

LITHUANIAN VETERINARY ACADEMY



Lina Baltrėnaite

INVESTIGATION OF GENETIC POLYMORPHISM IN GOATS BRED IN LITHUANIA

Summary of doctoral dissertation
Biomedical sciences, zootechny (13 B)

Kaunas, 2007

The work was carried out at the Lithuanian Veterinary Academy, Department of Animal Breeding and Genetics, K. Janauskas Laboratory of Animal Genetics in 2003–2007.

Research supervisor –

Acting Prof. Dr. Ilona Teodora Miceikienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny –13 B).

Zootechny Science Council:

Chairman –

Prof. Habil. Dr. Romas Gružauskas (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny – 13 B).

Members:

Prof. Habil. Dr. Juozas Lazutka (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01 B);

Prof. Habil. Dr. Aniolas Sruoga (VU Institute of Ecology, biomedical sciences, biology – 01 B);

Ass. Prof. Dr. Vigilius Jukna (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny –13 B);

Dr. Sigita Kerzienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny –13 B).

Opponents:

Prof. Habil. Dr. Ramutis Klimas (Šiauliai University, biomedical sciences, zootechny –13 B);

Ass. Prof. Dr. Natalija Burbulis (Lithuanian University of Agriculture, biomedical science, agronomy – 06 B).

Public defence of the doctoral dissertation in Zootechny Science Council will take place at the Lithuanian Veterinary Academy I auditorium 2 pm on 29th of November 2007.

Address: Tilžės str. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

The abstract of the doctoral dissertation has been sent on 29th of October 2007 according to confirmed address list.

The doctoral dissertation is available at the library of the Lithuanian Veterinary Academy and LVA Institute of Animal Science libraries.

LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA

Lina Baltrėnaitė

LIETUVOJE VEISIAMŲ OŽKŲ GENETINĖS ĮVAIROVĖS TYRIMAI

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, zootechnika (13 B)

Kaunas, 2007

Darbas atliktas 2003–2007 metais Lietuvos veterinarijos akademijos Gyvūnų veisimo ir genetikos katedroje K. Janušausko gyvūnų genetikos laboratorijoje.

Mokslinio darbo vadovė –

E. prof. p. dr. Ilona Teodora Miceikienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13 B).

Zootechnikos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

Pirmininkas –

Prof. habil. dr. Romas Gružauskas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13 B).

Nariai:

Prof. habil. dr. Juozas Lazutka (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

Prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (VU Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

Doc. dr. Vigilijus Jukna (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13 B);

Dr. Sigita Kerzienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13 B).

Oponentai:

Prof. habil. dr. Ramutis Klimas (Šiaulių universitetas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13 B);

Doc. dr. Natalija Burbulis (Lietuvos žemės ūkio universitetas, biomedicinos mokslai, agronomija – 06 B).

Disertacija bus ginama viešame Zootechnikos mokslo krypties tarybos posėdyje, kuris įvyks 2007 m. lapkričio mėn. 29 d. 14 val. Lietuvos veterinarijos akademijos I auditorijoje.

Adresas: Tilžės g. 18, LT-47181, Kaunas, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2007 m. spalio mėn. 29 d. pagal patvirtintą adresų sąrašą.

Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos veterinarijos akademijos ir LVA Gyvulininkystės instituto bibliotekose.

INTRODUCTION

It is widely known that animal productivity and other agricultural traits, such as milk quantity, milk composition, milk fat, protein quantity and chemical composition, milk's suitability for processing and producing individual milk products, milk discharge velocity during the milking process, succulence, speed of growth, etc., are inherited from generation to generation; whereas, their formation and functional features are determined by genes.

The majority of features, which stockbreeding takes interest in, are *quantitative* features. The indication of animal breed value is based on the quantitative theory of genetics. The conceptual basis of this theory is the so-called *polygenic model*, which states that quantitative features are conditioned by a vast number of genes that make influence by means of reciprocity. In this case, their determined features are prognosticated, using powerful statistical methods (animal model), based on the registration of separate animal and its congener's productivity features.

The inheritance of the quantitative features is basically based by polymeric (polygenic) gene performance, i. e. by common or similar influence of dominant independent or the majority of allele to a particular feature. The more gene pairs determine one or several quantitative feature evidence, the less there appear individuals with maximum conveyed feature. The more polymeric genes pass into the genotype, the more genotype classes convey in different generations and the less one might expect the maximum conveyance of the desirable feature.

The progress of molecular genetic technologies, especially DNA markers, over the last few decades had an enormous influence to the compilation of gene maps, which allowed identifying genes that control the changing part of multigenic features. For this purpose, two experimental strategies were formalized: candidate gene model and study of gene cohesion.

Gene cohesion studies are based on the recognition of genetic maps and search for quantitative feature locus (QTL), using kin data and comparing the segregation model of genetic markers (in most cases microsatellites) and analyzed features. Markers that tend to conglomerate with the analyzed feature, allow identifying the localization of gene (or genes), which contributes to the determination feature diversity, in the chromosome.

The other method is based on the study of several implicit gene (candidate gene) polymorphisms, with the presumption that they might influence the biological and physiological feature diversity. Therefore, relation analysis is performed, aiming to identify whether a particular genotype or haplotype (allele sequence along the DNA chain) has a stable relation with the feature analyzed (for example, protein synthesis velocity or milk produc-

tion). The application of this additional genetic information to the selection conditions better judgement concerning the true genetic value of the animal. It allows completing selection among the individuals that do not possess the analyzed feature. For example, to identify means of how milk protein genotypes will be inherited among the male individuals. This method is already applied in practice, while analysing cattle leucocyte adhesion deficiency (Shuster et al., 1992; Miceikiene et al., 2000; Kucinskiene et al., 2001), pig halotan locus (Rempel et al., 1993, Jokubka et al., 2001; Razmaite et al., 2001), goat AlfaS1-casein (Manfredi et al., 1995).

The detection of milk protein genetic variants gave rise to the analysis of milk protein polymorphism in many animal species – cattle, sheep and goat.

In the first stage of analysis cattle milk proteins were in the focus of attention; the aim was to indicate the relationship between milk protein variants, milk productivity and technological features. Cow Kappa-casein A and B variant's influence to the milk productivity proved that Kappa-casein BB genotype cow milk encompasses more fat, protein and caseins than in Kappa-casein AA genotype cow milk (Ng-Kwai Hang, 1998; Di Stacio et al., 2000). B allele is reliably associated with a larger quantity of casein and smaller quantity of whey protein; therefore, a larger casein/general protein proportion. Cow Kappa-casein BB genotype is also associated with milk production of better industrial features – shorter coagulation time, with the help of rennet performance, better consistence for curd formation and higher cheese output (Schaar, 1985; Marziali et al., 1986). This phenomenon is associated with milk casein micelles. Kappa-casein B micelle mass is more homogenetic and it encompasses a larger part of small micelles (Morini et al., 1975); therefore, total micelle surface area increases, conditioning better consistence curd formation.

The main focus of goat milk analysis was drawn to the AlfaS1-casein. „Strong“ (A, B, C) alleles, „medium“ (E), „low“ (F, D) and „zero“ alleles were identified in the AlfaS1-casein, associated with the high (3,6g/L), medium (1,6 g/L), low (0,6 g/L) and 0 AlfaS1-casein quantity in milk (Feligini et al., 2005). Nowadays many researches have been conducted concerning the AlfaS1-casein polymorphic relationship with the goat milk productivity, physic-chemical and technological features. However, the number of goat AlfaS2-casein and Kappa-casein researches was not that significant; this might have occurred due to its lesser polymorphism (Grosclaude et al., 1987; Jordana et al., 1991; Ramunno et al., 1991; Feligini et al., 2002; Veress et al., 2004). The fact of goat Kappa-casein polymorphism was demonstrated using protein electrophoresis (Russo et al., 1986; Di Luccia et al., 1990), chromatography (Jaubert et al., 1992; Law et al., 1993) and capillary electrophoresis (Recio et al., 1997). The first evidence of genetic polymor-

phism was provided by Mercier et al. (1976). Recently goat Kappa-casein variants were identified in different goat breed (Yahyaoui et al., 2001; Caroli et al., 2001; Angiolillo et al., 2002).

No research concerning goat milk protein genes have been conducted in Lithuania yet. We have analyzed milk protein gene polymorphism of different Lithuanian goat breeds and identified the relationship with milk traits.

Objective of the present study

Investigate distribution of genetic types of candidate genes for milk productivity traits in goats bred in Lithuania and determine their influence to milk yield and milk composition.

Tasks of the present study

Genotype AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes and determine their polymorphism in Lithuanian native, Saanen, Czech White and German White breeds.

Investigate influence of AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes polymorphic sites for milk yield and milk composition.

Determine polymorphism of AlfaS1-AlfaS2-Kappa-casein haplotype and influence for milk yield and milk composition.

Compare cattle and goat milk protein genes polymorphism and influence for milk yield and milk composition

Novelty of the present study

For the first time polymorphisms of AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes were genotyped identifying alleles and genotypes, their distribution in goat breeds raised in Lithuania and their relation to with milk yield and milk composition.

Practical importance

Modern methods of molecular genetics that have been implemented in LVA Animal Genetics laboratory encompass the possibility to identify genes that determine the diversity of milk proteins in goat genotypes. Genetic polymorphism of milk proteins found in goats bred in Lithuania can be used as selection criteria and informative marker for milk yield and milk composition in goat selection programs, investigating phylogenetic relations of breeds and in evolution studies.

MATERIAL AND METHODS

Samples to investigate milk protein genetic polymorphism were taken from Lithuanian native (30), Saanen (74), Czech White (29) and German White (18) breeds. DNA was extracted from hair roots. AlfaS1-casein gene polymorphism was investigated by AS-PGR method (Feligini et al., 2005). AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes polymorphism have been investigated by PGR-RFLP method (Cosenza et al., 1998; Yahyaoui et al., 2001; Folch et al., 1994).

For determination of milk proteins polymorphism influence to milk productivity traits data from 133 recorded goats were obtained from Record Processing Center „Žemės ūkio informacijos ir kaimo verslo centras“. Goats from German White breed were not used in this study as their milk productivity was not recorded.

Statistical analysis

Goat AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin allele, genotype, haplotype frequencies in each breed and in all investigated group, expected and observed heterozygosities per locus and population, deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were calculated using the R statistical package.

Effects of genetic and non genetic factors on milk production traits were estimated by monofactor and multifactor dispersion analysis (ANOVA) using the R statistical package.

First model was used to evaluate milk protein AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes influence to milk yield and milk composition traits.

Milk yield_{ijklmnop} (Fat, %_{ijklmnop}; Fat, kg_{ijklmnop}; Protein, %_{ijklmnop}; Protein, kg_{ijklmnop}) = μ + AlfaS1-casein_i + AlfaS2-casein_j + Kappa-casein_k + Beta-lactoglobulin_l + breed_m + farm_n + lactation_o + e_{ijklmnop}

Second model was used to evaluate milk protein AlfaS1-AlfaS2-Kappa-casein haplotype influence to milk yield and milk composition traits.

Milk yield_{ijklm} (Fat, %_{ijklm}; Fat, kg_{ijklm}; Protein %_{ijklm}; Protein, kg_{ijklm}) = μ + haplotype_i + breed_j + farm_k + lactation_l + e_{ijklm}

RESULTS AND DISCUSSION

According to our research results, B and E alleles were indicated in Lithuanian goat breeds milk protein AlfaS1-casein. B „strong“ allele, which conditions a larger quantity of AlfaS1-casein, was found very frequently (0.643-0.891) in the goats of all analyzed Lithuanian breeds, the most fre-

quent (0.89) in Lithuanian native goat breed. This allele is spread among the Italian goat breeds from 0.32 up to 0.52 frequency range (Feligini et al., 2002). In Hungarian milking goat breeds, B allele was identified along with the A allele and was found in 61 % of all goat population analyzed (Veress et al., 2004). Goat selection prefers „strong“ alleles, as a high output is achieved when making cheese out of such milk. „Low“ effect or 0 alleles are also important; they are not useful for milk manufacture industry, but are demanded by goat milk consumers, since this milk suits for allergic people. E allele was identified in Lithuanian Saanen goat population at the highest frequent range (0.36); whereas, the lowest frequency of E allele was found in Lithuanian native goat breed (0.12). These data coincide with the information provided in literature, which states that E allele was found in 41 % of Saanen goat, grown in France (Grosclaude et al., 1987) and in 46 % of Saanen goat grown in Italy (Ramunno et al., 1991). In Spanish Canaria goat breed, the E allele is spread only at 0.20 frequent range (Jordana et al., 1991), Hungarian milking goat breed possessed this allele only in 8 % of all the animals, in Polish white goat breed – 5 % (Krolikowska et al., 2002). Therefore, the „strong“ A and B alleles are most frequently found in goat breeds of Mediterranean region, as well as in Lithuanian goat breeds, especially in local Lithuanian breeds; whereas, „medium“ (E) and „low“ (F) alleles are more popular in French, Italian, Swiss and Spanish goat breeds (Jordana et al., 1996; Grosclaude et al., 1997; Enne et al., 1997) (Table 1).

The analysis of milk protein AlfaS2-casein gene variant spread proved that Lithuanian goat breeds possess the same milk protein AlfaS2-casein alleles as other European goat breeds – A and B. A allele frequency in Lithuanian goat breeds varied from 0.56 in Lithuanian native to 0.69 in Saanen breed; the average spread in analyzed goat population was 66.3 %. In Italian Alpine goat breed the A allele was found in 0.68 frequent range (Cosenza et al., 1998), in French Alpine goat breed – in 0.85 frequent range (Bouniol et al., 1994), whereas in South Italian locals this allele was spread among 31 % of the animals (Rammuno et al., 2001). The recently found E allele was found in two Italian goat breeds out of five (Lagonigro et al., 2001); it is possible that it could be used as breed marker to identify from what breed milk goat milk products are made. It would be useful to study this allele in Lithuanian goat breeds (Table 1).

Kappa-casein gene was analyzed among Italian, Spanish, German, French and Hungarian goat breeds (Caroli et al., 2001; Sacchi et al., 2001; Senese et al., 2001; Yahyaoui et al., 2001; Feligni et al., 2002; Veress et al., 2004; Chiatti et al., 2005). Our results correlate with the results provided by other scientists. Kappa casein C allele frequency varied among Lithuanian goat breeds from 0 in German white breed to 0.17 in Lithuanian local, alike

in Hungarian, Spanish and French goat breeds, where the frequency ranged from 0 to 0.15. Kappa casein A+B allele frequency in Lithuanian local breeds varied from 0.83 to 1, whereas in Hungarian, Spanish and French goat breeds - from 0.85 to 1. In French Saanen goat breed, the frequency of C allele was alike in Lithuanian Saanen breed, respectively 0.11 and 0.14 (Yahyaoui et al., 2001; Veress et al., 2004). A and B alleles were separately identified in Italian and German goat breeds. The frequency of A allele in Italian breeds varied from 0.44 to 0.67; whereas in German goat breeds this allele was found at a higher frequency range. 90 % of German Ionika goat breed possessed this allele, whereas the spread of this allele in Togenburgo breed was 100 % (Caroli et al., 2001). The A variant was found in all other breeds, but was not found among Italian Teramina and Montefalcone breeds. Except the E allele, which frequency range in Montefalcone breed is rather high (0.41), the frequency range of other variants was comparatively low – under 15 %. C variant is common among Saanen breed (13 %), whereas F alleles are found only among Italian Teramina, Girgentana and Sarda breeds. Alike the D allele, F, G and E alleles were not found in analyzed Spanish and French breeds (Yahyaoui et al., 2001; Jann et al., 2004) (Table 1).

Table 1. Allele frequencies of AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes in goats bred in Lithuania

Milk protein allele types	Lithuanian Native	Saanen	Czech White	German White
AlfaS1-casein				
B	0.891	0.643	0.875	0.778
E	0.109	0.357	0.125	0.222
AlfaS2-casein				
A	0.565	0.690	0.675	0.667
B	0.435	0.310	0.325	0.333
Kappa-casein				
A+B	0.826	0.857	0.925	1.000
C	0.174	0.143	0.075	0.000
Beta-lactoglobulin				
C	0.913	0.738	0.725	0.722
T	0.087	0.282	0.275	0.278

Beta-lactoglobulin was the first milk protein, which polymorphism was proved by electrophoresis method, while analysing cattle milk samples (Aschaffenburg and Drewy, 1955). Some genetic variants were identified in

different breeds, yet it was noted that the most frequently found alleles, A and B, are associated with the differences of milk yield and structure. AA genotype animal milk contained a larger quantity of Beta-lactoglobulin protein than BB genotype animal milk, moderately 2.58 mg/ml with the presence of A allele and 1.7 mg/ml with the presence of allele B (Ng-Kwai Hanget al., 1992). Due to such a remarkable quantity difference of Beta-lactoglobulin, associated with different alleles, structural Beta-lactoglobulin gene (A comparing to B) is the most important factor that influences the quantity of Beta-lactoglobulin in the milk (Grosclaude, 1988). The quantity of produced protein differs greatly in AB heterozygote animal milk as well. It was identified that in this case Beta-lactoglobulin A quantity is 1.5 times larger than Beta-lactoglobulin B (Graml et al., 1989; Lum et al., 1997).

Table 2. Genotype frequencies of AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes in goats bred in Lithuania

Milk protein genotypes	Lithuanian Native	Saanen	Czech White	German White
AlfaS1-casein				
BB	0.83	0.48	0.80	0.72
BE	0.13	0.33	0.15	0.11
EE	0.04	0.19	0.05	0.17
AlfaS2-casein				
AA	0.35	0.62	0.50	0.45
AB	0.43	0.14	0.35	0.45
BB	0.22	0.24	0.15	0.10
Kappa-casein				
A+B/A+B	0.74	0.80	0.85	1.00
A+B/C	0.17	0.10	0.15	0.00
CC	0.09	0.10	0.00	0.00
Beta-lactoglobulin				
CC	0.87	0.57	0.55	0.56
CT	0.09	0.33	0.35	0.34
TT	0.04	0.10	0.10	0.10

In West European milky goat breeds, Beta-lactoglobulin C and T alleles are found. C allele is popular among such Spanish breeds as Malagvena (0.75), Pajoja (0.73), whereas this allele was found in all the goats of Canaria breed (1.00); in French Saanen goat breed this allele was found at 73 % of frequent range, in Hungarian milky – 88 % (Veress et al., 2004). In Lithuanian goat breeds the average of C allele frequent range was 0.78.

Lithuanian native goats had the highest frequency range (0.91). In Lithuanian Saanen goat breed, the C allele was of the same frequency as in French goat breeds (Table 1).

In local Lithuanian breed, AlfaS1-casein BB genotype was found at a high frequency, whereas EE genotype – at low frequent range. 30 % of Polish white goat breed had the BB genotype; Italian goat breed had this genotype in 25-38 % (Feligini et al., 2002). No BE and EE genotypes were found in Italian Montefalkone breed (Belivacqua et al., 1999) (Table 2).

After the examining of milk traits according to AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin homozygote and heterozygote genotypes in Lithuanian goat population, it was identified that goats, which possessed AlfaS1-casein and Beta-lactoglobulin homozygote genotypes, had a statistically higher percent of fat and protein, whereas goats, which possessed AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin homozygote genotypes, were statistically milkier.

Caseins are coded by four related genes that form a cluster: AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Beta-casein and Kappa-casein, found in the 6th goat chromosome. Allele combinations in casein locus (haplotypes) are closely related and inherited as one genetic unit, therefore, casein locus genotype-forming is extremely important for a successful process of selection. All in all 8 different haplotypes were found. Haplotypes B/A/AB are indicated as the most popular ones among Lithuanian goat population. B/B/C and E/A/C haplotypes were found solely in two breeds – Lithuanian native and Saanen. Haplotype E/B/C is unique, since it was found only in one breed – Saanen. The milkiest goats, possessing milk high in fat were the ones who had E/A/AB haplotype (Table 3).

Table 3. Frequencies of casein haplotypes in goats bred in Lithuania

Haplotype*	Lithuanian Native	Saanen	Czech White	German White
B/A/AB	0.32	0.37	0.42	0.58
B/A/C	0.17	0.06	0.05	-
B/B/AB	0.24	0.17	0.32	0.26
B/B/C	0.13	0.06	-	-
E/A/AB	0.06	0.14	0.05	0.11
E/B/AB	0.04	0.08	0.16	0.05
E/A/C	0.04	0.06	-	-
E/B/C	-	0.06	-	-

* Haplotype was composed from AlfaS1-casein, AlfaS2-casein ir Kappa-casein alleles

All Lithuanian goat breeds had a similar level of genetic diversity and comparable number of different alleles found in milk protein locus. No unique alleles, typically found in one breed, that could be used as breed genetic markers and with which help one might have the ability to marker goat milk and products of this breed, were found.

The evaluation of milk protein allele diversity and distribution proved genetic balance in all Lithuanian goat breeds, while observing a lesser heterozygosis than prognosticated by Hardy-Weinberg balance law. The average heterozygosis found in goat group was 0.325. According to literary data, Kappa-casein locus was found in genetic balance in German (Caroli et al., 2001), Italian and Spanish goat breeds, except Alpine, Frontalaska and Sarda breeds, where a deficiency of heterozygote genotypes was observed (Feligini et al., 2005). Of our investigated goat breeds, Lithuanian native, German white and Saanen breeds had the Kappa-casein locus in the genetic balance, whereas Czech white goat breed contained a remarkable deviation of Kappa-casein gene locus from the Hardy-Weinberg law in the course of heterozygosis deficiency ($\chi^2 = 20,0$; $P < 0,001$) (Table 4).

Table 4. Observed and expected heterozygosis for four milk protein loci in Lithuanian goat breeds

Breeds	Investigated population	Lithuanian Native	Saanen	Czech White	German White
Heterozygosis					
Observed H	0.325	0.293	0.238	0.213	0.222
Expected H	0.341	0.313	0.397	0.297	0.298
χ^2 - test (P- value)	1.852 (0.6035)	1.226 (0.2682)	0.015 (0.9014)	0.428 (0.5131)	0.184 (0.6684)

The investigation of genetic and non-genetic factor influence to milk indicators in Lithuanian goat breeds, both according to the one-factor and multi-factor analysis, proved the statistically most remarkable AlfaS2-casein gene influence to all of the milk traits. It influenced 6.7 % of milk yield diversity, 8 % of milk fat quantity and 9.5 % of protein quantity diversity. According to our data, AlfaS1-casein statistically influences milk and fat quantity; this information coincides with the one provided in literature (Reineuf, 1993). The results of scientific research proved AlfaS1-casein genotype influence on the casein quantity in milk; cheese output from AA genotype goat milk was 7 percent greater in comparison with the EE genotype and 15 % in comparison with FF genotype (Vassal et al., 1994). In Lithuanian goat breeds Kappa-casein gene influenced 4.2 % ($P < 0.01$) of milk

quantity diversity, whereas Beta-lactoglobulin gene – 4.8 % ($P < 0.05$) of protein quantity diversity. Breed, as well as non-genetic factor – farm influenced milk quantity diversity at the greatest extent. Lactation influence varied from 1 % of fat % to 8.1 % ($P < 0.01$) of milk protein kilograms (Table 5).

Table 5. Influence of genetic (casein and lactoglobulin genes) and non genetic factors to milk traits in goats

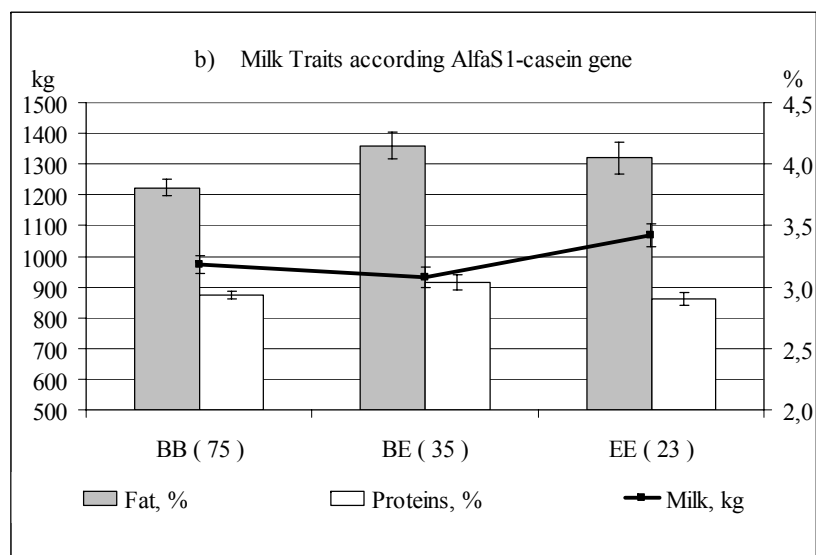
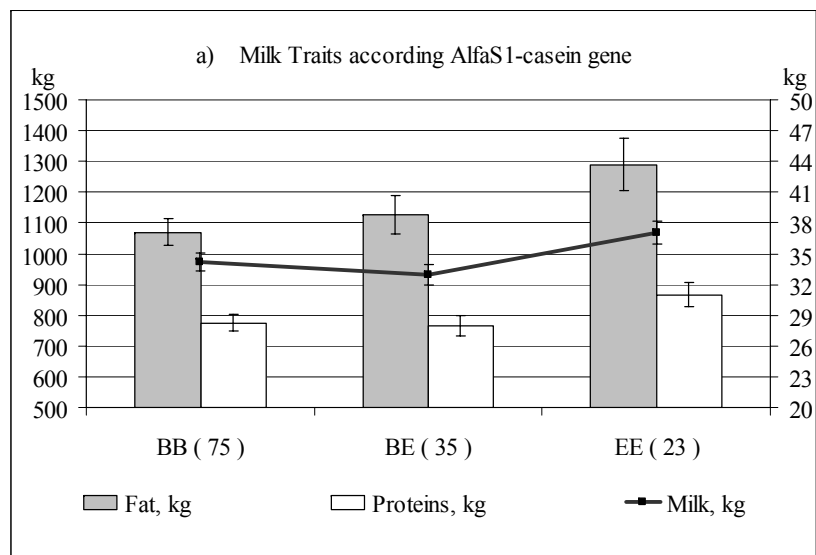
Genetic and non genetic factors	Number of classes	Milk, kg	Fat, %	Fat, kg	Proteins, %	Proteins, kg
AlfaS1 - casein	3	3.8**	1.9**	6.2**	0.3	2.9
AlfaS2 - casein	3	6.7***	2.7**	8.0**	1.1*	9.5**
Kappa - casein	3	4.2**	0.1	0.5	0.1	1.7
Beta - lactoglobulin	3	2.3	0.8	1.8	0.6	4.8*
Breed	3	36.6***	0.8*	1.3	0.5	6.5**
Farm	5	12.2***	0.6	3.0	1.2*	7.3*
Lactation	9	8.1**	1.0	2.8	1.1	5.9
Regression with milk amount	c	-	69.2***	-	80.6***	-

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

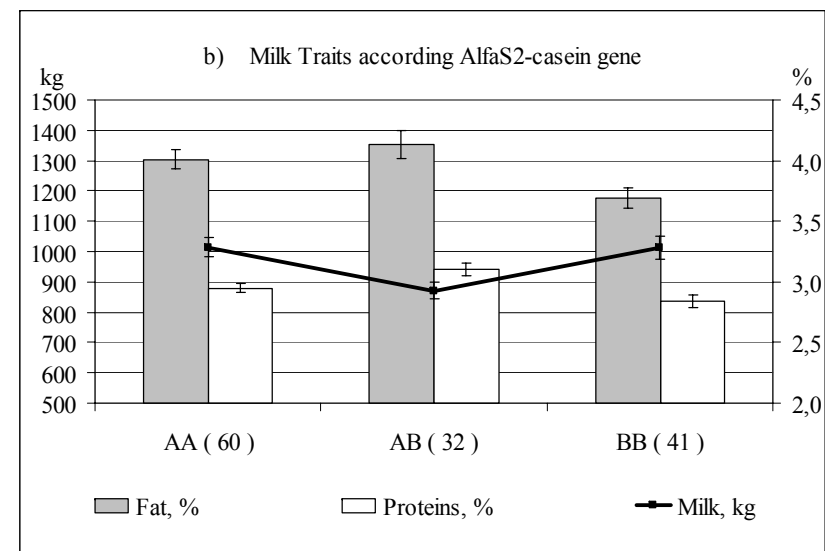
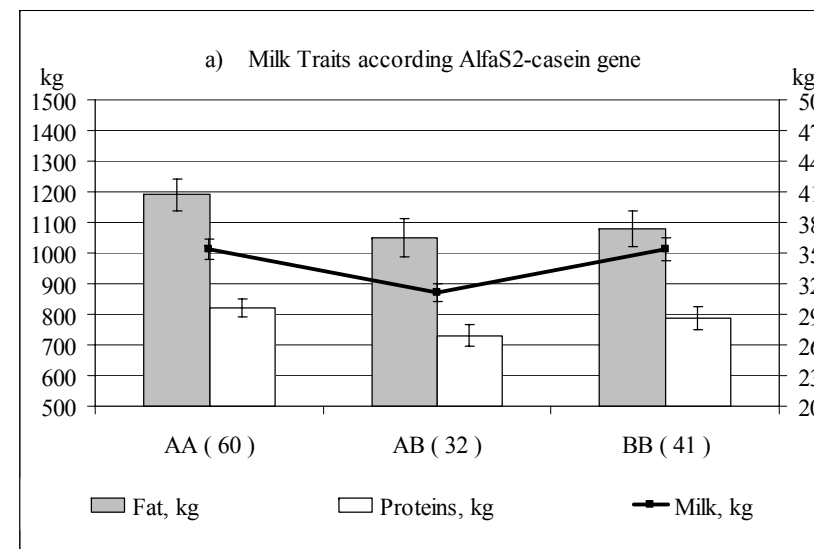
Table 6. Influence of genetic (casein haplotype) and non genetic factors to milk traits in goats

Genetic and non genetic factors	Number of classes	Milk, kg	Fat, %	Fat, kg	Protein, %	Protein, kg
AlfaS1- AlfaS2- Kappa casein haplotype	8	3.0*	2.2*	7.4*	0.9	3.4
Breed	3	37.8***	0.5	4.1**	0.3	1.1
Farm	5	11.3***	1.1*	4.1*	1.5**	10.2***
Lactation	9	7.7***	1.4	4.9	1.4	6.6
Regression with milk amount	c	-	69.3***	-	78.6***	-

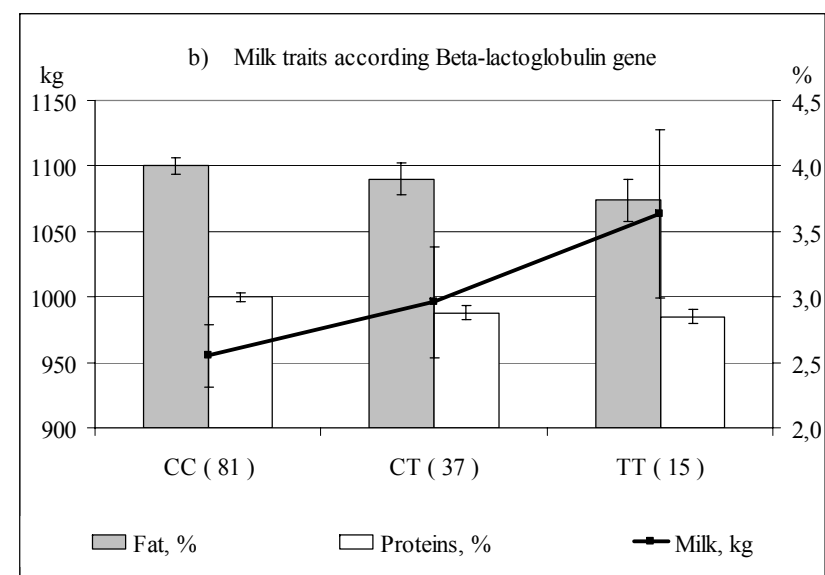
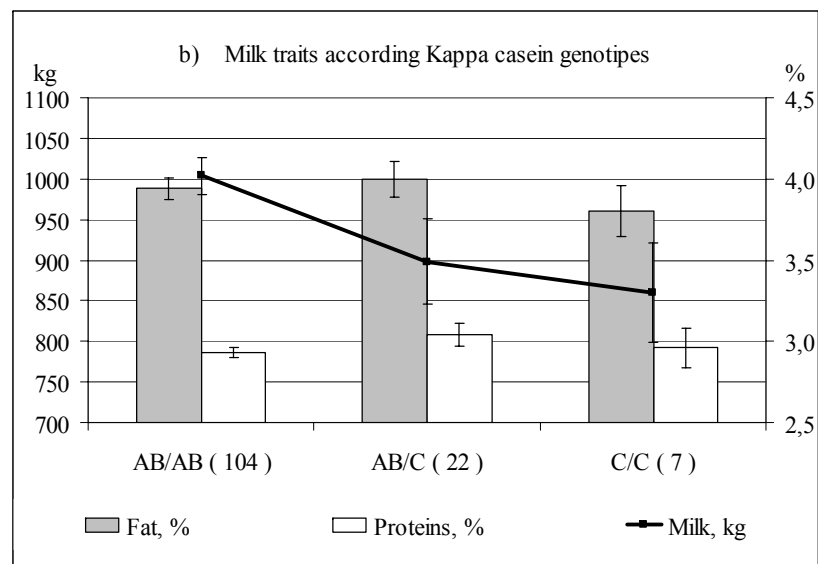
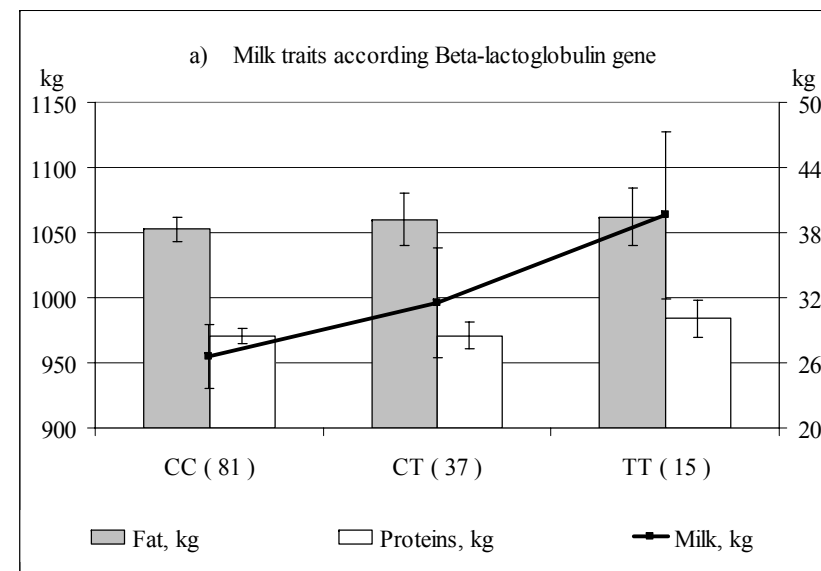
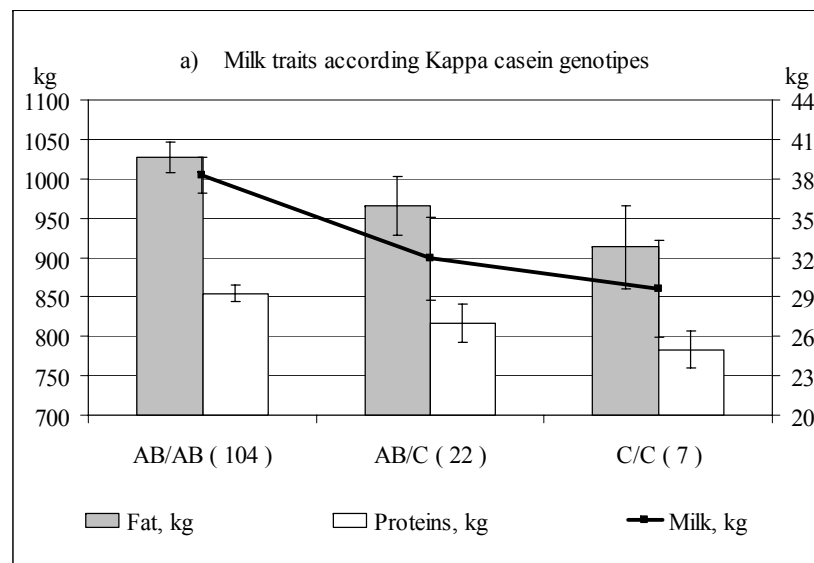
$P < 0.05$; * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ ***



1 Figure. Comparison of milk yield and milk composition traits according to AlfaS1- casein genotypes (a – indicators “kg”; b - “%“).



2 Figure. Comparison of milk yield and milk composition traits according to AlfaS2- casein genotypes (a – indicators “kg”; b - “%“).



3 Figure. Comparison of milk yield and milk composition traits according to Kappa-casein genotypes (a – indicators “kg”; b - “%”).

4 Figure. Comparison of milk yield and milk composition traits according to Beta-lactoglobulin genotypes (a – indicators “kg”; b - “%”).

Dispersive analysis (ANOVA) proved AlfaS1-AlfaS2-Kapa-casein haplotype influence made to the milk traits. Casein haplotype influenced about 4.78 % of diversity of milk traits and explained 3 % of milkiness diversity, 5.8 % of fatness and 4.3 % of protein diversity (Table 6).

After the grouping of Lithuanian goats according to milk protein AlfaS1-casein genotypes, it was identified that EE genotype goats possessed larger quantity of milk (1069.5 ± 38.38 kg), whereas BE genotype goats had the largest percent of fat and proteins (1 Figure).

After the grouping of Lithuanian goats according to milk protein AlfaS2-casein genotypes, it was identified that goats, which possessed the AA and BB genotype, were equally milky (1012.8 ± 31.7 kg and 1012.5 ± 37.6 kg). Goat milk of AB genotype contained more fat ($4.13 \pm 0.113\%$) and proteins ($3.10 \pm 0.051\%$) (2 Figure).

After the grouping of Lithuanian breeds according to milk protein Kappa-casein genotypes, it was identified that goats, which possessed AB/AB genotype, were the most milky (1003.8 ± 22.6 kg), yet the largest quantity of fat ($4.00 \pm 0.111\%$) and protein ($3.04 \pm 0.073\%$) was found among the AB/C genotype goats (3 Figure).

After the grouping of Lithuanian goats according to whey protein Beta-lactoglobulin genotypes, it was identified that CC genotype goat milk contained the largest quantity of fat ($4.00 \pm 0.061\%$) and proteins ($3.00 \pm 0.034\%$), whereas the most productive goats (1063.4 ± 64.1 kg) were the ones, which possessed the TT genotype (4 Figure).

After the comparison of goat and cattle milk protein gene influence made to the milk traits, applying one-factor and multi-factor means of analysis, based on linear mixed model, it was proved that the majority of diversity of milk traits, concerning the cattle, were conditioned by Kappa-casein gene (about 2.6 %), for goats – AlfaS2-casein (about 5.6 %). Beta-lactoglobulin influenced cattle and goat milk traits in the similar way (about 2 %).

Goat breeding programs focused solely on the AlfaS1-casein variants, due to its well known influence made to milk integrate parts and technological features. In the nearest future it is worth estimating the whole casein locus, additionally forming genotype Beta-casein, influence made to milk indicators in Lithuanian goat breeds, paying great attention to AlfaS2-casein, since it proved to influence milk indicators at the greatest extent. It is also recommended to examine as many polymorphic places of milk protein genes as possible, since new alleles are persistently found, estimating their influence made to milk integrate parts and technological features.

High genetic variability, indicated in casein locus, and relation to milk features provide the opportunity to derive such goat breeds that would give

milk, suitable for different manufacture technologies and special consumers' needs (Rando et al., 2000). For example, goat milk that possess AlfaS1-casein, AlfaS2-casein or Beta-casein gene zero alleles is more suitable for allergic people to consume (Martin et al., 1996; Martin et al., 1999; Chanat et al., 1999). In addition, allergic milk features depend upon the protein proportion found in milk (Bevilacqua et al., 2001). Goat breed could be attributed to relatively reduced level of artificial selection, in comparison with cattle and sheep breeds. This conditioned a high level of genetic variability in goat casein genes. Some breeds or populations might possess unique alleles or allele combinations that no other breeds would possess and which might be useful as the source of genetic diversity for commercial domestic breeds. This emphasises the importance of preservation of such a wide genetic diversity in these populations and the need of genetic sources preservation programs.

The application of genetic markers in the selection of farm animals opens the possibility to estimate animals from the inside and fully use beneficial agricultural features that reside inside them. Genetic markers can be used for identifying both one gene or gene group determinant feature or feature group. One more advantage of the usage of genetic markers in the selection is actually the fact that this mean of animal estimating is reliable, economical and time-consumeless; it allows identifying genes that control selection and technological value of the animal in young age, estimating genetic variability and spread of genetic deficiency in agricultural animals and grants with the opportunity to avoid the evidence of undesirable features. The usage of genetic markers in the selection might accelerate the selection process, improve the quality of agricultural production, reduce its production prime cost and make the production more competitive in foreign markets.

CONCLUSIONS

1. Lithuanian native, Saanen, Czech White and German White breeds have been found to be polymorphic for AlfaS1-casein, AlfaS2-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin genes. The most favourable AlfaS1-casein gene B allele (0.981) and BB genotype (0.83) as well as Beta-lactoglobulin C allele (0.913) and CC genotype (0.87) in the largest frequency were found in Lithuanian native goat breed.

2. Level of genetic polymorphism have been found similar in all tested goat breeds. Unique alleles specific only for one breed that could be genetic markers for the breed and its products were not found.

3. The evaluation of milk protein allele diversity and distribution proved genetic balance in all tested goat breeds, while observing a lesser heterozygosity than prognosticated by Hardy-Weinberg balance law what shows not significant reduction of within breed genetic diversity. While evaluating genetic balance in each locus AlfaS1-casein locus showed low level of heterozygosity ($\chi^2 = 20.0$; $P < 0.001$).

4. The investigation of influence of genetic and non-genetic factors to milk traits in goats bred in Lithuania showed statistically significant influence of AlfaS2-casein to all milk traits. It influenced 6.7 % of milk yield diversity, 8 % of milk fat quantity and 9.5 % of protein quantity diversity.

5. 8 different haplotypes were found in goats bred in Lithuania. Haplotypes B/A/AB and B/B/AB are indicated as the most popular ones among Lithuanian goat population. B/B/C and E/A/C haplotypes were found solely in two breeds – Lithuanian native and Saanen. Haplotype E/B/C is unique, since it was found only in one breed – Saanen. The milkiest goats, possessing milk high in fat were the ones who had E/A/AB haplotype. Casein haplotype influenced 4.8 % milk traits variation.

6. While comparing of goat and cattle milk protein gene influence to the milk traits it was proved that the majority of diversity of milk traits, concerning the cattle, were conditioned by Kappa-casein gene (about 2.6 %), for goats – AlfaS2-casein (about 5.6 %). Beta-lactoglobulin influenced cattle and goat milk indicators in the similar way (about 2 %).

PROPOSALS

1. Select goats by DNA test carrying AlfaS2-casein AB genotypes to increase milk protein and fat percent.

2. Select goats by DNA test carrying E/A/AB casein haplotypes to increase milk yield and milk fat percent.

LIST OF PUBLICATIONS ON DISSERTATION TOPIC

Scientific papers in journals listed by ISI:

1. Miceikienė I., Pečiulaitienė N., Baltrėnaitė L., Skinkytė R., Indriulytė R. Association of cattle genetic markers with performance traits // *Biologija*. Lietuvos mokslų akademijos leidykla. ISSN 1392 – 0146. 2006. Nr.1. P. 24-29.

2. Pečiulaitienė N., Mišeikienė R., Baltrėnaitė L., Miceikienė I. Genetic

differences among native and modern cattle breeds in Lithuania based on milk protein loci polymorphism // *Polish Journal of Veterinary Science*. ISSN 1505 – 1773. 2007. Vol. 10. No. 1. P. 35-41.

Scientific papers in International reviewed journals:

1. Baltrėnaitė L., Miceikienė I. Investigation of beta lactoglobulin gene polymorphism in goat breeds in Lithuania // *Proceedings of the 13th Baltic Animal Breeding Conference*. ISBN 978 – 9949 – 426 – 26 – 3. Pärnu. 2007. P. 11-14.

2. Baltrėnaitė L., Kriauzienė J., Miceikienė I. Ožkų kapa kazeino geno polimorfizmas // *Veterinarija ir Zootechnika*. ISSN 1392-2130. 2007. T. 38 (60). P. 9-12.

Conference thesis:

1. Baltrėnaitė L., Miceikienė I. Goat kappa casein gene polymorphism // *Biodiversity. Molecular Ecology and Toxicology*. Lithuania, Palanga. 2005. ISBN 2005/35. 2005. P. 35.

OTHER SCIENTIFIC PUBLICATIONS

Scientific papers in Lithuanian reviewed journals:

1. Skinkytė R., Zwierzchowski L., Riaubaitė L., Baltrėnaitė L., Miceikienė I. Distribution of allele frequencies important to milk production traits in Lithuanian Black and White and Lithuanian Red cattle. LVA mokslo darbai. Veterinarija ir zootechnika. ISSN 1392 – 2310. Kaunas. 2005. Nr.31 (53). P. 93-97.

2. Kriauzienė J., Miceikienė I., Masiulienė A., Baltrėnaitė L. Hal geno įvairovė S linijos kiaulių bandoje. Geno įtaka kiaulių reprodukciniams savybėms. LVA mokslo darbai. Veterinarija ir zootechnika. ISSN 1392 – 2130. Kaunas. 2005. Nr.30 (52). P. 50 -53.

Scientific papers in International reviewed journals:

1. Riaubaitė L., Baltrėnaitė L., Miceikienė I., Indriulytė R. Investigation of cattle prolactin gene polymorphism in Lithuanian dairy cattle population. *Proceedings of the 11th Baltic Animal Breeding and Genetics Conference*. ISBN 9985 – 652 – 06 – 3. Palanga. 2005. P. 28-30.

REZIUOMĖ

Darbo tikslas – ištirti genų, kurie galėtų įtakoti produktyvumo rodiklius, genetinių tipų paplitimą Lietuvoje auginamų ožkų veislėse ir nustatyti jų įtaką pieno kiekiui bei pieno sudėčiai.

Siekiant tikslo buvo iškelti šie uždaviniai:

- Genotipuoti AlfaS1-kazeino, AlfaS2-kazeino, Kapa-kazeino ir Beta-laktoglobulino genus ir nustatyti jų įvairovę Lietuvos vietinės, Zaneno, Čekijos baltojoje ir Vokietijos baltojoje ožkų veislėse.
- Ištirti AlfaS1-kazeino, AlfaS2-kazeino, Kapa-kazeino ir Beta-laktoglobulino genų polimorfinių vietų įtaką pieno kiekiui ir pieno sudėčiai.
- Nustatyti AlfaS1-AlfaS2-Kapa-kazeinų haplotipo įvairovę ir įtaką pieno kiekiui ir pieno sudėčiai.
- Palyginti galvijų ir ožkų pieno baltymų genų polimorfizmą bei įtaką pieno kiekiui ir pieno sudėčiai

Pieno baltymų genetinių variantų aptikimas inicijavo pieno baltymų polimorfizmo tyrimus daugelyje gyvulių rūšių – galvijų, avių ir ožkų. Tyrimų pradžioje visas dėmesys buvo sutelktas į galvijų pieno baltymus ir buvo orientuotas nustatyti ryšį tarp pieno baltymų variantų bei pieno produktyvumo ir technologinių savybių. Karvių Kapa-kazeino A ir B variantų įtakos pieno produkcijai tyrimai parodė, kad Kapa-kazeino BB genotipo karvių piene yra daugiau riebalų, baltymų ir kazeinų, negu Kapa-kazeino AA genotipo karvių piene (Ng-Kwai Hang, 1998; Di Stasio et al., 2000). B alelis yra patikimai susijęs su didesniu kazeino ir mažesniu išrūgų baltymo kiekiu, taigi, didesniu kazeinų/bendrų baltymų santykiu. Karvių Kapa-kazeino BB genotipas taip pat susijęs su produkcija pieno, pasižyminčio geresnėmis pramoninėmis savybėmis - trumpesniu koaguliacijos laiku, veikiant šliužo fermentui, tvirtesnės konsistencijos varškės susidarymu ir didesne sūrio išeiga (Schaar, 1985; Marziali et al., 1986). Šis reiškinys susijęs su pieno kazeino micelėmis. Kapa-kazeino B micelių masė yra homogeniškesnė ir joje yra didesnė mažų micelių dalis (Morini et al., 1975), dėl to bendras micelių paviršiaus plotas yra didesnis, o tai lemia tvirtesnės ir geresnės konsistencijos varškės susidarymą.

Pagrindinis dėmesys vykdant ožkų pieno baltymų tyrimus buvo sukoncentruotas į AlfaS1-kazeiną. AlfaS1-kazeinui buvo nustatyti „stiprūs“ (A, B, C) aleliai, „vidutiniai“ (E), „žemi“ (F, D) ir „nuliniai“ (0) aleliai, susiję su aukštu (3,6g/L), vidutiniu (1,6 g/L), žemu (0,6 g/L) ir 0 AlfaS1-kazeino kiekiu piene atitinkamai (Feligini et al., 2005). Šiandien yra atlikta pakankamai daug AlfaS1-kazeino polimorfizmo ryšio su ožkų pieno produktyvumo, fizi-

ko-cheminėmis ir technologinėmis savybėmis tyrimų. Daug mažiau dėmesio buvo skirta ožkų AlfaS2-kazeino ir Kapa-kazeino tyrimams, turbūt dėl rasto mažesnio jų polimorfizmo (Grosclaude et al., 1987; Jordana et al., 1991; Ramunno et al., 1991; Feligini et al., 2002; Veress et al., 2004). Ožkų Kapa-kazeino polimorfizmo faktas buvo pademonstruotas naudojant baltymų elektroforezę (Russo et al., 1986; Di Luccia et al., 1990), chromatografiją (Jaubert et al., 1992; Law et al., 1993) bei kapiliarinę elektroforezę (Recio et al., 1997). Pirmuosius genetinio polimorfizmo įrodymus pateikė Mercier su bendraautorais (1976). Pastaruoju metu ožkų Kapa-kazeino variantai buvo nustatyti įvairiose ožkų veislėse (Yahyaoui et al., 2001; Caroli et al., 2001; Angiolillo et al., 2002). Lietuvoje ožkų pieno baltymų genai iki šiol nebuvo tyrinėti. Mes ištyrėme įvairių Lietuvoje veisiamų ožkų veislių pieno baltymų genų polimorfizmą bei nustatėme ryšį su pieno rodikliais.

Pagal mūsų gautus rezultatus, pieno baltymui AlfaS1-kazeinui Lietuvos ožkų veislėse buvo nustatyti B ir E aleliai. B „stiprus“ alelis, kuris sąlygoja didesnį AlfaS1-kazeino kiekį ožkų piene rastas dideliu dažniu (0,643-0,891) visose tirtose Lietuvos ožkų veislėse, didžiausiu dažniu (0,89) Lietuvos vietinėje ožkų veislėje. Italijos ožkų veislėse šis alelis paplitęs nuo 0,32 iki 0,52 dažniu (Feligini et al., 2002). Vengrų melžiamoje ožkų veislėje B alelis buvo identifiktuotas kartu su A aleliu ir rastas 61 proc. tirtos ožkų populiacijos (Veress et al., 2004). Ožkų selekcijoje pageidaujami „stiprus“ aleliai, kadangi iš tokio pieno gaminant sūrius yra gaunama didelė išeiga. Svarbūs yra ir „žemo“ efekto arba 0 aleliai, kurie nėra naudingi pieno perdirbimo pramonei bet pageidaujami ožkų pieno vartotojų, kadangi toks pienas yra tinkamas alergiškiems žmonėms. E alelis aukščiausiu dažniu (0,36) buvo nustatytas Zaneno ožkų populiacijoje auginamoje Lietuvoje, o žemiausiu Lietuvos vietinėje ožkų veislėje (0,12). Šie duomenys sutampa su literatūros duomenimis, kur teigiama, kad E alelį turėjo 41 proc. Zaneno ožkų veisiamų Prancūzijoje (Grosclaude et al., 1987) ir 46 proc. Zaneno ožkų auginamų Italijoje (Ramunno et al., 1991). Ispanijos Kanarija ožkų veislėje E alelis paplitęs tik 0.20 dažniu (Jordana et al., 1991), Vengrijos melžiamų ožkų veislėje šį alelį turi tik 8 proc. gyvulių, o Lenkijos baltųjų ožkų veislėje 5 proc. (Krolikowska et al., 2002). Lietuvos vietinėje veislėje AlfaS1-kazeino BB genotipas rastas dideliu dažniu, o EE genotipas mažu dažniu. Lenkijos baltųjų ožkų veislėje BB genotipą turėjo 30 proc. ožkų, o Italų ožkų veislėse įvairavo nuo 25 iki 38 proc. (Feligini et al., 2002). Italų Montefalkone veislėje BE ir EE genotipai iš viso nerasti (Belivacqua et al., 1999). Taigi „stiprieji“ A ir B aleliai dažniausiai sutinkami Viduržemio regiono ožkų veislėse, taip pat ir Lietuvoje veisiamose ožkų veislėse, ypač Lietuvos vietinėje, o „vidutiniai“ (E) ir „žemi“ (F) dažnesni Prancūzų, Italų, Šveicarų ir Ispanų ožkų veislėse (Jordana et al., 1996; Grosclaude et al., 1997; Enne et al.,

1997). Suskirsčius Lietuvos tirtas ožkas pagal pieno baltymo AlfaS1-kazeino genotipus nustatyta, kad EE genotipo ožkos pasižymėjo didesniu pieno ($1069,5 \pm 38,38$ kg) kiekiu, o BE genotipo ožkos turėjo didžiausią riebalų ir baltymų proc.

Analizuojant pieno baltymo AlfaS2-kazeino geno variantų paplitimą, mūsų atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad Lietuvos ožkų veislės turi tokius pat dažniausiai sutinkamus pieno baltymo AlfaS2-kazeino alelius kaip ir kitos Europos ožkų veislės – A ir B. A alelio dažnis Lietuvos ožkų veislėse svyravo nuo 0,56 Lietuvos vietinėje iki 0,69 Zaaneno veislėje, vidutiniškai paplitęs tirtose ožkų populiacijoje 66,3 proc. Alpių ožkų veislėje auginamoje Italijoje A alelis buvo rastas 0,68 dažniu (Cosenza et al., 1998), Alpių veislėje veisiamoje Prancūzijoje 0,85 dažniu (Bouniol et al., 1994), o Pietų Italijos vietinėje ši alelį turėjo tik 31 proc. gyvulių (Rammuno et al., 2001). Neseniai atrastas E alelis ištyrus penkias Italų ožkų veisles buvo rastas tik dviejose (Lagonigro et al., 2001) ir manoma, kad jis galėtų būti panaudotas kaip veislės markeris identifikuojant iš kokios veislės pieno yra pagaminti ožkų pieno gaminiai. Ši alelį yra tikslinga ateityje ištirti ir Lietuvoje veisiamose ožkų veislėse. Suskirsčius Lietuvoje tirtas ožkas pagal pieno baltymo AlfaS2-kazeino genotipus buvo nustatyta, kad AA ir BB genotipą turinčios ožkos buvo vienodai pieningos ($1012,8 \pm 31,7$ kg ir $1012,5 \pm 37,6$ kg). AB genotipo ožkos pasižymėjo didesniu pieno riebumu ($4,13 \pm 0,113$ proc.) ir baltymingumu ($3,10 \pm 0,051$ proc.).

Ožkų tarpe Kapa-kazeino genas tirtas Italijos, Ispanijos, Vokietijos, Prancūzijos, Vengrijos veislėse (Caroli et al., 2001; Sacchi et al., 2001; Senese et al., 2001; Yahyaoui et al., 2001; Feligni et al., 2002; Veress et al., 2004; Chiatti et al., 2005). Mūsų gauti rezultatai koreliuoja su kitų mokslininkų rezultatais. Kapa kazeino C alelio dažnis įvairavo Lietuvoje veisiamų ožkų veislių tarpe nuo 0 Vokietijos baltojoje veislėje iki 0,17 Lietuvos vietinėje, panašiai kaip ir Vengrijoje, Ispanijoje ir Prancūzijoje veisiamose ožkų veislėse nuo 0 iki 0,15. Kapa kazeino A+B alelių dažnis Lietuvoje veisiamų ožkų veislių tarpe įvairavo nuo 0,83 iki 1, o Vengrijoje, Ispanijoje ir Prancūzijoje veisiamose ožkų veislėse nuo 0,85 iki 1. Zaaneno ožkų tarpe Prancūzijoje C alelio dažnis buvo panašus kaip ir Zaaneno veislėje Lietuvoje, atitinkamai 0,11 ir 0,14 (Yahyaoui et al., 2001; Veress et al., 2004). A ir B aleliai atskirai buvo identifikuoti Italų ir Vokiečių ožkų veislėse. A alelio dažnis Italų veislėse svyravo nuo 0,44 iki 0,67, o Vokiečių ožkų veislėse buvo sutinkamas ženkliai dažniau. Vokiečių Ionika veislės 90 procentų ožkų turėjo šį alelį, o Togenburgo net 100 procentų (Caroli et al., 2001). A variantas, rastas visose kitose veislėse, neaptiktas Italijos Teramina ir Montefalcone veislėse. Išskyrus E alelį, kurio pasiskirstymo dažnis Montefalcone veislėje itin aukštas (0,41), kitų variantų pasitaikymo dažnis

santykinais žemas - mažiau nei 15 proc. C variantas būdingas Zaaneno veislei (13 proc.), kai tuo tarpu F aleliai aptinkami tik Italijos Teramina, Girgentana ir Sarda veislėse. Kaip ir D alelis F, G ir E aleliai neaptikti tirtose Ispanijos ir Prancūzijos veislėse (Yahyaoui et al., 2001; Jann et al., 2004). Suskirsčius Lietuvos tirtas ožkas pagal pieno baltymo Kapa-kazeino genotipus buvo nustatyta, kad pieningiausios buvo AB/AB genotipą turinčios ožkos ($1003,8 \pm 22,6$ kg), tačiau pienas riebiausias ($4,00 \pm 0,111$ proc.) ir baltymingiausias ($3,04 \pm 0,073$ proc.) buvo AB/C genotipo ožkų.

Beta-laktoglobulinas buvo pirmasis pieno baltymas, kurio polimorfizmą pavyko įrodyti elektroforezės būdu tiriant galvijų pieno mėginius (Aschaffenburg ir Drewy, 1955). Šioje rūšyje buvo nustatyta eilė genetinių variantų, tačiau pastebėta, jog tik dažniausiai pasitaikantys aleliai, A ir B, yra ženkliai susiję su pieno primilžio ir struktūros skirtumais. AA genotipo gyvulių piene Beta-laktoglobulino baltymo kiekis didesnis nei BB genotipo gyvulių piene, vidutiniškai $2,58$ mg/ml esant aleliui A ir $1,7$ mg/ml esant aleliui B (Ng-Kwai Hanget al., 1992). Dėl tokio reikšmingo Beta-laktoglobulino kiekio skirtumo, susijusio su skirtingais aleliais, struktūrinis Beta-laktoglobulino genas (A lyginant su B) laikomas svarbiausiu veiksnium, įtakančiu Beta-laktoglobulino kiekį piene (Grosclaude, 1988). Gaminamo baltymo kiekis labai skiriasi ir AB heterozigotinių gyvūnų piene. Nustatyta, jog šiuo atveju Beta-laktoglobulino A yra 1,5 karto daugiau nei Beta-laktoglobulino B (Graml et al., 1989; Lum et al., 1997).

Vakarų Europos pieninių ožkų veislėse yra paplitę Beta-laktoglobulino C ir T aleliai. C alelis dažnas Ispanų veislėse tokiose kaip Malagvena (0,75), Pajoja (0,73), o Kanarija veislėje rastas visose tirtose ožkose (1,00); Prancūzų Zaaneno ožkų veislėje rastas 73 proc. dažniu, o Vengrų melžiamoje 88 proc. (Veress et al., 2004). Lietuvos ožkų veislėse C alelio dažnis buvo vidutiniškai 0,78. Didžiausiu dažniu išsiskyrė Lietuvos vietinės ožkos (0,91). Lietuvoje auginamų Zaaneno ožkų tarpe C alelis buvo paplitęs tokiu pačiu dažniu kaip ir Prancūzijoje auginamų ožkų. Suskirsčius Lietuvos tirtas ožkas pagal išrūgų baltymo Beta-laktoglobulino genotipus nustatyta, kad CC genotipo ožkų pienas buvo riebiausias ($4,00 \pm 0,061$ proc.) ir baltymingiausias ($3,00 \pm 0,034$ proc.), o produktyviausios ($1063,4 \pm 64,1$ kg) buvo TT genotipą turinčios ožkos.

Ištyrus pieno produktyvumo rodiklius pagal AlfaS1-kazeino, AlfaS2-kazeino, Kapa-kazeino ir Beta-laktoglobulino homozigotinius ir heterozigotinius genotipus Lietuvos ožkų populiacijoje nustatyta, kad AlfaS1-kazeino ir Beta-laktoglobulino homozigotinius genotipus turinčios ožkos pasižymėjo statistiškai reikšmingu didesniu riebalų ir baltymų proc., o AlfaS2-kazeino, Kapa-kazeino ir beta-laktoglobulino homozigotinius genotipus turinčios ožkos pasižymėjo statistiškai reikšmingu didesniu pieningumu.

Visose tirtose Lietuvos ožkų veislėse buvo rastas panašus genetinės įvairovės lygis ir panašus rastų skirtingų alelių skaičius tirtuose pieno baltymų lokusuose. Unikalių alelių, būdingų tik tam tikrai veislei, kurie galėtų būti veislės genetiniais žymenimis ir kurių pagalba būtų galima markiruoti tokios veislės ožkų pieną bei jo produktus tirtose Lietuvos ožkų veislėse nerasta.

Įvertinus pieno baltymų alelių įvairovę bei pasiskirstymą genetinė pusiausvyra buvo nustatyta visose tirtose Lietuvos ožkų veislėse, stebint truputį mažesnę esamą heterozigotiškumą nei prognozuojamą pagal Hardžio–Veinbergo pusiausvyros dėsnį. Vidutinis rastas heterozigotiškumas tirtose ožkų grupėse buvo 0,325. Pagal literatūros duomenis Kapa-kazeino lokusas rastas genetinėje pusiausvyroje Vokiečių (Caroli et al., 2001), Italų ir Ispanų ožkų veislėse išskyrus Alpių, Frontalaską ir Sarda veisles, kur nustatytas heterozigotinių genotipų trūkumas (Feligini et al., 2005). Iš mūsų tirtų ožkų veislių Lietuvos vietinėje, Vokiečių baltojoje ir Zaneno veislėse Kapa-kazeino lokusas rastas genetinėje pusiausvyroje, o Čekijos baltosios veislės ožkų tarpe Kapa-kazeino geno lokuse rastas statistiškai reikšmingas nuokrypis nuo Hardžio–Veinbergo dėsnio heterozigotiškumo trūkumo kryptimi ($\chi^2 = 20,0$; $P < 0,001$).

Ištyrus genetinių ir negenetinių veiksnių įtaką pieno produktyvumo rodikliams Lietuvoje veisiamų ožkų veislėse tiek pagal vienfaktorinę tiek pagal daugiafaktorinę analizę nustatyta didžiausia statistiškai reikšminga AlfaS2-kazeino geno įtaka visiems pieno rodikliams. Jis įtakojo 6,7 proc. pieno kiekio įvairovės, 8 proc. riebalų kiekio ir 9,5 proc. baltymų kiekio įvairovės. Pagal mūsų gautus duomenis AlfaS1-kazeinas statistiškai reikšmingai veikė pieno ir riebalų kiekį, kas sutampa su literatūroje pateiktais duomenimis (Remeuf, 1993). Mokslininkų tyrimų rezultatai patvirtino AlfaS1-kazeino genotipų įtaką kazeino kiekiui piene; sūrio išeiga iš AA genotipo ožkų pieno buvo 7 proc. didesnė lyginant su EE genotipo ir 15 proc. lyginant su FF genotipo (Vassal et al., 1994). Lietuvos ožkų veislėse Kapa-kazeino genas įtakojo 4,2 proc. ($P < 0,01$) pieno kiekio įvairovės, o Beta-laktoglobulino genas 4,8 proc. ($P < 0,05$) baltymų kiekio įvairovės. Veislė, kaip ir negenetinis veiksnys – ūkis, labiausiai veikė pieno kiekio įvairumą. Laktacijos įtaka kito nuo 1 proc. riebalų % iki 8,1 proc. ($P < 0,01$) pieno baltymų kilogramams.

Kazeinus koduoja keturi glaudžiai susiję ir sudarantys klasterį genai AlfaS1-kazeinas, AlfaS2-kazeinas, Beta-kazeinas ir Kapa-kazeinas randami ožkų 6-oje chromosomoje. Alelių deriniai kazeino lokuse (haplotipai) glaudžiai susiję bei paveldimi kaip vienas genetinis vienetas, todėl kazeinų lokuso genotipavimas ypatingai svarbus sėkmingam selekcijos procesui. Viso buvo rasti 8 skirtingi haplotipai. Haplotipai B/A/AB ir B/B/AB nustatyti kaip labiausiai vyraujantys Lietuvos ožkų populiacijoje. B/B/C ir E/A/C

haplotipai rasti tik dviejuose veislėse – Lietuvos vietinėje ir Zaneno. Haplotipas E/B/C yra unikalus, nes rastas tik vienoje veislėje – Zaneno. Pieninčiausios ir riebiausią pieną turinčios buvo E/A/AB haplotipą turinčios ožkos. Jų pienas buvo ir pakankamai baltymingas – antroje vietoje iš aštuonių haplotipų pagal pieno baltymų proc. Atlikta vienfaktorinė dispersinė analizė (ANOVA) parodė AlfaS1-AlfaS2-Kapa-kazeinų haplotipo įtaką pieno rodikliams. Kazeinų haplotipas vidutiniškai įtakojo 4,78 proc. pieno rodiklių įvairavimo ir paaiškino 3 proc. pieningumo įvairavimo, 5,8 proc. riebumo ir 4,3 proc. baltymingumo įvairavimo.

Palyginus ožkų ir galvijų pieno baltymų genų poveikį pieno produktyvumo rodikliams vienfaktorinės ir daugiafaktorinės analizės būdu pagal tiesinį mišrų modelį buvo nustatyta, kad galvijams didžiausią dalį pieno rodiklių įvairavimo paaiškina Kapa-kazeino geno įtaka (vidutiniškai 2,6 proc.), ožkoms AlfaS2-kazeinas (vidutiniškai 5,6 proc.). Beta-laktoglobulinas veikė ir galvijų ir ožkų pieno rodiklius panašiai (vidutiniškai 2 proc.).

Ožkų veisimo programose dėmesys buvo kreipiamas tik į AlfaS1-kazeino variantus dėl jau žinomos jų įtakos pieno sudėtinėms dalims ir pieno technologinėms savybėms. Ateityje yra tikslinga įvertinti viso kazeinų lokuso, papildomai genotipuojant Beta-kazeiną, poveikį pieno rodikliams Lietuvos ožkų veislėse ypatingą dėmesį kreipiant į AlfaS2-kazeiną, kadangi jis parodė didžiausią įtaką pieno rodikliams. Taip pat rekomenduojama ištirti kuo daugiau pieno baltymų genų polimorfinių vietų, kadangi nuolat atrandami vis nauji aleliai, įvertinant jų poveikį pieno sudėtinėms dalims bei technologinėms savybėms.

Didelis genetinis kintamumas nustatytas kazeino lokusuose ir ryšys su pieno savybėmis sudaro sąlygas išvesti tokias ožkų veisles, kurių pienas labiausiai atitiktų įvairias perdirbimo technologijas ar specialius žmonių poreikius (Rando et al., 2000). Pavyzdžiui, ožkų, turinčių AlfaS1-kazeino, AlfaS2-kazeino ar Beta-kazeino geno nulinius alelius pienas labiau tinkamas alergiškiems žmonėms vartoti (Martin et al., 1996; Martin et al., 1999; Chana et al., 1999). Be to, alergizuojančios pieno savybės priklauso nuo į pieno sudėtį įeinančių baltymų santykio (Bevilacqua et al., 2001). Ožkų rūši galima priskirti santykinai sumažintam dirbtinės selekcijos lygiui lyginant su galvijų ir avių rūšimis. Tai sąlygojo didelį genetinio kintamumo lygį ožkų kazeino genuose. Kai kurios veislės ar populiacijos gali turėti unikalių alelių ar alelių kombinacijų, kurių neturi kitos veislės ir kurios gali būti naudingos kaip genetinės įvairovės šaltinis komercinėms naminėms rūšims. Tai pabrėžia tokios didelės genetinės įvairovės išsaugojimo šiose populiacijose svarbą vykdant genetinių išteklių išsaugojimo programas.

Genetinių žymenų panaudojimas žemės ūkio gyvulių selekcijoje atveria

galimybes įvertinti gyvulį iš vidaus ir pilnai panaudoti jame slypinčias naudingas ūkines savybes. Genetiniai žymenys gali būti naudojami tiek vieno geno, tiek genų grupės lemiamo požymio ar požymių grupės identifikavimui. Dar vienas genetinių žymenų panaudojimo selekciroje privalumas yra tas, kad šis gyvulių vertinimo būdas yra patikimas, nereikalaujantis didelių ekonominių bei, svarbiausia, laiko sąnaudų, leidžia jauname amžiuje išaiškinti genus, kontroliuojančius selekcinę ir technologinę auginamų gyvulių vertę, įvertinti žemės ūkio gyvulių genetinį kintamumą ir genetinių defektų paplitimą bei suteikia galimybę laiku išvengti nepageidaujamų požymių pasireiškimo. Genetinių žymenų panaudojimas selekciroje gali labai paspartinti selekcijos procesą, pagerinti žemės ūkio produkcijos kokybę, sumažinti jos gamybos savikainą bei padaryti produkciją konkurentabilę užsienio rinkose.

IŠVADOS

1. Lietuvos vietinė, Zaneno, Čekijos baltoji ir Vokietijos baltoji veislė rastos polimorfiškos pieno baltymus koduojančių genų atžvilgiu. Labiausiai pageidaujamas AlfaS1-kazeino B alelis ir BB genotipas (0,891) kaip ir Beta-laktoglobulino C alelis (0,913) ir CC genotipas didžiausiu dažniu rasti Lietuvos vietinėje ožkų veislėje.

2. Visose tirtose Lietuvos ožkų veislėse buvo rastas panašus genetinės įvairovės lygis. Unikalių alelių, būdingų tik tam tikrai veislei, kurie galėtų būti veislės genetiniais žymenimis ir kurių pagalba būtų galima markiruoti tokios veislės ožkų pieną bei jo produktus tirtose Lietuvos ožkų veislėse nerasta.

3. Įvertinus pieno baltymų alelių įvairovę bei pasiskirstymą genetinė pusiausvyra buvo nustatyta visose tirtose Lietuvos ožkų veislėse, stebint truputį mažesnę esamą heterozigotiškumą nei prognozuojamą pagal Har- džio–Veinbergo pusiausvyros dėsnį, kas rodo nežymų viduveislinį genetinės įvairovės sumažėjimą. Įvertinus genetinę pusiausvyrą atskiruose lokusuose, AlfaS1-kazeino gene rastas mažai išreikštas heterozigotiškumas ($\chi^2 = 20,0$; $P < 0,001$).

4. Ištyrus genetinių ir negenetinių veiksnių įtaką pieno produktyvumo rodikliams Lietuvoje veisiamų ožkų veislėse, nustatyta didžiausia statistiškai reikšminga AlfaS2-kazeino geno įtaka visiems pieno rodikliams. Jis įtakojo 6,7 proc. pieno kiekio įvairovės, 8,0 proc. riebalų kiekio ir 9,5 proc. baltymų kiekio įvairovės.

5. Lietuvoje veisiamose ožkų veislėse rasti 8 skirtingi AlfaS1-AlfaS2-

Kapa-kazeinų haplotipai. Haplotipai B/A/AB ir B/B/AB nustatyti kaip labiausiai vyraujantys. B/B/C ir E/A/C haplotipai rasti tik dviejuose veislėse - Lietuvos vietinėje ir Zaneno. Haplotipas E/B/C yra unikalus, nes rastas tik vienoje veislėje - Zaneno. Pieningiausios ir riebiausią pieną turinčios buvo E/A/AB haplotipo ožkos. Kazeinų haplotipas vidutiniškai įtakojo 4,8 proc. pieno rodiklių įvairavimą.

6. Palyginus ožkų ir galvijų pieno baltymų genų poveikį pieno produktyvumo rodikliams buvo nustatyta, kad galvijams didžiausią dalį pieno rodiklių įvairavimo paaiškina Kapa-kazeino genas (2,6 proc.), ožkoms AlfaS2-kazeinas (5,6 proc.). Beta-laktoglobulinas veikė ir galvijų ir ožkų pieno rodiklius vienodai (2 proc.).

DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ IR PASIŪLYMAI

Šiuolaikiniai molekulinės genetikos metodai sudaro galimybę identifikuoti ožkų genotipe esančius, pieno baltymų įvairovę apsprendžiančius genus. Nuo piene esančių baltymų tipo, o tuo pačiu nuo genotipe esančių juos apsprendžiančių genų priklauso ne tik pieno kokybė, bet ir jo perdirbimo galimybės bei tinkamumas vienų ar kitų pieno produktų gamybai. Atliktas Lietuvoje veisiamų ožkų veislių charakterizavimas pagal pieno baltymų genų įvairovę gali būti panaudotas, kuriant selekcinės programas, sudarant kryžminimo schemas, identifikuojant gyvulius, bioįvairovės ir filogenetinės analizės tikslais. Pagal gautus tyrimų rezultatus teikiame sekančius pasiūlymus:

1. DNR testo pagalba atrinkti ožkas turinčias AlfaS2-kazeino AB genotipą, siekiant padidinti ožkų pieno baltymų ir riebalų procentą.

2. DNR testo pagalba atrinkti ožkas turinčias kazeinų E/A/AB haplotipą, siekiant padidinti ožkų pieningumą bei pieno riebumą.

GYVENIMO APRAŠYMAS (CURRICULUM VITAE)

LINA BALTRĖNAITĖ (g. 1979 06 02, Kaune)

1985 – 1997 m. mokėsi J.Urbšio vidurinėje mokykloje.

1997 – 2001 m. LVA gyvulininkystės technologijos fakulteto studentė. 2001 metais įgijo gyvulininkystės technologės specialybę.

2001-2003 m. Gyvūnų veisimo ir genetikos katedros magistrantė. 2003 m. apgynė magistrantūros baigiamąjį darbą tema "Pieno baltymų polimorfizmas: genetinių variantų aptikimas ir išplitimas Lietuvos galvijų veislėse".

2003-2007 m. Gyvūnų veisimo ir genetikos katedros doktorantė.

Nuo 2002 m. dirba K. Janušausko gyvūnų genetikos laboratorijoje prie Gyvūnų veisimo ir genetikos katedros jaunesniąja mokslo darbuotoja, o nuo 2007 m. Gyvūnų veisimo ir genetikos katedroje lektore.

Maketavo R. Trainienė
Už teksto turinį ir redagavimą atsakingas autorius

Spausdino LVA Spaudos ir leidybos skyrius
Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas
Tiražas 50. _____ sp.l. Užs. Nr. _____. 2007