglobulin in Croatian Simmental were similar to German Fleckvieh. That leads to the conclusion that the two breeds have similar phylogenetic background.

Primljeno: 13. 11. 1992.