SZENT ISTVÁN EGYETEM

TEJFEHÉRJE GENETIKAI VIZSGÁLATOK HAZAI SZARVASMARHA FAJTÁKBAN

Doktori értekezés tézisei

Baranyi Mária

Gödöllő
2000

A doktori program

címe: Az állattenyésztés biológiai alapjai

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: Dr. Dohy János
egyetemi tanár, akadémikus
Szent István Egyetem
Állattenyésztési és Tartástechnológiai Intézet

Témavezető: Dr. Bősze Zsuzsanna
tudományos főmunkatárs, biológiai tudományok kandidátusa
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

A programvezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. A munka előzményei

Az elmúlt évtizedekben bizonyítást nyert, hogy a főbb tejfehérjék mindegyike kisebb-nagyobb mértékben befolyásolja a tej összetételét vagy a tejfeldolgozás szempontjából fontos tulajdonságokat (pl. hőstabilitás, alvadási idő). Egyes országokban már a tenyésztésben is figyelembe veszik a tejfehérjék genetikai polimorfizmusát, és előnyben részesítik pl. a κ-CN *B* allélt hordozó egyedeket. A tenyésztők számára érdekes genotípusok molekuláris biológiai módszerekkel ma már szinte a születéssel egyidőben meghatározhatók, nem kell kivárni, amíg az állatok ill. utódaik elérik az életteljesítmény elbírálásához szükséges kort. Sőt, a tejfehérjék esetében nemcsak a tejet termelő tehenek, hanem a tenyészbikák közvetlen tipizálása is lehetővé válik, így az állatok sokkal korábban és nagyobb hatékonysággal vonhatók be a tenyésztésbe.

A hazai tejelő szarvasmarha állomány minőségi javításához, ill. az alacsony létszámú, génrezervként jelentős szerepet játszó magyar szürke állomány genetikai változatosságának megőrzéséhez elengedhetetlen a meglévő populációk génállományának felmérése és ezen információknak a szelekció során történő hasznosítása.

1.2. Az értekezés célkitűzései

- A legfontosabb hazai szarvasmarha fajták ill. állományok tejfehérje genetikai összetételének meghatározása, a jellemző α_{S1}-, β-, κ-kazein és β-laktoglobulin genetikai variánsok genotípus- és allélgyakoriság megoszlásának vizsgálata.
- A vizsgált tejelő állományok esetében a különböző tejfehérje genotípusok és a termelési adatok valamint reproduktív tulajdonságok közötti összefüggések vizsgálata.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Állatok, mintavétel

A vizsgálatokhoz szükséges magyartarka (*MT*), holstein-fríz (*HF*) és hungarofríz (*HuF*) tejmintákat 1990 és 1995 között gyűjtöttem: Kocséri Petőfi Termelőszövetkezet (*MT*, 101 minta), Mezőhegyesi Állami Ménesbirtok Rt. (*MT*, 195 minta), Enyingi Agrár Rt. Kiscséripusztai Tehenészet (*HF*, 578 minta), Szentesi Termál Kertészeti és Mezőgazdasági Szövetkezet (*HuF*, 161 minta), Szegvári Puskin Tej Kft. (*HuF*, 29 minta). A mintavétel a gépi fejést megelőzően, kézi fejéssel történt. A magyar szürke (*MSZ*) tejminták (325 db) a hortobágyi, városföldi és orosházi állományból származtak.

A vizsgált *HF* állomány közel 60%-a fajtatiszta, míg a fennmaradó részpopuláció r_4 és r_5 nemzedékbe tartozó keresztezett (0,78-25% *MT* vérhányaddal rendelkezik). A *MT* állatok fajtatiszták, a *HuF* állatok pedig 25-75% *HF*, 12,5-62,50% Jersey és 0-25% *MT* vérhányaddal rendelkeznek. A vizsgált *HF* egyedek 141 apától, a *MT* egyedek 45 apától, a *HuF* állatok pedig 10 apától származnak.

2.2. Alkalmazott módszerek

2.2.1. Fehérjevizsgálatok

2.2.1.1. Mintavétel

A mintavétel a gépi fejést megelőzően kézi fejéssel történt. A tejmintákat 0,004% Na-aziddal történő tartósítás után centrifugálással zsírtalanítottam (800 *g*, 4°C, 10 perc), és felhasználásig -20°C-on tároltam, vagy liofilizáltam.

2.2.1.2. Mintakészítés

CA-IEF-hez: 100 µl zsírtalanított tejhez 500 µl minta puffert (8 M urea, 5% glicerin, 5% 2-ME vagy 30 mM DTT) adtam, vagy 10-20 mg liofilizált tejet oldottam 1 ml minta pufferben.

CA-IPG-IEF-hez: A lefagyasztott, zsírtalanított tejből vagy a liofilizált tejmintákból készített 10 mg/ml-es vizes oldatból savas kicsapással (pH 4,6) eltávolítottam a kazeineket. A savó frakciót a megfelelő natív (10 mM Tris/HCl pH 6,8, 1,15% (w/v) glicerin, 0,5% (w/v) Servalyte pH 5-6) vagy denaturáló/redukáló pufferrel (natív minta puffer + 5% (v/v) mercaptoethanol) hígítottam: 4 µl savó + 10 µl minta puffer.

2.2.1.3. Izoelektromos fókuszálás amfolinok jelenlétében (CA-IEF)

A 124 x 258 x 0,25 mm-es poliakrilamid géleket 9,4 ml gél törzsoldatból (4,85% akrilamid, 0,15% BIS, 8M urea, 15% glicerin) készítettem 10 mg glicin és 0,62 ml amfolin keverék (100 µl pH 2,5-4,5, 80 µl pH 4,2-4,9, 70 µl pH 4,5-5,0, 70 µl pH 5,0-5,5, 150 µl pH 5-6, 150 µl pH 5-8) hozzáadásával. A gélek futtatásához LKB Multiphor II horizontális gélelktroforézis rendszert használtam (Pharmacia LKB). Anód puffer: 0,5 M H_3PO_4. Katód puffer: 0,5 M NaOH. Mintafelvitel: 18-24 µl/cm. Előfókuszálás 25 percig és mintafókuszálás 60 percig 4 W-on (maximum 2000 V és 15 mA), majd 120 percig 5 mA-en (maximum 2500 V és 20 W). A géleket coomassie brilliant blue R-250 festékkel festettem.

2.2.1.4. Immobilizált pH-gradiensen történő izoelektromos fókuszálás amfolinok jelenlétében (CA-IPG-IEF) natív körülmények között

A gyári gélekből (Immobiline Dry Plate pH 5,0-6,0, poliakrilamid T=4%, C=3%, 250 x 110 mm, Pharmacia LKB) pH 5,21-5,57 tartományban kivágott 50 x 45 mm-es darabokat natív gélrehidratáló oldatban (10 mM Tris/HCl pH 6,8, 1,15% (w/v) glicerin, 0,5% (w/v) Servalyte pH 5-6) rehidratáltam 2 óra hosszat. A gélek futtatása a PhastSystem automatikus gélelektroforézis- és festő egységgel történt (Pharmacia LKB). Minta felvitel: 1µl/slot. Mintafókuszálás (35 AVh): 150 V, 0,5 mA, 2,0 W, 15°C-on és fókuszálás (2500 AVh): 2000 V, 0,5 mA, 2,0 W, 15°C-on. A gélek festése coomassie brilliant blue R-250 festékkel történt.

2.2.1.5. Immobilizált pH-gradiensen történő izoelektromos fókuszálás amfolinok jelenlétében (CA-IPG-IEF) denaturáló / redukáló körülmények között

Az Immobiline Dry Plate pH 4,5-5,4 gyári gélből pH 4,74-5,15 tartományban kivágott 50 x 45 mm-es darabokat 2 óra hosszat rehidratáltam denaturáló/ redukáló gélrehidratáló oldatban (8 M urea, 20% glicerin, 1% DTT, 1% Pharmalyte pH 4,5-5,4; pH 6,8). Mintafelvitel: 4 µl/ slot. Fókuszálás 15°C-on, 90 percig (2500 AVh, maximum 0.5 mA és 2000 V mellett). A géleket coomassie brilliant blue R-250-nel festettem.

2.2.2. DNS vizsgálatok

2.2.2.1. DNS izolálás

A nagyméretű genomiális DNS izolálása kisózásos módszerrel történt.

2.2.2.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A β-LG gén 5. exonját amplifikáló 21 bp hosszúságú primer szekvenciákat a β-LG gén szekvenciájának ismeretében a MedProbe Oligo 4.0 program segítségével terveztem meg (EXON5BLG5': CCTGGGCCGGGTGGCTTCC TG, EXON5BLG3': TGCACACCACCCTGGAGAGCA).

A PCR reakciók összetétele (50 µl végtérfogatban): 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM $MgCl_2$, 200-200 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 600 ng genomiális DNS, 100 ng 5' primer, 100 ng 3' primer, 2,5 NE Taq polimerase. A ciklusok száma 35 (95°C, 1 perc; 63°C, 1 perc; 72°C, 20 másodperc).

2.2.2.3. Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP)

A szarvasmarha β-LG gén 5. exonjában található restrikciós fragmenthossz polimorfizmust (RFLP) Msp I enzimmel történő emésztéssel mutattam ki. A reakciókeveréket (18 µl amplifikált DNS, 2 µl puffer L, 0,5 µl Msp I) 60 percig inkubáltam 37°C-os vízfürdőben. Az emésztett DNS fragmentek nagyságát egy Mighty Small II vertikális gélektroforézis egység (Pharmacia LKB) felhasználásával natív poliakrilamid gélen vizsgáltam (12%-os elválasztó-, és 4%-os gyüjtőgél) a standard technikáknak megfelelően. A géleket ezüst-nitráttal festettem.

2.3. Statisztikai számítások

2.3.1. Genotípus- és géngyakoriságok kiszámítása

A genotípus-gyakoriságok meghatározása az adott fenotípust mutató egyedek megszámolásával történt. Az adott populáción belüli, azonos fenotípust mutató egyedeket a populáció teljes létszámának arányában, tizedes tört formájában fejeztem ki.

2.3.2. *A fajták közötti genotípus- és géngyakoriságbeli különbségek vizsgálata*

Az egyes szarvasmarha fajták közötti genotípus- és allélgyakoriságbeli különbségek, ill. a tapasztalt és várt értékek közötti eltérések vizsgálata χ^2 -próbával vagy a Fischer-féle teszttel történtek a Graphpad InStat 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) számítógépes program segítségével.

2.3.3. *Rokonsági kapcsolatok vizsgálata*

A különböző szarvasmarha fajták ill. populációk közötti genetikai hasonlóságot *Oishi és Tomita* (1976) módszerével határoztam meg. A számításokat a következő képlet szerint végeztem:

$$D_m = \sum_{i=1}^{n} \sqrt{(X_{ij} - X_{ik})^2}$$

ahol: D_m a "*j*" és "*k*" populációk közötti genetikai távolság az "*m*" lokuszban
Xij és Xik az "i" allél gyakorisága a két populációban
n az allélok száma az adott lokuszban

A két populáció közötti átlagos genetikai távolság ($\overline{D}$) az összes kókuszra mért genetikai távolságok átlaga:

$$\overline{D} = \frac{1}{l} \sum_{m=1}^{l} D_m$$

ahol: l a vizsgált lokuszok száma.

2.3.4. *Tejfehérje genotípusok és egyes termelési adatok közötti összefüggések vizsgálata*

Az első és második laktáció adatai kerültek feldolgozásra. Genotípusokra lebontva vizsgáltam az állatok tej-, tejfehérje- és tejzsírtermelését, valamint a tej %-os fehérje- és zsírtartalmát. A reprodukciós teljesítményt az első és a második ellés között eltelt idő, valamint a tehénhasználat intenzitási index (*Vági*, 1990) alapján értékeltem, melynek képlete:

$$I_v^{'} = \frac{AFC_{optimális} + (n-1)x365}{AFC_{tényleges} + \sum_{i=1}^{n-1} CI_i}$$

ahol:	*AFC*	az első ellési életkor
	CI	a két ellés között eltelt idő
	n	az ellések száma.

A statisztikai értékeléshez "egy-génes" (egytényezős variancia-analízis) és "több-génes" analízist (General Linear Model) egyaránt alkalmaztam. A számítások a STATGRAPHICS 5.0 és az SPSS 8.0 statisztikai programcsomagok felhasználásával történtek. Egy adott lokuszon belül a különböző genotípusok közötti különbségeket t-teszttel vizsgáltam. Az alkalmazott GLM mátrix a következő:

$$(y = x\beta + \varepsilon)$$

$$y = \mu + a_i + b_j + k_k + g_l + e_{ijklm}$$

ahol:	y	a függő változó (pl. tejtermelés) vektora
	μ	a vizsgált populáció átlaga
	a_i	az α_{S1}-CN genotípus fix hatása (i = 1, 2, 3)
	b_j	a β-CN genotípus fix hatása (j = 1, 2, ...11)
	k_k	a κ-CN genotípus fix hatása (k = 1, 2, ...6)
	g_l	a β-LG genotípus fix hatása (l = 1, 2, 3, 4)
	e_{ijklm}	random reziduális hatás.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Genotípus- és allélgyakoriságok hazai szarvasmarha fajtákban

A vizsgált szarvasmarha állományok genetikai egyensúlyban vannak, a tapasztalt és a Hardy-Weinberg törvény alapján számolt várt genotípus-gyakoriságok között nincsen szignifikáns eltérés.

3.1.1. α_{S1}-CN

Az *B* és *C* allél minden eddig vizsgált szarvasmarha populációban megtalálható. A nyugat-európai ill. tengerentúli *HF* állományokhoz hasonlóan a hazai fajták közül is a *HF* populáció esetében a legalacsonyabb (3,65%) a *C* allél gyakorisága. A *HuF* esetében ez 10,9%, a *MT* -nál pedig 12,07%. A *MSZ* fajtában a *C* allél aránya viszont igen magas, eléri a 26,57%-ot. Ez mind a *MT*-nál, mind a *HF*-nél és *HuF*-nél szignifikánsan (P<0,0001) magasabb *C* allélgyakoriságot jelent. A 70-es évek elején észlelt (*Horváth*, 1970; *Horváth és Mészáros*, 1971) és az általunk tapasztalt allélgyakoriságok között az eltérés nem szignifikáns sem a *MSZ*, sem a *MT* esetében. Az igen ritka *A* és *D* allél a vizsgált hazai populációkban nem fordult elő.

3.1.2. β-CN

A hazai populációkban minden esetben az A^2 allél volt a gyakoribb. Az A^2 allélt hordozó állatok száma *MSZ* (78,18%) > *MT* (64,8%) > *HF* (49,04%) > *HuF* (44,95%) irányban csökken, míg az A^1 allélt hordozó egyedek száma közel hasonló módon nő: *MSZ* (19,39%) < *MT* (27,38%) < *HuF* (38,03%) < *HF* (45,57%). Az A^3 allél csak a *MT* és *HF* állományban fordult elő, 0,5% ill. 0,26%-os gyakorisággal. Az vizsgált hazai populációk közötti különbségek nem szignifikánsak az A^3 allél esetében, viszont szignifikánsak a *HF* és *HuF* populációk közötti különbségek kivételével az A^2 és A^1 allél esetében. Ha nem teszünk különbséget az A^1, A^2 és A^3 allélok között, akkor a 70-es évek elején mért allélgyakoriságokhoz képest a *MSZ* állomány mára nem változott szignifikánsan. Ezzel szemben a *MT* fajta esetében az elmúlt két évtizedben szignifikánsan (P<0,0001) megnövekedett (81,9%-ról 92,7%-ra) az *A* allél aránya, méghozzá a *C* rovására. A közönséges szarvasmarha fajták többségében a β-CN *B* allél gyakorisága nem haladja meg a 10%-ot. A hazai állományok esetében előfordulási gyakorisága 2,44% (*MSZ*), 5,13% (*HF*), 6,46% (*MT*) és 16,22% (*HuF*). A *B* allél gyakoriságát tekintve egyedül a *MT* és a *HF*

között nincsen szignifikáns különbség. A *B* allélra nézve a mai *MSZ* és *MT* populációk nem különböznek szignifikánsan a 70-es évek elején vizsgált állományoktól. A *C* allél a *MSZ*-ében és a *HF*-ben nem fordul elő, míg gyakorisága a *MT*-ban 8,5%, a *HuF*-ben pedig 8%. A *MT* állomány *C* allélgyakorisága ma több mint 70%-kal alacsonyabb ($P<0,0001$) mint a 70-es években.

3.2.3. κ-CN

A két leggyakoribb κ-CN allél közül (*A* és *B*) a fajták többségében az *A* allél fordul elő nagyobb gyakorisággal. Így van ez a hazai állományokban is, a *HuF* kivételével: *MSZ* (67,8%), *HF* (70,4%) és *MT* (77,7%). A *HuF* esetében, a fajta 12,5-62,50%-os Jersey vérhányadának köszönhetően a *B* allélt hordozó állatok aránya 50,27%. A vizsgált fajták közötti allélgyakoriságbeli különbségek általában szignifikánsak, kivéve az *A* allélgyakoriságokat a *MSZ* és *HF* között, ill. a *B* allélgyakoriságokat a *MT* és *HF* között. A ritka *C* allélt kizárólag heterozigóta formában és csak a *MT* és *HuF* állományokban sikerült detektálni 1,18% ill. 0,27% gyakorisággal. A fajták közötti, allélgyakoriságbeli eltérések szignifikánsak a *MT* és *MSZ* ($P=0,0063$), ill. a *MT* és *HF* esetében ($P=0,0005$). Az *E* allél mind a *MT* és *HF*, mind a *HuF* tehenek tejéből kimutatható (allélgyakoriságok: 0,34%, 6,61% és 1,86%), és a fajták közötti különbségek egyedül a *MSZ* és *MT* között nem szignifikánsak.

3.2.5. β-LG

A β-LG allélok közül a *Bos taurus* fajták túlnyomó többségében a *B* allél a gyakoribb. A *HuF* tehenek 62,37%-a, a *MSZ* tehenek közül pedig még ennél is több, 79,72% hordozza ezt az allélt. A *MT* és *HF* esetében közel azonos gyakorisággal fordul elő az *A* (45,61% ill. 45,33%) és *B* (53,38% ill. 54,67%) allél. Ezzel a *MT* és *HF* szignifikánsan különbözik a többi hazai fajtától. A jelen tanulmány keretében vizsgált *MT* populációban a különböző β-LG allélok gyakorisága nem különbözik szignifikánsan a 70-es évek elején tanulmányozott *MT* állománytól. A ritka *D* allél a hazai fajták közül egyedül a *MT*-ban fordul elő, méghozzá 1%-os gyakorisággal. A *MSZ* fajtában ezen kívül sikerült kimutatni egy új, az irodalomból eddig még nem ismert allélt (β-LG *J*), melynek allélgyakorisága 4,87%, és a többi hazai fajtában nem fordul elő.

3.2. A hazai szarvasmarha fajták közötti rokonsági kapcsolatok vizsgálata

A vizsgált hazai fajták közötti átlagos genetikai távolságok *HF-MT* (0,119) < *HF-HuF* (0,178) < *HuF-MT* (0,201) < *MSZ-MT* (0,231) < *MSZ-HuF* (0,297) < *MSZ-HF* (0,307) irányban nőnek.

3.3. Egy új β-laktoglobulin allél kimutatása és jellemzése

A *MSZ* tehenek tejfehérje-genotípusának meghatározása során felfedeztem egy új β-LG allélt, mely a *J* betűjelet kapta. Izoelektromos pontja (pI=5,393) 0,014 pH-egységgel savasabb, mint a β-LG *B* allélé. Két német kutatócsoporttal együttműködve sikerült az új allélt izolálni, és elsődleges szerkezetét meghatározni. Aminosavlánca a β-LG *B* allélhoz képest a 126. pozícióban mutat eltérést: ahol a többi variánsnál egy prolin található, ott a *J* allél esetében egy leucin helyezkedik el a fehérjeláncban. Ez az aminosavcsere (néma mutáció) valószínűleg a szomszédos (127. pozícióban lévő) glutaminsav karboxil-csoportjának megnövekedett disszociációját okozva felelős az izoelektromos pont savas irányba történt eltolódásáért. A *J* allélt vizsgálataim során egyedül a *MSZ* fajtában és csak heterozigóta formában tudtam kimutatni. A tehenek közel 10%-a hordozza.

3.4. A β-LG *J* allél kimutatása DNS szinten

Vérmintából készített genomiális DNS felhasználásával PCR segítségével amplifikáltam a β-LG gén 5. exonját tartalmazó DNS szakaszt. Ez a DNS szakasz tartalmazza az aminosav-cseréért felelős pontmutációt (Pro - CCG → Leu - CTG). A reakcióterméket Msp I restrikciós endonukleázzal emésztettem, és az így kapott DNS fragmenteket poliakrilamid gélelektroforézis segítségével azonosítottam. A gél festése után megállapítható a *J* allélra jellemző 85 nukleotid hosszúságú DNS fragment jelenléte vagy hiánya.

3.5. A tejfehérje genotípusok hatása a termelési tulajdonságokra és a tej összetételére

Az α_{S1}-CN lokusz hatása szignifikáns vagy közel szignifikáns "egy-génes" analízissel vizsgálva a tejhozamra (*HuF*, 2. laktáció $P<0,1$), a fehérjetartalomra (*HF*, 2. lakt. $P<0,0005$; *HuF*, 1. és 2. lakt. $P<0,05$) és a tejzsír-termelésre (*HuF*, 2. lakt. $P<0,1$). A β-CN lokusz hatása szignifikáns vagy közel szignifikáns "egy-génes" analízissel vizsgálva a tejhozamra (*HF*, 2. lakt. $P<0,1$), "több-génes"

analízissel pedig a fehérjetartalomra (*MT*, 2. lakt. *P*<0,05). A κ-CN lokusz hatása szignifikáns vagy közel szignifikáns "egy-génes" analízissel vizsgálva a tejhozamra (*MT*, 1. lakt. *P*<0,001 és 2. lakt. *P*<0,05), a tejfehérje-termelésre (*MT*, 1. lakt. *P*<0,05), a fehérjetartalomra (*MT*, 1. lakt. *P*<0,05 és 2. lakt. *P*<0,005), a zsírtermelésre (*HF*, 1. lakt. *P*<0,05; *MT*, 1. lakt. *P*<0,05) és a zsírtartalomra (*HF*, 1. lakt. *P*<0,05; *MT*, 1. lakt. *P*<0,1), "több-génes" analízissel pedig a tejhozamra (*MT*, 1. lakt. *P*<0,005 és 2. lakt. *P*<0,05; *HuF*, 1. lakt. *P*<0,05), a tejfehérje-termelésre (*MT*, 1. lakt. *P*<0,05), a fehérjetartalomra (*MT*, 1. lakt. *P*<0,05 és 2. lakt. *P*<0,005), a tejzsírtermelésre (*MT*, 1. és 2. lakt. *P*<0,1; *HuF*, 1. lakt. *P*<0,1 és 2. lakt. *P*<0,1) és a tej zsírtartalmára (*MT*, 1. lakt. *P*<0,05). A β-LG genotípusok hatása pedig közel szignifikáns ill. szignifikáns "egy-génes" analízissel vizsgálva a tej fehérje- (*MT*, 1. lakt. *P*<0,1) és zsírtartalmára (*MT*, 1. lakt. *P*<0,05).

3.6. A tejfehérje genotípusok hatása a reproduktív tulajdonságokra

A *HF* állományban az első és második ellés között eltelt időre a β-LG lokusz fejt ki szignifikáns hatást (*P*<0,001). Az *AA* genotípus estében legrövidebb a két ellés között eltelt idő, de a genotípusok közötti különbségek nem szignifikánsak.

A tehénhasználat intenzitási index alakulására a *HF* állományban a κ-CN lokusz közel szignifikáns (*P*<0,1), a β-LG lokusz pedig szignifikáns (*P*<0,001) hatást gyakorol, a *HuF* állományban pedig a κ-CN lokusz hatása szignifikáns (*P*<0,001), míg a β-LG genotípusok csak közel szignifikáns (*P*<0,1) hatással bírnak. A fajtától függően a κ-CN *BB* (*HF*) ill. *AE* (*HuF*), valamint a β-LG *AA* (*HF*) ill. *AB* (*HuF*) genotípus a legelőnyösebb.

3.7. Új tudományos eredmények

1./ A tejminták vizsgálata során a magyar szürke tehenek tejében egy eddig nem ismert, új β-LG allélt (*J*) találtam, melyet natív körülmények között, CA-IPG-IEF módszerrel lehet kimutatni. Ennek izoelektromos pontja (pI=5,393) 0,014 pH egységgel savasabb, mint a *B* allélé.

2./ Két német munkacsoporttal együttműködve sikerült meghatározni az új β-LG allél aminosav sorrendjét. Elsődleges szerkezete egyetlen aminosavban

tér el a *B* variánstól. A 126. pozícióban, ahol a többi allélnál egy prolin található, ott a *J* esetében egy leucin helyezkedik el a fehérjeláncban.

3./ Beállítottam egy polimeráz láncreakción (PCR) és restrikciós fragmenthossz polimorfizmuson (RFLP) alapuló módszert, melynek segítségével vérmintából izolált genomiális DNS-t MspI enzimmel emésztve már akár az állat születésével egyidőben megállapítható, hogy hordozza-e a β-LG *J* allélt vagy sem.

4./ A hetvenes évek eleje óta egyedül én vizsgáltam, az akkoriban használatos módszernél (keményítő elektroforézis) sokkal érzékenyebb gélelektroforetikus technikákkal (CA-IEF és CA-IPG-IEF) hazai magyartarka és magyar szürke tehenek tejfehérje genotípusát. Saját eredményeimet az irodalmi adatokkal összevetve megállapítottam, hogy az elmúlt húsz év alatt a magyar szürke állományban az α_{S1}-CN és β-CN lokuszban nem változtak szignifikánsan az allélgyakoriságok, míg a magyartarka állományban a β-CN *A* allél gyakorisága szignifikánsan megnőtt, mégpedig a *C* allél rovására.

5./ Két különböző statisztikai módszerrel („egy-génes” és „több-génes” analízissel) vizsgáltam, hogy a főbb hazai tejelő szarvasmarha állományok esetében a különböző tejfehérje genotípusoknak milyen hatása van a termelt tej, tejfehérje és tejzsír mennyiségére, ill. a tej összetételére. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan a genotípusok hatása a hazai állományokban is erősen függött az állatok genetikai hátterétől (fajta). A tejfehérje lokuszok közül a κ-CN az, amely a legtöbb vizsgált paramétert befolyásolja. Az első laktációs magyartarka állomány esetében pl. szignifikáns hatást gyakorol nemcsak a tejhozamra, a fehérje- és zsírtermelésre, hanem a tej fehérje- és zsírtartalmára is.

6./ Megvizsgáltam a tejfehérje genotípusok és egyes reproduktív tulajdonságok közötti összefüggéseket is. Itt is erős fajtafüggést tapasztaltam. A κ-CN és a β-LG lokusz szignifikáns hatását sikerült kimutatni az I. és II. ellés között eltelt időre, ill. a tehénhasználat intenzitási indexre.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

- Az elmúlt 15-20 év során világszerte intenzíven folyó tejfehérje kutatások arra utalnak, hogy egyes tejfehérje allélok kapcsolatban állhatnak a termelési paraméterekkel, a tej összetételével, ill. annak fizikai-kémiai tulajdonságaival. Ezek az eredmények nagy érdeklődésre számíthatnak a tenyésztők körében, mert ha a tejfehérje géneket szelekciós markerként lehetne használni a tenyésztésben, akkor ez a szelekció hatékonyságának növelése révén új lehetőségeket nyitna a tejhozam emelése és a tejösszetétel javítása terén.
- A tejfehérje genotípusok meghatározására használt egyre nagyobb számú és egyre érzékenyebb módszer az általánosan előforduló, gyakori allélok mellett egy sor új, ritka allél felfedezését is eredményezte. Ilyen új, korábban nem ismert allél például a magyar szürke fajtában leírt β-LG *J*. Feltétlenül érdemes lenne megvizsgálni, hogy ez az új allél hogyan befolyásolja a tej minőségét, összetételét ill. fizikai-kémiai tulajdonságait, és van-e hatása a tejhozamra vagy a reproduktív tulajdonságokra. Mivel azonban a magyar szürke nehezen hezelhető, javasolom az új allélt keresztezéssel egy másik fajtára átvinni, és úgy tanulmányozni.
- A tejfehérje genotípusoknak a termelési tulajdonságokra (pl. tejhozamra) gyakorolt hatására vonatkozó irodalmi adatok igen ellentmondásosak. A valódi ok-okozati összefüggésekről a legtöbb esetben igen keveset lehet tudni. Feltételezik azonban, hogy az egyes tejfehérje genotípusok hatása általában nem közvetlenül, hanem más, kapcsolt géneken keresztül, közvetve érvényesül. Ezen kívül számos környezeti és genetikai tényező is szignifikánsan befolyásolja (pl. a tehén életkora, évszak hatása, laktációk száma, egészségi állapot, genetikai háttér, takarmányozás). Így a külföldi tanulmányok eredményei közvetlenül nem alkalmazhatók a hazai szarvasmarha állományokra. Ezért, mielőtt hozzáfoghatnánk egy tejfehérje markereket is magába foglaló, tejhozam emelésére vagy tejösszetétel megváltozatására irányuló szelekciós stratégia kidolgozásának, fontosnak tartom a hazai állományok vizsgálatát.
- Jelen tanulmány eredményei azt mutatják, hogy az irodalmi adatokhoz hasonlóan a hazai állományok esetében is a tejfehérje genotípusok termelési tulajdonságokra gyakorolt hatása erős fajtafüggést mutat. Mindazonáltal elmondható, hogy a κ-CN és β-LG genotípusok, mind "egy-génes", mind "több-génes" analízissel vizsgálva nagyobb hatást gyakorolnak a tejhozamra, tejösszetételre és a fertilitásra, mint az α_{S1}- és β-CN genotípusok.

- A tej fehérje- és kazeintartalma, az alvadási idő, valamint az alvadék keménysége és a sajtkinyerés szempontjából kedvezőbb κ-CN *B* allélt számos ország szarvasmarha tenyésztői (pl. Svájc, Dánia, Olaszország) a szelekció során előnyben részesítik. A hazai szarvasmarha állományok esetében a κ-CN *BB* genotípusú egyedek a vizsgált paraméterek közül (tejhozam, fehérjetermelés, zsírtermelés, fehérjetartalom, zsírtartalom, reproduktív tulajdonságok) egyedül a tej %-os fehérjetartalmában mutattak mindkét laktációban fajtától függetlenül átlagon felüli teljesítményt. A *B* allél gyakoriságának növelése támogatandó törekvés akkor, ha a szelekció célja a tej összetételének ill. technológiai értékének a sajtgyártás szempontjából kedvezőbb irányú megváltoztatása. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy pl. a tejhozam, valamint a tej zsír- és fehérjetartalma között negatív korreláció tapasztalható.
- A másik tejfehérje allél, melyet érdemes lenne bizonyos szelekciós stratégiákba bevonni a β-LG *B*. Az irodalmi adatok szerint a kazeintartalom és kazeinszám, a zsírtartalom és a kinyerhető sajt mennyisége szempontjából a *B* allél kedvezőbb, mint a β-LG *A*. A tanulmányozott hazai állományokban a β-LG genotípusoknak nem volt szignifikáns hatása a tejhozamra, tejzsír- és tejfehérje-termelésre, ill. a tej fehérje- és zsírtartalmának alakulására. A β-LG *BB* genotípusú egyedek egyetlen esetben sem produkáltak fajtától függetlenül átlagon felüli eredményeket.
- Javasolom a jelen munka során tanulmányozott tehenek leányainak és unokáinak tipizálását, amely lehetővé tenné a tejfehérje haplotípusok hatásának vizsgálatát, ill. a későbbiekben QTL vizsgálatok elvégzését is.
- A ritka genetikai variánsok ill. genotípusok hatásának statisztikai értékelése az alacsony egyedszám miatt (1-4 állat) nem volt lehetséges. Annak kiderítésére, hogy ezek a ritka allélok (α_{S1}-CN *C*, β-CN A^3, *B* és *C*, κ-CN *E*, β-LG *D*) hogyan befolyásolják a tej összetételét ill. a termelési és reproduktív tulajdonságokat, nagyobb számú, ritka allélokat hordozó egyed vizsgálata lenne szükséges.
- A tejfehérje genetikai polimorfizmus jó segítséget nyújthat a meglévő, alacsony egyedszámú szarvasmarha populációk ill. fajták (pl. magyar szürke) genetikai variabilitásának és változatosságának fenntartását célzó szelekciós stratégiák kidolgozásában is.

5. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

5.1. A dolgozat témakörében megjelent közlemények

5.1.1. Idegen nyelven megjelent közlemények

Bősze, Zs., Baranyi, M., Buchberger, J., Krause, I. (1992): Milk protein polymorphism in Hungarian cattle. Abstract. EAAP/ASAS Workshop on the Biology of Lactation in Farm Animals. September 11-12, 1992; Madrid, Spain. In *Livestock Production Science* (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam), **35**, 190.
Impakt faktor: *1,035*

Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J., Krause, I. (1993): Genetic Polymorphism of Milk Proteins in Hungarian Spotted and Hungarian Grey Cattle: A Possible New Genetic Variant of β-Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, **76**, 630-636.
Impakt faktor: *1,674*

Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J., Krause, I. (1996): Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian cattle. *Archiev fürTierzucht, Dummerstorf*, **39**, 489-496.
Impakt faktor: *0,244*

Godovac-Zimmermann, J., Krause, I., Baranyi, M., Fischer-Frühholz, S., Juszczak, J., Erhardt, G., Buchberger, J., Klostermeyer, H. (1996): Isolation and Rapid Sequence Characterization of Two Novel Bovine β-Lactoglobulins I and J. *Journal of Protein Chemistry*, **15**, 743-750.
Impakt faktor: *1,255*

Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J., Krause, I. (1997): Ungarisches Grauvieh. Häufigkeit der genetischen Varianten der Milchproteine. *Unser Land - Arche Nova*, **10**, 28-29.
Impakt faktor: -

5.1.2. Magyar nyelven megjelent közlemények

Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J., Krause, I. (1992): Tejfehérje genetikai polimorfizmus vizsgálata magyar tarka és magyar szürke szarvasmarha fajtákban. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, **41**, 427-439.
Impakt faktor: -

Vági, J. és Baranyi, M. (2000): A tejfehérje genotípusok kapcsolata a tehenek tejtermelésével és fertilitásával holstein-fríz, magyartarka és keresztezett állományokban. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, **49**, 107-119.
Impakt faktor: -

5.1.3. Konferencia kiadványokban megjelent közlemények, absztraktok

Baranyi, M., Bősze, Zs. (1991): Tejfehérje genetikai variánsok gyakorisága magyar tarka és magyar szürke szarvasmarha fajtákban. VII. Állat-biotechnológiai Kerekasztal Konferencia. Kaposvár, 1991. okt. 10-11. *FloppYnfo* elektronikus folyóirat, C-sorozat: konferenciák. HU - ISSN : 1215 - 4407 /003. sz. [FloppYnfo Szerkesztőség, 1067 Bp., Teréz Krt. 23. (c/o ARGO), Szerkeszti: Kállai László].

Baranyi, M., Bösze, Zs., Porvay, M. (1992): Milk protein polymorphisms in Holstein-Friesian cattle in Hungary. In *Proceedings*. 8th World Holstein-Friesian Conference, Budapest. pp. 20.

Baranyi, M. (1992): Milk protein polymorphism in Hungarian Grey cattle: a possible new genetic variant of β-lactoglobulin. In *Abstracts*. 20th Congress of the Hungarian Biological Society. pp. 15.

Vági, J., Baranyi, M., Bősze, Zs. (1996): Relationship between milk protein genetic variants and production, as well as secondary traits in Holstein, Hungarian Red Spotted and crossbred herds. In *Book of abstracts* of the 47th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, August 25-29, 1996, Lillehammer, Norway. pp. 43.

Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J., Krause, I. (1996): Milk protein polymorphisms in different Hungarian cattle breeds and demonstration of a new β-lactoglobulin genetic variant. In *Book of abstracts* of the 47th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, August 25-29, 1996, Lillehammer, Norway. pp. 185.

Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J., Krause, I. (1996): Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian cattle breeds and identification of β-lactoglobulin J by RFLP. XII. Állat-biotechnológiai Kerekasztal Konferencia, 1996 október 17-18., Sárvár - Bécs. *FloppYnfo* Nr. 012. (HU - ISSN : 1215 - 4407, Editor: László Kállai, Kalliopé Bt., Budapest, Hungary)

Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J., Krause, I. (1997): Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian cattle breeds and PCR amplification of β-lactoglobulin exon 5 to

identify genetic variant J by RFLP. In *Milk Protein Polymorphism* (International Dairy Federation, Brussels, Belgium, ISBN 92 9098 026 9), Proceedings of the "Milk Protein Polymorphism II" IDF Seminar, Palmerston North, New Zealand, February 1997, pp. 87-92.

Vági, J., Baranyi, M., Bősze, Zs., Dohy, J. (1997): Association between bovine milk protein polymorphisms and milk production and fertlity traits. EU Cost Action 825: First International Workshop on Mammary Gland Biotechnoloy, August 15-17, 1997, Budapest. In *Book of Abstracts*.

Baranyi, M., Bősze, Zs., Buchberger, J., Krause, I. (1997): A new milk protein genetic variant in a native Hungarian cattle breed: beta-lactoglobulin J and its identification from milk and blood samples. EU Cost Action 825: First International Workshop on Mammary Gland Biotechnoloy, August 15-17, 1997, Budapest. In *Book of Abstracts*.

Vági, J., Baranyi, M., Bősze, Zs. (1998): Milk protein haplotypes and their association with milk production traits and fertility in Holstein, Hungarian Red Spotted and crossbred herds. In *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. January 11-16, 1998, Armidale, NSW, Australia. Volume 23, pp.463-466.

5.2. Egyéb közlemények

5.2.1. Idegen nyelven megjelent egyéb közlemények

Czelleng, F., Zsitvay, K., Egyházi, Zs., Baranyi, M., Fazekas, A. (1987): Comparative analysis of BHK-21 cell lines of virus strains of Foot-and-Mouth disease. *Arch. exper. Vet. med., Leipzig*, **41**, 791-796.
Impakt faktor: -

Baranyi, M., Hevér-Szabó, A., Venetianer, A. (1991): Heat-shock response of rat hepatoma variant cells. *Eur. J. Biochem.*, **200**, 707-713.
Impakt faktor: *3,307*

Baranyi, M., Brignon, G., Anglade, P., Ribadeau-Dumas, B. (1995): New data on the proteins of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Comp. Biochem. Phys.*, **111B**, 407-415.
Impakt faktor: *0,814*

Baranyi, M., Aszódi, A., Devinoy, E., Fontaine, M.-L., Houdebine, L.-M., Bősze, Zs. (1996): Structure of the rabbit κ-casein encoding gene: expression of the cloned gene in the mammary gland of transgenic mice. *Gene*, **174**, 27-34.
Impakt faktor: *2,258*

Hiripi, L., Devinoy, E., Rat, P., Baranyi, M., Fontaine, M.-L., Bősze, Z. (1998): Polymorphic insertions/deletions of both 1800 nt and 100 nt in two microsatellite-containing *LINE*-related intronic regions of the rabbit κ-casein gene. *Gene*, **213**, 23-30.

Impakt faktor: *2,258*

Devinoy E., Rat P., Baranyi, M., Hiripi, L., Fontaine, M.L., Hamer, I., Bősze, Zs. (1999): Polymorphisme de gene de la caséine-β dans une souche de lapins d' origine raciale Néo-Zélandais. *8émes Journ. Rech. Cunicole Fr.*, Paris. pp. 139-142.
Impakt faktor: -

Bősze, Zs., Baranyi, M., Hiripi, L., Fontaine, M.L., Devinoy, E. (1999): High level expression of rabbit kappa casein in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res.*, **8,** 56.
Impakt faktor: *1,849*

Aszódi, A., Bateman, J.F., Hirsch, E., Baranyi, M., Hunziker, E.B., Hauser, N., Bősze, Zs., Fässler, R. (1999): Normal skeletal development of mice lacking matrilin 1: Redundant function of matrilins in cartilege? *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7841-7845.
Impakt faktor: *9,866*

Hiripi, L., Baranyi, M., Szabó, L., Tóth, Sz., Fontaine, M-L., Devinoy, E., Bősze, Zs. (2000): Effect of rabbit κ-casein expression on the properties of milk from transgenic mice. *J. Dairy Res.*, **67**, 541-550.
Impakt faktor: *1,356*

5.2.2. Konferencia kiadványokban megjelent egyéb közlemények, absztraktok

Baranyi, M., Hevér-Szabó, A., Venetianer, A. (1990): Regulation of protein synthesis of hepatoma cells during heat-shock. 20th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS). August 19-24, 1990, Budapest. Editor: FEBS Publication Committee. Publisher: TOPREKLÁM Ltd., Budapest, Hungary. In *Book of Abstracts*.

Baranyi, M. (1993): Nyúltejvizsgálat fordított fázisú HPLC-vel és gél-elektroforézissel. IX. Állat-biotechnológiai Kerekasztal Konferencia. Mosonmagyaróvár, 1993. okt. 12-13. *FloppYnfo* elektronikus folyóirat. HU - ISSN : 1215 - 4407 /009. sz. [FloppYnfo Szerkesztőség, 1067 Bp., Teréz Krt. 23. (c/o ARGO), Szerkeszti: Kállai László].

Bősze Zs., Aszódi A., Baranyi M., Hiripi L. (1995): Production of pharmaceutical proteins from transgenic rabbits. Abstract. "Neurotransmitter systems - Modern technical approaches", International Symposium of the Drug Biochemistry Section of the Hungarian Biochemical Society, Balatonőszöd, May 8-10, 1995. *Neurobiology*, **3**, 181-182.

Virág, Gy., Baranyi, M., Bősze, Zs., Devinoy, E. (1996): Variability of α_{S2}-casein phenotypes in a New Zealand White rabbit breeding stock in Hungary. In *Proceedings of the 6th World Rabbit Congress*, July 9-12, 1996, Toulouse, France. Volume 2, pp. 377-380.

Baranyi, M., Aszódi, A., Devinoy, E., Fontaine, M.-L., Houdebine, L.-M., Bősze, Zs. (1996): Structure of the rabbit κ-casein encoding gene and expression in the mammary gland of transgenic mice. Abstract. Third Joint EAAP/ASAS Workshop on the Biology of Lactation in Farm Animals. August 24-25, 1996; Lillehammer, Norway. In *Livestock Production Science* (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam), **50**, 163.

Impakt faktor: *1,035*

Baranyi, M., Aszódi, A., Devinoy, E., Fontaine, M.-L., Houdebine, L.-M., Bősze, Zs. (1996): Structure of the rabbit κ-casein encoding gene and expression in the mammary gland of transgenic mice. Abstract. Third Joint EAAP/ASAS Workshop on the Biology of Lactation in Farm Animals. August 24-25, 1996; Lillehammer, Norway. In *Livestock Production Science* (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam), **50**, 163.
Impakt faktor: *1,035*

Hiripi, L., Devinoy, E., Baranyi, M., Fontaine, M-L., Bősze, Zs. (1997): Characterization of a rabbit kappa-casein gene polymorphism. EU Cost Action 825: First International Workshop on Mammary Gland Biotechnoloy, August 15-17, 1997, Budapest. In *Book of Abstracts*.

Virág, Gy., Bősze, Zs., Baranyi, M., Syabó, L., Devinoy, E. (1997): The effect of different kappa casein genotypes on the economically important production traits in rabbit. A field study. EU Cost Action 825: First International Workshop on Mammary Gland Biotechnoloy, August 15-17, 1997, Budapest. In *Book of Abstracts*.

Devinoy E., Baranyi M., Hiripi L., Aszódi A., Fontaine M-L., Bősze Zs. (1998): Modifying milk composition, use of rabbit as a model. In: *COST 825, Proceedings of the first international workshop on mammary gland biotechnology* (EUR 18392 en, Luxemburg), pp. 54-59.

Baranyi, M., Aszódi, A., Hirsch, E., Hauser, N. Paulsson, M., Bősze, Zs., Fässler, R. (1998): Az extracelluláris porc mátrix biokémiai analízise matrilin-1 knock-out egerekben. In *Előadás és poszterkivonatok*. VI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 1998, január 18-21, Szeged. pp. 47.

Bősze Zs., Baranyi M., Hiripi L., Barta E., Fontaine M-L., Devinoy E. (1998): Altering milk composition through transgenesis: a new approach for producing biologically active protein. In: *Peptides 1998* (eds. S. Bajusz &F. Hudecz) Akadémiai Kiadó, Budapest ISBN 9630576228. Proceedings of the 25th European Peptide Symposium, Aug. 30- Szept. 4, 1998, Budapest. pp. 128-129.

Bősze Zs., Baranyi M., Hiripi L., Barta E., Fontaine M-L., Devinoy E. (1998): Altering milk composition through transgenesis: a new approach for producing biologically active protein. In *Journal of Peptide Science*, Special Issue Vol.4 (25th European Peptide Symposium, Aug. 30- Szept. 4, 1998, Budapest. Programme and Abstracts) pp. 22.
Impakt faktor: *1,311*

Bősze, Zs., Baranyi, M., Hiripi, L., Tóth, Sz., Makovics, F., Fontaine, M-L., Devinoy, E. (1998): Tejösszetétel megváltoztatása transzgenikus állatokban. In *Új kihívások a mezőgazdaság számára az EU-csatlakozás tükrében*. XVII. Óvári Tudományos Napok, 1998, szeptember 29-30, Mosonmagyaróvár. I. kötet, pp. 24-28.

Vági, J., Baranyi, M., Bősze, Zs. (1998): A tejfehérje genotípusok kapcsolata a tejtermeléssel, a fertilitással és a tehénhasználat intenzitásával. In *Új kihívások a mezőgazdaság számá-*

ra az EU-csatlakozás tükrében. XVII. Óvári Tudományos Napok, 1998, szeptember 29-30, Mosonmagyaróvár. I. kötet, pp. 185-199.

Baranyi, M., Hiripi, L., Szabó, L., Tóth, Sz., Bősze, Zs., Fontaine, M.L., Devinoy, E. (1999): Expression of rabbit kappa-casein in transgenic mice: Alterations of milk micelle structure and modified nursing qualities of transgenic mice. In *Book of Abstracts*. International Conference on the Biology of the Mammary Gland. EU Cost Action 825. September 16-18, 1999. Tours, France. P.1, pp. 36.

Baranyi, M., Pellegrini, A. (2000): Antibacterial activity of rabbit casein peptides. In *Book of Abstracts*. Workshop on Bioactive Components of Milk. EU Cost Action 825: Mammary Gland Biology. pp. 22.