

Acta agriculturae slovenica

Letnik 84, številka 2
Volume 84, Number 2

Doslej:

ZBORNIK

BIOTEHNIŠKE FAKULTETE
UNIVERZE V LJUBLJANI
Kmetijstvo. Zootehnika

Previously:

RESEARCH REPORTS

BIOTECHNICAL FACULTY
UNIVERSITY OF LJUBLJANA
Agriculture. Zootechny

Acta agriculturae slovenica, 84(december 2004)2

Acta agriculturae slovenica

Doslej: Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika

Izdaja	Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana. Letno izhajata dva letnika vsak z dvema številka.
Glavni in odgovorni urednik	prof. dr. Peter DOVČ
Tehnični urednik	Jože STOPAR
Uredniški odbor	prof. dr. Tajana ČERNY (Zagreb), akad. prof. dr. Remzi BAKALLI (Athens, ZDA), prof. dr. Zdenko PUHAN (Zürich), dr. Michel BONNEAU (Saint Gilles), prof. dr.dr.h.c. Franz PIRCHNER (Innsbruck), prof. dr. Jasna M.A. STEKAR (Ljubljana), dr. Drago BABNIK (Ljubljana), izr.prof. dr. Jernej TURK (Maribor), izr.prof. dr. Dejan ŠKORJANC (Maribor), doc. dr. Slavica GOLC TEGER (Ljubljana), izr.prof. dr. Milena KOVAČ (Ljubljana)
Jezikovni pregled	Vanda ŠUŠTERŠIČ
Razmnoževanje	Tiskarna Pleško d.o.o., Rožna dolina, cesta IV/32-36, SI-1000 Ljubljana v 450 izvodih
Naslov uredništva	Groblje 3, SI-1230 Domžale, tel.: 01 7217 800, telefaks: 01 7241 005
E-pošta	peter.dove@bfro.uni-lj.si
Domača stran	http://www.bf.uni-lj.si/aas
Letna naročnina	6 000 SIT, za tujino 35 USD
Posamezna številka	4 000 SIT, za tujino 25 USD
Račun	01100-6030707410, sklic na številko 40-521-200341
Sofinancira	Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport Republike Slovenije
Zbornik redno selektivno zajemajo	AGRIS, CAB Abstracts, COBISS in FSTA
Dokumentacijska obdelava	Mednarodna: Slovenski nacionalni center AGRIS Domača: INDOK Oddelka za zootehniko
Publikacije v zameno za Zbornik pošljite na naslov	Centralna knjižnica Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana, p.p. 2995
Avtorska pravica	© 2004 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Acta agriculturae slovenica

Previously: Research Reports Biotechnical Faculty University of Ljubljana. Agriculture. Zootechny

Issued by	Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana., Slovenia.
Editor-in-Chief	Prof. Peter DOVČ, Ph.D.
Technical Editor	Jože STOPAR
Editor Board	Prof. Tajana ČERNY, Ph.D. (Zagreb), Academician Prof. Remzi BAKALLI, Ph.D., (Athens, ZDA), Prof. Zdenko PUHAN, Ph.D. (Zürich), Michel BONNEAU, Ph.D. (Saint Gilles), Prof. Dr.h.c. Franz PIRCHNER, Ph.D. (Innsbruck), Prof. Jasna M.A. STEKAR, Ph.D. (Ljubljana), Drago BABNIK, Ph.D. (Ljubljana), Assoc.Prof. Jernej TURK, Ph.D. (Maribor), Assoc.Prof. Dejan ŠKORJANC, Ph.D. (Maribor), Ass.Prof. Slavica GOLC TEGER, Ph.D. (Ljubljana), Assoc.Prof. Milena KOVAČ, Ph.D. (Ljubljana)
Proof Reading	Vanda ŠUŠTERŠIČ
Printed by	Tiskarna Pleško d.o.o., Rožna dolina, cesta IV/32-36, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, in 450 copies
Address of Editor	Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia, Tel.: +386 1 7217 800, Telefaks: +386 1 7241 005
E-mail	peter.dovc@bfro.uni-lj.si
Home page	http://www.bf.uni-lj.si/aas
Annual subscription	6 000 SIT, for foreign countries 35 US\$
Individual issue	4 000 SIT, for foreign countries 25 US\$
No. of Bank Account	27620-5085063007-040
SWIFT Code	Deželna banka Slovenije d.d., Kolodvorska 9, SI-1000 Ljubljana SZKB SI-2X
Subsides by	Ministry of Education, Science and Sport of Republic Slovenia
Res. Reports are regularly indexed and abstracted by	AGRIS, CAB Abstracts, COBISS and FSTA
Indexing, Classification and Networking	International: Slovene National AGRIS Center National: INDOC of zootechnics
Please, address exchange publication to	Central Library of the Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana, P.O. Box 2995, Slovenia
Copyright	© 2004 University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department

Acta agriculturae slovenica

Letnik 84

Ljubljana, december 2004

Številka 2

VSEBINA / CONTENTS

	stran page
IN MEMORIAM	
Josef A. STARK (1942-2004) Janez POKLUKAR	93
Doc. dr. Janez POKLUKAR (1960–2004) Peter KOZMUS	95
GENETIKA / GENETICS	
Transkripcijsko uravnavanje adipogeneze in vloga koaktivatorja PGC-1α Tamara MILOŠEVIČ BERLIČ in Peter DOVČ	97
Milk production in the post-genomic era Polona FRAJMAN and Peter DOVČ	109
Polimorfizem genov za β-laktoglobulin in α_{s1}-kazein paške ovce Ante IVANKOVIČ in Peter DOVČ	121
Rodovi lipicancev slovenske reje glede na haplotip mitohondrijske DNK Tatjana KAVAR, Franc HABE in Peter DOVČ	131
MIKROBIOLOGIJA / MICROBIOLOGY	
Razgradnja ksilana z različnimi ksilanazami vampne bakterije <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5^T Tadej ČEPELJNIK, Katarina FIDLER in Romana MARINŠEK-LOGAR	141
ŽIVINOREJA / ANIMAL BREEDING	
Distribution of tissues in the carcass of Turopolje pig, an autochthonous Croatian breed Marija ĐIKIĆ, Krešimir SALAJPAL, Danijel KAROLYI, Ivan JURIC and Vlatko RUPIC	153

Subject index by Agrovoc descriptors	
Tomaž BARTOL.....	161
Subject index by Agris category codes	
Nataša SIARD.....	163
Abecedno kazalo avtorjev	165
Navodila avtorjem.....	167
Notes for authors.....	169

JOSEF A. STARK (1942-2004)



Prvega marca letos nas je zapustil član uredniškega odbora Josef A. Stark s Švedske univerze kmetijskih znanosti v Uppsali na Švedskem. Prijatelji smo ga na njegovo željo klicali enostavno Jože.

Jože se je rodil 18. avgusta 1942 v Čurilih pri Metliki. Vojna vihra druge svetovne vojne mu je vzela očeta, tako, da je moral z bratoma in nesebičnim razdajanjem svoje matere in stare mame odraščati v skromnosti in nenehni borbi za življenje ter za dokazovanje – to znam, to zmorem. Osnovno šolo je končal v Metliki, srednjo kmetijsko šolo pa v Križevcih na Hrvaškem pri svojem stricu. Po odsluženi vojaščini je odšel v Ljubljano. Kmalu se je odločil, da bo poskušal na novo začeti v Kaliforniji pri svojem stricu. Tja naj bi odpotoval preko Švedske. Usoda je hotela drugače – ostal je na Švedskem. Zaposlil se je kot fizični delavec na farmi blizu Uppsale. Ob delu je končal gimnazijo. V letu 1975 je z delom »Studies of microorganisms active on the degradation of 2,4-D and MCPA« diplomiral na Švedski univerzi kmetijskih znanosti v Uppsali. Na Univerzi se je najprej zaposlil kot asistent, v letih 1979-1982 je napredoval v pomočnika vodje odseka za čebelarstvo. Leta 1982 je doktoriral z delom »Persistence of herbicides in forest soils« in napredoval v vodjo odseka za čebelarstvo. Na Univerzi je bil zaposlen do leta 2003, ko je po reorganizaciji le-te odšel v pokoj. Poleg številnih znanstvenih del smo lahko vedno znova občudovali njegovo energijo in dejavnost pri čebelarjih v Skandinaviji in tudi na mednarodni ravni. Srečali smo ga lahko povsod v zahodno evropskih državah. Večkrat je v okviru raziskovalnih projektov obiskal Kubo, Peru, Bolivijo, Japonsko, Avstralijo, ZDA, Poljsko in Slovenijo. Ni čudno, da je bil na Švedski univerzi kmetijskih znanosti cenjen mentor številnim dodiplomskega in podiplomskega študija. Bil je predsednik strokovnega združenja rejcev temne čebele SICAMM in veliki občudovalec naše kranjske čebele.

Jože je sodeloval tudi v številnih dokumentarnih filmih, televizijskih in radijskih oddajah. Med čebelarji je bil poznan kot odličen predavatelj. Bil je član številnih združenj in organizacij. Prejel je najvišje kraljevo odlikovanje Švedskega kralja. Jože je bil velik svetovljan. Slovenska vlada ga je leta 2000 imenovala za častnega konzula republike Slovenije na Švedskem, pisnega

imenovanja pa iz njemu neznanih razlogov ni prejel. Na žalost ga je zaradi dolgotrajnosti formalnih postopkov in nekaterih proceduralnih zapletov tik pred končnim pisnim sklepom o imenovanju prehitela smrt.

Kljub trdemu delu in razpetostjo med rojstnim krajem in novo domovino, je Jože našel čas za druženje z belokranjskimi in slovenskimi čebelarji ter strokovnjaki s tega področja. Kadar koli ga je pot prinesla domov, nam je pripravil čudovita predavanja.

Na zadnjem svetovnem čebelarskem kongresu v Ljubljani je vodil posvet »Biologija čebel in vpliv okolja nanje«. Slovenski čebelarji so mu zelo hvaležni za njegov prispevek k uspešni izvedbi kongresa. Jože je bil ponosen, da so lahko čebelarji Švedske in drugih držav sveta, videli in dojeli našo urejenost in kulturo.

Domači in najtesnejši prijatelji so se od njega poslovili v petek 10. marca 2004 v katoliški cerkvi v Uppsali. Tudi mi ga ohranimo v trajnem spominu.

doc. dr. Janez POKLUKAR

Doc. dr. JANEZ POKLUKAR (1960–2004)



V ponedeljek, 5. aprila je za posledicami poškodb pri delovni nesreči, v ljubljanskem Kliničnem centru, umrl doc. dr. Janez Poklukar iz Seničnega pri Trziču, ugleden, svetovno znan čebelarški strokovnjak, raziskovalec, znanstvenik in pedagog na Biotehniški fakulteti.

Rodil se je 2. maja 1960 v Kranju, kot sin kmečkih staršev Jakoba in Ane Poklukar. Po prvih štirih letih osnovne šole, ki jo je obiskoval v Dupljah, je osnovno šolanje nadaljeval v Kranju. Po končani osnovni šoli se je leta 1975 vpisal na živinorejsko-veterinarsko tehnično šolo v Ljubljani, kjer je leta 1978 z odliko maturiral. Po končani srednji šoli se je vpisal na višješolski študij živinoreje na Biotehniški fakulteti v Ljubljani in po opravljeni diplomu nemudoma nadaljeval študij na visokošolskem študiju živinoreje. Diplomiral je 3. septembra 1982 z diplomskim delom »Primerjava mlečnih proizvodenj na družbenem obratu in na kmetijah« in si s tem pridobil strokovni naziv diplomirani inženir kmetijstva živinorejske smeri. Po študiju je odšel na služenje vojaškega roka, potem pa se je za določen čas zaposlil kot pripravnik na Kmetijsko živilskem kombinatu v Kranju.

Leta 1984 se je poročil z Miro Papler iz Žej pri Naklem. Preselila sta se v Senično, in v zakonu so se jima rodili trije otroci: Tanja, Klavdija in Aleš.

Janez Poklukar je bil od 1. novembra 1984 zaposlen na Kmetijskem inštitutu Slovenije, kjer je bil vodja selekcije v čebelarstvu. Že med služenjem vojaškega roka je vpisal podiplomski študij na Biotehniški fakulteti s področja genetike in selekcije v živinoreji. Magistrski študij genetike in selekcije v živinoreji je zaključil z delom »Uspešnost masovne selekcije domače čebele v pogojih kontroliranega in svobodnega parjenja matic v letu 1989«. V letu 1992 je uspešno zagovarjal doktorsko disertacijo z naslovom »Genetski parametri površine domače pčele (*Apis mellifera carnica*) i proizvodnja meda«, na Agronomski fakulteti Vseučilišča v Zagrebu. S tem je zaključil dobo usposabljanja v okviru programa mladih raziskovalcev.

V letu 1995 si je pridobil naziv višji znanstveni sodelavec, v letu 1997 pa je bil habilitiran za docenta na področju čebelarstva na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. V času izvolitve v naziv je bil mentor 11 diplomantom visokega strokovnega in univerzitetnega študija zootehnik na

Biotehniški fakulteti. Dve diplomski nalogi sta bili nagrajeni s Prešernovo nagrado Biotehniške fakultete. V zadnjem času je bil mentor dvema podiplomskima študentoma.

Poleg dela, ki ga je opravljal na kmetijskem inštitutu Slovenije in na Biotehniški fakulteti, je bil zelo dejaven tudi na drugih področjih: Med drugim je bil član stalne delovne skupine za čebelarstvo pri Evropski komisiji v Bruslju, nosilec predmeta "Genetika pčela" na podiplomskem študiju "Stočarstvo, Mljekarstvo, Pčelarstvo na Agronomski fakulteti Vseučilišča v Zagrebu, član upravnega odbora Čebelarke zveze Slovenije, član delovne skupine za pripravo Zakona o živinoreji, vodja vertikalne delovne skupine za pripravo podzakonskih aktov na področju čebelarstva, član programskega sveta Mednarodnega kmetijsko – živilskega sejma, Gornja Radgona, član oz. predsednik komisije za ocenjevanje medu, koordinator strokovnih nalog v čebelarstvu ter vodja opazovalno- napovedovalne službe gozdnega medenja.

Za dr. Janeza Poklukarja lahko rečemo, da je delal kolikor je mogel in da se ni skrival za obveznostmi, ki so mu bile dane s strani Kmetijskega inštituta. Tudi zaradi tega je njegova znanstvena, strokovna in poljudna bibliografija tako obsežna. Od leta 1982 je napisal preko 220 prispevkov, med drugim 24 znanstvenih in 77 strokovnih člankov, 20 znanstvenih prispevkov na konferencah, 17 strokovnih prispevkov na konferencah, 17 povzetkov znanstvenih prispevkov na konferencah, 20 končnih poročil o rezultatih raziskav ter 9 elaboratov, predštudij in študij. Neprecenljivo je tudi njegovo uredniško in avtorsko delo pri izdaji knjige »Od čebele do medu«, ki je izšla pred šestimi leti pri založbi *Kmečki glas*.

Zaradi svoje široke znanstvene in strokovne razgledanosti je bil tudi odličen pedagog, ki je svoje bogato znanje razdal študentom pa tudi na predavanjih za čebelarje, po vsej Sloveniji in v tujini. Tudi njegov mednarodni ugled je pripomogel, da je bil lani v Sloveniji svetovni čebelarski kongres Apimondia 2003, kjer je skupaj s pred kratkim preminulim dr. Josefom Starkom brezhibno izpeljal strokovni del kongresa. Odlična izvedba kongresa, pa tudi njegova sposobnost, da se je pri pomembnih odločitvah odločal hitro, sta pripomogli, da je v začetku letošnjega leta postal član devetčlanske strokovne skupine za med pri evropski komisiji v Bruslju.

Ob vsem tem pa je našel čas tudi za združevanje strokovnega in družabnega, saj je kot predsednik Slovenskega akademskega čebelarskega društva (SAČD) organiziral številna strokovna srečanja in ekskurzije. Kljub številnim obveznostim je ostal dostopen za vsakega čebelarja. Nikoli ni odrekel besede in njegova strokovna razlaga je pogosto pomagala pri reševanju problemov.

Ker se je njegova življenjska pot končala veliko prehitro, se je v slovenskem čebelarskem prostoru pojavila velika praznina, ki je ne bo mogoče kmalu zapolniti.

Od njega smo se poslovili 8. aprila 2004 v cerkvi v Naklem pri Kranju. Ohranili ga bomo v trajnem spominu.

Peter KOZMUS, univ. dipl. inž. zoot.

TRANSKRIPCJSKO URAVNAVANJE ADIPOGENEZE IN VLOGA KOAKTIVATORJA PGC-1 α *

Tamara MILOŠEVIČ BERLIČ^{a)} in Peter DOVČ^{b)}

^{a)} Krka, d. d., Dunajska 65, SI-1000 Ljubljana, dr., e-pošta: tamara.berlic@krka.biz.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof., dr., e-pošta: peter.dovc@bfro.uni-lj.si.

Delo je prispelo 10. novembra 2004, sprejeto 03. decembra 2004.

Received November 10, 2004, accepted December 03, 2004.

IZVLEČEK

Adipogeneza je kompleksen proces, na katerega vpliva veliko število genetskih in okoljskih faktorjev. Ker je posledica prekomernega nalaganja maščob debelost, pogosto pa tudi pojav diabetesa tipa 2, postaja proučevanje molekularskih osnov adipogeneze vse bolj pomembno tudi z vidika zdravja človeka. V živalski proizvodnji proces tvorbe maščobnega tkiva pomembno vpliva na kakovost prirasta, preko porabe krme pa na ekonomičnost proizvodnje. Poleg leptina in leptinskega receptorja, ki odločilno uravnata nalaganje maščob, je bil v zadnjem času odkrit tudi mehanizem uravnavanja tvorbe maščobnega tkiva, ki vključuje adaptivno termogenezo in biosintezo mitohondrijev. Pomembna regulatorja teh procesov sta PPAR γ in njegov koaktivator PGC-1 α . V pričujočem prispevku opisujemo mehanizem uravnavanja adipogeneze in vlogo PPAR γ in PGC-1 α v njem. Prikazana je tudi medvrstna primerjava aminokislinskih zaporedij PGC-1 α in možnosti za razvoj farmacevtskih učinkovin, ki bi vplivale na izražanje PGC-1 α .

Ključne besede: prašiči / adipogeneza / molekularna genetika / transkripcijsko uravnavanje / termogeni koaktivator PGC-1 α

TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF ADIPOGENESIS AND ROLE OF THE COACTIVATOR PGC-1 α †

ABSTRACT

Adipogenesis is a complex proces, depending on numerous genetic and environmental factors. Study of the molecular basis of adipogenesis becomes, due to its central role in obesity and diabetes type-2 in human, more and more important also in human medicine. Adipogenesis is of central importance also for animal production, due to its impact on carcass composition, meat quality and profitability of fattening. In addition to the role of leptin and leptin receptor in adipogenesis, a new regulatory mechanism was recently discovered, which includes adaptive thermogenesis and biosynthesis of mitochondria. Important regulators of these processes are PPAR γ and his co-activator PGC-1 α . In this article we describe the mechanism of adipogenesis regulation and the role of PPAR γ and PGC-1 α in it. The interspecies comparison of PGC-1 α amino sequence and possibilities for development of drugs regulating PGC-1 α are presented.

Key words: pigs / adipogenesis / molecular genetics / transcriptional control / thermogenic coactivator PGC-1 α

* Prispevek je del doktorskega dela Tamare Milošević Berlič z naslovom 'Molekulski mehanizmi uravnavanja tvorbe maščobnega tkiva pri prašiču (*Sus scrofa*)', mentor prof. dr. Peter Dovč.

† This article is part of a doctoral thesis 'Molecular background of fat tissue formation in pig (*Sus scrofa*)', issued by Tamara Milošević Berlič, supervisor prof. Peter Dovč, Ph.D.

UVOD

Maščobno tkivo je v zadnjih dvajsetih letih postalo predmet intenzivnih raziskav. Raziskave je spodbudila predvsem dostopnost nesmrtnih celičnih linij preadipocitov, ki je omogočila preučevanje lastnosti maščobnih celic (adipocitov) *in vitro* (v kulturi), pa tudi spoznanje, da ima maščobno tkivo odločilno vlogo pri vzdrževanju energetskega ravnovesja v telesu. Na intenzivnost raziskav sta v veliki meri vplivala tudi razširjenost debelosti in diabetesa tipa 2 pri človeku.

Tvorba maščobnega tkiva (adipogeneza) je kompleksen proces, ki ga uravnavajo številni endogeni (genetski, nevroendokrini) in eksogeni (okoljski) dejavniki. Raziskave zadnjih let so usmerjene predvsem v iskanje genetskih dejavnikov, saj nam poznavanje le-teh omogoča boljši vpogled in razumevanje molekulskega ozadja nalaganja maščevja in posledične debelosti.

Na molekularni ravni proces adipogeneze uravnava zapletena mreža celega niza transkripcijskih faktorjev, ki prispevajo k tvorbi in diferenciaciji maščobnih celic (Rosen in sod., 2000). Osrednjo vlogo ima PPAR γ (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*), ki sodi v družino jedrnih hormonskih receptorjev (angl. *nuclear hormone receptors*). Ta protein ni pomemben le v adipogenezi, ampak tudi v drugih fizioloških in patoloških procesih v telesu. Uravnava namreč tudi diferenciacijo številnih drugih tipov celic (npr. hepatocitov, miocitov, fibroblastov, keratinocitov), zato so proteini PPAR γ in ligandi, ki te proteine aktivirajo, pomembne terapevtske tarče za zdravljenje mnogih bolezni človeka. Sprememba v sintezi in/ali aktivnosti teh transkripcijskih faktorjev lahko namreč povzroči določene presnovne bolezni, za katere so značilne povečane ali zmanjšane zaloge maščobnega tkiva, zato je poznavanje podrobne strukture PPAR γ in razumevanje mehanizma njegove aktivacije ključno za pridobivanje novih zdravil.

Debelost je problem današnjega časa. Etiopatogeneza debelosti je večvzročna. Med eksogene vzroke spadajo: premalo gibanja, razmeroma lahka dostopnost hrane, stresi in anksiozna stanja. Tudi endogenih oz. genetskih vplivov je več: sestava organizma, energijske potrebe, osnovna presnova in termogeneza, ki jo povzročajo gibanje, uživanje hrane in toplotne spremembe. Pogostnost (incidenca) debelosti še vedno narašča in je v zadnjem času postala velik zdravstveni problem. Tudi število novo odkritih genov in drugih molekularskih označevalcev, ki jih povezujejo z debelostjo pri človeku, je vedno večje (trenutno preko 250). Pri tem je pomembna predvsem identifikacija tistih mutacij in kombinacij genov, ki bistveno prispevajo k dovzetnosti za razvoj debelosti, in okoljskih dejavnikov, ki omogočajo izražanje teh genov (Rankinen in sod., 2002).

Zaradi izjemne podobnosti v fiziologiji in presnovi lipidov so prašiči odlični model za preučevanje debelosti, diabetesa in številnih drugih presnovnih bolezni človeka (Fajas in sod., 1998; Sundvold in sod., 2001). Z razumevanjem molekulskega ozadja nalaganja maščobe lahko bistveno prispevamo k zmanjšanju nastanka debelosti in zmanjšanju tveganja za razvoj z debelostjo povezanih bolezni. To znanje je pomembno tudi pri reji domačih živali, saj prekomerno nalaganje maščevja pri prašiču vpliva tako na gospodarnost reje kot na kakovost prašičjega mesa.

Tvorba maščobnega tkiva (adipogeneza)

Sesalci imajo dve vrsti maščobnega tkiva, belo (angl. *white adipose tissue*, WAT) in rjavo (angl. *brown adipose tissue*, BAT), ki se razlikujeta po presnovnih značilnostih. Rjavi in beli adipociti imajo različno vlogo pri vzdrževanju energetskega ravnovesja. Funkcija belih adipocitov je shranjevanje energije v obliki trigliceridov, funkcija rjavih pa poraba metaboličnih hraniv, pri čemer se sprošča toplota. Motnje v tem stanju dinamičnega ravnotežja med vnosom in porabo energije vodijo v povečanje ali zmanjšanje količine belega maščevja, npr. pri debelosti

oz. lipodistrofičnih sindromih (podhranjenost, nervozna anoreksija). V fiziološkem smislu je vloga rjavega maščevja adaptacija na mraz in zaščita pred debelostjo.

Maso maščobnega tkiva v osnovi določa število adipocitov in ravnotežje med vnosom in porabo energije. Pri vzpostavljanju energetskega ravnovesja v telesu imajo pomembno vlogo geni, ki uravnavajo presnovo maščob in razgradnjo hranilnih snovi. Nalaganje maščevja je kvantitativna poligenetska lastnost, kar pomeni, da je izražanje take lastnosti v večini primerov pod vplivom velikega števila genov. Prispevek posameznih genov k izoblikovanju lastnosti je lahko zelo različen – z delovanjem nekaterih genov lahko pojasnimo velik del fenotipske variance (Weller in sod., 1990).

Masa maščobnega tkiva se lahko spremeni zaradi spremembe v številu, velikosti ali volumnu adipocitov. Povečano število celic je rezultat neprekinjene stimulacije procesa celične diferenciacije, zmanjšano število pa je posledica apoptoze in dediferenciacije adipocitov. Zanimivo je, da proces diferenciacije mezenhimskih zarodnih celic v adipocite poteka celo življenje (Fajas in sod., 1998).

Molekulsko uravnavanje adipogeneze

Diferenciacija celic je odraz sprememb v izražanju genov. Morfološke spremembe, ki spremljajo adipogenezo (npr. sprememba oblike celic, kopičenje maščobe), so posledica aktiviranja genov in sprememb v sintezi in delovanju adipogenih transkripcijskih faktorjev. Ti transkripcijski faktorji skupaj stimulirajo izražanje genov, specifičnih za adipocite, kar vodi v značilen fenotip zrelih adipocitov.

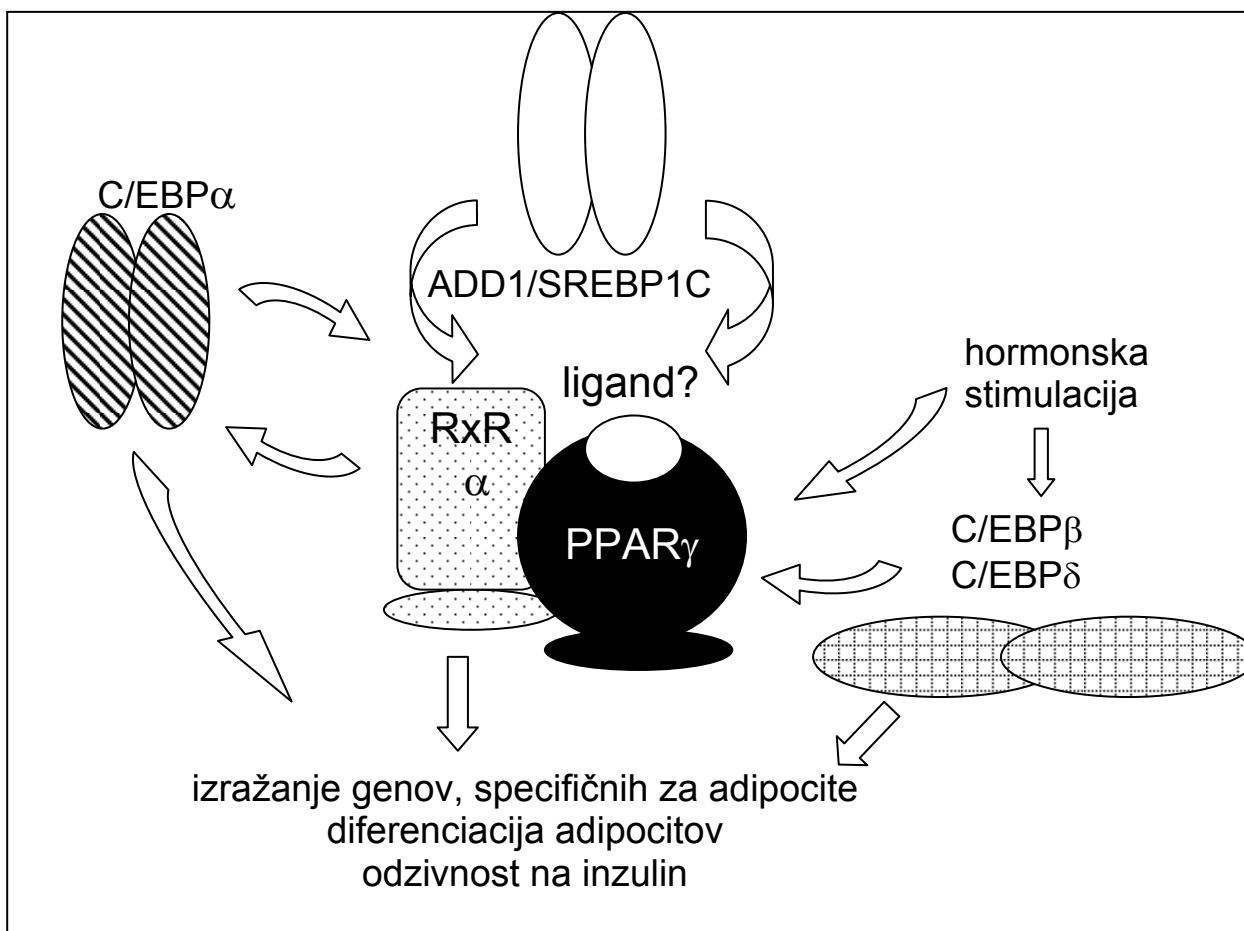
Pomembna stopnja v diferenciaciji adipocitov je prekinitev rasti celic. Na tej stopnji se, po stimulaciji z ustreznimi hormoni, preadipociti začnejo diferencirati v adipocite. Proces uravnavajo medsebojno odvisni adipogeni transkripcijski faktorji PPAR γ (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*), C/EBP (angl. *CCAAT/ enhancer-binding protein*) in ADD/SREBP1 (angl. *adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein-1*).

Ključno vlogo ima PPAR γ

Ključno vlogo pri uravnavanju adipogeneze ima transkripcijski faktor PPAR γ . Je pglavitni koordinator diferenciacije adipocitov – aktivirani PPAR γ namreč sproži izhod iz celičnega cikla. PPAR γ se veže na promotorje genov, specifičnih za maščobne celice, in aktivira njihovo izražanje. Zato, da se lahko veže na DNA in aktivira transkripcijo, se mora povezati z jedrnim receptorjem RXR (angl. *retinoid receptor X*) v heterodimer. Heterodimeri PPAR γ /RXR se vežejo na specifične PPAR-odzivne elemente (angl. *PPAR response elements*, PPRE) v ciljnih genih (Spiegelman in sod., 2000). Dodatni adipogeni učinek PPAR γ je tudi zmanjšanje izražanja leptina (hormona, ki ga izločajo maščobne celice), kar povzroči povečan vnos energije v adipocite (Fajas in sod., 1998).

Pri uravnavanju aktivnosti PPAR γ imajo osrednjo vlogo proteini C/EBP. Rezultati številnih poskusov kažejo na zaporedno aktivacijo celega niza transkripcijskih faktorjev, vpletenih v adipogenezo (slika 1). Najprej se pojavita proteina C/EBP β in C/EBP δ , sledi PPAR γ , ki nadalje aktivira C/EBP α . C/EBP α vzajemno vzdržuje raven PPAR γ (pozitivna kontrola) in na ta način ohranja diferencirano stanje. Aktivacijo PPAR γ lahko s produkcijo endogenega liganda za PPAR γ sproži tudi ADD1/SREBP1C. Vsi omenjeni faktorji prispevajo k izražanju genov, ki so značilni za dokončno diferenciran fenotip maščobnih celic.

Na pomen PPAR γ v patologiji debelosti kaže tudi polimorfizem v genu *PPAR γ* , ki je povezan z nižjimi koncentracijami leptina pri debelih ljudeh v primerjavi s kontrolno skupino, ki ima normalno obliko PPAR γ .



Slika 1. Transkripcijsko uravnavanje adipogeneze – zaporedna aktivacija številnih družin transkripcijskih faktorjev (prirejeno po Rosen in sod., 2000).

Figure 1. Transcriptional control of adipogenesis – sequential activation of several transcriptional factors (adapted from Rosen *et al.*, 2000).

V maščobnem tkivu prašiča sta prisotni dve izoformi proteina PPAR γ ($\gamma 1$ in $\gamma 2$), prevladuje pa PPAR $\gamma 1$. Zanimivo je, da PPAR $\gamma 1$ prevladuje tudi v podkožnem maščevju človeka, medtem ko je za uravnavanje adipogeneze pri glodalcih pomembnejša izoforma PPAR $\gamma 2$ (Tontonoz in sod., 1994).

Houseknecht in sodelavci (1998) so klonirali cDNA za PPAR γ prašiča in preiskovali uravnavanje izražanja gena *PPAR γ* v podkožnem maščobnem tkivu prašiča. Ugotovili so, da gen *PPAR γ* prašiča nosi zapis za 1,8 kb dolgo molekulo mRNA in da je na ravni aminokislinskega zaporedja 99, 96 oz. 97-odstotno identičen s PPAR γ človeka, miši oz. krave. Z analizo northern so potrdili, da se mRNA za PPAR γ v skeletni mišici ne izraža, medtem ko so z analizo western potrdili visoko raven proteina PPAR γ v maščobnem tkivu prašiča v primerjavi z drugimi tkivi. Zmanjševanje kalorične vrednosti obrokov in stradanje prašičev sta povzročila znatno znižanje vsebnosti proteina PPAR $\gamma 2$ v podkožnem tkivu, ne pa tudi PPAR $\gamma 1$, v primerjavi s kontrolno skupino prašičev, hranjenih *ad libitum*. Mehanizem diferencialnega uravnavanja izražanja *PPAR $\gamma 2$* in *PPAR $\gamma 1$* še ni povsem jasen. Na osnovi teh rezultatov so Houseknecht in sodelavci (1998) skleпали, da na izražanje *PPAR γ* med drugim vplivata tudi vrsta in kalorična vrednost hrane oz. endokrini dejavniki (hormoni).

Na aktivnost PPAR γ vplivajo tudi transkripcijski koaktivatorji

Aktivacija transkripcije z jedrnimi receptorji vključuje delovanje mnogih dejavnikov, ki tvorijo komplekse, sestavljene iz več proteinov. Ti delujejo zaporedno (tj. ob različnem času) in/ali v kombinaciji in s tem poskrbijo za dodatno raven uravnavanja transkripcije.

Da bi transkripcijski faktorji aktivirali izražanje tarčnih genov, morajo najprej razrahljati strukturo kromatina in zbrati elemente bazalnega transkripcijskega aparata. To opravijo proteini, imenovani koaktivatorji, ki v osnovi predstavljajo 'most' med jedrnimi receptorji in transkripcijskim aparatom. Koaktivatorski proteini olajšajo komunikacijo med jedrnimi receptorji, bazalnim transkripcijskim aparatom in kromatinskim okoljem in na ta način posredno olajšajo transkripcijo. Ti proteini torej niso neposredno vezani na DNA, ampak nanjo delujejo preko jedrnih receptorjev. Na aktivnost bazalnega transkripcijskega aparata vplivajo tudi neposredno preko interakcij s proteini.

Za koaktivatorje jedrnih receptorjev so značilni visoko ohranjeni amfipatični motivi LXXLL (v katerih L predstavlja levcin, X pa katerokoli aminokislino), ki so pomembni pri interakcijah med koaktivatorji in jedrnimi receptorji. Ti motivi uravnavajo tudi interakcije med posameznimi koaktivatorji, za katere je značilna velika kombinatorska fleksibilnost. Poleg omenjenih so pomembna še druga aminokislinska zaporedja, ki prispevajo k specifičnosti vezave na PPAR γ (Rosenfeld in Glass, 2001).

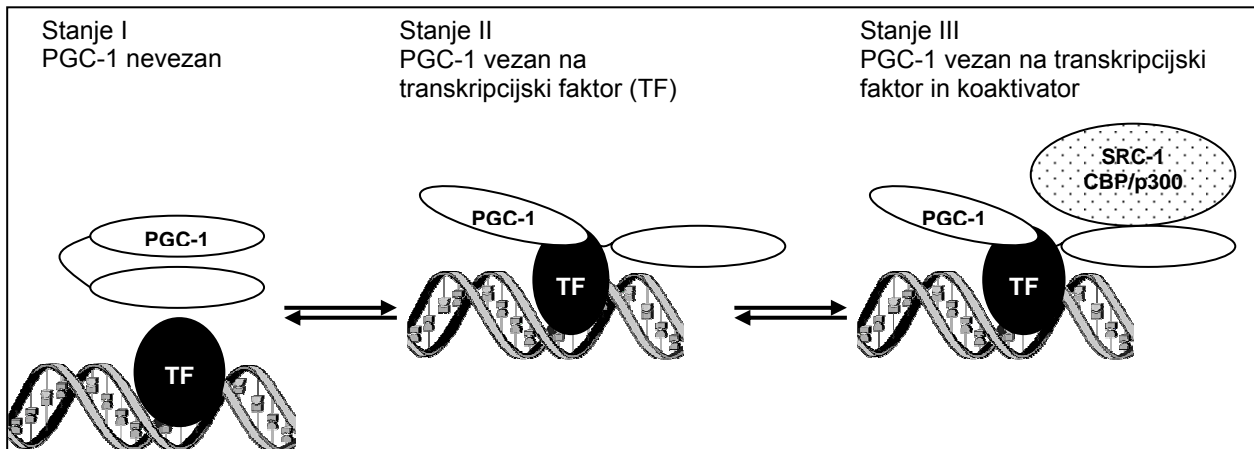
Termogeni koaktivator PGC-1 α

Koaktivatorji jedrnih receptorjev so precej raznolika skupina proteinov – uravnavajo lahko zelo specifične celične procese. Pri uravnavanju presnove in porabi energije ima ključno vlogo koaktivator PGC-1 α (angl. *PPAR γ coactivator-1 α*), ki sproži biogenezo (tj. povečanje števila) mitohondrijev in podvajanje mtDNA ter uravnava adaptivno termogenezo in β -oksidacijo maščobnih kislin (Knutti in Kralli, 2001; Wu in sod., 1999; Lin in sod., 2002; Lehman in sod., 2000). PGC-1 α uravnava tudi determinacijo tipa mišičnih vlaken (Lin in sod., 2002) in glukoneogenezo (tj. encimsko sintezo glukoze), ki poteka v jetrih in je pomembna komponenta v patogenezi diabetesa tipa 2 (Herzig in sod., 2001).

Koaktivator PGC-1 α poveča učinkovitost aktivacije transkripcije s PPAR γ . Veže se na PPAR γ in številne druge jedrne receptorje in ima pomembno vlogo pri zbiranju drugih koaktivatorjev in njihovi vezavi na PPAR γ . PGC-1 α je namreč istočasno v interakciji s številnimi transkripcijskimi faktorji, zbranimi na promotorju določenega gena, ki kumulativno učinkujejo na transkripcijsko aktivnost gena. Vezava koaktivatorja povzroči alosterično spremembo v transkripcijskem faktorju, ki temu omogoča vezavo na številna različna vezna mesta na DNA. Z vezavo na heterodimer PPAR γ /RXR pa PGC-1 α ovira tudi vezavo korepresorjev in na ta način aktivira transkripcijo ciljnih genov (Puigserver in sod., 1998).

Transkripcijski koaktivatorji niso stalno aktivni proteini, ki jih je treba le primerno 'namestiti' na genomsko DNA, da začnejo aktivirati gene. Raziskave Puigserverja in sodelavcev (1999) kažejo, da vezava transkripcijskih faktorjev aktivira PGC-1 α . Neaktivno stanje koaktivatorja vzdržuje represor, medtem ko fosforilacija PGC-1 α z MAPK (angl. *mitogen-activated protein kinase*) sprosti represor in s tem poveča aktivnost PGC-1 α (Knutti in sod., 2001). Znano je, da koaktivator PGC-1 α obstaja v treh stanjih, ki se razlikujejo po transkripcijski aktivnosti. PGC-1 α , ki ni vezan na noben transkripcijski faktor, ima šibko transkripcijsko aktivnost in minimalno sposobnost vezave kompleksa SRC-1 in CBP/p300. Z vezavo na transkripcijski faktor se PGC-1 α aktivira in konformacijsko spremeni, kar omogoči vezavo drugih kofaktorjev, ki aktivirajo transkripcijo tega lokusa (Puigserver in sod., 1999). Transkripcijski faktor nato zbere koaktivatorski kompleks, ki se delno veže tudi na PGC-1 α , in vzdržuje kromatin v 'odprti'

konfiguraciji. Transkripcijski faktorji aktivirajo PGC-1 α tudi tako, da odmaknejo represorje, ki vzdržujejo neaktivno stanje PGC-1 α (Knutti in sod., 2001). Model tri-stopenjske aktivacije PGC-1 α je prikazan na sliki 2.



Slika 2. Model tri-stopenjske aktivacije PGC-1 α (prirejeno po Puigserver in sod., 1999).
Figure 2. PGC-1 α is present in three different states (adapted from Puigserver *et al.*, 1999).

Uravnavanje aktivnosti PGC-1 α poteka na več ravneh. S podhladitvijo organizma, stradanjem in fizično aktivnostjo se sinteza PGC-1 α poveča, medtem ko je za vzdrževanje bazalne ravni PGC-1 α potreben leptin (Kakuma in sod., 2000). Nadalje se raven PGC-1 α uravnava s specifičnim izražanjem v tkivih, ki imajo velike zahteve po energiji (kot npr. rjavo maščevje, srce, ledvica, možgani) ali pomembno vlogo v adaptivni termogenezi (Wu in sod., 1999; Larrouy in sod., 1999; Esterbauer in sod., 1999).

PGC-1 α so prvotno izolirali iz knjižnice cDNA rjavega maščevja miške (Puigserver in sod., 1998). V začetku so menili, da izolirani protein nima bližnjih homologov, saj s pregledovanjem podatkovnih zbirk niso našli strukturno sorodnih proteinov. Pred kratkim pa so iz knjižnice cDNA rjavega maščevja miši klonirali nov koaktivator, ki je homologen PGC-1 α , in ga poimenovali PGC-1 β (Lin in sod., 2002). PGC-1 α in PGC-1 β se izražata v istih tkivih, predvsem v rjavem maščevju in v srcu, vendar uravnavanje njunih mRNA med izpostavljenostjo mrazu in med diferenciacijo rjavih maščobnih celic poteka različno. Od do sedaj znanih koaktivatorjev se PGC-1 α razlikuje tudi po tem, da je njegova sinteza tkivno-specifična in odvisna od fiziološkega stanja živali. Dokazano je, da izpostavitve mrazu in delovanje β -adrenergičnih agonistov inducira izražanje PGC-1 α (Puigserver in sod., 1998).

Poleg PGC-1 α miši so bili izolirani in karakterizirani tudi PGC-1 α človeka (Esterbauer in sod., 1999; Larrouy in sod., 1999), podgane (Goto in sod., 2000) in prašiča (Milošević Berlič, 2002; Milošević Berlič in sod., v tisku). Gen PGC-1 α obsega ~67 kb v genomu človeka. Pri vseh omenjenih vrstah je sestavljen iz 13 eksonov, ki kodirajo 91-kDa protein, katerega aminokislinsko zaporedje je 95-odstotno identično s prašičjim in 94-odstotno identično z mišjim ortologom. Visok odstotek identičnosti aminokislinskih zaporedij PGC-1 α med različnimi živalskimi vrstami kaže na evlucijski pomen tega gena. Tudi primerjava kodogenega zaporedja prašičjega PGC-1 α s homolognimi regijami pri drugih vrstah (slika 3) kaže na visoko evlucijsko ohranjenost domen, ki predstavljajo potencialna vezna mesta za transkripcijske faktorje. Med njimi sta pomembni predvsem dve: domena, ki veže jedrne receptorje in domena, ki je v interakciji s PPAR γ .

Prisotnost številnih domen na PGC-1 α , ki omogočajo vezavo različnih proteinov, ki se vežejo na DNA, odpira možnosti za usmerjanje delovanja PGC-1 α na promotorje izbranih tarčnih genov in za razvoj zdravih učinkovin, ki bi selektivno delovale na posamezne skupine tarčnih genov.

Adaptivna termogeneza

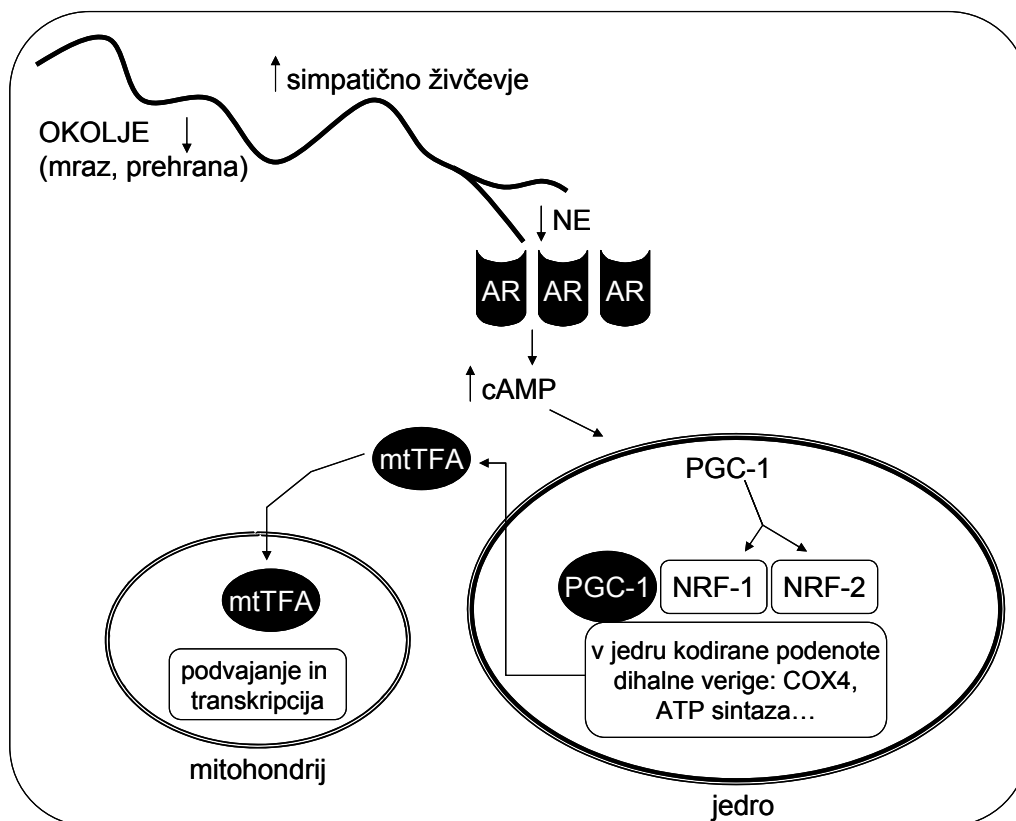
Debelost je kronična presnovna bolezen, ki je posledica porušenega ravnotežja med vnosom in porabo energije. Energija se v organizmu porablja na različne načine, med drugim z bazalnim metabolizmom, s fizično aktivnostjo in z adaptivno oz. netresavo termogenezo.

Adaptivna termogeneza je fiziološki proces, kjer se energija sprošča v obliki toplote. Porabo energije sprožijo spremenjene razmere v okolju, predvsem stres zaradi izpostavitve mrazu in prekomerno hranjenje (t.i. z dieto sprožena termogeneza). S podhladitvijo organizma se zaradi hipertrofije rjavega maščobnega tkiva, biogeneze mitohondrijev in povečane sinteze in aktivacije razklopnega proteina UCP-1 (angl. *uncoupling protein-1*) poveča oddajanje energije v obliki toplote (Puigserver in sod., 1998). Do energetskih izgub pride zaradi razklopa sinteze ATP in zgorevanja kisika ter uhajanja protonov skozi notranjo membrano mitohondrijev. Zaradi prekinitve vezave fosfata v oksidativni fosforilaciji teče dihalna veriga v prazno in prosta energija reakcije se sprosti v obliki toplote.

Proces adaptivne termogeneze uravnavajo možgani (slika 4), ki zaznajo podhladitev organizma in sprožijo aktivacijo simpatičnega živčevja, sproščanje norepinefrina in posledično aktivacijo β -adrenergičnih receptorjev na površini celic. V celicah rjavega maščevja se poveča koncentracija cAMP, sekundarnega prenašalca, ki aktivira lipolizo (tj. razgradnjo lipidov) in stimulira aktivacijo transkripcije *UCP-1*, hipertrofijo rjavega maščobnega tkiva in biogenezo mitohondrijev (Lowell in Spiegelman, 2000). Hkrati se poveča tudi koncentracija termogenega koaktivatorja PGC-1 α , ki uravnava biogenezo mitohondrijev. PGC-1 α prek indukcije proteina NRF-1 (angl. *nuclear respiratory factor-1*) aktivira sintezo encimov dihalne verige in mitohondrijskega transkripcijskega faktorja A (mtTFA), ki pa je ključen za aktivacijo transkripcije in podvajanje mtDNA (Puigserver in sod., 1998; Wu in sod., 1999). Zaradi možne vloge adaptivne termogeneze tako v patogenezi kot pri zdravljenju debelosti pri človeku, je zanimanje za ta proces precejšnje.

Vlogo PGC-1 α v adaptivni termogenezi kaže predvsem njegova povezava s ključnimi tkivi in hormoni, vključenimi v ta tkivno-specifični proces. Splošno sprejeto mnenje je, da imata pomembno vlogo predvsem skeletno mišičje in rjavo maščevje – s podhladitvijo organizma se namreč v skeletnem mišičju in rjavem maščevju, ne pa tudi v drugih tkivih, sproži izražanje *PGC-1 α* (Puigserver in sod., 1998). Pri majhnih sesalcih, kot so npr. miši in podgane, poteka adaptivna termogeneza v glavnem v mitohondrijih rjavih maščobnih celic in skeletnega mišičja, medtem ko ima pri večjih živalih in človeku osnovno vlogo v termogenezi skeletno mišičje (Wu in sod., 1999). Znanih je veliko genov, ki so neposredno udeleženi v adaptivni termogenezi, transkripcijsko uravnavanje tega procesa pa do danes še ni docela znano. Obetaven pristop k rešitvi tega vprašanja je preučevanje diferenciacije in izražanja genov v celicah rjavega maščevja.

Vlogo rjavega maščevja v obrambi organizma pred debelostjo so razjasnili z odstranitvijo tega tkiva pri miškah; miške brez rjavega maščevja so zelo debele in slabo odzivne na inzulin (angl. *insulin resistance*), poleg tega pa so zanje značilne tudi druge bolezenske spremembe, povezane z debelostjo (Lowell in sod., 1993; Lowell, 1998). Analiza vloge rjavega maščevja pri človeku in drugih velikih sesalcih je bolj kompleksna. Odrasli ljudje namreč nimajo definiranih področij rjavega maščobnega tkiva, pač pa so celice rjavega maščevja razpršene med celicami belega maščobnega tkiva (Krief in sod., 1993).



Slika 4. Uravnavanje biogeneze mitohondrijev s termogenim koaktivatorjem PGC-1 α (prirejeno po Wu in sod., 1999).

Figure 4. Pathway of mitochondrial biogenesis through PGC-1 α (adapted from Wu *et al.*, 1999).

ZAKLJUČEK

V zadnjih letih smo bili priča izjemnemu porastu znanja o molekularnih mehanizmih uravnavanja adipogeneze. Ta odkritja so vodila do novih vprašanj – zanimiva je predvsem vloga maščob v hrani, ki lahko služijo kot ligandi za PPAR γ . Na osnovi novejših rezultatov je realno pričakovanje, da bomo na to in podobna vprašanja kmalu znali odgovoriti.

Molekularni mehanizmi, povezani s porabo energije in termogenezo pri prašiču, so podobni molekularnim mehanizmom pri človeku. Poznavanje teh presnovnih poti nudi obetavne možnosti za zdravljenje debelosti in diabetesa.

Genetske raziskave adipogeneze so nujne za identifikacijo kombinacij genov in mutacij v kodogenih regijah teh genov, ki povečajo dovzetnost za debelost. Razumevanje procesa diferenciacije adipocitov nam omogoča razvoj strategij za spreminjanje aktivnosti transkripcijskih faktorjev s farmacevtskimi učinkovinami, zato so proteini iz družine PPAR vse bolj zanimivi za farmacevtsko industrijo. Glavni razlog je njihova vloga v presnovi maščob, in potencialna vloga v procesih, ki vodijo do ateroskleroze, vnetij, raka in motenj plodnosti. Sintetični ligandi za PPAR, vključno s fibrati in tiazolidindioni (TZD), so se pokazali kot zelo učinkoviti za zdravljenje diabetesa.

Farmakološki pristop k povečevanju količine ali aktivnosti PGC-1 α bi bil sprejemljiv, če ne bi imel neželenih učinkov. Za razvoj uspešnih aplikacij je potrebno še podrobnejše znanje o delovanju PGC-1 α , ki v glavnem temelji na fizioloških raziskavah v celičnih kulturah. Novejše raziskave na transgenih miših so pokazale, da ima lahko čezmerno izražanje PGC-1 α neželene učinke (pri transgenih miših so namreč opazili kardiomiopatije) in da je ustrezno uravnavanje

izražanja PGC-1 α ključno za nemoten razvoj. Nadaljnji študij živalskih modelov z izničnim genom za PGC-1 α ali s specifičnimi aleli PGC-1 α bo omogočil oceno pozitivnih in negativnih učinkov, ki jih povzroča spremenjena raven izražanja PGC-1 α .

CONCLUSION

As outlined above, recent years have witnessed a phenomenal increase in knowledge regarding the molecular control of adipogenesis. These findings now lead to next level of questions. Of particular interest is the role of dietary fats to serve as precursors to PPAR γ ligands. Based upon recent progress, it is likely that answers to these questions will be forthcoming.

Molecular mechanisms related to energy expenditure and thermogenesis in pigs are similar with the molecular mechanisms in humans. These pathways can be used as novel therapeutic approaches for the treatment of obesity and diabetes.

Genetic approaches are critical in identifying the combination of genes and mutations that predispose to obesity. Knowledge of adipocyte differentiation process (adipogenesis) permits us to devise strategies to modulate the activity of transcription factors by drugs. PPARs are now attracting the attention of pharmaceutical industry. They play a key role in lipid metabolism and have potential roles in atherosclerosis, inflammation, cancer and infertility. Synthetic PPAR ligands including fibrates and thiazolidinediones (TZDs), have proven effective in the treatment of diabetes.

Pharmacological strategies to increase the amount or activity of PGC-1 α could also be useful, if this can be done without deleterious effect. Of course, the likelihood of success depends upon better understanding of the function of PGC-1 α . Physiological roles of PGC-1 α in energy homeostasis have been tested for the most part in cell culture systems. Recent studies with transgenic mice have shown, that too much PGC-1 α can be undesirable (transgenic mice develop cardiomyopathy) and that appropriate regulation of this coactivator is important. Future studies in animal models with loss of PGC-1 α function and/or specific alleles of PGC-1 α will be necessary to elucidate beneficial and adverse effects of PGC-1 α .

VIRI

- Esterbauer, H./ Oberkofler, H./ Krempler, F./ Patsch, W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, 62(1999), 98–102.
- Fajas, L./ Fruchart, J.C./ Auwerx, J. Transcriptional control of the adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 10(1998), 165–173.
- Goto, M./ Terada, S./ Kato, M./ Katoh, M./ Yokozeki, T./ Tabata, I./ Shimokawa, T. cDNA cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle swimming-exercised rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274(2000), 350–354.
- Herzig, S./ Long, F./ Jhala, U.S./ Hedrick, S./ Quinn, R./ Bauer, A./ Rudolph, D./ Schutz, G./ Yoon, C./ Puigserver, P./ Spiegelman, B./ Montminy, M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, 413(2001), 179–183.
- Houseknecht, K.L./ Bidwell, C.A./ Portocarrero, C.P./ Spurlock, M.E. Expression and cDNA cloning of porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *Gene*, 225(1998), 89–96.
- Kakuma, T./ Wang, Z.W./ Pan, W./ Unger, R.H./ Zhou, Y.T. Role of leptin in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 expression. *Endocrinol.*, 141(2000)12, 4576–4582.
- Knutti, D./ Kralli, A. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol. Metabol.*, 12, 8(2001), 360–365.
- Knutti, D./ Kressler, D./ Kralli, A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(2001)17, 9713–9718.

- Krief, S./ Lonngqvist, F./ Raimbault, S./ Baude, B./ Van Spronsen, A./ Arner, P./ Strosberg, A.D./ Ricquier, D./ Emorine, L.J. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.*, 91(1993), 344–349.
- Larrouy, D./ Vidal, H./ Andreelli, F./ Laville, M./ Langin, D. Cloning and mRNA tissue distribution of human PPAR-gamma coactivator-1. *Int. J. Obesity*, 23(1999), 1327–1332.
- Lehman, J.J./ Barger, P.M./ Kovacs, A./ Saffitz, J.E./ Medeiros, D.M./ Kelly, D.P. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.*, 106(2000)7, 847–856.
- Lin, J./ Puigserver, P./ Donovan, J./ Tarr, P./ Spiegelman, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β (PGC-1 β), a novel PGC-1-related transcriptional coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.*, 277(2002)3, 1645–1648.
- Lowell, B.B. Adaptive thermogenesis. Turning on the heat. *Curr. Biol.*, 8(1998)15, R517–R520.
- Lowell, B.B./ Spiegelman, B.M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404(2000), 652–660.
- Lowell, B.B./ Susulic, S./ Hamann, A./ Lawitts, J.A./ Himms-Hagen, J./ Boyer, B.B./ Kozak, L.P./ Flier, J.S. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, 366(1993), 740–742.
- Milošević Berlič, T./ Kokalj-Vokac, N./ Anderson, S.I./ Archibald, A.L./ Dovc, P. Porcine Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator-1 (*PPARGC1*) gene: cDNA sequence, chromosomal localization and polymorphisms. *Anim. Genet.* In press.
- Milošević Berlič, T. Molekulski mehanizmi uravnavanja tvorbe maščobnega tkiva pri prašiču (*Sus scrofa*). Doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinani podiplomski študij biotehnologije, 2002.
- Puigserver, P./ Adelmant, G./ Wu, Z./ Fan, M./ Xu, J./ O'Malley, B./ Spiegelman, B.M. Activation of PPAR-gamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, 286(1999), 1368–1371.
- Puigserver, P./ Wu, Z./ Park, C.W./ Graves, R./ Wright, M./ Spiegelman, B.M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(1998), 829–839.
- Rankinen, T./ Perusse, L./ Weisnagel, S.J./ Snyder, E.E./ Chagnon, Y.C./ Bouchard, C. The Human Obesity Gene Map: The 2001 Update. *Obesity Research*, 10(2002)3, 196–225.
- Rosen, E.D./ Walkey, C.J./ Puigserver, P./ Spiegelman, B.M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.*, 14(2000), 1293–1307.
- Rosenfeld, M.G./ Glass, C.K. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.*, 276(2001)40, 36965–36868.
- Spiegelman, B.M./ Puigserver, P./ Wu, Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPAR γ and PGC-1. *Int. J. Obesity*, 24(2000)4, S8–S10.
- Sundvold, H./ Grindflek, E./ Lien S. Tissue distribution of porcine proxisome proliferator-activatd receptor α : detection of alternatively spliced mRNA. *Gene*, 273(2001), 105–113.
- Tontonoz, P./ Hu, E./ Spiegelman, B.M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79(1994), 1147–1156.
- Weller, J.I./ Kashi, Y./ Soller, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 73(1990)9, 2525–2537.
- Wu, Z./ Puigserver, P./ Andersson, U./ Zhang, C./ Adelmant, G./ Mootha, V./ Troy, A./ Cinti, S./ Lowell, B.B./ Scarpulla, R.C./ Spiegelman, B.M. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1999), 115–124.

MILK PRODUCTION IN THE POST-GENOMIC ERA

Polona FRAJMAN^{a)} and Peter DOVČ^{b)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Zootechnical Dept., Groblje3, SI-1230 Domžale, Slovenia.

^{b)} Same address, Prof., Ph.D.

Received November 03, 2004, accepted December 10, 2004.

Delo je prispelo 03. novembra 2004, sprejeto 10. decembra 2004.

ABSTRACT

Milk plays an important role in human nutrition. Nowadays, dairy industry is oriented in the production of increasing number of different milk products and technological properties of milk are gaining more and more attention. Introduction of recombinant DNA technology in the early 1970 and development of molecular genetics enabled studies of the organization of milk protein genes and mechanisms involved in their expression. Genome research in farm animals was oriented in production of low-density genetic maps with the emphasis on the genetic variation in some functionally important regions. In the public databases, 1598 cattle genes have already been mapped and partially sequenced by the end of 2003. In addition, numerous quantitative trait loci (QTL) were mapped for economically important traits. Typical examples include milk yield and milk composition in dairy cattle. The availability of genomic DNA sequences for a number of potential candidate genes with an impact on production traits allowed construction of cattle genome microarrays. Functional studies of milk protein genes revealed the impact of different genetic variants on technological properties of milk. Genomics approach thus offers an entirely new way to identify complex interactions among milk protein genes other genes involved in milk production and elucidation of the complex regulatory network allowing efficient milk production in the mammary gland.

Key words: milk production / technological properties / lactoproteins / molecular genetics / quantitative trait loci / QTL / genomics / micro array

PROIZVODNJA MLEKA V POST-GENOMSKI DOBI

IZVLEČEK

Sodobna mlekarstva industrija se zaradi pomembnosti mleka v človeški prehrani usmerja v proizvodnjo vse večjega števila različnih mlečnih proizvodov, pri čemer v ospredje stopajo tehnološke lastnosti mleka. Uvajanje tehnik rekombinantne DNA v zgodnjih sedemdesetih in razvoj molekularno-genetskih tehnik sta omogočila raziskovanje organizacije mlečnoproteinskih genov ter mehanizmov, ki uravnavajo njihovo izražanje. Določanje nukleotidnega zaporedja celotnih genomov je postalo mogoče z razvojem zmogljivih orodij genomike. Raziskave genomov ekonomsko pomembnih domačih živali so bile usmerjene v proizvodnjo genskih kart z nizko gostoto in s poudarkom na genetskih variabilnosti funkcionalno pomembnih genov. V javno dostopnih podatkovnih zbirkah se je do konca leta 2003 nahajalo 1598 kartiranih in deloma sekvenciranih genov goveda. Kartiranih je bilo tudi mnogo kvantitativnih lokusov (QTL) za ekonomsko pomembne lastnosti, kot so npr. količina in sestava mleka pri mlečnih pasmah goveda. Dostopnost genomskih zaporedij DNA za številne kandidatne gene z vplivom na proizvodne lastnosti je omogočila konstrukcijo genomskih mikromrež goveda. Funkcionalne študije mlečnoproteinskih genov so pokazale, da genetske variante vplivajo na tehnološke lastnosti mleka. Genomski pristop ponuja povsem novo pot pri proučevanju zapletenih interakcij

med mlečnoproteinskimi geni drugimi geni, ki so vključeni v kompleksno regulacijo učinkovite sinteze mleka v mlečni žlezi.

Ključne besede: mleko / priraja / tehnološke lastnosti / laktoproteini / molekularna genetika / kvantitativni lokusi / QTL / genomika / mikromreže

INTRODUCTION

Milk is a major source of energy, proteins, minerals and vitamins for young mammals during their first period of life. Milk of some farm animals plays an important role in human nutrition and milk production is one of the most important branches of animal production. Dairy industry in developed countries is nowadays oriented in the production of increasing number of different milk products therefore technological properties of milk are gaining more and more attention. The increasing cheese production, for example, prefers milk with higher content of proteins with favorable cheese making properties (Lodes *et al.*, 1996; Buchberger and Dovč, 2000). Study of milk proteins started with the determination of primary structure of four major caseins (α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN and κ -CN) and two whey proteins, α -lactalbumin and β -lactoglobulin (α -LA and β -LG) (Aschaffenburg and Drewry, 1957, Grosclaude *et al.*, 1973, Godovac-Zimmermann *et al.*, 1985). Polymorphisms in amino acid sequence of α_{S1} -CN, β -CN and κ -CN allowed classical linkage studies, revealing clustering of casein loci on bovine chromosome 6 (Grosclaude *et al.*, 1973, Gupta *et al.*, 1982). In this period, the early studies on the impact of casein variants on technological properties of milk were published (Mariani *et al.*, 1976). Introduction of recombinant DNA technology in the early 1970 allowed determining of cDNA sequences for all four major caseins and two whey proteins (Stewart *et al.*, 1984; Gorodetsky *et al.*, 1988; Alexander *et al.*, 1988). Based on DNA polymorphisms, rapid genotyping of casein loci has been introduced. Further development of molecular genetics enabled study of the exon-intron organization of casein genes as well as study of DNA sequences of non-coding regions of the casein gene cluster (Ferretti *et al.*, 1990, Threadgill and Womack, 1990). These studies revealed an insight into molecular mechanisms involved into the regulation of casein gene expression (Rijnkels *et al.*, 1997). Application of genomic tools combined with advanced statistical methods introduced the concept of QTL (quantitative trait loci) affecting complex milk production traits (Bovenhuis and Spelman, 2000). It became clear, that a huge number of genes are involved in this complex regulatory pathway, which is also influenced by numerous environmental factors (Schrooten *et al.*, 2004). New genomic tools allow us to analyze expression of thousands of genes in one experiment and to compare gene expression profiles among different stages of lactation and different environmental treatments. Gradually growing understanding of complex genetic machinery regulating the quantity as well as quality of produced milk, represents a basis for efficient marker assisted selection in dairy cattle.

THE COMPLEXITY OF ANIMAL GENOMES

Development of recombinant DNA technology allowed researchers to move from analysis of cDNA sequences to the studies revealing genomic organization of larger chromosomal regions and finally to decipher the whole genome sequence of an organism. The most appealing goal was certainly sequencing of a human genome, one of the most complex endeavors of the modern science, which was accomplished in 2001 (Bork and Copley, 2001). However, on the way to the sequence of human genome a number of less complex genomes, mainly from model organisms were sequenced, including microorganisms as *E.coli*, and *S. cerevisiae*, fruit fly *D. melanogaster* worm *C. elegans* and zebra fish. After the human genome, comprising 3.6 billion nucleotides, the mouse and rat genomes which are of similar complexity were released in 2002 (Anon. 2002)

and 2003 (Bromberg *et al.*, 2003). Just recently, the chicken genome sequence was completed, representing a vertebrate genome of a bit lower complexity, containing 1.1 billion base pairs (McPherson *et al.*, 2004). The availability of whole genome sequences for a number of more or less related species opens a whole new avenue of comparative genomic approach for the identification of gene function and regulation of complex metabolic pathways. The disappointing conclusion from the analysis of the first sequenced genomes is that from about 30.000 putative genes which were identified within the genome, to only 30–40% can be assigned a function, whereas physiological role for about 60% of the genes remains unknown.

The strategy of genome research in farm animals was a bit different from the strategy employed by the human genome project. Since the available resources in farm animal genome research are incomparable with resources mobilized within the human genome project and large of species of interest further reduces the research inputs, the strategy had to adapt to this circumstances. Therefore, considerable effort has been spent in order to produce low density genetic maps of different species, which have enabled rough localization of selected loci into syntenic groups (Gellin *et al.*, 2000). Synteny maps provided valuable information for practical animal breeding facilitating haplotype selection rather than simple selection for desired genotypes. For the practical animal breeding, the information about the genetic variation in some functionally important regions is far more important than entire nucleotide sequence from one animal. Therefore relative large population studies analyzing genetic polymorphisms within crucial genomic regions were performed.

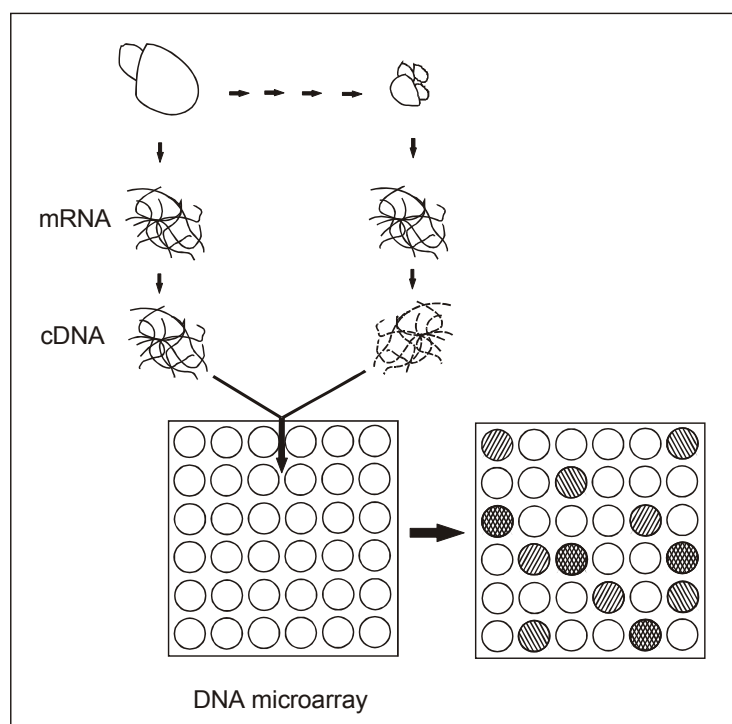


Figure 1. Development of microarrays enabled large-scale analysis of gene expression.

Slika 1. Razvoj mikromrež je omogočil sočasno analizo izražanja velikega števila genov.

GENOMIC TOOLS

DNA sequence analysis started with establishment of cDNA libraries, where relatively short DNA fragments (up to 2-3 kb) were cloned in the plasmid vectors. However, prerequisite for genomic research was the ability to handle large genomic sequences in the range of 0.1 – 1.0

Mb. The discovery of the new generation of vectors as yeast and bacterial artificial chromosomes (YAC, BAC) enabled researchers to clone large stretches of genomic DNA and to produce genomic libraries (Eggen *et al.* 2001), covering the entire genome in a reasonable number of overlapping clones. Further development and automation of DNA sequencing procedures was another important milestone, making genomic research feasible. Organization of DNA sequences in public databases, allowing searching for DNA sequences from different species and bioinformatics tools for sequence analysis made analysis of complex genomic data accessible for a wider scientific community. The number of DNA sequence entries in the public databases was growing exponentially during the last 20 years. Finally, in addition to powerful technology which allowed sequencing of entire genomes, microarray technology enabled analysis of gene expression in the whole genome in a single experiment. A new term, transcriptomics, was coined describing a high throughput analytical approach for the study of transcriptional activity of the genome. This approach can provide information about differential gene expression in different developmental and physiological stages as well as reaction to different environmental stimuli.

GENOMICS APPROACH IN FARM ANIMALS

Historically, pedigree analyses and establishing of suitable mapping populations was an important goal of animal genetic research. In farm animals creation of special mapping populations is often too costly, therefore suitable statistical models (e.g. daughter design) were developed in order to extract genetic information from already available population structure (Mosig *et al.*, 2001). An important tool in genomic research in farm animals were radiation hybrid cell panels, which allowed physical assignment of gene loci to genetic map. The fluorescent in situ hybridization was also successfully applied for physical mapping. Further development of animal gene maps was reached by the introduction of highly polymorphic genetic markers as RFLPs, microsatellites and single nucleotide polymorphisms (SNPs) for the fine mapping using reference populations. Recombination studies enabled narrowing of the mapping interval for the localization of candidate genes to the interval shorter than 1 cM, and introduction of large-capacity vectors (BAC, YAC), made physical cloning of candidate gene regions feasible. Genomic libraries containing ordered collection of large genomic fragments (mostly BAC clones) represent one of the most important genomic resources for genomic research in every species. At present BAC libraries with several fold coverage of the genome are available for all farm animal species. However, some genomic regions are still poorly covered and significant gaps are present in most of such libraries. More recently, expression sequence tag (EST) libraries from different tissues were established, serving as an excellent tool for identification of expressed genes. Information from EST libraries has been also used for assignment of gene ontology, shedding a new light into the functional organization of the genome. Since polygenic traits are of crucial importance in animal breeding, statistical methods for identification of genomic regions with significant phenotypic impact on quantitative traits have been developed. The concept of quantitative trait loci (QTL) overruled the old infinitesimal model of gene action. Using different strategies, genomic regions explaining 10–15% of the phenotypical variance were identified.

One of the most frequently used strategies based on genetic analysis of phenotypic tail of the population is presented on figure 2.

Two approaches are mainly used in mapping of production trait genes in farm animals:

1. *Candidate gene approach*: the target gene can be identified via clinical symptoms or physiological changes from human or mouse. This approach is successful for monogenic traits as some inherited disorders and some simple traits as coat color etc.

2. *Positional cloning approach*: there is no clear candidate gene evident. Linkage analysis pinpoints chromosomal region with unknown gene and subsequent fine mapping of the region can identify candidate genes by positional cloning. Using this approach the inconsistency of QTLs across breeds is a serious problem, hampering reliable localisation of the target region.

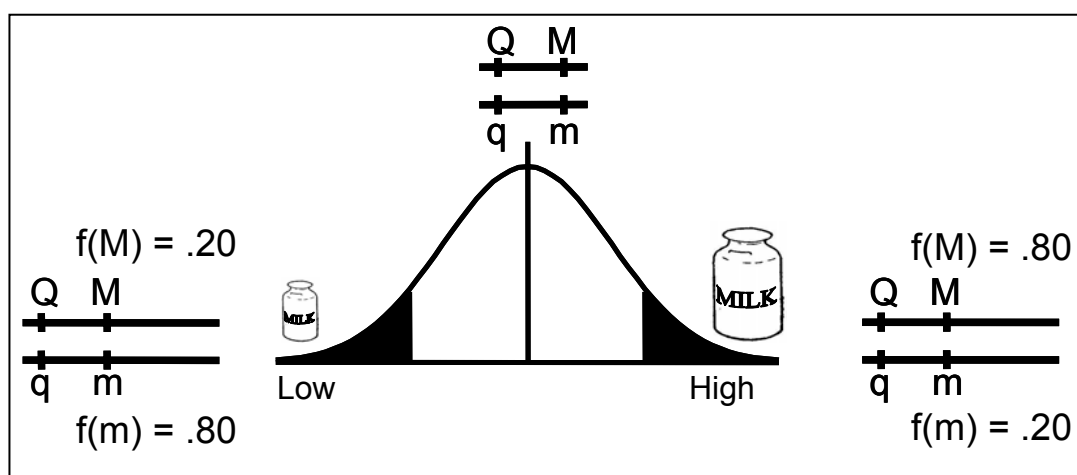


Figure 2. Association of marker gene polymorphisms and linked QTL locus with quantitative traits enables identification of genomic regions with QTL loci.

Slika 2. Asociacija polimorfizmov genskega markerja in vezanega kvantitativnega lokusa (QTL) s fenotipskimi lastnostmi, omogoča identifikacijo regij gena, kjer se nahajajo QTL.

STATE OF THE ART IN CATTLE GENOME RESEARCH

Improvement of farm animal's production traits started immediately after domestication, when people began to breed animals for a certain purpose in adapted environment. Classic selection is based on phenotypic performance which can be recorded either directly on the individual (performance test) or its relatives, mainly offspring (progeny test). However, in both cases the impact of genes affecting particular trait is blurred by a number of environmental factors. The development of recombinant DNA techniques in the last few decades enabled identification of genes that underlie genetic variation of production traits observed in livestock species. Identification of these genes is expected to contribute considerably to the development of more efficient selection procedures, which will employ genetic markers. This strategy, called marker assisted selection (MAS) will allow also better insight in the physiological background of corresponding traits (Davis and DeNise, 1998).

In cattle, several national and international projects were focused on production of molecular markers and improvement of existing genetic maps. In addition to that, interest in whole genome sequencing was growing with the improvement of technical tools for such project. At present the main initiative for whole genome sequencing is shared between research institutes at Baylor, NHGRI/NIH and A&M in Texas, as well as Canadian and New Zealand groups. The plan was to achieve 5–7 fold genome coverage using the shot-gun sequencing by the end of 2004. In the public databases 1598 cattle genes have already been mapped and partially sequenced by the end of 2003. More than 322.000 EST sequences were determined and deposited in public databases. The most comprehensive information regarding cattle genome organization is available from genome databases such as ArkDB (<http://www.thearkdb.org/browser?species=cow>) and BOVMAP. Cattle linkage maps contained in 2003 more than 2000 mapped loci, which is

comparable with about 2000 mapped loci on radiation hybrid maps. In addition, numerous QTLs were mapped for economically important traits. Typical examples include milk yield and composition in dairy cattle and growth and carcass characteristics in beef cattle. Two main strategies have been employed in order to identify genes underlying QTLs:

- experimental crosses between two strains, breeds or subspecies were performed to identify the genes contributing to the differences observed for a trait of interest between these two strains (breeds, subspecies).
- mapping of QTLs that are underlying the genetic variance, observed for a trait of interest in a commercial population, was carried out with a help of the outbred pedigrees.

Mapping of QTL is in general not very straightforward procedure because of the large genome regions occupied by them. QTLs normally comprise about 20 to 40 millions of base pairs containing several hundreds of genes, representing 1/50 to 1/100 of the whole genome. In addition, quantitative traits are affected by different breeding methods, interactions between environment and genotype, epistatic effects and by genetic imprinting. The precision of QTL mapping is therefore significantly reduced compared with a single gene locus. Another problem, associated with QTL identification is, that even they are determined in one population (breed) their consistency between populations is often low. Projects attempting to map genes affecting milk production traits in dairy cattle populations demonstrate different experimental designs. The Bov MAS project is one of the largest initiatives dealing with QTLs affecting milk production. The aim of this EU funded project is mapping of genes, which have an impact on milk production in order to provide tools for successful marker assisted selection.

Conservation of genome organization between cattle, sheep and goat was already demonstrated comparing mapping data from these species. The most advanced genome map in cattle can therefore serve as a model for sheep, goat and even deer genome mapping.

The availability genomic DNA sequences for a number of potential candidate genes with an impact on different production traits allowed construction of cattle genome micro arrays, which can be applied for large scale expression profiling in different physiological states, during infection and at different production levels. Complex expression profiles can help by identification of co-expressed genes and genes being involved in the same physiological pathways.

FUNCTIONAL STUDIES IN MILK PROTEIN GENES

Linkage analysis revealed clustering of all four casein loci in the relative gene order $\alpha 1$ -CN- β -CN- $\alpha 2$ -CN- κ -CN (Grosclaude *et al.*, 1973). In the 1980s as the cDNA- and genomic sequences for major bovine lactoproteins became available (Stewart *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1987; Vilotte *et al.*, 1991; Gorodetsky *et al.*, 1988; Alexander *et al.*, 1988; Bonsing and Mackinlay, 1987) the new era of casein research began. Exon intron organization and nucleotide sequences of regulatory regions were determined. In situ hybridisation studies revealed localisation of the casein gene cluster on the bovine chromosome 6 (Gupta *et al.*, 1982). However, the molecular proof of linkage and gene order was provided later using the long-range restriction analysis of the casein gene cluster DNA (Ferretti *et al.*, 1990; Threadgill and Womack, 1990), which occupies about 250 kb of genomic DNA. The transcriptional orientation of the β -CN gene is opposite to the orientation of the other three genes in the cluster (Rijnkels *et al.*, 1997). From the evolutionary point of view the three related calcium sensitive casein genes ($\alpha 1$ -CN- β -CN- $\alpha 2$ -CN) arose from the common ancestor through intra- and intergenic duplication and exon shuffling. They also share regulatory motifs in the proximal 5' flanking region (Groenen and Van der Poel, 1994). However, the kappa casein gene (κ -CN), the last member of the casein gene cluster is not evolutionary related to the other casein genes, although

it follows the similar expression pattern and its protein product is essential for micelle formation and stability (Alexander *et al.*, 1988).

All casein genes are present in numerous genetic variants (β -CN: 7, κ -CN: 6, α_{s1} -CN: 6, α_{s2} -CN: 4). Frequencies of casein genetic variants are breed-specific and, with exception of α_{s2} -CN, have an impact on milk composition and technological properties of milk. Their expression is hormonally regulated by lactogenic hormones prolactin, glucocorticoid and insulin. They act either directly by binding to DNA (like glucocorticoid hormone) or via different signal transduction pathways and transcription factors (TF) as activators of lactoprotein gene transcription by binding of TF on their binding sites in promoter regions of lactoprotein genes. Prolactin activates STAT5, which is a most important activator of lactoprotein gene expression (Doppler *et al.*, 2001). Considering consensus sequences of different TFs, their potential binding sites within the promoter regions could be identified and then further analyzed for their functionality using functional studies on cell cultures or transgenic animals.

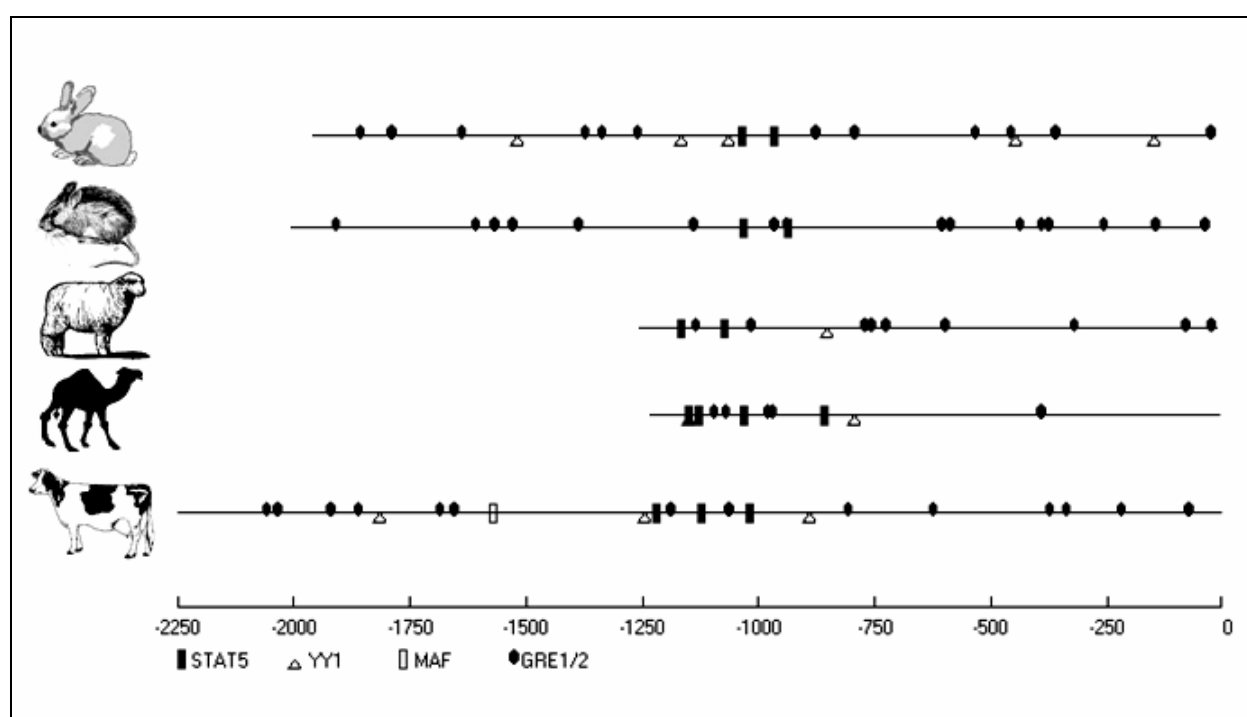


Figure 3. Diagrammatic representation of putative transcription factor binding sites in 2250 bp of the bovine κ -casein promoter compared to distribution of the putative TF binding sites in the κ -casein gene promoters of some mammalian species. Putative transcription factor binding sites were identified using consensus transcription factor binding sequences.

Slika 3. Shematska ponazoritev domnevnih vezavnih mest transkripcijskih faktorjev (TF) v 2250 bp κ -kazeinskem promotorju goveda, v primerjavi z razporeditvijo domnevnih vezavnih mest TF v κ -kazeinskih promotorjih pri nekaterih drugih živalskih vrstah. Ugotavljanje domnevnih vezavnih mest je potekalo s pomočjo konsenzus zaporedij transkripcijskih faktorjev.

In the case of the bovine κ -CN promoter, potential TF binding sites were determined on the basis of sequence similarity with consensus sequences (Adachi *et al.*; 1996; Debeljak *et al.*, 2000.). Four potential STAT5 binding sites were selected for further functional analysis using EMSA. Two promoter fragments of different length (925bp and 2064bp) were used for

luciferase reporter gene expression study in bovine mammary epithelial cell line BME-UV1. The expression experiment revealed important positive regulatory elements in the distal part of the bovine κ -CN promoter (Debeljak *et al.*, 2004, in press).

The 3' region of the mRNA can also have an impact on gene expression level, mostly by its effect on the length of polyA tail. It has been shown, that the length of polyA tail in the β -CN is affected by lactogenic hormones prolactin and glucocorticoid and is therefore changing during the different stages of lactation. In the fourth and fifth exon of the κ -CN gene, several polymorphisms were found, which could potentially influence the length of the polyA tail in different genetic variants of κ -casein (Debeljak, 2000).

Studies on the bovine β -lactoglobulin gene showed the importance of a transcription factor AP-2 binding site for a high level of β -lactoglobulin expression (Lum *et al.*, 1997). A single point mutation in the promoter region, binding AP-2 caused significant reduction of β -lactoglobulin/luciferase reporter gene in the HC11 cell line (Folch *et al.*, 1999). Recently this polymorphism has been confirmed as a first known genetic polymorphism in lactoprotein genes with clear quantitative effect (Kuss *et al.*, 2003).

DESIGNER MILK

The tissue specific expression of milk proteins offers a safe and renewable source for production of recombinant human proteins, useful for pharmaceutical industry, in the milk of transgenic farm animals. The capacity of the mammary gland to produce relatively high amounts of protein in milk and availability of efficient protein purification methods make production of biologically active proteins for pharmaceutical use also economically attractive. The human transferin from transgenic cattle, anti-thrombin III from transgenic goats, α 1-antitripsin from transgenic sheep and α -glucosidase from transgenic rabbits are examples of successful introduction and expression of human genes in the farm animal mammary gland (Rudolph *et al.*, 1999). More than 20 recombinant proteins have been produced using transgenic technology in five species (cow, goat, pig, rabbit and sheep). The efficacy of recombinant protein production in the mammary gland of transgenic animals is best illustrated by the fact that only four transgenic pigs producing factor IX could produce 2 kg of this protein which represent yearly demand for this protein worldwide.

Another attractive field of research represent manipulation of milk composition in order to improve technological and dietary properties of milk. An example for a model for production of milk with reduced level of lactose are transgenic animals, which produce intestinal lactase - phlorizin hydrolase in the mammary gland, producing milk, suitable for people with pronounced lactose intolerance (Jost *et al.*, 1999). Insertion of additional copies of lactoprotein genes under transcriptional control of different mammary gland specific promoters could alter protein concentration and influence micelle size and stability (Baranyi *et al.*, 2004). Such modified milk could have interesting cheese making properties. The high proportion of saturated fatty acids in bovine milk fat raised nutritional concerns related with development of arteriosclerosis. Selection of dairy cattle for more effective desaturases could increase the proportion of unsaturated fatty acids in bovine milk. In addition, increased activity of stearyl-CoA-desaturase could lead to higher proportion of conjugated linoleic acid (CLA) in milk, which would considerably improve dietary value of bovine milk fat (Bauman and Perfield, 2002). The content of CLA in milk is mostly influenced by nutrition and also by physiological factors such as breed, fertility, stage of lactation, level of the CLA desaturase. With changing of nutrition the level of CLA in milk could be up to five folds higher. In cattle, breed differences in CLA content in milk were observed, influenced by index of CLA-desaturase. Differences in CLA content in the milk fat could be up to three fold among individuals with the same nutrition with no remarkable

influence of the breed, parity or stage of lactation. Physiological and genetic background of individual differences in CLA content in milk still remains to be defined.

MASTITIS

Mastitis is most prevalent disease in dairy cattle, affecting around 40% of dairy cow population. Mastitis is a disease with low heritability and therefore selection attempts has little success. In sheep, but not in cows, genetic correlation between somatic cell count in milk and quantity of milk, was observed (Barillet *et al.*, 2001). Clinical forms of mastitis in sheep are rare but it seems that it would be possible to lower even subclinical forms of mastitis with selection for mastitis resistance using somatic cell count.

Recent research is oriented in identification of relevant genes and mechanisms controlling the pathogen specific immune defence in the mammary gland of ruminant dairy species. State-of-the-art functional genomics techniques are used to analyse specimens from udders of cows and goats, which have been experimentally infected with different pathogens. Genes with relevance for pathogen-specific immune defence can be characterized by comparative transcriptome analyses. Hierarchical clustering of the data is the next step in identification of relevant genes involved in immune response. Characterization of their genetic variants in relationship to relevant QTL will help dairy cattle breeders to improve dairy cows' genetics for mastitis resistance.

CONCLUSION

Genomics approach to identification of important genes with an impact on the milk quantity, quality and composition offers an entirely new way to identify complex interactions among genes and their physiological role for milk production. For the first time we can analyse complex relationship among genes within the entire genome and perform complex expression experiments, which were not feasible without high throughput genomic tools. As a consequence, the faster and more efficient selection for higher productivity, and even more interesting, for milk characteristics, influencing technological properties of milk or having better impact on human health will be possible. For example, selection on certain favorable haplotypes (κ -CN B and β -lactoglobulin B) will contribute to better technological properties of milk, especially cheese making properties. In the future, more robust QTLs have to be defined and search for appropriate markers for MAS needs to be continued. Functional polymorphisms within genes influencing production traits have to be evaluated *in vitro* and *in vivo* in order to enable selection for alleles with positive effects. And finally, gene expression patterns, revealed in micro array experiments will allow identification of new candidate genes involved in the expression of production traits.

REFERENCES

- Adachi, T./ Ahn, J. Y./ Yamamoto, K./ Aoki, N./ Nakamura, R./ Matsuda, T. Characterisation of the bovine κ -casein gene promoter. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(1996), 1937–1940.
- Alexander, L.J./ Stewart, A.F./ Mackinlay, A.G./ Kapelinskaya, T.V./ Tkach, T.M./ Gorodetsky, S.I. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *Eur J Biochem.*, 178(1988)2, 395–401.
- [Anon.] The mouse genome. *Nature*, 420(2002)6915, 520–562.
- Aschaffenburg, R./ Drewry, J. Genetics of the beta-lactoglobulins of cow's milk. *Nature*. 180(1957)4582, 376–378.
- Baranyi, M./ Gocza, E./ Lemos, A.P.C./ Hiripi, L./ Carstea, B.V./ Whitelaw, B./ Boesze, Zs. Production of kappa-casein knock-out mouse chimera. Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 2004.
- Barillet, F./ Rupp, R./ Mignon-Grasteau, S./ Astruc, J.M./ Jacquin, M. Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. *Genet Sel Evol.*, 33(2001)4, 397–415.

- Bauman, D.E./ Perfield, J.W. CLA – the milk fat wonder. *Pro-Dairy, Northeast DairyBusiness*, 4(2002)6, 21.
- Bonsing, J./ Mackinlay, A.G. Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. *J Dairy Res.*, 54(1987)3, 447–61.
- Bork, P./ Copley, R. The draft sequences. Filling in the gaps. *Nature*, 409(2001)6822, 818–820.
- Bovenhuis, H./ Spelman, R.J. Selective genotyping to detect quantitative trait loci for multiple traits in outbred populations. *J Dairy Sci.*, 83(2000)1, 173–180.
- Bromberg, S./ Twigger, S./ Nigam, R./ Hughes, A./ Mathis, J./ Lu, J./ Shimoyama, M./ Pasko, D./ Chen, C.F./ Gopinathrao, G./ Dela Cruz, N./ Ginster, J./ Ramachandran, H./ Maglott, D./ Eppig, J./ Stahl, F./ Tonellato, P. Rat genome database: A comparative genomics platform for rat, mouse and human. *Faseb J.* 17(2003)4, Part1 suppl., A491–A492.
- Buchberger, J./ Dovč, P. Lactoprotein genetic variants in cattle. *Food technol. Biotechnol.*, 38(2000)2, 91–98.
- Davis, G.P./ DeNise, S.K. The impact of genetic markers on selection. *J Anim Sci.*, 76(1998)9, 2331–2339.
- Debeljak, M./ Sušnik, S./ Milošević-Berlič, T./ Medrano, J.F./ Dovč, P. GeneTechnology and milk production. *Food technol. biotechnol.*, 38(2000)2, 83–89.
- Debeljak, M. Regulation of the bovine kappa casein (κ -CN) gene expression. Doctoral thesis, Univ. of Ljubljana, Medical Fac., 2002.
- Debeljak M./ Frajman P./ Lenasi V./ Narat M./ Baldi A./ Dovč P. Bovine mammary gland cell based functional analysis of bovine beta- and kappa casein promoters. *Archiv tierzucht*, in press.
- Doppler, W./ Windegger, M./ Soratroi, C./ Tomasi, J./ Lechner, J./ Rusconi, S./ Cato, A.C.B./ Almlöf, T./ Liden, J./ Okret, S./ Gustafsson, J./ Richard-Foy, H./ Starr, D.B./ Klocker, H./ Edwards, D./ Geymayer, S. Expression level-dependent contribution of glucocorticoid receptor domains for functional interaction with STAT5. *Molecular and cellular biology*, 21(2001), 3266–6279.
- Eggen, A./ Gautier, M./ Billaut, A./ Petit, E./ Hayes, H./ Laurent, P./ Urban, C./ Pfister-Genskow, M./ Eilertsen, K./ Bishop, M.D. Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome-equivalent coverage. *Genet Sel Evol*, 33(2001)5, 543–548.
- Ferretti, L./ Leone, P./ Sgaramella, V. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Res.*, 18(1990)23, 6829–6833.
- Folch, J.M./ Dovc, P./ Medrano, J.F. Differential expression of bovine beta-lactoglobulin A and B promoter variants in transiently transfected HC11 cells. *J Dairy Res.*, 66(1999)4, 537–544.
- Gellin, J./ Brown, S./ Marshall Graves, J.A./ Rothschild, M./ Schook, L./ Womack, J./ Yerle, M. Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals. *Mamm Genome*, 11(2000)2, 140–144.
- Godovac-Zimmermann, J./ Conti, A./ Liberatori, J./ Braunitzer, G. Homology between the primary structures of beta-lactoglobulins and human retinol-binding protein: evidence for a similar biological function? *Biol Chem Hoppe Seyler*, 366(1985)4, 431-434.
- Gorodetsky, S.I./ Tkach, T.M./ Kapelinskaya, T.V. Isolation and characterization of the *Bos taurus* beta-casein gene. *Gene*, 66(1988)1, 87–96.
- Grosclaude, F./ Mercier, J.C./ Ribadeau-Dumas, B. Genetic aspects of cattle casein research. *Neth. Milk Dairy J.*, 27(1973), 328.
- Groenen, M.A.M./ Van der Poel, J.J. Regulation of expression of milk protein genes: a review. *Livestock Production Science*, 38(1994), 61–78.
- Gupta, P./ Rosen, J.M./ D'Eustachio, P./ Ruddle, F.H. Localization of the casein gene family to a single mouse chromosome. *J Cell Biol.*, 93(1982)1, 199–204.
- Jost, E./ Vilotte J.L./ Duluc, I./ Rodeau, J.L./ Freund, J.N. Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nat Biotechnol.*, 17(1999)2, 160–164.
- Kuss, A.W./ Gogol, J./ Geidermann, H. Associations of a polymorphic AP-2 binding site in the 5'-flanking region of the bovine beta-lactoglobulin gene with milk proteins. *J Dairy Sci.*, 86(2003)6, 2213–2218.
- Lodes, A./ Buchberger, J./ Krause, I./ Aumann, J./ Klostermeyer, H. The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 1. Casein micelle size and the content of non-glycosylated κ -CN. *Milchwissenschaft*, 52(1996), 3–8.
- Lum, L.S./ Dovč, P./ Medrano, J.F. Polymorphisms of bovine beta-lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *J Dairy Sci.*, 80(1997)7, 1389–1397.
- Mariani, P./ Losi, G./ Russo, V./ Castagnetti, L./ Grazia, L./ Morini, D./ Fossa, E. Caseification tests made with milk characterized by variants A and B of κ -casein in the production Parmigiano-Reggiano cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 27(1976), 208–227.
- McPherson, J.D./ Dodgson, J./ Krumlauf, R./ Pourquié, O. Proposal to sequence the genome of the chicken. 2004. <http://www.genome.gov/11510730>.
- Mosig, M.O./ Lipkin, E./ Khutoretskaya, G./ Tchorzyna, E./ Soller, M./ Friedmann, A. A whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk protein percentage in Israeli-Holstein cattle, by means of selective milk DNA pooling in a daughter design, using an adjusted false discovery rate criterion. *Genetics*, 157(2001)4, 1683–1698.

- Rijnkels, M./ Kooiman, P.M./ De Boer, H.A./ Pieper, F.R. Organization of the bovine casein gene locus. *Mamm Genome*, 8(1997), 148–152.
- Rudolph, N.S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol.*, 17(1999)9, 367–374.
- Schrooten, C./ Bink, M.C./ Bovenhuis, H. Whole genome scan to detect chromosomal regions affecting multiple traits in dairy cattle. *J Dairy Sci.*, 87(2004)10, 3550–3560.
- Stewart, A.F./ Bonsing, J./ Beattie, C.W./ Shah, F./ Willis, I.M./ Mackinlay, A.G. Complete nucleotide sequences of bovine alpha S2- and beta-casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species. *Mol Biol Evol.*, 4(1987)3, 231–241.
- Stewart, A.F./ Willis, I.M./ Mackinlay, A.G. Nucleotide sequences of bovine alpha S1- and kappa-casein cDNAs. *Nucleic Acids Res.*, 12(1984)9, 3895–3907.
- Threadgill, D.W./ Womack, J.E. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Res.*, 18(1990)23, 6935–6942.
- Vilotte, J.L./ Soulier, S./ Printz, C./ Mercier, J.C. Sequence of the goat alpha-lactalbumin-encoding gene - comparison with the bovine gene and evidence of related sequences in the goat genome. *Gene*, 98(1991)2, 271–276.

POLIMORFIZEM GENOV ZA β -LAKTOGLOBULIN IN α_{S1} -KAZEIN PAŠKE OVCE *

Ante IVANKOVIĆ^{a)} in Peter DOVČ^{b)}

^{a)} Univ. v Zagrebu, Agronomski fak., Odd. za živinorejo, Svetošimunska 25, HR-10000 Zagreb, Hrvatska, doc., dr.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof., dr.

Delo je prispelo 12. januarja 2004, sprejeto 10. decembra 2004.

Received January 12, 2004, accepted December 10, 2004.

IZVLEČEK

Polimorfizmi genov, ki kodirajo proteine mleka imajo pogosto pomembem vpliv na tehnološke lastnosti mleka. Čeprav so podatki o vplivu alelnih variant laktoproteinskih genov na tehnološke lastnosti mleka pogosto kontradiktorni, v selekcijske vse pogosteje vključujejo tudi informacije o genotipu na laktoproteinskih lokusih, da bi v populacijah povečali frekvenco alel z ugodnim učinkom na tehnološke lastnosti mleka. Glavni proizvod paške ovce je mleko, ki ga večinoma predelajo v paški sir. Izboljšanje tehnoloških lastnosti mleka te pasme bi bistveno pripomoglo k večji ekonomičnosti reje te pasme. Z namenom, da bi ugotovili frekvenco alelov laktoproteinskih genov, ki pomembno vplivajo na predelovalne lastnosti ovčjega mleka, smo v tej raziskavi tipizirali gena za β -laktoglobulin in α_{S1} -kazein štiridesetih živali. Genotipizacijo smo izvedli s pomnoževanjem delov obeh genov z verižno reakcijo s polimerazo in estrikcijo amplifikatov z ustreznimi endonukleazami. Na lokusu za β -laktoglobulina smo našli alela A in B (0,5375; 0,4625), na lokusu za α_{S1} -kazein pa smo določali aleli A in D (0,0875; 0,1340). Glede na podatke v literaturi lahko rečemo, da frekvence alel za β -laktoglobulin in α_{S1} -kazein v populaciji paške ovce niso najugodnejše in da bi z uporabo molekularnih metod frekvenco alel z ugodnimi tehnološkimi lastnostmi lahko sorazmerno hitro povečali. To bi vodilo k izboljšanju ekonomičnosti reje te pasme, katere edini tržno uveljavljeni produkt je paški sir.

Ključne besede: ovce / pasme / paška ovca / mleko / laktoglobulini / kazein / molekularna genetika / polimorfizem genov / Hrvaška

POLYMORPHISMS OF β -LACTOGLOBULIN AND α_{S1} -CASEIN GENES IN THE PAG ISLAND SHEEP †

ABSTRACT

Polymorphisms of lactoprotein genes have a significant effect on technological properties of milk. In spite of the fact that literature data on the impact of lactoprotein variants on cheese making properties are sometimes contradictory, the information about the lactoprotein genotypes becomes important in selection programs in order to improve frequency of favourable alleles for technological properties of milk. The main product of the Pag Island Sheep is milk, which is mainly used for manufacturing of well known Pag Cheese. The improvement of cheese making properties of the Pag Island Sheep milk would contribute significantly to the rentability of the breed. In order to estimate the frequency of alleles contributing to technological properties of milk, we genotyped β -lactoglobulin and α_{S1} -casein loci of 40 Pag Island Sheep. Genotyping was performed using PCR followed by restriction analysis. At the β -lactoglobulin locus alleles A and B (0.5375; 0.4625) were found whereas at the α_{S1} -casein locus genotyping of alleles A in D

* Prispevek je del doktorske disertacije (zagovor 16. marca 2001), mentor izr. prof.dr. Peter Dovč.

† This paper is a part of a dissertation thesis (defense March 16, 2001) supervisor assoc.prof. Peter Dovč, Ph.D.

(0.0875; 0.1340) was performed. According to the literature data, we can conclude that allele frequencies at β -lactoglobulin and α_{s1} -casein locus in the population of Pag Island Sheep are not optimal for cheese making properties of milk. Application of molecular techniques would enable relatively rapid improvement of allelic frequencies towards technologically favourable alleles. This would also improve economical parameters of milk production with Pag Island Sheep breed, which is only known for special Pag cheese.

Key words: sheep / breeds / Pag island sheep / milk / lactoglobulins / casein / molecular genetics / gene polymorphism / Croatia

UVOD

Mleko ovac predstavlja kakovosten vir energije in beljakovin. Ima znatno višjo vsebnost suhe snovi kot kravje mleko. Delež mlečne masti v suhi snovi ovčjega mleka znaša 38,6 %; beljakovin 31,2 %; laktoze 25,1 % in pepela 5,1 %. Kravje mleko ima v primerjavi z ovčjim manj mlečne maščobe (30,8 %), manj proteinov (25,7 %), več laktoze (37,8 %) in več pepela (5,7 %) (Anifantakis, 1985). Mleko ovac vsebuje znatno več (23 %) nižjih maščobnih kislin (kaprilna, kaprinska, laurinska) kot mleko krav (12 %), kar mu daje specifičen okus. Skupna količina beljakovin in njihovo razmerje, sta v mleku ovac bistveno drugačna kot v mleku krav. Delež kazeina v skupnih beljakovinah mleka znaša podobno kot pri kravjem mleku 75-80 %, delež serumskih proteinov pa 20–25 %, zaradi česar ovčje mleko opredelimo kot kazeinsko mleko. Zaradi relativno velikega deleža proteinov mlečnega seruma, pa sirotko uporabljamo tudi za proizvodnjo albuminskih sirov.

Mleko ovac vsebuje, tako kot mleko drugih sesalcev, beljakovine, ki so deloma raztopljene v mleku, deloma pa so prisotne v obliki polidisperznih agregatov – micel. Proteine v ovčjem mleku razvrstimo v dve glavni skupini: kazeine (α_{s1} , α_{s2} , κ , β) in proteine sirotke (α -laktalbumin, β -laktoglobulin). Razmerje med glavnimi kazeinskimi frakcijami v ovčjem mleku je: $\alpha_s:\kappa:\beta = 30:47:7$ (Manfredini in Massari, 1989). Razmerje kazeinov odloča o koagulacijskih lastnostih mleka, zaradi česar ovčje mleko koagulira 1,56 krat hitreje kot kravje mleko, čvrstost sirarskega zrna pa je dvakrat večja. Kazeini se v mleku nahajajo v obliki kazeinskih micel s premerom 20–600 nm, za ohranjanje micel pa je odgovoren κ kazein. Za strukturo kazeinskih molekul so pomembne hidrofobne, vodikove, disulfidne in elektrostatične vezi. Primarna struktura kazeinov je definirana z aminokislinskim zaporedjem in s specifičnimi mesti za post translacijske modifikacije (predvesm fosforilacija in glikozilacija). Na velikost in čvrstost micel pomembno vplivajo polimorfizmi v aminokislinskem zaporedju κ kazeina. Prisi in sod. (1999b) ob primerjavi alelnih variant D in C α_{s1} CN opaža, da imajo največji premer micela mleka z genotipom DD, najmanjši pa micela mleka z genotipom CC.

V teku evolucije, se je v laktoproteinskih genih pojavilo večje število mutacij, ki danes opredeljujejo različne alelne variante laktoproteinskih genov. Pogostnost pojavljanja različnih alelnih tipov se med pasmami razlikuje in zato lahko frekvence alel laktoproteinskih genov uporabljamo kot genetski marker za razlikovanje med pasmami. Opažanja, da so nekatere alelne variante polimorfni laktoproteinov povezane z boljšo izkoristljivostjo mleka v tehnoloških postopkih, še posebej pri proizvodnji sira, so spodbudila raziskovanje polimorfizma laktoproteinov pri ovcah (King, 1969; Shalichev in Tanev, 1972; Arave in sod., 1973; Chianese in sod., 1992). Za večino polimorfizmov so značilne razlike v aminokislinskem zaporedju (Kolde in Braunitzer, 1983; Ferranti in sod., 1995). Razvoj tehnologije rekombinantne DNA in uvedba verižne reakcije s polimerazo (PCR) pa sta omogočila hitro in enostavno genotipizacijo alelnih variant na ravni DNK (Schlee in sod., 1993; Ramunno in sod., 1997; Feligini in sod., 1998; Pilla in sod., 1998; Prinzenberg in Erhardt, 1999). Ti postopki niso odvisni od spola osebka, fiziološkega stanja in okoljskih dejavnikov, tako da danes alelne variante laktoproteinskih genov lahko identificiramo tudi pri moških živalih takoj po rojstvu.

Beta laktoglobulin (β -LG), glavni protein sirotke, je sestavljen iz zaporedja 162 aminokislin. V mleku se nahaja v obliki stabilnega dimera. Za prežvekovalce je značilen en sam lokus, ki kodira različne alele β -LG, medtem ko pri neprežvekovalcih lahko najdemo dva (konj), pri mačkah celo tri lokuse za β -LG (β -LG I, β -LG II in β -LG III). V ovčjem mleku lahko najdemo tri alelne variante β -LG (A, B in C). Varianta A se od variante B razlikuje po aminokislinski substituciji Tyr²⁰→His²⁰ (Kolde in Braunitzer, 1983), razliko med variantama A in C pa opredeljuje aminokislinska substitucija Arg¹⁴⁸→Gln¹⁴⁸ (Erhardt in sod., 1989). Alel C so našli predvsem v nemški, madžarski in španski populaciji merino ovac (Erhardt in sod., 1989).

Za alfa-s1 kazein (α_{s1} -CN) ovce je znanih pet alelnih variant, ki jih označujemo s črkami A, B, C, D (Ferranti in sod., 1995) in E (Chianese in sod., 1996). Slednjo so našli le pri italijanskih pasmah ovac. V ovčjem mleku je za α_{s1} -CN značilen dolžinski polimorfizem: dolgo varianto tvori 199 aminokislin in predstavlja $\approx 80\%$ α_{s1} -CN, krajšo pa tvori 191 aminokislin in se od dolge variante razlikuje po deleciji med aminokislinami 141 in 148 (Ferranti in sod., 1995). Varianta C se od variante A razlikuje po substituciji Ser¹³→Pro¹³ kar povzroča tudi izgubo fosforilacijskega mesta na poziciji 12 v proteinski verigi, SerP¹²→Ser¹² (Ferranti in sod., 1995). Za varianto D je značilna substitucija SerP⁶⁸→Asn⁶⁸ kar povzroča eliminacijo fosforilacijskih mest na pozicijah Ser⁶⁴ in Ser⁶⁶, prav tako pri tej varianti Ser⁴¹ ni fosforiliran (Ferranti in sod., 1995). Varianta E, ki so jo odkrili pri nekaterih italijanskih pasmah ovac še ni podrobno proučena (Chianese in sod., 1996).

Navedbe o povezavi med različnimi alelnimi variantami β -LG ter kakovostjo in količino mleka, učinkovitostjo proizvodnje sira in drugimi tehnološkimi lastnostmi, so pogosto kontradiktorne. Nekateri raziskave (Bolla in sod., 1989; Garzon in Martinez, 1992; Portolano in sod., 1996) kažejo na ugoden vpliv alelne variante β -LG B na vsebnost proteinov v mleku, ne pa tudi na sirarski izplen. Anton s sod. (1998) ni ugotovil povezave med β -LG B in prej navedenimi lastnostmi mleka. Prisi in sod. (1999a) so ugotovil, da ima mleko ovac z genotipom β -LG AA več suhe snovi in masti kot mleko z genotipom β -LG AB ($P < 0.01$). Mleko genotipa AB ima primernejše razmerje med kazeinom in mlečno maščobo ($P < 0.01$) kot varianta AA. Kukovics s sod. (1999b) je potrdil značilno povezavo med genotipom β -LG in sestavo mleka. Prisi in sod. (1999a) so ugotovili, da je količina proizvedenega sira iz kilograma mleka največja pri genotipu AA ($P < 0.01$), srednja pri genotipu BB ($P < 0.01$), ter najmanjša pri genotipu AB. Moioli s sod. (1995) ugotavlja, da ima alelna varianta β -LG A pozitiven učinek na tehnološke lastnosti mleka, medtem ko varianta β -LG B pozitivno vpliva na količino mleka. Kukovics s sod. (1999a) je ugotovil, da je v sirarstvu najprimernejši genotip β -LG BB. Kukovics s sod. (1999c) opaža močno povezavo genotipa β -LG s številom somatskih celic v mleku, pomemben vpliv na to lastnost pa ima tudi pasma.

V številnih poskusih so proučevali povezavo med genetskimi variantami α_{s1} -CN in β -LG ter kvantitativnimi in kvalitativnimi lastnostmi mleka, ki so pomembne v predelavi mleka, posebno v sirarski proizvodnji. Bolla in sod. (1989) je ugotovil da je varianta α_{s1} -CN D povezana z nižjo vsebnostjo mlečne maščobe in beljakovin v mleku, medtem ko je Piredda s sod. (1993) ugotovil povezavo iste variante z nizkim deležem kazeina v mleku ter slabimi koagulacijskimi sposobnostmi. Prisi in sod. (1999b) so ugotovili, da ima mleko z genotipom α_{s1} -CN CC večji delež kazeina kot mleko z genotipoma CD in DD. Alelna varianta CC ima širše razmerje med beljakovinami in mlečno maščobo ter manjši premer kazeinskih micel. Najpomembnejše so razlike med genotipi v procesu sirenja (Prisi in sod., 1995; Prisi in sod., 1999b); mleko z genotipom α_{s1} -CN CC je zaradi boljših tehnoloških lastnosti primernejše za predelavo (hitrost sirenja, čvrstost sirarskega zrna, izplen pri proizvodnji sira) kot mleko genotipa DD, medtem ko je mleko genotipa CD po tehnoloških lastnostih med variantama CC in DD.

Otok Pag, s površino 294 km², je bil stoletja prebivališče posebne pasme ovac, ki se je odlikovala po dobri prilagojenosti okoljskim razmeram na tem otoku in je po njem dobila tudi ime 'paška ovca'. Klimatski in ekološki pogoji na otoku, skromna prehrana, pomanjkanje vode in zavetij pred vetrom, so oblikovali paško ovco v skromno, vzdržljivo in odporno žival. Do sredine XIX. stoletja paške ovce niso oplemenjevali z drugimi, produktivnejšimi pasmami. Merinizacija ovac na otoku Pagu se je pričela leta 1870 z uvozom 'Merino Negretti' ovnov in ustanovitvijo 'vzorčnih čred' ki so bile namenjene izboljšanju proizvodnih lastnosti (Pavlinić, 1936). Cilj križanja je bilo izboljšanje kakovosti volne in povečanje telesnega okvirja. Rezultat oplemenjevanja z Merino Negretti ovni, kasneje pa tudi z bergamaško ovco, se je odražal samo v izboljšani kvaliteti volne, medtem ko sta mlečnost in velikost telesnega okvirja ostali na prejšnji ravni (Jardas, 1951). Danes so na zunanosti paške ovce opazni sledovi bergamaške kot tudi Merino Negretti pasme.

Paška ovca je skladne telesne zgradbe in srednje velikega formata. Večina ovac je bele barve, pojav črnih ali pigmentiranih živali je dokaj redek. Glava je srednje velika, ravnega nosnega profila, medtem ko je pri ovnih profil lahko rahlo konveksen. Ovce so praviloma brez rogov, medtem ko imajo ovni dobro razvite rogove. Greben je izražen, hrbtina linija je pravilna, rep je dolg. Paška ovca ima čvrste in močne noge s pravilnimi parklji. Telo ovce je pokrito z zaprtim do polzaprtim runom mešane volne, na kateri je opazna sled merinizacije. Velikost populacije paške ovce znaša okoli 25.000 živali. Stanje populacije je stabilno, ker je reja te pasme donosna, predvsem zaradi predelave mleka v sir (Paški sir) in prireje mesa (Paška jagnjetina).

Detekcija alelnih variant proteinov mleka

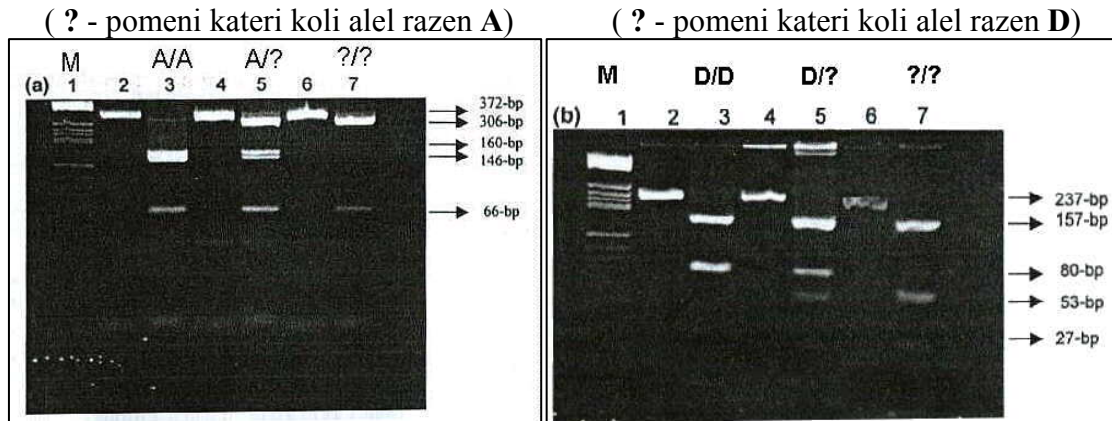
Alelne variante proteinov mleka so odkrili z visoko ločljivimi elektroforetskimi tehnikami, ob uporabi različnih metod za izolacijo proteinov iz mleka. Velika pomanjkljivost rutinske tipizacije na ravni beljakovin je bila nezmožnost direktnega tipiziranja plemenjakov, kar je oteževalo selekcijo. Razvoj PCR metodologije je omogočil določanje genotipov živali ne oziraje se na spol, starost in fiziološko stanje živali.

Schlee s sod. (1993) je opisal možnost za tipizacijo alelnih variant A in B β -LG z uporabo PCR metodologije. Prvi korak je amplifikacija 236 bp dolge regije, ki vsebuje del introna I in ekson II gena za β -LG pri ovci z uporabo ustreznih začetnih oligonukleotidov (OLG1, OLG2). Sledi restrikcija fragmenta z endonukleazo *RsaI*. Homozigote AA prepoznamo po fragmentih velikosti 148 in 66 bp, homozigote BB po fragmentu velikosti 214, heterozigote pa po treh fragmentih (214, 148 in 66 bp).

Feligini s sod. (1998) je za razlikovanje med variantama β -LG A in B uporabil mutacijo (T \leftrightarrow C) znotraj eksona II. Z uporabo ustreznih začetnih oligonukleotidov (LBG1, LBG2) je amplificiral 120 bp dolgo zaporedje, znotraj katerega se nahaja mutacijsko mesto, ki je hkrati tudi restrikcijsko mesto za *RsaI* pri varianti A. Tako *RsaI* cepi PCR fragment alelne variante β -LG A na tri fragmente (66, 37 in 17 bp), medtem ko da PCR fragment variante β -LG B po cepitvi le dva fragmenta (103 in 17bp). Kratek fragment, dolg 17 bp, se pojavlja v obeh alelnih variantah, kar predstavlja kontrolo delovanja restrikcijskega encima. Razen dveh glavnih alelnih variant (β -LG A in β -LG B) se precej redkeje pojavlja še tretja alelna varianta β -LG C. Prinzenberg in Erhardt (1999) sta uvedla metodo, ki omogoča PCR identifikacijo variante β -LG C. Najprej je treba pomnožiti 245 bp dolg fragment, ki vsebuje ekson V in intron V (nukleotidno mesto 4589-4834), nakar sledi cepitev produkta z endonukleazama *MspI* ali *AluI*.

Tudi za identifikacijo alelnih variant α_{s1} -CN so na voljo postopki, ki temeljijo na uporabi PCR metodologije. Ramunno s sod. (1997) je prvi opisal možnost določanja 'Welsh' variante α_{s1} -CN ovac na ravni DNA. Način za določanje variant A in D α_{s1} -CN pri ovcah pa je opisal Pilla s sod. (1998). Identifikacija A variante α_{s1} -CN temelji na amplifikaciji 372 bp dolgega fragmenta

gena za α_{s1} -CN ki vsebuje polimorfni ekson III. Sledi restrikcija z *Mbo*II in določitev genotipa na elektroforeznem gelu. Za homozigote A/A so značilni trije fragmenti (160, 146 in 66 bp), za heterozigote A/ne-A štiri (306, 160, 146 in 66 bp), homozigot brez alelna variante A pa daje dva fragmenta (306 in 66 bp).



Slika 1. Identifikacija alelna variante α_{s1} -CN A in α_{s1} -CN D (Pilla in sod., 1998).
Figure 1. Genotyping of the ovine α_{s1} -CN A and α_{s1} -CN D (Pilla *et al.*, 1998).

Varianto α_{s1} -CN D lahko določimo s pomočjo 237 bp dolgega fragmenta, ki vsebuje polimorfni ekson IX. Amplificiran fragment gena je treba cepiti z *Mae*III, nakar lahko elektroforetsko določimo genotipe. Homozigot D/D prepoznamo po dveh fragmentih (157 in 80 bp), heterozigot D/ne-D po štirih fragmentih (157, 80, 53 in 27 bp), homozigot brez alelna variante D pa po treh fragmentih (157, 53 in 27 bp).

MATERIAL IN METODE DE LA

V juniju 1999 leta smo zbrali 40 krvnih vzorcev paške ovce. Jedrno DNA smo izolirali po standardni metodi (Ausubel in sod., 1987). V reagenčno posodico z 200 μ l krvi smo dodali 800 μ l TE pufru, pretresli, centrifugirali 30 s pri 20.000 x g, odlili supernatant ter postopek še dvakrat ponovili. V reagenčno posodico smo dodali 200 μ l pufru za lizo celic in 8 μ l proteinaze K, sledila je inkubacija v vodni kopeli na 58 $^{\circ}$ C (dve uri). Po inkubaciji je sledila ekstrakcija z 220 μ l PCI (fenol:kloroform:izoamilalkohol v razmerju 25:24:1), centrifugiranje pri 20000 x g (10 min), nato smo odpipetirali zgornjo fazo v novo reagenčno posodico. Dodali smo 150 μ l mešanice kloroforma in izoamilalkohola (razmerje 24:1), centrifugirali pri 20000 x g 10 min in zgornjo fazo odpipetirali v novo reagenčno posodico. Po dodatku 2,5 volumna 96 % etanola (ohlajenega na -20 $^{\circ}$ C) smo vzorce shranili čez noč na -20 $^{\circ}$ C. Nato smo vzorce centrifugirali pri 20000 x g (10 min), odlili supernatant, dodali 100 μ l 70 % etanola (ohlajenega na -20 $^{\circ}$ C) ter centrifugirali (1 min/20000xg). Postopek smo ponovili. Nato smo odpipetirali etanol, posušili pelet do voskaste konzistence ter ga raztopili v 30 μ l Milli Q vode in shranili na 4 $^{\circ}$ C.

Uspešnost izolacije DNK smo preverili na 1 % gelu v 1xTBE puferu (20 minut / 120V). Na gel smo nanесли 2 μ l aplikacijskega pufru in 1,5 μ l raztopljenе DNK.

PCR-RFLP analiza polimorfizmov genov za α_{s1} kazein in β -laktoglobulin

Z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v verižni reakciji s polimerazo smo pomnožili fragmente kodogenih regij laktoproteinskih genov ki kodirajo α_{s1} -CN in β -LG.

Začetni oligonukleotidi so navedeni v preglednici 1, prav tako tudi temperatura prileganja (T_A °C) in koncentracija $MgCl_2$.

Tako dobljene PCR produkte smo cepili z ustreznimi restrikcijskimi endonukleazami. V preglednici 2 so navedeni uporabljeni restrikcijski encimi in njihova cepitvena mesta.

Preglednica 1. Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za amplifikacijo dela genov α_{s1} -CN in β -LG paške ovce

Table 1. The primers used for amplification of α_{s1} -CN and β -LG gene fragments in Pag island sheep

Začetni oligonukleotidi Primers		Nukleotidna zaporedja zečetnih oligonukleotidov Nucleotide sequence primers	T_A °C	$MgCl_2$	Referenca Reference
β -LG	LBG 1	5'-CAACTCAAGGTCCTCTCCA-3'	54 °C	2,0 mM	(Feligini in sod., 1998)
	LBG 2	5'-CTTCAGCTCCTCCACGTACA-3'			
α_{s1} -CN	AS1-1	5'-GGTGTCAAATTTAGCTGTTAAA-3'	53 °C	1,5 mM	(Pilla in sod., 1998)
	AS1-2	5'-GCCCTCTTCTCTAAAAAGGTTT-3'			
	AS1-3	5'-CAACATATTTTAAATAAATTGACAAT-3'			
	AS1-4	5'-AATTAACATAAAAAATGGCATAACGTC-3'			

Pri določanju variant β -LG smo inkubirali 15 μ l PCR produkta 3 ure, na 37 °C s 25 enotami restrikcijske endonukleaze *RsaI*. Pri določanju variant α_{s1} -CN smo inkubirali 15 μ l PCR produkta 3 ure, na 37 °C z restrikcijsko endonukleazo *MboII* (alel A) in z restrikcijsko endonukleazo *MaeIII* (alel D). Rezultate encimatske cepitve smo analizirali na 3 % agaroznem gelu, skupaj z velikostnim standardom (100 bp DNA Ladder, Gibco BRL).

Preglednica 2. Restrikcijske endonukleaze uporabljene za detekcijo alel α_{s1} -CN in β -LG

Table 2. The restriction enzyme used for detection of α_{s1} -CN and β -LG alleles

Restrikcijska endonukleaza Restriction enzyme		Cepitveno mesto Restriction site
<i>MaeIII</i>	BOEHRINGER MANNHEIM GmbH	\downarrow GTNAC CANTG \uparrow
<i>MboII</i>	PROMEGA	GAAGA (N) \downarrow CTTCT (N) \uparrow
<i>RsaI</i>	PROMEGA	GT \downarrow AC CA \uparrow TG

Frekvence alelnih variant, opaženo (H_o) in pričakovano heterozigotnost (H_e), informativno vrednost lokusa (PIC), verjetnost izključitve napačnega roditelja (E_p) in oceno frekvenc ničelnih alelov (F_e) smo izračunali s programskim paketom CERVUS (Marshall in sod., 1998).

REZULTATI IN DISKUSIJA

Z metodo PCR-RFLP smo izvedli genotipizacijo 40 ovac na lokusih za β -LG i α_{s1} -CN. Rezultati analize obeh lokusov so prikazani v preglednici 3.

V našem sistemu smo identificirali dve alelni varianti β -LG, A in B. Našli smo devet homozigotov AA, 25 heterozigotov AB in šest homozigotov BB. Alelne variante β -LG C nismo

našli v proučevanem vzorcu. Testiranje distribucije genotipov ($\chi^2 = 1,71$) kaže, da opazovane frekvence ne odstopajo značilno od pričakovanih frekvenc.

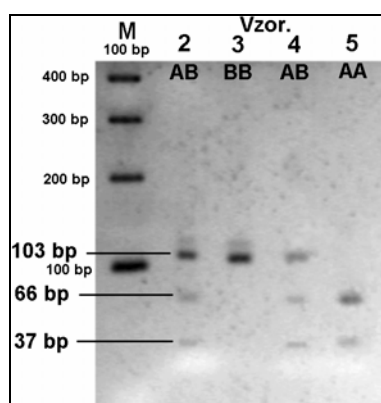
Genotip AA smo identificirali po fragmentih dolžine 66, 37 in 17 bp, genotip AB po fragmentih 103, 66, 37 in 17 bp, genotip BB pa po fragmentih 103 in 17 bp. Na sliki 2 je prikazanih nekaj genotipov vzorcev paške ovce.

Preglednica 3. Porazdelitev frekvenc genotipova i alela laktoproteina β -LG i α_{s1} -CN paške ovce (opazovana heterozigotnost, Ho; pričakovana heterozigotnost, He; informativna vrednost lokusov, PIC; verjetnost izključitve, Ep; ocena frekvence ničelnih alel, Fe)

Table 3. Distribution of β -LG and α_{s1} CN genotypes and gene frequencies of Pag sheep (observed heterozygosity, Ho; expected heterozygosity, He; polymorphism information content, PIC; exclusion probability, Ep; estimate null allele frequency, Fe)

	Genotip Genotyp	Alel Allele	Ho	He	PIC	Ep	Fe
β -LG	AA 9	A	0,625	0,503	0,374	0,187	-0,1139
	AB 25	0,5375 \pm 0,0557					
	BB 6	B 0,4625					
α_{s1} -CN	AA 1	A	0,350	0,361	0,327	0,185	+0,0119
	AD 1	0,0875 \pm 0,0447					
	A- 4	D 0,1250 \pm 0,0523					
	D- 9	- 0,7875 \pm 0,0647					
	-- 25						

--^c = alelne variante B, C in E na lokusu za α_{s1} -CN / --^c = allelic variants B, C and E at α_{s1} -CN locus



Slika 2. Genotipi β -LG štirih vzorcev paške ovce.

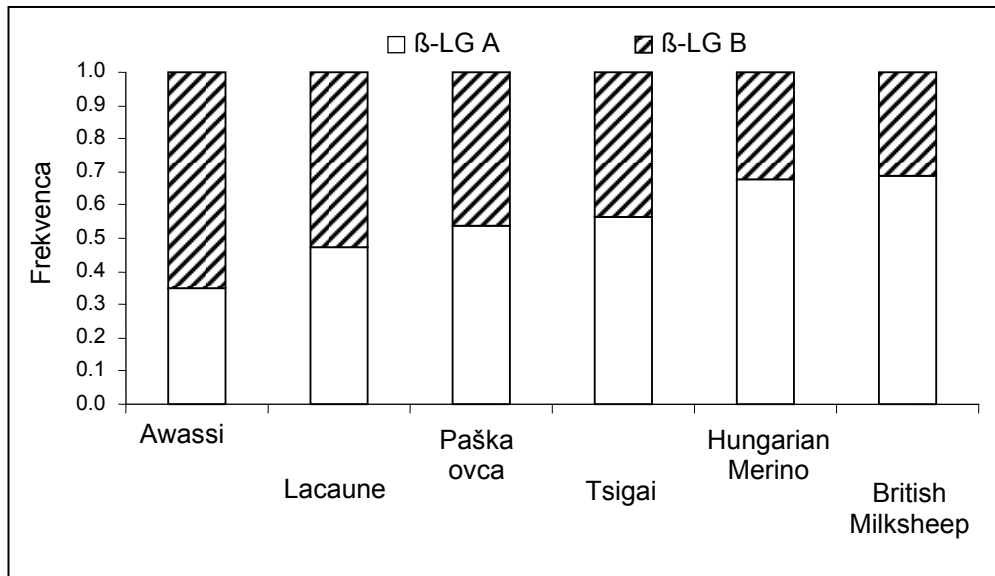
Figure 2. Genotypes at the β -LG locus of the four Pag island sheep.

Z metodo PCR-RFLP smo določili frekvence alelnih variant α_{s1} -CN A in D v populaciji paške ovce. Pri 15 od 40 testiranih ovac smo našli alelne variante α_{s1} -CN (A in D), v preostalih 25 vzorcih pa ti dve varianti nista bili navzoči. V vzorcu smo našli 14 heterozigotnih živali in eno homozigotno AA žival. Najpogosteje zastopan heterozigot je genotip D-ki se je pojavil pri devetih vzorcih, sledi mu A-pri štirih vzorcih (- pomeni kateri koli drug alel α_{s1} -CN, razen že prisotnega). Med preiskanimi živalmi smo našli le eno heterozigotno žival z genotipom AD. Test distribucije genotipov ($\chi^2 = 2,7916$) kaže, da odstopanje opazovanih frekvenc genotipov od pričakovanih ni signifikantno.

Ocenjene frekvence alelov skupaj z rezultati predhodnih raziskav o korelaciji med alelnimi variantami in kvalitativnimi in kvantitativnimi lastnostmi mleka odpirajo možnosti za selekcijo v smeri izboljšanja proizvodnih parametrov mleka za proizvodnjo "paškega sira", ki je edini tržno uveljavljen proizvod paške ovce. Določene frekvence alelnih variant β -LG A in B paške ovce (0,5375; 0,4625) kažejo na odstopanje od frekvenc nekaterih izrazito mlečnih pasem ovac. Frekvence β -LG variant "British Milkshoop" in "Hungarian Merino" ki jih je ocenil Anton s sod. (1999) imajo znatno višjo frekvenco alela A (0,6857; 0,6767). Pasma "Awasi" ima nižjo frekvenco alela A (0,3478), medtem ko imata

madžarski populaciji pasem Tsigai in Lacaune (0,5650; 0,4730) podobne frekvence β -LG A kot paška ovca. Zastopanost frekvenc alel β -LG je prikazana na sliki 3.

Nekatere raziskave kažejo (Moioli in sod., 1995; Prisi in sod., 1999a), da je v sirarstvu bolj zaželena alelna varianta β -LG A, ker vpliva na boljšo izkoristljivost mleka in boljšo kakovost sira. Glede na to, da se večina mleka paške ovce predela v "paški sir", bi bila bolj zaželena večja zastopanost alelne variante β -LG A. Mlečni pasmi ovac "British Milkssheep" in "Hungarian Merino" (Anton in sod., 1999) imata mleko, ki je zaradi visoke frekvence alela A primernejše za sirarsko proizvodnjo, mleko paške ovce pa ima zaradi nizke frekvence tega ugodnega alela po vsej verjetnosti manj ugodne tehnološke lastnosti.



Slika 3. Frekvence alelnih variant β -LG nekaterih populacij ovac.

Figure 3. Frequencies β -LG alleles of different breeds sheep.

Oceni frekvenc alelnih variant α_{s1} -CN A in D ne odstopata znatno od frekvenc populacij, navedenih v literaturi. Frekvenca alele A je nizka pri vseh proučevanih pasmah, pri paški ovci pa je nekoliko višja. Varianta D je v populaciji paške ovce zastopana z nižjo frekvenco kot pri sardinijski ovci, kar je ugodno, saj je varianta D v sirarstvu nezaželena. Frekvence alelnih variant α_{s1} -CN nekaterih populacij ovac so prikazane v preglednici 4. Varianta D je povezana z nižjo vsebnostjo mlečne masti in proteinov (Bolla in sod., 1989), nižjo vsebnostjo kazeina in s slabšimi lastnostmi sirarskega zrna (Piredda in sod., 1993). Prisi s sod. (1999b) meni, da je najprimernejši genotip za proizvodnjo sira genotip CC.

Preglednica 4. Frekvenca alelnih variant α_{s1} CN nekaterih populacij ovac

Table 4. Frequencies of α_{s1} CN alleles in different sheep breeds

Populacije Breeds	Frekvence alelov / Alele frequencies					Avtorji Authors
	A	B	C	D	E	
Paška ovca Pag Island Sheep	0,087	?	?	0,130	?	ta študija / this study
Manchega	0,055	0,345	0,600	-	-	López Gálvarez in sod., 1999
Segureña	0,020	0,090	0,890	-	-	López Gálvarez in sod., 1999
Sarda sheep	0,070	0,175	0,485	0,250	0,020	Prisi in sod., 1999

Na osnovi ugotovljenih frekvenc lahko rečemo, da v populaciji paške ovce po vsej verjetnosti razmerje alelnih variant proučevanih laktoproteinov ni najugodnejše za tehnološke lastnosti mleka. Ker uporaba PCR-RFLP metodologije omogoča identifikacijo polimorfni variant tudi pri moških živalih, bi z učinkovito selekcijo na ugodne genotipe laktoproteinskih genov dokaj hitro spremenili frekvence alelov laktoproteinskih genov v korist genotipov z ugodnimi lastnostmi na tehnološke lastnosti mleka. Uporaba opisane metodologije, bi v okviru ustreznega rejskega programa, lahko kmalu pokazala tudi ekonomsko korist zaradi pričakovanega izboljšanja kvalitete osnovne surovine za proizvodnjo paškega sira.

LITERATURA

- Anifantakis, E.M. Comparison of the physico-chemical properties of ewes and cows milk. *Bulletin International Dairy Federation*, 202(1985), 42–53.
- Anton, I./ Zsolnai, A./ Kukovics, S./ Molnár, A./ Fésüs, L. Genetic polymorphisms of milk proteins in Hungarian dairy sheep breeds and crosses. V: *FAO Proceedings of the workshop, Budapest, 1997-11/12-29/02*. Rome, REU Technical Series, 1998, 224–226.
- Anton, I./ Zsolnai, A./ Fésüs, L./ Kukovics, S./ Molnár, A. Survey of β -lactoglobulin and α_{s1} -casein polymorphism in Hungarian dairy sheep breeds and crosses at DNA level. *Archiv für Tierzucht*, 42(1999), 387–392.
- Arave, C.W./ Gillet, T.A./ Price, D.A./ Matthews, D.H. Polymorphisms in caseins of sheep milk. *Journal of Animal Science*, 36(1973), 241–244.
- Ausubel, F.M./ Brent, R./ Kingston, R.E./ Moore, D.D./ Seidman, G.G./ Smith, J.A./ Struhl, R. *Current protocols in molecular biology*. Green Publishin Associates and Wiley-Interscience, New York, 1987.
- Bolla, P./ Caroli, A./ Mezzelani, A./ Rizzi, R./ Pagnacco, G./ Fraghi, A./ Casu, S. Milk protein markers and production in sheep. *Animal Genetics*, 20(1989)Suppl. 1, 78.
- Chianese, L./ Mauriello, R./ Moio, L./ Intorcica, N./ Addeo, F. Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. *Journal of Dairy Research*, 59(1992), 39–47.
- Chianese, L./ Garro, G./ Mauriello, R./ Laezza, P./ Ferranti, P./ Addeo, F. Occurrence of five α_{s1} -casein variants in ovine milk. *Journal of Dairy Research*, 63(1996), 49–59.
- Erhardt, G. Evidence for a third allele at the β -Lg lokus of sheep and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics*, 20(1989), 197–204.
- Feligini, M./ Parma, P./ Aleandri, R./ Greppi, G.F./ Enne, G. PCR-RFLP test for direct determination of β -lactoglobulin genotype in sheep. *Animal Genetics*, 29(1998), 473–474.
- Ferranti, P./ Malorni, A./ Nitti, G./ Laezza P./ Pizzano, R./ Chianese, L./ Addeo, F. Primary structure of ovine α_{s1} -caseins: localization of phosphorylation sites and characterization of genetic variants A, C and D. *Journal of Dairy Research*, 62(1995), 281–296.
- Garzon, A.I./ Martinez, J. Beta-lactoglobulins (β -Lg) in Manchega sheep breed: Relationship with milk technological idnexes in handcraft manufacture of Manchego cheese. *Animal Genetics*, 23(1992)Suppl. 1, 106.
- Jardas, F. Dosadašnji rad i iskustva oko merinizacije u NR Hrvatskoj. *Stočarstvo*, 5(1951), 97–114.
- King, J.W.B. The distribution of sheep β -lactoglobulins. *Animal Production*, 11(1969), 53.
- Kolde, H.J./ Braunitzer, G. The primary ctructure of ovine β -Lg. *Milchwissenschaft*, 38(1983), 70–72.
- Kukovics, S./ Daróczy, L./ Kovács, P./ Molnár, A./ Anton, I./ Zsolnai, A./ Fésüs, L./ Ábrahám, M. The effect of β -lactoglobulin genotype on cheese yield. V: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, 1998-09/10-26/01*. Wageningen, EAAP Publication, 95(1999a), 524–527.
- Kukovics, S./ Molnár, A./ Anton, I./ Zsolnai, A./ Fésüs, L./ Ábrahám, M. The effect of β -lactoglobulin genotypes on milk composition of various sheep breeds. V: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, 1998-09/10-26/01*. Wageningen, EAAP Publication, 95(1999b), 539–542.
- Kukovics, S./ Molnár, A./ Ábrahám, M./ Anton, I./ Zsolnai, A./ Fésüs, L. The effect of sheep genotype on the somatic cell counts of milk. V: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, 1998-09/10-26/01*. Wageningen, EAAP Publication, 95(1999c), 443–446.
- López Gálvez, G./ Chianese, L./ Addeo, F./ Amigo, L./ Ramos, M. Polymorphism of α_{s1} -caseins ina the of two Spanish ovine breeds. *Milchwissenschaft*, 54(1999), 17–19.
- Manfredini, M./ Massari, M. Small ruminant milk. Technological aspects: storage and processing. *Option Mediteraneennes*, 6(1989), 191–198.
- Marshall, T.C./ Slate, J./ Kruuk, L./ Pemberton, J.M. Statistical confidence for likelihood based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7(1998), 639–655.

- Moioli, B./ Pilla, F./ Rando, A./ Tripaldi, C. Possible exploitation of DNA polymorphisms as genetic markers to improve milk production traits in sheep and goats. V: Proceedings of the 46th Annual meeting of European Association for Animal Production, Prague, 1995-09-04/07. Wageningen, Wageningen Pers, 1995, 229.
- Pavlinić, P. Paška ovca. Veterinarski arhiv, 6(1936), 276–296.
- Pilla, F./ Bevilacqua, C./ Leroux, C./ Fraghi, A./ Martin, P. Genotyping of α -s1 casein in sheep. *Animal Genetics*, 29(1998), 472–473.
- Piredda, G./ Papoff, C.M./ Sanna, S.R./ Campus, R.L. Influence of α s1-casein genotype on the physicochemical and lactodynamographic characteristics of milk. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 44(1993), 135–143.
- Portolano, B./ Giaccone, P./ Todaro, M./ Di Stasio, L./ Fiandra, P. Effect of β -lactoglobulin on milk composition and cheese yield in sheep. *Animal Genetics*, 27(1996)Suppl. 2, 119.
- Prinzenberg, E.M./ Erhardt, G. Molecular genetic characterization of ovine β -lactoglobulin C allele and detection by PCR-RFLP. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 116(1999), 9–14.
- Prisi, A./ Fraghi, G./ Piredda, G./ Leone, P. Influence of sheep AA, AB and BB β -lactoglobulin genotypes on milk composition and cheese yield. V: Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, 1998-09/10-26/01. Wageningen, EAAP Publication, 95(1999a), 553–555.
- Prisi, A./ Piredda, G./ Di Salvo, R./ Papoff, C.M./ Pintus, S. Influence of ovine α s1-casein genotype on milk composition and cheeseyielding capacity. V: Proceedings of the IDF/ CIRVAL Seminar: Production and utilization of ewe and goat milk, Crete, 1995-10-19/21. Bruxelles, International Dairy Federation, 1995, 179–183.
- Prisi, A./ Piredda, G./ Papoff, C.M./ Di Salvo, R./ Pintus, S./ Garro, G./ Ferranti, P./ Chianese, L. Effects of sheep α s1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. *Journal of Dairy Research*, 66(1999b), 409–419.
- Ramunno, L./ Cosenza, G./ Rando, A./ Macciotta, N.P.P./ Pappalardo, L./ Masina, P. Identification of Carriers of the Welsh CASA1 variant using an allele-specific PCR method. *Animal Genetics*, 28(1997), 154–155.
- Schlee, P./ Krause, I./ Rottmann, O. Genotyping of ovine β -lactoglobulin alleles A and B using the polymerase chain reaction. *Archiv für Tierzucht*, 36(1993), 519–523.
- Shalichev, J./ Tanev, G. Isolation, Purification and Determination of Some Chemical and Physicochemical Characteristics of Sheep Alpha s-Casein. *Journal of Dairy Science*, 56(1972), 171–176.

RODOVI LIPICANCEV SLOVENSKE REJE GLEDE NA HAPLOTIP MITOHONDRIJSKE DNK

Tatjana KAVAR ^{a)}+, Franc HABE ^{b)} in Peter DOVČ ^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija.

⁺ Sedaj: Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, dr., mag.

^{b)} Isti naslov, kot ^{a)}, prof., dr.

^{c)} Isti naslov, kot ^{a)}, prof., dr., e-pošta: peter.dovc@bfro.uni-lj.si.

Delo je prispelo 01. septembra 2004, sprejeto 24. septembra 2004.

Received September 01, 2004, accepted September 24, 2004.

IZVLEČEK

Z analizo mitohondrijske DNK 53 lipicancev slovenske reje smo našli 17 različnih haplotipov mitohondrijske DNK. Deset haplotipov (Capriola, Allegra, Monteaura, Slavina, Batosta, Gratirosa, Wera, Betalka, Dubovina in Gaetana) je bilo značilnih za klasične lipicanske rodove, haplotip Thais za nov slovenski rod Rebecca in haplotipi M, C, Strana, Trompeta, Boka in Y za lipicanske rodove hrvaškega, romunskega ali madžarskega izvora. Visok delež haplotipov, značilnih za klasične rodove, je bil pričakovan, ker so v Sloveniji po letu 1947 želeli obnoviti lipicansko čredo predvsem s klasičnimi rodovi. Rezultati kažejo, da so bili trije klasični rodovi obnovljeni z lipicanci iz napačnih rodov; v teh rodovih imajo lipicanci slovenske reje namreč različne haplotipe kot lipicanci iz drugih evropskih držav. Več kot en haplotip smo našli znotraj štirih rodov, kar kaže na dodatne nepravilnosti v rodovnikih. Predlagamo, da se nepravilnosti odpravijo z uvedbo novih rodov in z manjšimi prerazporeditvami lipicancev med rodovi. Geografski izvor lipicanskih haplotipov ostaja večinoma neznan, toda haplotipa Allegra in Monteaura bi bila lahko španskega izvora, ker so taki haplotipi najbolj pogosti pri iberijskih (andaluzijskih in lusitano konjih) ter severno-afriških konjih (berberih). Kladrubiški izvor haplotipov Batosta in Slavina, ki sta značilna za lipicanska rodova kladrubiškega izvora Africa in Almerina, lahko potrdimo z odkritjem obeh haplotipov pri današnjih kladrubiških konjih; arabski izvor haplotipa Gaetana, ki je značilen za lipicanski rod arabskega izvora Gidrane, pa z visoko pogostostjo haplotipa Gaetana v populaciji arabskih konj.

Ključne besede: konji / pasme / lipicanec / molekularna genetika / mitohondrijska DNK / haplotipi / rodovniki / izvor

MITOCHONDRIAL DNA HAPLOTYPES IN SLOVENIAN LIPIZZAN MARE FAMILIES

ABSTRACT

Sequencing of mitochondrial DNA from 53 Slovenian Lipizzans revealed 17 distinct mtDNA haplotypes: ten haplotypes (Capriola, Allegra, Monteaura, Slavina, Batosta, Gratirosa, Wera, Betalka, Dubovina and Gaetana) were present in classical mare families, haplotype Thais in the new Slovenian mare family Rebecca and haplotypes C, M, Strana, Trompeta, Boka and Y in mare families of Croatian, Romanian or Hungarian origin. We expected large amount of "classical" haplotypes, because after 1947 the Lipizzan breed in Slovenia was re-established using mainly Lipizzans from classical mare families. However, Lipizzans from incorrect mare families were probably used for the recovery of three classical families and therefore in these three families Slovenian Lipizzans had different haplotypes than other European Lipizzans. Additional pedigree errors were detected in four families showing more than one haplotype. We

suggested that pedigree errors should be corrected by introduction of several new mare families and by minor re-distributions of Lipizzans among mare families. Geographical origin of the Lipizzan haplotypes remains uncertain, but haplotypes Allegra and Montaura could be of Spanish origin due to the highest frequency of these haplotypes in Iberian (Andalusian and Lusitano) and North African horses (Barbs). Kladrubian origin of haplotypes Batosta and Slavina, which are characteristic for Lipizzan mare families of Kladrubian origin, Africa and Almerina, could be supported by the presence of both haplotypes in the present Kladruber horses. The Arabic origin of haplotype Gaetana, which is characteristic for the Lipizzan mare family of Arabic origin, could be supported by the high frequency of the haplotype Gaetana in Arabian horses.

Key words: horses / breeds / Lipizzan horse / molecular genetics / mitochondrial DNA / haplotypes / pedigrees / origin

UVOD

Lipicanci slovenske reje se po rodovniških podatkih, zbranih v Rodovni knjigi lipicancev slovenske reje (Pangos, 1999) uvrščajo v štirinajst klasičnih rodov, v nov slovenski rod Rebecca in v hrvaška rodova Margit in Munja. Z izmenjavami med kobilarnami so iz madžarske kobilarne Szilvasvarad v kobilarno Lipica dobili še lipicance iz rodu S14 Marquese (preglednica 1, stolpec A). Klasični lipicanski rodovi so bili oblikovani v kobilarni Lipica pred II. svetovno vojno. Tam je bil oblikovan tudi nov slovenski rod Rebecca, vendar po II. svetovni vojni, medtem ko so bili hrvaški, madžarski in romunski rodovi oblikovani večinoma v zasebnih ali vojaških kobilarnah v nekdanji Avstro-ogrski (Ouhlela, 1996). Začetnice ali pramatere lipicanskih rodov so bile običajno kraškega, španskega, staro-italijanskega ali arabskega porekla (Dolenc, 1980).

Informacije o rodovih kobil lahko dobimo iz rodovniških podatkov, lahko pa tudi z analizo mitohondrijske DNK. Pri vseh lipicancih iz istega rodu namreč lahko pričakujemo enako nukleotidno zaporedje oz. enak haplotip mitohondrijske DNK, saj se mitohondrijska DNK deduje samo po materi, pogostnost mutacij pa je v relativno kratkih časovnih odsekih, ki jih predstavlja zgodovina kulturnih pasem konj, relativno nizka. Zato lahko predvidevamo, da so začetnice lipicanskih rodov kobil oz. pramatere imele enak haplotip kot ga imajo njihovi potomci po ženski liniji še danes. Zato primeri, ko ugotovimo različne haplotipe pri lipicancih, ki naj bi se po rodovniških podatkih uvrščali v isti rod, kažejo na nepravilnosti v rodovnikih.







V prejšnji raziskavi (Kavar in sod., 2002) smo z analizo 212 lipicancev iz osmih evropskih kobilarn: Lipica (SI), Piber (A), Monterotondo (I), Đakovo (Hr), Szilvasvarad (H), Topolcianky (Sk), Beclean (Ro) in Fagaras (Ro), že opisali 56 lipicanskih rodov kobil s 37 različnimi haplotipi mitohondrijske DNK. S to analizo smo takrat našli tudi 25 napak v rodovnikih lipicancev.

V tej raziskavi smo genetske podatke o lipicancih iz kobilarne Lipica, ki so bili znani že iz prejšnje raziskave, dopolnili še s podatki o lipicancih Združenja rejcev lipicanca Slovenije (ZRLS). Z zbranimi podatki smo želeli ugotoviti:

- kateri haplotipi mitohondrijske DNK so značilni za lipicance slovenske reje,
- od kod bi ti haplotipi lahko izvirali,
- ali genetski podatki potrjujejo rodovniške podatke iz Rodovne knjige lipicancev slovenske reje (Pangos, 1999) in
- ali se po posameznih rodovih haplotipi lipicancev slovenske reje morebiti ne razlikujejo od haplotipov, ki smo jih našli pri lipicancih v drugih evropskih državah.

Preglednica 1. Haplotipi mitohondrijske DNK po rodovih kobil. Stolpec A – Lipicanski rodovi kobil v Sloveniji ter kraj rojstva ali pasma začetnice rodu kobil. Stolpec B – Haplotipi, ugotovljeni pri lipicancih slovenske reje. Stolpec C – Frekvence haplotipov, ugotovljene v prejšnji raziskavi (Kavar in sod., 2002) pri lipicancih iz kobilar Lipica, Piber, Monterotondo, Đakovo, Szilvasvarad, Topolcianky, Beclean in Fagaras.

Table 1. Mitochondrial DNA haplotypes by mare family. Column A – Lipizzan mare families in Slovenia, including place of birth or breed of the founder mare. Column B – haplotypes found in Slovenian Lipizzans. Column C – Haplotype frequencies in Lipizzans from studs Lipica, Piber, Monterotondo, Đakovo, Szilvasvarad, Topolcianky, Beclean and Fagaras, as detected in our previous study (Kavar *et al.*, 2002).

A	B	C
Klasični rodovi / Classical mare families		
SARDINIA Lipica (SI)	Betalka	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Capriola <input checked="" type="checkbox"/> Betalka <input checked="" type="checkbox"/> Monteaura
SPADIGLA Lipica (SI)	Monteaura	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Monteaura <input checked="" type="checkbox"/> Batosta <input checked="" type="checkbox"/> Dubovina
ARGENTINA Lipica (SI)	Capriola	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Capriola <input checked="" type="checkbox"/> X
AFRICA Kladruby (Cz)	Batosta Boka	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Batosta <input checked="" type="checkbox"/> Monteaura
ALMERINA Kladruby (Cz)	Slavina	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Slavina <input checked="" type="checkbox"/> Allegra
PRESCIANA Kladruby (Cz)	Capriola	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Capriola <input checked="" type="checkbox"/> Allegra <input checked="" type="checkbox"/> Slavina
ENGLANDERIA Kladruby (Cz)	Allegra	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Allegra
EUROPA* Kladruby (Cz)	Trompeta	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> U
STORNELLA Kopčany (Sk)	Allegra	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Capriola <input checked="" type="checkbox"/> Allegra
DEFLORATA Frederiksborg (Dn)	Capriola, Betalka Gaetana	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Capriola Allegra <input checked="" type="checkbox"/>
GIDRANE čistokrvna arabka	Gaetana Y Capriola	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Gaetana
DJEBRIN Radautz (Ro)	Dubovina	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Dubovina
MERCURIO Radautz (Ro)	Gratiosa	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Gratiosa
THEODOROSTA Radautz (Ro)	Wera	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Wera <input checked="" type="checkbox"/> Allegra <input checked="" type="checkbox"/> U
Nov slovenski rod / New Slovenian mare family		
REBECCA Vrbik (Hr)	Thais	 <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Thais

nadaljevanje na naslednji strani

A	B	C
Hrvaški rodovi / Croatian mare families		
MARGIT Terezovac (Hr)	C	○ □ D
MUNJA Đakovo (Hr)	Gaetana, Strana	○ □ Gaetana ■ Strana ▣ Slavina
Madžarski rod /Hungarian mare family		
S14 Marquese Mezohegjes (H)	M	○ □ M

*V Rodovni knjigi lipicancev slovenske reje (Pangos, 1999) so lipicanci s haplotipom Trompeta uvrščeni v rod Europa, toda po rodovniških in genetskih podatkih je bila pramater teh lipicancev Triglava, rojena 1916. / Lipizzans with the haplotype Trompeta could be found within the mare family Europa in the Studbook of Slovenian Lipizzans (Pangos, 1999), but according to the pedigree and genetic data, founder mare of these Lipizzans was Triglava (born in 1916).

MATERIAL IN METODE

V okviru projekta Slovenski lipicanec so bili v letih 2001 in 2002, zbrani krvni vzorci lipicancev ZRLS in lipicancev iz kobilarne Lipica. Izmed njih smo načrtno, po rodovniških podatkih, za analizo izbrali 19 vzorcev. Prednostno smo izbirali vzorce lipicancev iz rodov, ki doslej še niso bili analizirani, oz. v rodovih z že analiziranimi vzorci, vzorce iz bolj oddaljenih vej. Izbrani vzorci naj bi v kombinaciji s 35 vzorci lipicancev slovenske reje, analiziranimi v prejšnjih raziskavah (Kavar in sod., 1999, 2002), enakomerno pokrili vse lipicanske rodove v Sloveniji.

Po že opisanih protokolih (Kavar *in sod.*, 2002) smo pomnožili kontrolno regijo mitohondrijske DNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Pomnožene fragmente DNK smo uporabili za določitev nukleotidnega zaporedja z avtomatskim sekvenatorjem ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Nukleotidna zaporedja smo poravnali z referenčnim zaporedjem GenBank X79547 (Xu in Arnason, 1994) ter s 37 že znanimi haplotipi lipicancev (Kavar in sod., 1999, 2002). Genetske razdalje smo ocenili po Kimura dvo-parametrski metodi s programom Phylip (Felsenstein, 1993). Z istim programom smo po metodi »združevanja sosedov« konstruirali NJ drevo. Za grafično predstavitev drevesa smo uporabili program TreeView (Page, 1998).

REZULTATI IN RAZPRAVA

Haplotipi

Z analizo mitohondrijske DNK lipicancev slovenske reje smo našli 17 različnih haplotipov. Polimorfna mesta predstavljamo v preglednici 2, nukleotidna zaporedja pa so na voljo v bazi GenBank. Haplotipe smo poimenovali z imeni lipicancev (npr. Allegra, Capriola, Monteaura) ali s črkami (A, B, C, ...). Vsi razen dveh (haplotipa Boka in Y) so bili pri lipicancih ugotovljeni že v prejšnjih raziskavah (Kavar in sod., 1999; Kavar in sod., 2002).

1, stolpec C, vrstica Gidrane). Konji s haplotipom Y zato v rod Gidrane ne spadajo in bi jih bilo potrebno uvrstiti v nov rod. V rod Gidrane prav tako ne spadajo lipicanci s haplotipom Capriola.

V rodu Deflorata je situacija nekoliko drugačna. Za ta rod je zelo verjetno značilen haplotip Capriola, zato lipicanci z drugačnimi haplotipi v ta rod ne sodijo. V primeru vzorcev s haplotipi Betalka je do pomote prišlo le pri razvrščanju po rodovih kobil v Rodovni knjigi. Vzorcji s haplotipom Betalka se po rodovniških podatkih uvrščajo v klasičen rod Capriola in ne v rod Deflorata. Rodovniške podatke potrjujejo tudi genetski. Za rod Capriola je namreč značilen prav haplotip Betalka (Kavar, 2000). Predvidevamo, da je do napake v Rodovni knjigi prišlo zaradi podobnih imen, ki se pojavljajo v rodovih Capriola in Deflorata. Predlagamo, da se lipicance s haplotipom Betalka iz rodu Deflorata uvrsti v klasičen rod Capriola.

Tretji primer neskladij med genetskimi in rodovniškimi podatki smo opazili znotraj rodu Munja, kjer je bil za eno linijo značilen haplotip Strana, za drugo pa haplotip Gaetana. Ker je haplotip Gaetana značilen za rod Gidrane, bi bil za rod Munja lahko značilen haplotip Strana. Še posebej, ker haplotipa Strana v drugih lipicanskih rodovih ne zasledimo. Predlagamo, da se lipicance s haplotipom Gaetana uvrsti v rod Gidrane, lipicanci s haplotipom Strana pa naj ostanejo v rodu Munja.

Nadaljnja tri neskladja smo opazili v rodovih Sardinia, Argentina in Europa, ko smo haplotipe, ki smo jih našli pri lipicancih slovenske reje, primerjali s haplotipi lipicancev iz osmih evropskih lipicanskih kobilarn (Piber, Monterotondo, Đakovo, Szilvasvarad, Topolcianky, Beclean in Fagaras).

Vsi lipicanci slovenske reje iz rodu Sardinia se uvrščajo v isto izmed treh že dalj časa ločenih vej znotraj rodu Sardinia, in za vse lipicance iz te veje je značilen haplotip Betalka. Lipicanci iz drugih evropskih kobilarn se v glavnem uvrščajo v preostali dve veji, in imajo haplotip Capriola. Kakšen haplotip je imela začetnica rodu Sardinia ne vemo zanesljivo, ker možnosti, da je bilo v rodovniku roda Sardinia več napak, ne moremo izključiti. V primeru, da je v tem rodu res prišlo samo do ene napake, je Sardinia imela haplotip Capriola, torej najpogostejši haplotip pri lipicancih, značilen za več kot četrtino lipicancev (Kavar in sod., 2002). Za oba haplotipa (Capriola in Betalka) velja, da so jih imeli lipicanci že vsaj pred dvestotimi leti, in da zato oba nedvomno spadata med haplotipe, značilne za klasične lipicanske rodove.

Znotraj rodu Argentina je za vejo, v katero se uvrščajo vsi lipicanci slovenske reje, značilen haplotip Capriola. Torej haplotip, ki je značilen še za nekaj drugih lipicanskih rodov. Pri vzorcih iz druge linije smo našli, bodisi haplotip Capriola, bodisi haplotip X. Ker je bil haplotip X značilen za vzorce iz italijanske kobilarne Monterotondo, v kateri naj bi bili bolj ali manj le lipicanci, ki izvirajo iz stare lipicanske črede, menimo, da je haplotip X tudi eden od haplotipov, značilnih za klasične rodove kobil. Zato je možno, da v Sloveniji ni lipicancev iz klasičnega rodu kobil z značilnim haplotipom X.

Tretje neskladje smo opazili v rodu Europa, kjer so vsi lipicanci slovenske reje imeli haplotip Trompeta, medtem ko so lipicanci iz istega rodu v drugih državah imeli haplotip U. Ime Trompeta je bilo pogosto tako pri prednicah lipicancev s haplotipom Trompeta, kot pri lipicancih s haplotipom U. Rodovniki lipicancev s haplotipom U so znani do začetka 19. st. in vemo tudi, da so lipicance s haplotipom U imeli že v stari Lipici. Haplotip U zato lahko brez večjega tveganja uvrstimo med haplotipe, značilne za klasične rodove, česar pa za haplotip Trompeta ne moremo reči. Rodovniki lipicancev s haplotipom Trompeta so znani samo do Triglave, roj. leta 1916. Njeni potomci so živeli v kobilarnah v Stančič in Seleš, in so v Lipico prišli šele po 2. svetovni vojni. Haplotip Trompeta se zato verjetno uvršča med haplotipe, značilne za rodove kobil hrvaškega izvora. Predlagamo tudi, da se lipicance s haplotipom Trompeta uvrsti v nov rod, in ne več v rod Europa.

V primeru vzorcev iz rodu Margit, kjer smo prav tako opazili dva različna haplotipa (C in D) gre lahko spet za napako v rodovnikih, možno pa je tudi, da je prišlo do nove mutacije znotraj istega rodu. Razlika med haplotipoma C in D je namreč na enem samem nukleotidnem mestu.

Na splošno lahko rečemo, da število napak ni veliko, in da bi bilo zaradi tega smiselno narediti nekaj popravkov, s katerimi bi uskladili rodovniške podatke o rodu kobil z genetskimi podatki (haplotipi). V nasprotnem primeru se bodo vse napake ohranjale tudi v naslednjih generacijah lipicancev. Naj omenimo še, da neskladje genetskih in rodovniških podatkov ni specifičen problem lipicanske pasme. Do zelo podobnih ugotovitev so prišli tudi s preverjanjem arabskih rodov kobil (Bowling in sod., 2000) in rodov kobil pri angleških polnokrvnih konjih (Hill in sod., 2002).

Izvor lipicanskih haplotipov

Lipicanski haplotipi se uvrščajo v štiri glavne skupine haplotipov: C1, C2, C3 in C4 (slika 1). Vsako skupino haplotipov povezujejo iste skupne mutacije. Npr. haplotipe iz skupine C4 povezujejo mutacije na mestih 15494, 15496, 15534, 15603, 15635, 16407 in 16563a (preglednica 2), ki so se zgodile in fiksirale pri skupnih prednikih po materini strani današnjih konj s haplotipi iz skupine C4.

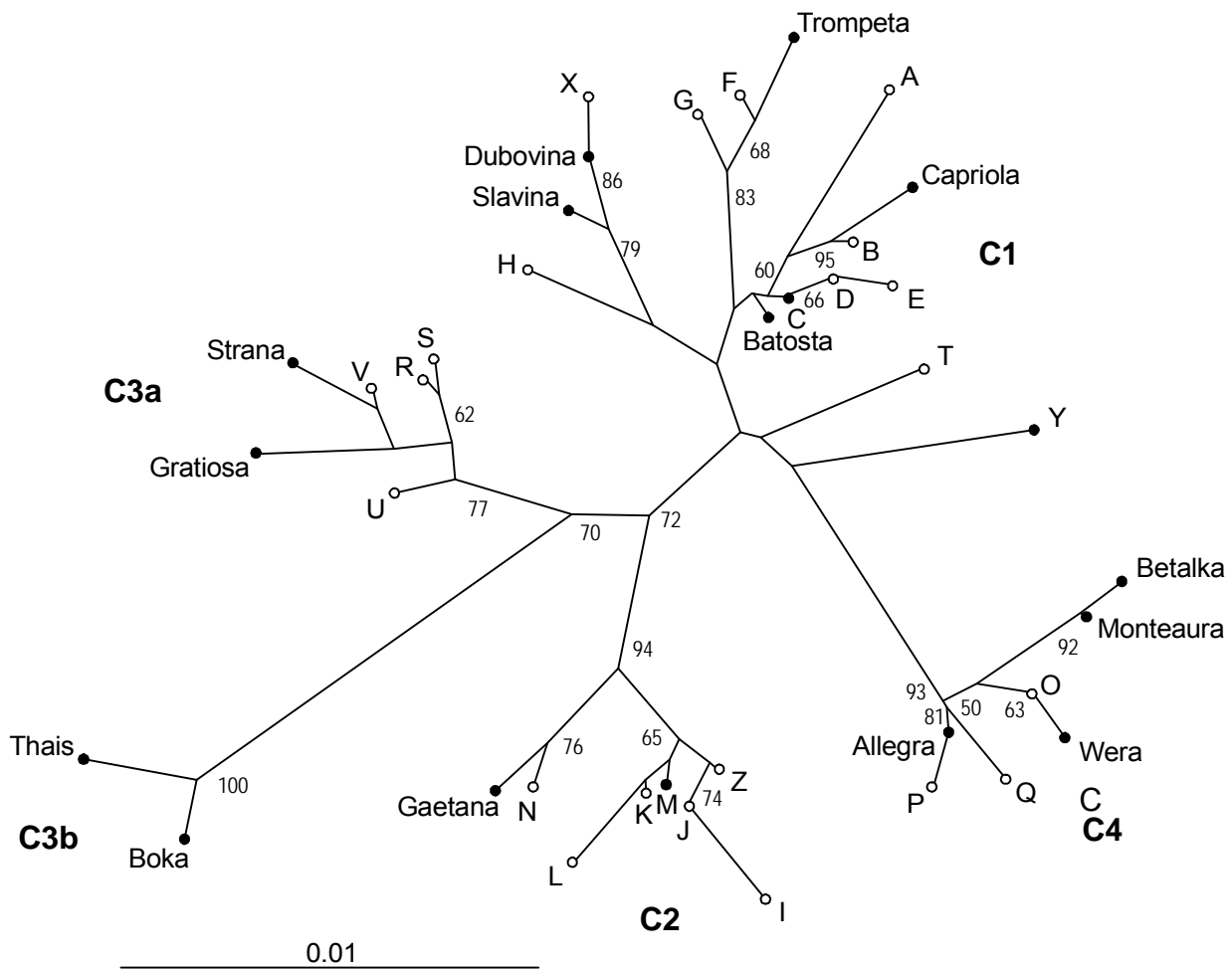
Kaže, da imajo lipicanci skupne bližnje prednike z drugimi domačimi konji, saj je primerjava lipicanskih haplotipov s haplotipi drugih pasem konj pokazala, da so lipicanski haplotipi zelo podobni, večkrat tudi enaki haplotipom, ki so jih našli pri drugih pasmah konj. Ti skupni bližnji predniki domačih konj so bili verjetno udomačeni v obdobju pred okrog 6000 do 4000 leti (Clutton-Brock, 1999). Genetski podatki kažejo, da je bilo udomačenih veliko število konj iz več različnih populacij divjih konj (Vila in sod., 2001; Jansen in sod., 2002)

Ker so se v preteklosti verjetno dogajale številne migracije konj, je danes skupine haplotipov zelo težko povezati z določeno fenotipsko skupino konj (poniji, orientalski konji, težki hladnokrvni konji, itd.). Običajno namreč v večini pasem ugotovijo haplotipe iz vseh štirih glavnih skupin haplotipov (C1-C4), tako kot smo to ugotovili tudi pri lipicancih. Do nedavnega je zato prevladovalo mnenje, da vsi domači konji izvirajo iz ene večje populacije divjih konj. Ta naj bi vsebovala konje s haplotipi iz vseh štirih glavnih skupin (Lister, 1998); pri čemer naj bi različne fenotipske skupine nastale šele po udomačitvi konj s kombinacijo umetne in naravne selekcije (prilagoditev na okoljske dejavnike) (Clutton-Brock, 1999). Zadnja raziskava (Jansen in sod., 2002) pa kaže, da nekaj povezav med skupinami haplotipov in geografskim izvorom oz. fenotipsko skupino le obstoji.

Tako naj bi bila skupina haplotipov C3a (slika 1) značilna predvsem za konje iz srednje Evrope, Britanskega otočja, Skandinavije in Islandije, oz. za »exmoor«, fjordske, islandske in škotske »highland« ponije (Jansen in sod., 2002). V to skupino se uvrščata tudi dva haplotipa lipicancev slovenske reje. Haplotip Strana, ki je značilen za hrvaški rod Munja, ter haplotip Gratirosa, ki je značilen za arabski rod Mercurio. Jansen in sod. (2002) to skupino imenujejo C1, skupino, ki jo bomo omenjali v naslednjem odstavku pa D1.

Ker naj bi pri nastanku lipicancev sodelovali tudi španski konji, je za nas zanimiva ugotovitev, da naj bi bila za iberijske (andaluzijske in lusitano konje) ter severno-afriške konje berbere značilna skupina haplotipov C4 oz. predvsem haplotipa Allegra in Monteaura (Jansen in sod., 2002). Oba haplotipa smo našli tudi pri lipicancih slovenske reje. Haplotip Allegra je bil značilen za pet rodov, med drugim tudi za klasična rodova Englanderia in Stornella, ki izvirata iz češke kobilarne Kladruby (preglednica 1). Ker naj bi v tej kobilarni imeli predvsem konje španskega porekla, haplotip Allegra v rodovih Englanderia in Stornella ne preseneča. Haplotip Monteaura, ki naj bi bil prav tako značilen za španske oz. severno-afriške konje, smo našli v kraškem rodu Spadigla. To lahko pomeni, da rod Spadigla izvira iz španskih konj, ki naj bi jih v 16., 17., ali 18. stoletju uvozili iz Španije. Skoraj enako verjetna se nam zdi tudi možnost po kateri naj bi haplotip Monteaura sicer izhajal iz konj, ki so bili udomačeni na področju severne Afrike, vendar naj bi konji s tem haplotipom v naše kraje prišli že prej, lahko tudi pred več tisoč leti. Haplotip Monteaura namreč sodi med tiste haplotipe, ki so pri domačih konjih zelo pogosti.

Znanih je vsaj okrog 17 takih zelo pogostih haplotipov (Jansen in sod., 2002). Od lipicanskih haplotipov, poleg haplotipa Monteaura, mednje lahko uvrstimo vsaj še haplotipe Gaetana, Allegra, Capriola in Dubovina. Za te zelo pogoste haplotipe velja, da jih lahko najdemo v fenotipsko zelo različnih pasmah. Menimo, da so take haplotipe imeli že vsaj prvi udomačeni konji. Gre torej za »starejše« haplotipe, iz katerih so kasneje, z novimi mutacijami, nastajali »novejši« haplotipi. Dva taka tipična primera »novejših« haplotipov zasledimo tudi pri lipicancih slovenske reje. Tako naj bi haplotip Betalka nastal iz haplotipa Monteaura, haplotip X pa iz tudi zelo pogostega haplotipa Dubovina, ki je tudi zelo pogost pri domačih konjih. Tako haplotip Betalka kot haplotip X sodita med bolj redke haplotipe. Haplotip Betalka smo našli samo pri lipicancih, haplotip X pa še pri konju z oznako PO2 (Mirol in sod., 2003). Menimo, da nam bodo prav taki novejši haplotipi, zaradi večje specifičnosti, v prihodnosti v pomoč pri ugotavljanju migracij in povezav med pasmami.



Slika 1. Odnosi med 39 lipicanskimi haplotipi mitohondrijske DNK predstavljeni z NJ drevesom. Sedemnajst haplotipov lipicancev slovenske reje je označenih s črnimi krogi.

Figure 1. Relationship among 39 Lipizzan mitochondrial DNA haplotypes presented by NJ tree. The circles representing 17 haplotypes of Slovenian Lipizzan are black.

Opazili smo tudi nekaj povezav med haplotipi in pasmo, iz katere naj bi izvirali lipicanski rodovi. Tako je bil najbolj pogost haplotip v populaciji arabskih konj, registriranih v ZDA s 16 % prav haplotip, ki smo ga pri lipicancih poimenovali Gaetana (Bowling in sod., 2000).

Značilen je za lipicanski rod arabskega izvora Gidrane (preglednica 1). Po rodovniških podatkih naj bi bila začetnica tega rodu polnokrvna arabka OX Gidrane. Zato ta povezava med lipicansko in arabsko pasmo verjetno ni zgolj naključna. Verjetno tudi ni naključje, da smo pri kladrubskih konjih zasledili haplotipa Batosta in Slavina. Torej enaka haplotipa kot v klasičnih lipicanskih rodovih kladrubskega porekla: Africa in Almerina (preglednica 1). Da gre za naključje je malo verjetno še posebej zato, ker oba haplotipa spadata med zelo redke haplotipe, in jih razen pri kladrubskih in lipicanskih konjih še niso našli.

O izvoru v lipicanski pasmi najbolj pogostega haplotipa Capriola, ki je značilen za več lipicanskih rodov kobil, med drugimi tudi za kraški rod Argentina, danski rod Deflorata in kladrubski rod Presciana, lahko samo ugibamo, saj tudi haplotip Capriola spada med zelo pogoste haplotipe pri domačih konjih. Našli so ga denimo pri Connemara ponijih, trakencih, fjordskih ponijih, dülmenerskih konjih, holštajncih, arabcih in berberih.

VIRI

- Bowling, A.T./ Del Valle, A./ Bowling, M. A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. *Anim. Genet.*, 31(2000)1, 1–7.
- Clutton-Brock, J. A natural history of domesticated mammals, 2nd edn. Cambridge, New York, Melbourne, Cambridge University Press, 1999, 238 s.
- Dolenc, M. Lipica. Ljubljana, Mladinska knjiga, Lipica: kobilarna, 1980, 96 s.
- Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c., Univ. of Washington, Dept. of Genetics, Seattle, 1993.
- Hill, E.W./ Bradley, D.G./ Al-Barody, M./ Ertugrul, O./ Splan, R.K./ Zakharov, I./ Cunningham, E.P. History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Animal Genetics*, 33(2002), 287–294.
- Jansen, T./ Forster, P./ Levine, M.A./ Oelke, H./ Hurler, M./ Renfrew, C./ Weber, J./ Olek, K. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(2002)16, 10905–10910.
- Kavar, T. Ocena genetske raznolikosti v populaciji konj lipicanske pasme. Doktorska disertacija. Domžale, Univ. v Ljubljani, 2001, 118 s.
- Kavar, T./ Brem, G./ Habe, F./ Sölkner, J./ Dovč, P. History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. *Genet. Sel. Evol.* 34(2002), 635–548.
- Kavar, T./ Habe, F./ Brem, G./ Dovč, P. Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. *Anim. Genet.* 30(1999), 423–430.
- Lister, A.M./ Kadwell, M./ Kaagan, L.M./ Jordan, W.C./ Richards, M.B./ Stanley, H.E. Ancient and modern DNA in a study of horse domestication. *Ancient Biomolecules*, 2(1998), 267–280.
- Mirol, P.M./ Peral García, P./ Vega-Pla, J.L./ Dulout, F.N. Phylogenetic relationship of Argentinean Creole horses and other South American and Spanish breeds inferred from mitochondrial DNA sequences. *Anim. Genet.*, 33(2002), 356–363.
- Ouhlela, J. Züchterische Standards in der Lipizzanerpferde-population. Habilitationsarbeit Brno – Piber, Fachtierarzt für Pferde und Tierzucht, 1996, 120 s.
- Page, R.D.M. Treeview (Win32), University of Glasgow, Division of Environmental and Evolutionary biology Institute of Biomedical and Life Sciences, Glasgow, 1998.
- Pangos, J. Rodovna knjiga lipicancev slovenske reje. Lipica, Kobilarna Lipica, 1999, 254 s.
- Vila, C./ Leonard, J.A./ Gotherstrom, A./ Marklund, S./ Sandberg, K./ Liden, K./ Wayne, R.K./ Ellegren, H. Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*, 291(2001), 474–477.
- Xu, X./ Arnason, U. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene*, 148(1994), 357–362.

RAZGRADNJA KSILANA Z RAZLIČNIMI KSILANAZAMI VAMPNE BAKTERIJE *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

Tadej ČEPELJNIK^{a)}, Katarina FIDLER^{b)} in Romana MARINŠEK-LOGAR^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, mag., e-pošta: tadej.cepeljnik@bfro.uni-lj.si.

^{b)} Volčji Potok 30, SI-1240 Kamnik, Slovenija.

^{c)} Isti naslov kot ^{a)}, doc., dr., mag.

Delo je prispelo 31. oktobra 2004, sprejeto 10. decembra 2004.

Received October 31, 2004, accepted December 10, 2004.

IZVLEČEK

Uporaba ksilanaz kot krmnih dodatkov je pri monogastričnih živalih zelo obetavna, saj so njihov ugoden učinek na zdravstveno stanje in prirast živali potrdile številne raziskave. Pred kratkim je bila opisana nova vrsta vampne bakterije *P. xylanivorans* s tipskim sevom Mz5^T, ki je močno ksilanolitična. Nekaj njenih ksilanolitičnih encimov je že opisanih, preiskati pa želimo še ostale, da bi ugotovili vzrok visoke ksilanolitične aktivnosti in možnosti uporabe bakterije kot probiotika pri monogastričnih živalih (prašiči, perutnina) ali encimov kot krmnih dodatkov. Iz celičnega izvlečka smo uspeli delno očistiti ksilanazi, veliki 44 kDa in 81 kDa in delno proučiti njuno encimsko delovanje. Primerjali smo tudi encimsko delovanje na celično površino vezanih ksilanaz s ksilanazami celičnega izvlečka. 44 kDa ksilanaza je eksoksilanaza brez β-ksilozidazne aktivnosti, pri ksilanazi velikosti 81 kDa predvidevamo, da gre za endoksilanazo. Ksilanolitični encimi celične površine učinkovito razgrajujejo ksilan, vendar niso sposobni cepiti ksilobioze. Le-to razgradijo ksilanolitični encimi v notranjosti celice.

Ključne besede: mikrobiologija / anaerobne bakterije / *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* / ksilanaze / ksilan / vamp

XYLAN DEGRADATION BY DIFFERENT XYLANASES OF RUMEN BACTERIUM *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

ABSTRACT

The use of xylanases as feed additives for monogastric animals is very promising. Many experiments have proved their beneficial effect on animal health and performance. A new rumen bacterium species has recently been isolated: *P. xylanivorans*, type strain Mz5^T, which has a very high xylanolytic activity. Some of its xylanolytic enzymes have already been described. We want to analyse the rest of them to find the reason for its high xylanolytic activity and to assess the possibilities of using this bacterium as a probiotic for monogastric animals (pigs, poultry) or its enzymes as feed additives. We have partially isolated two xylanases from the cell extract: 44 kDa and 81 kDa and examined their properties. We also compared enzyme activities of cell surface xylanases with xylanases in cell extract. The 44 kDa xylanase is an exoxylanase without β-xylosidase activity. We assume that the 81 kDa xylanase is an endoxylanase. Xylanolytic enzymes on the cell surface are efficient xylan degraders, but they are unable to degrade xylobiose. Xylobiose is degraded by xylanolytic enzymes inside the cell.

Key words: microbiology / anaerobic bacteria / *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* / xylanases / xylan / rumen

UVOD

Rastlinojede živali so popolnoma odvisne od mikrobne razgradnje rastlinskih polisaharidov, saj nimajo lastnih encimov za razgradnjo le-teh (Hobson, 1997). V ta namen so se razvile številne prilagoditve prebavil, ki omogočajo mikrobno fermentacijo. Predželodčna fermentacija poleg izrabe kratkoverižnih maščobnih kislin in vitaminov rastlinojedim živalim omogoča tudi izrabo mikrobne biomase kot vir proteinov. Najbolj razvito obliko predželodčne fermentacije najdemo pri prežvekovalcih: razvil se je poseben del prebavil – vamp (Flint, 1997).

Največji delež krme prežvekovalcev predstavljajo ogljikovi hidrati, najpogosteje celuloza, hemiceluloze, škrob in pektin, (Chesson in Forsberg, 1997). Poglavitna sestavina rastlinskih hemiceluloz so ksilani – za celulozo drugi najpogostejši obnovljivi polisaharidi v naravi (Biely, 1985). Struktura ksilanov je variabilna, od linearnih 1,4- β glikozidno vezanih verig poliksiloze do močno razvejanih heteropolisaharidov, pri katerih se na osnovno verigo D-ksiloznih ostankov vežejo različne substituenti (Biely, 1985). Substituenti se lahko na ksilozne ostanke vežejo z glikozidnimi vezmi (L-arabinoza, glukuronska kislina ali 4-O-metil glukuronska kislina), z estrsko vezjo (ocetna kislina) ali z etrskimi vezmi prek L-arabinoze (ferulna kislina, *p*-kumarna kislina) (Puls in Poutanen, 1989; Kulkarni in sod., 1999). Ferulna in *p*-kumarna kislina lahko med dvema fenolnima kislinama tvorita mostič, kar je ključno za povezovanje ksilanskih verig med seboj (Malburg in sod., 1992). Ksilan trav in žitaric, ki predstavlja pomemben delež v krmi prežvekovalcev, je arabinoksilan. Njegov delež pri travah je 20-40 % snovi celične stene (Hespell in Whitehead, 1990).

Zaradi zapletene sestave ksilana je za njegovo učinkovito razgradnjo potrebno sinergistično delovanje več različnih encimov. Ena od strategij mikroorganizma za razgradnjo tako heterogenega substrata je produkcija več oblik encimov s specializiranimi funkcijami. Multiple oblike ksilanaz (običajno tri do pet ksilanaz na mikroorganizem) so prisotne pri mnogih mikroorganizmih, tudi pri vampnih bakterijah (Wong in sod., 1988).

Mikrobne encime, ki hidrolizirajo ksilan, delimo v dve skupini. Prva zajema encime, ki cepijo osnovno verigo ksilana, druga encime, ki odcepljajo stranske skupine. Te imenujemo tudi pomožni ksilanolitični encimi (Bajpai, 1997). Osnovno verigo ksilana cepijo endo-1,4- β -ksilanaze, β -ksilozidaze in eksoksilanaze. Endo-1,4- β -ksilanaze katalizirajo hidrolizo 1,4- β -D-glikozidnih vezi v glavni verigi ksilana (Hespell in Whitehead, 1990). β -ksilozidaze hidrolizirajo krajše ksilooligosaharide, največkrat ksilobiozo do ksiloze (Bajpai, 1997). Eksoksilanaze odcepljajo ksilozilne ostanke od konca verige ksilooligomerov (Reilly, 1981).

Mikrobne ksilanaze so na osnovi sorodnosti aminokislinskih zaporedij uvrščene v družini 10 in 11 glikozidnih hidrolaz. Ti dve skupini med seboj nista sorodni. Ksilanaze iz družine 10 so večje in kompleksnejše in hidrolizirajo tako ksilan, neredko tudi celulozo in ostale polisaharide. Ksilanaze iz družine 11 hidrolizirajo le ksilan. Ksilanaze obeh družin imajo ohranitveni mehanizem delovanja: glikozidno vez hidrolizirajo tako, da se konfiguracija anomernega atoma C₁ ohrani (Davies in Henrissat, 1995).

Mikrobni ksilanolitični encimi so že prodrli v marsikatero industrijsko panogo. Zelo obetavno področje uporabe je papirna industrija, kjer v postopku beljenja celulozne kaše ksilanaze lahko učinkovito nadomestijo toplotno obdelavo in kemijske oksidante za prekinitve vezi med celulozo in ligninom. V prehrabeni industriji uporabljajo ksilanaze skupaj s celulazami in pektinazami za bistrenje piva, mošta in sadnih sokov ter za utekočinjenje sadnih in zelenjavnih kaš (Kulkarni in sod., 1999, Beg in sod., 2001). Ksilanolitični mikroorganizmi (oz. encimi) bi lahko pripomogli k biokonverziji rastlinskih odpadkov v dostopnejše oligo- in monosaharide. Le-te bi lahko izkoristili kot substrat za namnoževanje industrijsko zanimivih mikroorganizmov (Vazquez in sod., 2000). V raziskovalne namene ksilanaze uporabljajo za odstranjevanje rastlinske celične stene pri pridobivanju protoplastov (Beg in sod., 2001).

Zelo obetavno je tudi področje uporabe ksilanaz kot krmnih dodatkov. Krmljenje živali z žiti zaradi prisotnosti hemiceluloznih sestavin pogosto vodi do povečane viskoznosti črevesne vsebine, kar zmanjšuje dostopnost hrane za prebavne encime, zmanjšuje možnost absorpcije prebavljene hrane ter omogoča nastanek primerne okolja za patogene mikroorganizme. To je predvsem težava neprežvekovalcev, saj nimajo indigene mikroflore, ki bi bila sposobna razgraditi vlaknine iz krme. Encimski krmni dodatki (pogosto tudi ksilanaze) lahko zmanjšajo zdravstvene težave (driska, ki je posledica naselitve patogenih mikroorganizmov) (Bedford, 2000). Omogočajo tudi boljše izrabo krme z nizko hranilno vrednostjo in zmanjšujejo variacije v prirastu živali. Tako je kombinacija uporabe ksilanaze in fitaze pri brojlerjih privedla do hitrejše izpostavitve fitata hidrolizi in s tem povečala prirast (Bedford, 2000). Dodatek ksilanaz in β -glukanaz v rženo krmo brojlerjev je prav tako zmanjšal viskoznost črevesne vsebine in povečal povprečen dnevni prirast živali (Lázaro in sod., 2004). Tudi dodatek ksilanaz v krmo rac, ki je vsebovala velik delež vlaknin, je znatno izboljšal energetske izrabo krme (Adeola in Bedford, 2004). Dodajanje fibrolitičnih encimov pa ima ugodne učinke tudi pri prežvekovalcih. Dodatek fibrolitičnih encimov (celulaze, ksilanaze) v krmo krav mlekaric je povečal število vampnih bakterij, ki razgrajujejo hemiceluloze in sekundarne produkte razgradnje celuloze (Nsereko in sod., 2002).

MATERIAL IN METODE

Priprava encimskih vzorcev 44 kDa in 81 kDa ksilanaze

44 kDa ksilanazo in celični izvleček smo pripravili kot smo predhodno opisali (Čepeljnik in sod., 2002).

81 kDa ksilanazo smo očistili po sledečem postopku: bakterijo *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T smo gojili pri 37 °C v anaerobnih razmerah v 700 ml delno spremenjenega gojišča M330 (DSM Catalogue of strains, medium 330). Glukozo, maltozo, celobiozo in topni škrob smo nadomestili s ksilanom ovsenih plev v koncentraciji 5 g/l. Po 48 urah gojenja smo celice ločili od gojišča s centrifugiranjem pri 4 °C, 4000 × g, 15 minut. Bakterijske celice smo dvakrat sprali v 50 mM natrij fosfatnem pufru, pH = 6,5 (NaFP). Nato smo pelet resuspendirali v 70 ml bidestilirane vode, ga dvakrat zamrznili (-20 °C) in odmrznili ter nazadnje izpostavili ultrazvoku v ultrazvočni kopeli za 10 minut. Po centrifugiranju (4 °C, 12500 × g, 30 minut) smo pelet zavrgli. Iz supernatanta (celični izvleček) smo z dodajanjem amonijevega sulfata (AS) postopno oborili proteine. Tiste, ki so se oborili med 40- in 60-odstotno nasičenostjo, smo ponovno raztopili v NaFP in razsolili z dializo. Tako pripravljen vzorec smo nanegli na uravnoteženo kolono CIM[®] DEAE-8 (BIA Separations, Slovenija), ki omogoča ločevanje proteinov glede na njihov naboj. Vezane proteine smo nato spirali z linearno naraščajočo koncentracijo NaCl od 0 do 1 M v 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 v 50 ml pri pretoku 4 ml/min. Sprane proteine smo zbirali v frakcijah po 1,5 ml. S presejalnim testom (Marinšek Logar, 1999) smo določili pet ksilanolitično aktivnih frakcij, jih združili in jih razsolili z dializo. Celoten razsoljen vzorec (7,5 ml) smo ponovno nanegli na predhodno uravnoteženo kolono CIM[®] DEAE-8 in ponovili kromatografijo pri istih pogojih, le da je ta pufer imel pH 6,8.

Vzorec površinskih proteinov smo pripravili po rahlo spremenjenem postopku, kot so ga opisali Rincón in sod. (2004). Po 24 urah gojenja smo celice s centrifugiranjem pri 4 °C, 10000 × g, 15 minut, ločili od gojišča. Pelet smo dvakrat sprali v 25 mM pufru Tris-HCl, pH 7,0 s 150 mM NaCl in ga nato resuspendirali v 35 ml 25 mM Tris-HCl, pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 % (m/v) N-lauril sarkozin, 1 mM PMSF (fenilmetansulfonil fluorid) in mešanico eno uro inkubirali na ledu, jo na hitro premešali in centrifugirali pri 4 °C, 10000 × g, 15 minut in nato še 30 minut pri 12500 × g. Supernatant je predstavljal pripravek površinskih proteinov. Pred analizo vzorca

z NaDS-PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom) smo del pripravka skoncentrirali z ultrafiltracijo. Uporabili smo mikrocentrifugirke (Vivascience, VS0101) z vgrajenim ultrafiltrom z velikostjo por 10 kDa in centrifugirali 5 minut pri $12000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentriran vzorec smo uporabili za encimogram, nekoncentriranega za barvanje proteinov s koloidnim srebrom.

Encimski testi

Encimsko aktivnost izolirane ksilanaze smo določili z metodo redukcijskih sladkorjev (Lever, 1977) in jo izrazili kot nkat/mg (količina sproščenih redukcijskih koncev na sekundo in mg proteinov. Osnovni test je bil izveden v NaFP, pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ksilanom ovsenih plev (1 % (m/v)) kot substratom.

Za določanje pH optimuma smo vzorce inkubirali s substratom v 50 mM NaFP (pH 4,08; 4,59; 5,07; 5,53; 6,04; 6,53; 6,92) ali pa v 20 mM TRIS pufrih (pH 7,09; 7,28; 7,44; 7,5; 8,0; 8,54; 9,0). Za določanje temperaturnega optimuma smo vzorce inkubirali s substratom pri temperaturah $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $39\text{ }^{\circ}\text{C}$, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ostale razmere so ostale nespremenjene. Vse encimske teste smo naredili v štirih ponovitvah.

Sledenje produktov encimskega delovanja

Vzorce encimov smo inkubirali 24 ur s substratom (1 % (m/v) ksilanom ovsenih plev, ksilobiozo, ksilotriozo, ksilotetraozo oz. ksilopentaozo). Po 20 μl vzorcev smo nanegli na stekleno ploščo, ki je bila prekrita s silikagelom (Merck) in razgradne produkte ločili s tankoplastno kromatografijo (Christov in sod., 2000).

Ksilanogrami

Proteine smo ločili z denaturirajočo elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata v reducirajočih razmerah (Laemmli, 1970) na 10 % (m/v) poliakrilamidnih gelih, v katere smo predhodno vključili ksilan ovsenih plev. Kot proteine znanih molekulskih mas (MW) smo uporabili Protein Ladder 10–200 kDa (Fermentas #SM0661). Aktivne ksilanaze smo vizualizirali po renaturaciji elektroforetskih gelov, inkubaciji 4 ure pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in barvanju z barvilom kongo rdeče (Wood, 1980). Kadar smo želeli zaznati vse prisotne proteine, gelov nismo razvili kot ksilanogram, temveč smo jih pobarvali s koloidnim srebrom (Merril in sod., 1981).

REZULTATI IN RAZPRAVA

Bakterija *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T ima vsaj 7 elektroforetsko različnih ksilanaz, ki ta sev uvrščajo med najaktivnejše bakterijske razgrajevalce ksilana v vampu (Marinšek-Logar in sod., 2000). Namen naše raziskave je bil proučiti delovanje posamičnih encimov.

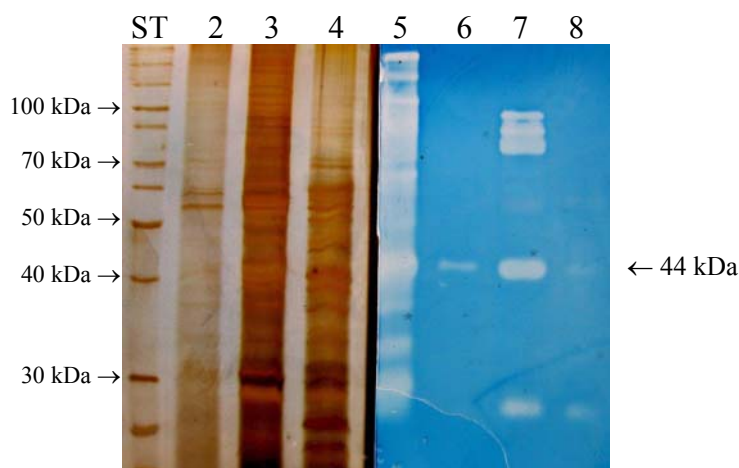
Zato smo se lotili izolacije posamičnih ksilanaz. 44 kDa encim smo predhodno opisali (Čepeljnik in sod. 2002) kot 50 kDa ksilanazo, vendar smo tokrat uporabili standardno mešanico več proteinov z znanimi molekulskimi masami in tako točneje izračunali novo MW. Izolacijo pa smo ponovili po istem postopku.

Izolirani ksilanazi smo določili tudi optimalno temperaturno in pH območje delovanja. Največjo aktivnost (100 %) smo izmerili pri temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. V območju med $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaže več kot 80-odstotno aktivnost, že pri $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa je aktivnost le še 60-odstotna. Pri nižjih temperaturah ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$) je aktivnost okoli 20-odstotna in pri $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ okoli 10-odstotna. Pri $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ksilanaza skoraj popolnoma izgubi aktivnost (0,7 %).

Pri določanju optimalnega pH smo največjo aktivnost 44 kDa ksilanaze izmerili pri pH 6,04 (= 100 %), pri pH 6,53 je aktivnost 99-odstotna. Med pH 5,53 in 7,09 je aktivnost okoli 80-

odstotna in v območju med pH 5,07 in 7,80 več kot 60-odstotna. Pri pH vrednostih manj od 5,07 in nad 8,50 aktivnost močno upade. Pri pH 4,59 zaznamo 30 % aktivnost in pri pH 4,08 le še 2 % aktivnost. Pri pH 8,50 je aktivnost 30 %, pri pH 9,00 pa le še okoli 5-odstotna.

Izolacije novih ksilanaz smo se lotili s postopnim obarjanjem proteinov iz celičnega izvlečka 48-urne kulture. Pri 20-odstotni nasičenosti z AS smo iz celičnega izvlečka 48-urne kulture oborili velik del proteinov, vključno z večino ksilanaz. V naslednji stopnji, od 20 do 40 % nasičenosti, je bilo prisotnih mnogo manj proteinov in le ena ksilanaza (44 kDa). Obarjanje smo nadaljevali do 60 % nasičenosti in skupaj z vsaj 5 ksilanazami (120 kDa, 100 kDa, 81 kDa, 44 kDa in 30 kDa) ponovno oborili precejšen del proteinov. Pri 80 % nasičenosti je bilo ponovno prisotnih manj proteinov in dve ksilanazi: že opisana ksilanaza velikosti 30 kDa (Čepeljnik in sod., 2004) in 44 kDa ksilanaza (slika 1).



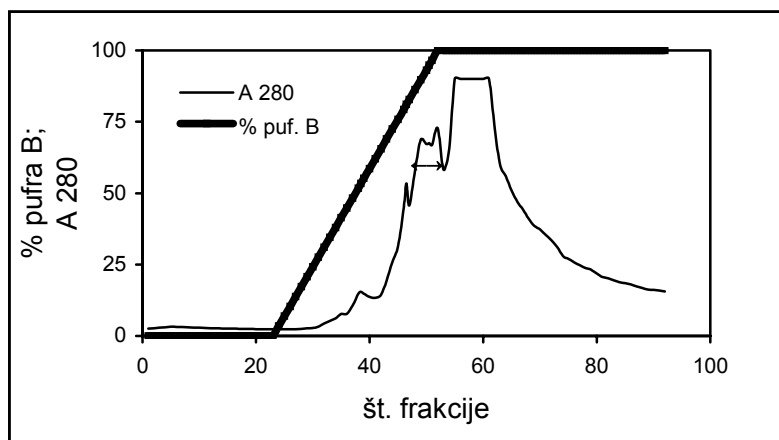
Slika 1. NaDS-PAGE analiza oborjenih proteinov iz celičnega izvlečka pri različnih stopnjah nasičenosti z AS. V žepke koncentrirnega NaDS-PAGE gela smo nanegli po 50 μ l vzorcev. Po elektroforezi smo polovico 10 % ločevalnega gela pobarvali s koloidnim srebrom, drugo polovico pa smo razvili kot encimogram. Na progi ST so ločeni proteinski standardi z označenimi MW, na progi 5 proteini, ki so se oborili pri 20 % nasičenosti z AS. Sledijo proteini, oborjeni med 20-40 % nasičenostjo (progi 2 in 6), 40-60 % nasičenostjo (progi 3 in 7) in 60-80 % nasičenostjo (progi 4 in 8). S puščico na desni strani je označeno mesto na gelu, ki ustreza potovanju proteina z molekulsko maso 44 kDa.

Proteine, ki so se oborili med 40- in 60-odstotno nasičenostjo, smo ponovno raztopili v Na-fosfatnem pufru in razsolili z dializo. Razsoljen vzorec smo nanegli na kolono z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM[®] DEAE-8) in vezane proteine spirali z naraščajočo koncentracijo NaCl v elucijskem pufru s pH vrednostjo 7,5 (slika 2).

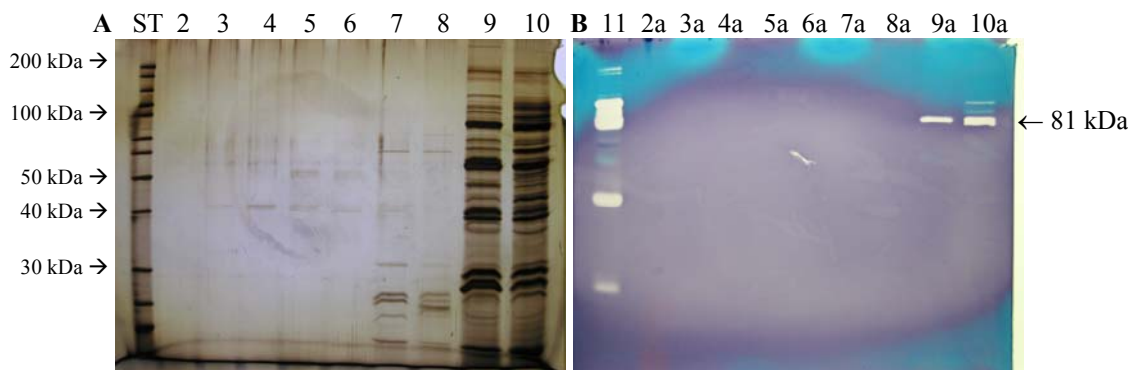
Preverili smo prisotnost ksilanolitične aktivnosti v zbranih frakcijah in proteine v najaktivnejših vzorcih ločili z elektroforezo. Barvanje s koloidnim srebrom je pokazalo, da je v frakcijah prisotnih mnogo različnih proteinov, na encimogramu pa smo ugotovili, da so v ksilanolitično aktivnih frakcijah prisotne močno aktivna ksilanaza velikosti 81 kDa in dve zelo šibko aktivni ksilanazi (100 kDa, 120 kDa) (slika 3).

Pet ksilanolitično aktivnih frakcij, od tiste nanešene na progi 9 pa do vključno tiste s proge 10 (slika 3), smo združili in jih razsolili z dializo. Celoten razsoljen vzorec (7,5 ml) smo ponovno nanegli na kolono CIM[®] DEAE-8. Ker so se ksilanolitični encimi v prvi kromatografiji razmeroma pozno sprali s kolone (med 70 in 80 % elucijskega pufra, kar pomeni med 0,7 M in 0,8 M NaCl), smo predvidevali, da so v takih razmerah ti proteini močno nabiti in se zato močno vežejo na nosilec. Glede na te rezultate smo predvidevali, da imajo izoelektrične točke v kislem območju pH. Zato smo v nadaljevanju izbrali elucijski pufer z nižjo pH vrednostjo, to je 6,8.

Pričakovali smo, da se bomo tako v naslednjem koraku znebili več ostalih neksilanolitičnih proteinov. Ponovili smo kromatografijo (slika 4) in ksilanolitične frakcije ponovno proučili na encimogramih (slika 5).



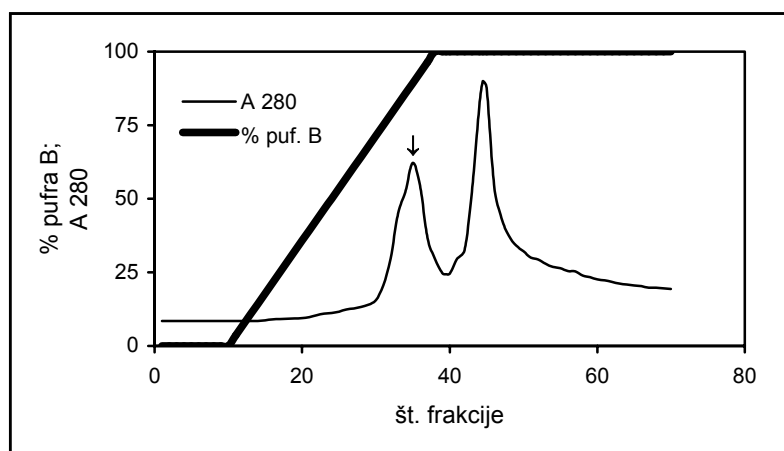
Slika 2. Ločevanje proteinov s tekočinsko kromatografijo na koloni z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM[®] DEAE-8). Na kolono smo nanegli 6 ml vzorca oborjenih proteinov iz celičnega izvlečka in nevezane proteine sprali s 50 ml pufra A (20 mM Tris, pH 7,5). Vežane proteine smo postopno spirali z naraščajočim gradientom od 0 % do 100 % pufra B v 50 ml pri pretoku 4 ml/min (debelejša črta). Koncentracijo spranih proteinov v frakcijah po 1,5 ml smo sledili z merjenjem absorbance pri 280 nm (tanjša črta). Puščici označujeta območje, v katerem smo na ksilanogramu zaznali ksilanolitično aktivnost (slika 3).



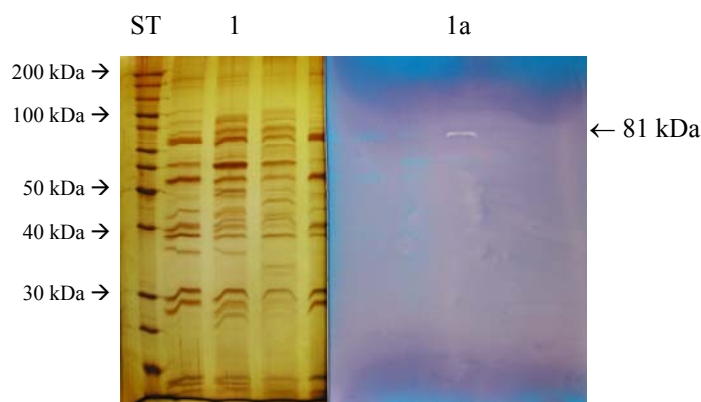
Slika 3. NaDS-PAGE analiza vzorcev po prvem ločevanju oborjenih proteinov na koloni z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM[®] DEAE-8). V žepke koncentriranega NaDS-PAGE gela smo nanegli po 50 μ l vzorcev. Po elektroforezi smo en 10 % ločevalni gel pobarvali s koloidnim srebrom (A) ter drugega razvili kot encimogram (B). Proga ST: proteinski standardi z označenimi MW; Proga 11: proteini, oborjeni v območju med 40 in 60 % nasičenosti z AS; proge 9,10 in 9a,10a: encimsko aktivni frakciji iz tekočinske kromatografije, proge 2-8 in 2a-8a: encimsko neaktivne ali slabo aktivne frakcije iz tekočinske kromatografije. S puščico na desni strani je označeno mesto na gelu, ki ustreza potovanju proteina z molekularno maso 81 kDa.

Tokrat je bila ksilanolitična aktivnost v zbranih frakcijah veliko manjša, na encimogramu pa smo uspeli vizualizirati le eno ksilanazo z molekularno maso 81 kDa. Na proteinskih gelih smo poleg ksilanaze zaznali še več drugih, neidentificiranih proteinov, ki pa niso razgrajevali ksilana (ena sama lisa na progi 1a, slika 5). Kljub temu je prisotnih precej manj ostalih proteinskih lis v primerjavi s prvo stopnjo čiščenja (proga 9, slika 3). Postopek izolacije bi lahko nadaljevali s kromatografijo na drugih nosilcih ali izbiro drugačnih pufrov, vendar smo opazili, da so

kvalitativno vidni izkoristki vedno manjši in je zaznana ksilanolitična aktivnost v gelih vedno šibkejša. Zato smo se zadovoljili z delno očiščenim encimskim pripravkom, ki smo ga uporabili za proučevanje cepitve ksilana z 81 kDa ksilanazo.



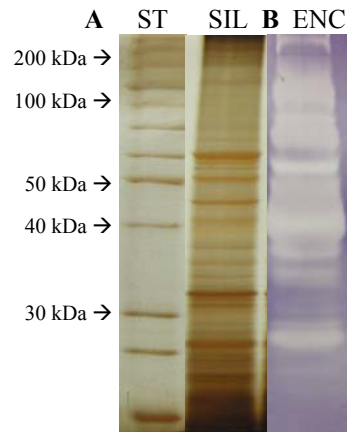
Slika 4. Nadaljevanje ločevanja proteinov s tekočinsko kromatografijo na koloni z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM[®] DEAE-8). Na kolono smo nanesti 7,5 ml vzorca razsoljenih združenih frakcij iz predhodne kromatografije. Nevezane proteine smo sprali s 50 ml pufra A (20 mM Tris, pH 6,8). Vezane proteine smo postopno spirali z naraščajočim gradientom od 0 % do 100 % pufra B v 50 ml pri pretoku 4 ml/min (debelejša črta na grafikonu). Koncentracijo spranih proteinov v frakcijah po 1,5 ml smo sledili z merjenjem absorbance pri 280 nm (tanjša črta na grafikonu). Puščica označuje frakcijo, pri kateri smo na encimogramu zaznali ksilanolitično aktivnost.



Slika 5. NaDS-PAGE analiza vzorcev po drugem ločevanju na koloni z nosilcem za šibko anionsko izmenjavo (CIM[®] DEAE-8). V žepke koncentrirnega NaDS-PAGE gela smo nanesti po 50 μ l vzorcev frakcij iz tekočinske kromatografije (slika 4). Po elektroforezi smo polovico 10 % ločevalnega gela pobarvali s koloidnim srebrom in drugo polovico razvili kot encimogram. Proga ST: proteinski standardi; progi 1 in 1a: le pri eni frakciji smo zaznali ksilanolitično aktivnost (1a), v njej je še vedno prisotnih precej različnih proteinov (1). Ostale proge: encimske aktivnosti v ostalih frakcijah nismo zaznali. S puščico na desni strani je označeno mesto na gelu, ki ustreza potovanju proteina z molekularno maso 81 kDa.

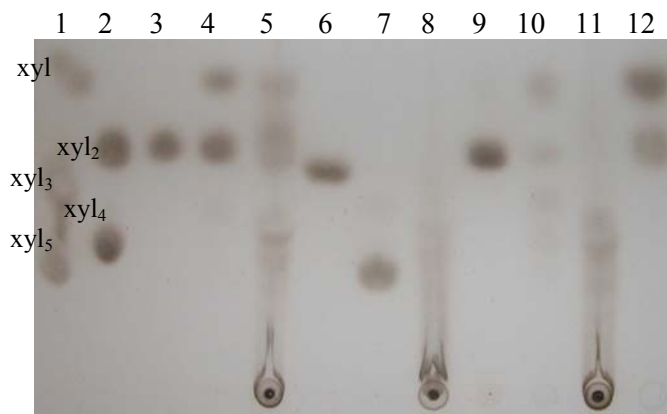
Pripravek površinskih proteinov, pripravljen po postopku, ki so ga opisali Rincon in sod. (2004), iz 24-urne kulture *P. xylanivorans* Mz5^T, je na ksilanogramu pokazal enak vzorec ksilanolitičnih encimov, kot je to običajno za pripravek vseh celičnih proteinov (slika 6).

Vse tri vzorce encimskih pripravkov smo uporabili za študij razgradnje ksilana in ksiloooligosaharidov. Razgradne produkte smo ločili s tankoplastno kromatografijo (sliki 7 in 8).

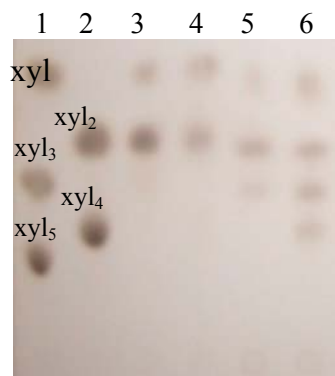


Slika 6. NaDS-PAGE analiza pripravka površinskih proteinov. V žepke koncentrirnega NaDS-PAGE gela smo nanjali po 50 μ l vzorcev. Po elektroforezi smo en 10 % ločevalni gel pobarvali s koloidnim srebrom (A) ter drugega razvili kot encimogram (B). Proga ST: proteinski standardi z označenimi MW. Proga SIL: pripravek površinskih proteinov, barvano s koloidnim srebrom. Proga ENC: pripravek površinskih proteinov – encimogram.

Izolirana 44 kDa ksilanaza je učinkovito cepila ksilan ovsenih plev vse do najmanjših gradnikov (proga 5, slika 7). Sposobna je bila cepiti tudi ksilotri-, -tetra- (progi 3 in 4, slika 8) in -pentaozo (proga 4, slika 7) do ksilobioze in ksiloze, ne pa tudi ksilobioze do ksiloze (proga 3, slika 7). Glede na te rezultate sklepamo, da prepozna zaporedje vsaj treh zaporednih ksiloz, ki se prilega aktivnemu mestu tega encima, in zaporedoma od substrata odceplja ksilobiozne enote, gre torej za eksoksilanazo brez β -ksilozidazne aktivnosti. Encimi s podobnim delovanjem imajo ponavadi aktivno mesto oblikovano kot žep (Davies in Henrissat, 1995).



Slika 7. Analiza produktov razgradnje ksilana s ksilanazama (44 kDa, 81 kDa), površinskimi proteini in celičnim izvlečkom. Vzorce smo s substratom inkubirali v razmerju 1 : 1 (v/v) preko noči pri temperaturi 37 °C. Razgradne produkte smo naslednji dan ločili s tankoplastno kromatografijo. Na progah 1 in 2 smo nanjali mono- in oligosaharidne standarde (proga 1: ksiloza, ksilotrioza in ksilopentaoza; proga 2: ksilobioza, ksilotetraza). Na proge 3-5 smo nanjali razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize z izolirano 44 kDa ksilanazo: vzorci, inkubirani s ksilobiozo (proga 3), ksilopentaozo (proga 4) in topnim ksilanom ovsenih plev (proga 5). Na proge 6-8 smo nanjali razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize z delno izolirano 81 kDa ksilanazo: vzorci, inkubirani s ksilobiozo (proga 6), ksilopentaozo (proga 7) in topnim ksilanom ovsenih plev (proga 8). Na progah 9-11 so nanešeni razgradni produkti, ki so bili posledica hidrolize s ksilanolitičnimi encimi s celične površine (površinski proteini): vzorci, inkubirani s ksilobiozo (proga 9), ksilopentaozo (proga 10) in topnim ksilanom ovsenih plev (proga 11). Na zadnjo proggo smo nanjali razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize ksilobioze s celičnim izvlečkom (proga 12).



Slika 8. Analiza produktov razgradnje ksilooligosaharidov s 44 kDa ksilanazo in površinskimi proteini. Vzorce smo s substratom inkubirali v razmerju 1 : 1 (v/v) preko noči pri temperaturi 37 °C. Razgradne produkte smo naslednji dan ločili s tankoplastno kromatografijo. Na progi 1 in 2 smo nanegli mono- in oligosaharidne standarde (proga 1: ksiloza, ksilotrioza in ksilopentaoza; proga 2: ksilobioza, ksilotetraoza). Na progi 3 in 4 smo nanegli razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize s 44 kDa ksilanazo: vzorci, inkubirani s ksilotriozo (proga 3) in ksilotetraozo (proga 4). Na progi 5 in 6 smo nanegli razgradne produkte, ki so bili posledica hidrolize s ksilanolitičnimi encimi celične površine (površinski proteini): vzorci, inkubirani s ksilotriozo (proga 5), ksilotetraozo (proga 6).

Delno izolirana 81 kDa ksilanaza je razgrajevala ksilan ovsenih plev le do večjih ksilooligosaharidov, največ do ksilopentaoz (proga 8, slika 7). Prav tako ni uspela cepiti ne ksilobioze ne ksilopentaoze (progi 6 in 7, slika 7). Predvidevamo, da je ta encim endoksilanaza, ki za razpoznavo substrata potrebuje daljše verige oligosaharidov. Pri podobnih encimih je aktivno mesto oblikovano kot reža (Davies in Henrissat, 1995).

Med proteini, ki so vezani na celično površino, je tudi več ksilanaz, ki učinkovito razgrajujejo ksilan, kot tudi ksilotri-, -tetra- (progi 5 in 6, slika 8) in -pentaozo (proga 10, slika 7) do manjših gradnikov. Prav tako ti encimi ne morejo razgraditi ksilobioze do ksiloze (proga 9, slika 7). Tako aktivnost smo zaznali v celičnem izvlečku, kjer je bila očitno prisotna tudi β -ksilozidaza, ki je lahko katalizirala gornjo reakcijo (proga 12, slika 7).

Predhodne raziskave in v tem delu opisani rezultati predpostavljajo naslednji mehanizem razgradnje ksilana pri vampni bakteriji *P. xylanivorans* Mz5^T:

- dve ksilanazi (145 kDa in 44 kDa) se izražata stalno (konstitutivno) in, če je prisoten ksilan, začeta z njegovo razgradnjo: večji encim je aktivnejši, kot smo to lahko opazili na ksilanogramu (Zorec in sod., 2000),
- razgradni produkti močno inducirajo izražanje tudi drugih ksilanaz (Zorec in sod., 2000), ki se vse prenesejo skozi celično membrano in steno ter imajo tako dostop do zelo zapletene, velike molekule substrata ksilana,
- ksilan nato načnejo encimi, ki cepijo substrat znotraj verige: to so XynT (Čepeljnik in sod., 2004), 81 kDa ksilanaza in njim podobni encimi, ki tvorijo večje ksilooligosaharide,
- nato te krajše substrate cepijo 44 kDa ksilanaza in njej podobni encimi, rezultat njihovega delovanja so oligosaharidi ksiloza in predvsem ksilobioza, ki se prenesejo v notranjost bakterijske celice,
- tam pa nastopijo β -ksilozidaze, ki razgradijo gornji substrat do monomerov. To je ksiloza, ki jo bakterija lahko uporabi kot vir energije in ogljika po Embden-Meyerhofovi glikolizi, ali pa v kombinaciji s potjo pentoze fosfata, kot so ugotovili za sev CE 51 (Marounek in Petr, 1995). Zadnji način je manj verjeten, glede na enako učinkovito uporabo tako različnih heksoz kot tudi pentoz (Zorec, 2002).

SKLEPI

44 kDa ksilanaza kaže lastnosti eksoksilanaze brez β -ksilozidazne aktivnosti, pri ksilanazi velikosti 81 kDa pa predvidevamo, da gre za endoksilanazo. Primerjava encimskega delovanja ksilanaz s celične površine s ksilanazami celičnega izvlečka je pokazala, da površinski proteini nimajo β -ksilozidazne aktivnosti. Na osnovi dobljenih rezultatov in rezultatov predhodnih raziskav smo predpostavili mehanizem razgradnje ksilana vampne bakterije *P. xylanivorans* Mz5^T: dve ksilanazi se konstitutivno izražata in ob prisotnosti ksilana razgradni produkti močno inducirajo izražanje tudi drugih ksilanaz. Razgradnjo začnejo ksilanaze, ki cepijo substrat znotraj verige (XynT, 81 kDa ksilanaza in njim podobni encimi, ki tvorijo večje ksilooligosaharide), nato krajše substrate cepijo 44 kDa ksilanaza in njej podobni encimi, rezultat njihovega delovanja so ksiloza in predvsem ksilobioza, ki se prenese v notranjost bakterijske celice. Tam pa nastopijo β -ksilozidaze, ki razgradijo dimerni substrat do monomera, to je ksiloza, ki jo bakterija lahko uporabi kot vir energije in ogljika.

SUMMARY

44 kDa xylanase seems to be an exoxylanase without β -xylosidase activity. We assume that the 81 kDa xylanase is an endoxylanase. The comparison of cell surface and cell extract enzyme activities showed that surface proteins have no β -xylosidase activity. Based on these results and prior research work the possible mechanism of *P. xylanivorans* Mz5^T xylan degradation is: two xylanases are constitutive and in the presence of xylan the products of degradation strongly induce expression of other xylanases. Degradation is started by enzymes that act as *endo* enzymes (XynT, 81 kDa xylanase and similar enzymes that produce larger xylooligosaccharides), than shorter substrates are degraded by 44 kDa xylanase and similar enzymes. The result is xylose and, in the first place, xylobiose, that is transferred inside the cell. β -xylosidases inside the cell degrade dimers to monomers – xylose, which can be used as energy and carbon source.

VIRI

- Adeola, O./ Bedford, M.R. Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity-induced anti-nutritional effects in wheat-based diets for White Pekin ducks (*Anas platyrinchos domesticus*). *British Journal of Nutrition*, 92(2004), 87–94.
- Bajpai, P. Microbial xylanolytic enzyme system: Properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 43(1997), 141–194.
- Bedford, M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, 86(2000), 1–13.
- Beg, Q.K./ Kapoor, M./ Mahajan, L./ Hoondal, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(2001), 326–338.
- Biely, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends in biotechnology*, 3(1985)11, 286–290.
- Chesson, A./ Forsberg, C.W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. V: The rumen microbial ecosystem (Eds.: Hobson, P.N./ Stewart, C.S.). London, Thomas Science, 1997, 329–381.
- Christov, L./ Biely, P./ Kalogeris, E./ Christakopoulos, P./ Prior, B.A./ Bhat, M.K. Effects of purified endo- β -1,4-xylanases of family 10 and 11 and acetyl xylan esterases on eucalypt sulfite dissolving pulp. *Journal of Biotechnology*, 83(2000), 231–244.
- Čepeljnik, T./ Zorec, M./ Nekrep, F.V./ Marinšek-Logar, R. Isolation of endoxylanases from anaerobic bacterium *Butyrivibrio* sp. Mz5 is possible by anion exchange chromatography on CIM[®] DEAE-8 monolythic column. *Acta Chimica Slovenica*, 49(2002), 401–408.
- Čepeljnik, T./ Križaj, I./ Marinšek-Logar, R. Isolation and characterization of the *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T xylanase XynT—the first family 11 endoxylanase from rumen *Butyrivibrio*-related bacteria. *Enzyme Microb. Technol.*, 34(2004), 219–227.
- Davies, G./ Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(1995), 853–859.

- DSM Catalogue of strains. Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Nemčija, 1993, <http://www.dsmz.de/media/med330.htm> (1. sept. 2004).
- Flint, H.J. The rumen microbial ecosystem – some recent developments. *Trends in Microbiology*, 5(1997)12, 483–488.
- Hespell, R.B./ Whitehead, T.R. Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *Journal of Dairy Science*, 73(1990), 3013–3022.
- Hobson, P.N. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem (Eds.: Hobson, P.N./ Stewart, C.S.). London, Thomas Science, 1997, 1–9.
- Kulkarni, N./ Shendye, A./ Rao, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1999), 411–456.
- Lázaro, R./ Latorre, M.A./ Medel, P./ Gracia, M./ Mateos, G.G. Feeding regimen and enzyme supplementation to rye-based diets for broilers. *Poultry Science*, 83(2004), 152–160.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(1970), 680–685.
- Lever, M. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry*, 81(1977), 21–27.
- Malburg, L.M./ Lee, J.M./ Forsberg, C. Degradation of cellulose and hemicelluloses by rumen microorganisms. V: Microbial degradation of natural products (Ed.: Winkelmann G.). Weinheim, VCH, 1992, 126–156.
- Marinšek-Logar, R. Opis ksilanolitičnega encimskega sistema vampne bakterije *Prevotella bryantii* B14. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fak., 1999, 120 str.
- Marinšek-Logar, R./ Zorec, M./ Nekrep, F.V. Isolation and characterisation of *Butyrvibrio*-like rumen bacteria possessing high xylanolytic activity. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40(2000), 191–192.
- Marounek, M./ Petr, O. Fermentation of glucose and xylose in ruminal strains of *Butyrvibrio fibrisolvens*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21(1995)4, 272–276.
- Merril, C.R./ Goldman, D./ Sedman, S./ Ebert, H. Ultrasensitive stain for proteins in poly-acrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211(1981), 1437–1438.
- Nsereko, V.L./ Beauchemin, K.A./ Morgavi, D.P./ Rode, L.M./ Furtado, A.F./ McAllister, T.A./ Iwaasa, T.A./ Yang, W.Z./ Wang, Y. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.*, 48(2002), 14–20.
- Puls, J./ Poutanen, K. Mechanisms of enzymatic hydrolysis of hemicelluloses (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. V: Enzyme systems for lignocellulose degradation (Ed.: Coughlan, M.P.). London, Elsevier Applied Science, 1989, 151–165.
- Reilly, P.J. Xylanases: structure and function. *Basic Life Science*, 18(1981), 111–129.
- Rincon, M.T./ Martin, J.C./ Aurilia, V./ McCrae, S.I./ Rucklidge, G.J./ Reid, M.D./ Bayer, E.A./ Lamed, R./ Flint, H.J. ScaC, an adaptor protein carrying a novel cohesin that expands the dockerin-binding repertoire of the *Ruminococcus flavefaciens* 17 cellulosome. *Journal of Bacteriology*, 186(2004)9, 2576–2585.
- Vazquez, M.J./ Alonso, J.L./ Dominguez, H./ Parajo, J.C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci. Technol.*, 11(2000), 387–393.
- Wong, K.K.Y./ Tan, L.U.L./ Sandler, J.N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52(1988)3, 305–317.
- Wood, P.J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 85(1980), 271–287.
- Zorec, M./ Marinšek-Logar, R./ Čepeljnik, T./ Nekrep, F.V. The influence of substrate concentration and growth phase on expression of *Butyrvibrio* sp. Mz5 endoxylanases. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. Zooteh.*, 76(2000)2, 199–206.
- Zorec, M. Izolacija vampne bakterije z močno ksilanolitično aktivnostjo in opis njenega encimskega sistema za razgradnjo ksilana. Magistrska naloga. Ljubljana, Medicinska fak., 2002, 79 str.

DISTRIBUTION OF TISSUES IN THE CARCASS OF TUROPOLJE PIG, AN AUTOCHTHONOUS CROATIAN BREED

Marija ĐIKIĆ^{a)}, Krešimir SALAJPAL^{b)}, Danijel KAROLYI^{c)}, Ivan JURIC^{a)} and Vlatko RUPIC^{a)}

^{a)} Univ. of Zagreb, Fac. of Agriculture, Dept. of Animal Science, Svetošimunska c. 25, HR-10000 Zagreb, Croatia, Prof., Ph.D., M.Sc.

^{b)} Same address.

^{c)} Same address: M.Sc.

Received September 01, 2004, accepted December 10, 2004.

Delo je prispejelo 01. septembra 2004, sprejeto 10. decembra 2004.

ABSTRACT

Carcass composition and distribution of tissues in the carcass of Turopolje pig were established by analysing the share of muscle (M), fat (F) and bone (B) tissue in the carcass and each of this tissues from parts leg, shoulder, loin, neck and belly-rib part (BRP) in the carcass as well as the same tissue in the parts. Investigation was carried out in two groups of fattened pigs at different age and live weight at slaughtering (T_I $n = 10$, age 584 ± 20 days and $81.9 \text{ kg} \pm 6.1 \text{ kg}$; T_{II} $n = 9$, age 679 ± 20 days and $100.3 \text{ kg} \pm 4.9 \text{ kg}$). Pigs were fattened in the outdoor system of flood forests and marsh meadows biocenosis (*Quercus robur* and *Deschampsietum caespitosae*) according to traditional Croatian technology of low input feed (0.5 kg/day/animal). On the slaughter line the animals and carcasses were separately weighted and cut according to Weniger method and by total dissection. In the groups T_I and T_{II} the percentages of muscle (38.2% and 40.5%, respectively) and bone tissue (10.6% and 9.7%, respectively) were significantly different in the carcass, while the share of fat (34.2% and 33.8%, respectively) was not significantly different. In the groups T_I and T_{II} the distribution of muscle, fat and bone tissue in the body parts leg, shoulder, loin, neck and belly-rib part (BRP) were estimated.

Key words: pigs / autochthonous breeds / Turopolje pig / carcass / muscles / fat / bones / Croatia

PORAZDELIZEV TKIV V KLAVNIH TRUPIH AUTOHTONE HRVAŠKE PASME TUROPOLJSKI PRAŠIČ

IZVLEČEK

Sestavo klavnih trupov in porazdelitev tkiv v klavnih trupih turopoljskega prašiča smo določili z analizo deleža mišičnega, maščobnega in kostnega tkiva v klavnih trupih in v delih noge, pleča, ledja, vrat in trebuh. Raziskavo smo opravili v dveh skupinah pitancev pri dveh različnih starostih in telesnih masah ob klanju (T_I $n = 10$, starost 584 ± 20 dni in $81.9 \text{ kg} \pm 6.1 \text{ kg}$; T_{II} $n = 9$, starost 679 ± 20 dni in $100.3 \text{ kg} \pm 4.9 \text{ kg}$). Prašiče smo pitali po klasični tehnologiji, ki vključuje pašo v gozdovih in na travnikih, ki ju označujeta biocenozi *Quercus robur* in *Deschampsietum caespitose* ob nizki porabi krme (0.5 kg/dan/žival). Na liniji klanja so bile živali posamično stehane in razkosane po metodi popolne disekcije po Wenigerju. Skupini T_I in T_{II} sta se statistično značilno razlikovali po odstotku mišičnega tkiva (38.2 % in 40.5 %) in kosti v trupih (10.6% in 9.7%), medtem ko razlike v deležu maščobe niso bile statistično značilne (34.2 % in 33.8 %). V obeh skupinah smo določili tudi deleže mišičnega, maščobnega in kostnega tkiva v telesnih delih: noge, pleča, ledja, vrat in trebuh.

Ključne besede: prašiči / avtohtone pasme / turopoljski prašič / klavne polovice / mišice / maščoba / kosti / Hrvaška

INTRODUCTION

Turopolje pig breed is Croatian autochthonous breed, belonging to older European pig breeds (Grunenfelder, 1994 and Robić *et al.*, 1996). A number of scientific and professional papers were published about the origin, historical and economic importance and about the factors, which brought this breed into the FAO list of endangered and disappearing breeds (World Watch List for Domestic Animal Diversity, Loftus and Scherf, 1993). This list was formed after signing the Convention on Biological Diversity (CBD) in Rio de Janeiro in June 1992. The Republic of Croatia signed CBD on January 5, 1997 and in 1999. Croatia passes the strategy of biological diversity which includes also Turopolje pig (Radović, 1999).

Table 1 gives the size of breeding population registered in the herdbook of Turopolje pig breed in the years 1996 (the start of the programme of re-establishment and preservation) and 2003 as reported in annual reports of Croatian Livestock Center (CLC, 1997 and 2004).

Table 1. Breeding population of Turopolje pig breed in Croatia
Preglednica 1. Populacija turopoljskega prašiča na Hrvaskem

Year / Leto	Sows / Svinje	Boars Merjasci	Gilts Mladice	Y. boar Mladi merjasci	Piglets Pujski
1996	12	3	-	-	-
2003	99	6	76	3	180

Source: Annual report – pig breeding, CLC (1997, 2004).

The number of sows and boars (Table 1), in addition to the state subsidies, indicates the state of critical endangerment of this breed according to the FAO standards (Loftus and Scherf, 1993), but number of gilts and piglets gives the opportunity to change the present state. The breeding population is owned by family farms and by organization Universitas Communitas Nobilium Campi Turopolia (UCNCT, V. Gorica) which owns the majority of the population. The UCNCT started first in 1996 with preservation by opening herdbook at CLC. This organization, a farmer land community, established in 13th century and legally suppressed in 1947 (Đikić *et al.*, 2002), renewed its activities and included them into the project of re-establishment and preservation of Turopolje pig as cultural and biological value, as well as its natural habitat of origin and *in – situ* survival. It is important to emphasize that the traditional Croatian technology of low input pig production in the outdoor ecosystem of flood forests and marsh meadows, typical for Turopolje pig, is a part of Croatian cultural heritage. Existing research results about characteristics of Turopolje pig are mostly published in the monography “Turopolje pig – autochthonous Croatian breed – turopolka” (Đikić *et al.*, 2002). In 2002 in V. Gorica the 1st symposium with a round table discussion on Turopolje pig was held. There was concluded that UCNCT and Faculty of Agriculture should define a program which would support the re-establishment of the population of Turopolje pig on the economical base.

Following this conclusion and based in the current knowledge about characteristics of Turopolje pig, the objective of this study was to establish slaughtering properties, carcass composition as well as distribution of muscle, fat and bone tissues in parts of carcass of Turopolje pig. Results of this study will be used as a base for defining the characteristics (standards) of today’s Turopolje pig breed, as well as a starting point for breeding and economical program for re-establishment, preservation and definition of production type of this breed.

MATERIAL AND METHODS

Investigation was carried out on two groups of Turopolje breed hogs (T_I $n = 10$ and T_{II} $n = 9$). Pigs were fattened in the outdoor production system. The whole production cycle took place in the outdoor system of forest biocenosis (*Quercus robur*, *Fraxinus excelsior* and *Fagus sylvatica*) and marsh meadows (*Deschampsietum caespitosae*) in the Turopolje area (about 40 km from Zagreb). Traditional Croatian technology of low feed input (0,5 kg of corn seed/animal/day) in the ecosystem was implemented in the extensive management. Natural resources (acorn, soil, pasture) were utilized, but having in mind the environmental balance as well. No industrial feed, vitamins or minerals were used neither for piglet rearing nor later in the fattening period. The average age of fattened pigs in group T_I was 584 ± 20 days, and in T_{II} 679 ± 20 days.

In the abattoir for each hog the live weight and warm carcass weight were taken. The averages for T_I group were 81.9 ± 6.1 kg and 65.6 ± 4.8 kg, respectively and for T_{II} group 100.3 ± 4.9 kg and 80.1 ± 4.6 kg, respectively. After chilling for 24 hours at $+4^\circ\text{C}$ the weights of cold carcass and of single of halves (the halve on which the tail remained during the cutting of carcass) for the dissection were recorded. The Weniger method (Weninger *et al.*, 1963) was used for cutting the halves into the parts: leg, shoulder, loin, neck, belly-rib part (BRP), less value part (LVP), double chin (DC) and kidney fat (KF). By the method of total dissection each part was dissected into muscle, fat and bone tissues and weights of tissues were recorded. The lard and double chain were weighted separately. On the basis of mass of each tissue in the parts and the mass of halves, the percentage of parts in the carcass and the percentage of tissues in the carcass as well as in the parts of the carcass were established. The descriptive statistics within groups and differences between groups (t-test) were analysed (SAS, 1999).

RESULTS AND DISCUSSION

Carcass composition

According to the results (Table 2) of the experimental groups (T_I and T_{II}), the established values of slaughtering weight indicate very low daily gain in fattened Turopolje pig produced in the outdoor system with technology of low feed input and dependency on capability of each individual animal to utilize the natural resources of the ecosystem. Obtained statistically significant differences between groups (T_I and T_{II}) for slaughtering weight and for cold and warm carcass weights were expected, due to the difference in age. However, high variability of slaughtering weights found within each group indicates an interaction between genotype and environment, in relation to the outdoor production system. Analysis of carcass composition (Table 2) within both groups shows that muscle : fat ratio in the carcass without lard is in favour of muscle tissue. If both, fat tissue and lard are included into calculation, than the ratio is 1:1. Pigs in the T_I group had significantly lower share of muscle tissue ($P < 0.05$) and higher share of bone tissue lard and double chain ($P < 0.01$) than animals in the group T_{II} , what could be explained, according to Lawrie (1998), by different age and slaughtering weights. However, statistically significant differences were not found for percentage of fat tissue in the carcass. This indicates that there is a need for the investigation of growth and gain dynamics, and for the relation between body weight and body protein and fat in pigs at different age, which is, according to Reeds *et al.*, (1993), important for regulation of growth processes which are defined as dimensional, compositional and functional changes in pigs. Regarding muscle : fat tissue ratio in carcass, according to older references (Vukina, 1961, Belić *et al.*, 1961), Turopolje pig is a late-mature fat producing type of pig, together with Mangalitza and Bagun. On the contrary, Horvat (1939), based on own research, concluded that fattened pigs with the average body

weight of 101.7 kg and 81.6 kg of cold carcass weight were too fatty for production of fresh meat and not enough fatty for production of fat (which was important at that time). However, if the recorded differences (Table 2) for muscle : fat tissue ratio between groups T_I and T_{II} were compared with the recent data on breeds Mangalitza and Black Slavonian (Kralik and Petričević, 2001; Uremović *et al.*, 2000), than present population of Turopolje pig can be defined as a late mature, combined meatness – fatty type of pig for production in low feed input technology in ecosystem of biocenosis marsh meadows and flood forests (*Deschampsietum caespitosae – Quercetum roboris*). In addition, obtained results (Table 2) indicate that Turopolje pig was not affected by trends in pig selection directed by changes in demand for muscle and fat tissue on pig meat market, which resulted in very high share of muscle tissue in carcass, in relation to the share of fat tissue, in selected breeds. (Đikić and Jurić, 2003). Reeds *et al.*, (1993) reported that in commercial fattened pigs of Landrace and Large White breeds at 210 days and body weight of 90 kg, in the year 1940 muscle : fat tissue ratio was 0.87:1, while in 1980 it was 1:1. If these figures are compared to the fattened Turopolje pigs, the status of selection according to carcass quality in the remaining population can be illustrated.

Table 2. Carcass (cold) weights and carcass composition of the two groups of Turopolje hogs

Pregladnica 2. Masa (hladnih) trupov in sestava trupov dveh skupin merjascev turipoljske pasme

Group Skupina	Carcass Trup	Tissue, % Tkivo, %			LVP MVD ⁺	KF and DC Ledvična maščoba in podbradek
		kg	M	F		
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
T _I	63.9 ± 5.7**	38.2 ± 2.98*	34.2 ± 2.91	10.6 ± 0.94**	8.9 ± 0.88	3.2 ± 0.40** 4.9 ± 0.53**
T _{II}	79.7 ± 4.4**	40.5 ± 1.39*	33.8 ± 1.29	9.7 ± 0.74**	8.8 ± 0.84	4.0 ± 0.65** 3.2 ± 0.82**

** = P < 0.01, * = P < 0.05; + = manj vredni deli

Tissue distribution in the carcass

In the fattened pigs of Turopolje breed, regarding the share of parts in carcass, the leg is in the first place, followed by BRP, shoulder, loin, and neck. Statistically significant difference (P < 0.01) is established between groups for the share of BRP, which could be explained by development of gastrointestinal system in pigs at different age (Reeds *et al.*, 1993). Analysis of the results (Table 3) shows that Turopolje pig has a higher share of shoulder's and neck (T_I 24.0% and T_{II} 24.3%) and lower share of loin and BRP in carcass, than modern pig genotypes (Đikić and Jurić, 2003, Kralik and Petričević, 2001). Although the data of carcass length are not given, Turopolje pig has relatively short carcass (*os pubis – atlas* 87.0 cm and *os pubis – first rib* 68.4 cm) compared to modern pig genotypes (98.5 cm and 88.3 cm, respectively) (Đikić *et al.*, 2002).

Within the groups the percentage (Table 3) of muscle tissue in the carcass and in the leg, shoulder loin, neck and BRP is low, while percentage of fat tissue is relatively high, when compared to the ratio in selected pigs. However, percentage of muscle tissue in carcass was higher than fat in all parts of the carcass, except for BRP in both groups.

Table 3. The tissues distribution and share of parts in the carcass of two groups of Turopolje hogs

Preglednica 3. Porazdelitev tkiv in delež telesnih delov v trupih dveh skupin turopoljskih prašičev

Parts of carcass Deli trupa	Tissue in carcass Tkiva v trupu	Percentage of parts and tissues of these parts in the carcass Odstotek telesnih delov in tkiv v trupu	
		Group / Skupina	
		T _I $\bar{x} \pm SD$	T _{II} $\bar{x} \pm SD$
Leg / Noge	Muscle / Mišice	12.9 ± 0.55	12.7 ± 0.77
	Fat / Maščobno tkivo	10.1 ± 0.70	10.6 ± 0.95
	Bone / Kosti	3.0 ± 0.62**	2.4 ± 0.26**
	Total / Skupaj	26.0 ± 0.85	25.7 ± 0.53
Shoulder / Pleča	Muscle / Mišice	7.8 ± 0.19*	8.2 ± 0.52*
	Fat / Maščobno tkivo	5.3 ± 0.78	5.7 ± 0.58
	Bone / Kosti	2.0 ± 0.19*	1.6 ± 0.48*
	Total / Skupaj	15.1 ± 0.75	15.5 ± 0.20
Loin / Ledja	Muscle / Mišice	5.5 ± 0.46*	6.6 ± 0.57*
	Fat / Maščobno tkivo	5.3 ± 0.81	5.8 ± 0.47
	Bone / Kosti	2.4 ± 0.36	2.4 ± 0.60
	Total / Skupaj	13.2 ± 0.99	14.8 ± 0.63
Neck / Vrat	Muscle / Mišice	4.5 ± 0.44**	5.2 ± 0.44**
	Fat / Maščobno tkivo	2.9 ± 0.39**	2.3 ± 0.33**
	Bone / Kosti	1.5 ± 0.27	1.3 ± 0.13
	Total / Skupaj	8.9 ± 0.20	8.8 ± 0.48
BRP Potrebušina z rebri	Muscle / Mišice	6.9 ± 0.71**	7.9 ± 0.37**
	Fat / Maščobno tkivo	11.1 ± 0.83**	9.6 ± 0.79**
	Bone / Kosti	2.2 ± 0.16	1.7 ± 0.15
	Total / Skupaj	20.2 ± 0.68**	19.2 ± 0.54**

** = P < 0.01, * = P < 0.05.

Testing of differences between groups T_I and T_{II} showed that heavier and older animals have significantly higher share of muscle tissue in carcass in shoulder (P < 0.05), as well as in the neck and BRP (P < 0.01), while the share of fat tissue from neck and BRP is significantly lower (P < 0.01). Analysis of figures for bone tissue from different body parts shows that younger and lighter Turopolje breed hogs have a higher share of bones from leg (P < 0.01), shoulder and BRP (P < 0.05) than the older and heavier ones. Records (Table 2 and 3) obtained in fattened Turopolje pigs of present population do not suggest that breeding and selection processes in modern pig production had any influence on this population in the sense of increasing muscle : fat tissue ratio in carcass, or in the increase of the ratio between back (leg + back) and front (loin + neck) part of carcass.

The percentage of tissues in some parts of the carcass in two groups of Turopolje hogs are shown in Table 4.

The ratio between muscle and fat tissue in the parts within groups as well as the differences between groups are more than 1 : 1, what indicates the possibilities for utilization for some kind of pork product processing (dry ham, dry loin or various sausages). Obtained values, in addition to the recent results (Grunenfelder, 1994; Robić *et al.*, 1996; Đikić *et al.*, 1999, 2002) confirm

that Turopolje pig is, because of its specific origin (Ritzoffy, 1931 and 1933), as well as biological characteristics, a valuable cultural and biological resource. Assuming that statements of Sellier (1998), Hammond (1998), Jurić and Đikić (2001) and Grunenfelder (1994) are accepted, this breed could also have an economical value.

Table 4. Percentage of tissues in the parts of the carcass
Pregladnica 4. Odstotek tkiv v delih trupa

Parts of carcass Deli trupa	Tissue in carcass Tkiva v trupu	Group / Skupina	
		T _I $\bar{x} \pm SD$	T _{II} $\bar{x} \pm SD$
Leg / Noge	Muscle / Mišice	49.2 ± 2.63	49.6 ± 2.90
	Fat / Maščobno tkivo	38.6 ± 2.23	39.7 ± 2.61
	Bone / Kost	12.2 ± 2.35**	10.5 ± 1.45**
Shoulder / Pleča	Muscle / Mišice	52.8 ± 5.15*	54.1 ± 4.39*
	Fat / Maščobno tkivo	34.3 ± 6.37	35.3 ± 4.97
	Bone / Kost	12.9 ± 1.59*	10.6 ± 0.84*
Loin / Ledja	Muscle / Mišice	42.1 ± 4.32*	44.5 ± 2.80*
	Fat / Maščobno tkivo	40.3 ± 4.21	39.7 ± 2.06
	Bone / Kost	17.6 ± 2.99	15.8 ± 1.88
Neck / Vrat	Muscle / Mišice	51.5 ± 4.89**	58.6 ± 3.81**
	Fat / Maščobno tkivo	32.7 ± 5.24**	26.4 ± 3.37**
	Bone / Kost	15.8 ± 2.37	14.9 ± 1.20
BRP Potrebušina z rebri	Muscle / Mišice	37.2 ± 5.83**	40.8 ± 3.04**
	Fat / Maščobno tkivo	52.9 ± .89**	50.7 ± 3.15**
	Bone / Kost	9.9 ± 1.6*	8.5 ± 0.98*

** = P < 0.01, * = P < 0.05.

CONCLUSIONS

Turopolje pig breed is in the state of critical endangerment (by FAO standard), but number of gilts and piglets suggests the improvement of that state.

Present population of Turopolje pig breed is with regard to muscle:fat tissue ratio in the carcass and in each parts of the carcass (1.0–1.2 : 1) late – mature type, what is a consequence of specific historical conditions of selection and production in specific environment of the outdoor system. The carcass composition and the distribution of tissue in single parts of carcass give the opportunity to set up a program which would support re-establishment of the population on the economic base.

REFERENCES

- Belić, J./ Ognjanović, A./ Šterk, V. Modern pig production. Beograd, Ed. Zadržna knjiga, 1961, 69–73.
 Croatian Livestock Center. Annual report – pig breeding. Zagreb, 1997, 64 p.
 Croatian Livestock Center. Annual report – pig breeding. Zagreb, 2004, 63 p.
 Đikić, M./ Jurić, I. Relation and distribution of tissues in pigs as factor of competitiveness on pig meat market. Agronomski glasnik, 65(2003)3–4, 88–96.
 Đikić, M./ Jurić, I./ Kos, F. Turopolje pig – autochthonous Croatian breed – turopolka. Velika Gorica, Plemenita općina turopoljska, 2002, 181 p.
 Đikić, M./ Jurić, I./ Robić, Z./ Henc, Z./ Gugić, G. Litter size and weight of piglets of Turopolje pig breed in suckling period. Poljoprivredna znanstvena smotra, 64(1999), 97–102.

- Grunenfelder, H.P. Saving the Turopolje pig. – An international pilot project in Croatia in collaboration with Euronatur. Proc 3rd International Dagine – Symposium on gene conservation, Zagreb – Pag, Croatia, pp 27–30. *Stočarstvo*, 48(1994), 361–364.
- Hammond, K./ Leitch, H.W. Genetic resources and Global Programme for their management. In: Genetics of the pig (Eds.: Rothschild, M.F./ Ruvinsky, A.). Wallingford, CAB, 1998, 405–427.
- Horvat, B. Results of controlled fattening of pigs of Turopolje and Bagun breeds. *Arhiv Ministarstva poljoprivrede – Smotra naučnih radova*, 6(1939), 55–76.
- Jurić, I./ Đikić, M. Breeding methods and changes of gene frequencies in population. Proceedings: Biological diversity in animal production of Republic of Croatia. HAZU, Zagreb, 2001, 39–50.
- Kralik, G./ Petričević, A. Production traits of Black Slavonian pig. Proceedings: Biological diversity in animal production of Republic of Croatia, Zagreb, Hrvatska, 2001, 115–122.
- Loftus, R./ Scherf, B. World Watch List for Domestic Animal Diversity. 1st Edit. Rome, FAO UNEP, 1993.
- Lawrie, R.A. Lawrie's meat science. Abingdon Hall, Abingdon, Woodhead Publishing limited, 1998, 336.
- Radović, J. Overview of condition of biological and landscape diversity of Croatia with strategy and action plan for protection. (Pregled stanja biološke i krajobrazne raznolikosti Hrvatske sa strategijom i akcijskim planovima zaštite). Zagreb, Državna uprava za zaštitu prirode i okoliša, 1999, 151 p.
- Reeds, P.Y./ Burrin, D.G./ Davis, T.A./ Fiorotto, M.A./ Meremann, H.J./ Pond, W.G. Growth regulation Particular Reference to the Pig. In: Growth of the Pig (Ed.: Hollis, G.R.). Wallingford, CAB International, 1993, 1–32.
- Ritzoffy, N. Contribution to knowledge on Turopolje pig. *Veterinarski arhiv*. 1(1931), 83–134.
- Ritzoffy, N. About inbreeding in general, especially within Turopolje pig breed. *Veterinarski arhiv*. 12(1933), 533–571.
- Robić, Z./ Đikić, M./ Jurić, I./ Stipić, N./ Rupić, V./ Mužić, S./ Božac, R./ Liker, B. The Turopolje pig one of the oldest European races: It is saving and Renewal. In: Proceedings 4th International Symposium Animal Science Days, Kaposvar, Hungary, 1996, 90–94.
- SAS Institute. SAS Online Doc® Release 8. SAS Institute Inc., Cary NC. USA, 1999.
- Sellier, P. Genetic of meat and carcass traits. In: Genetic of the pig (Eds.: Rothschild, M.F./ Ruvinsky, A.). Wallingford, CAB, 1998, 463–510.
- Uremović, M./ Uremović, Z./ Luković, Z. Production properties of the black Slavonian pig breed. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljubl., Kmet. Zooteh.*, 76(2000), 131–134.
- Vukina, R. Practical pig production. Zagreb, Znanje, 1961, 191 p.
- Weniger, H.J./ Steinkanf, D./ Pahl, G. Muscular topography of carcass BLV. München, Verlagsgesellschaft München, 1963.

Acta agriculturae slovenica

Letnik 84

Ljubljana, december 2004

Številka 2

SUBJECT INDEX BY AGROVOC DESCRIPTORS

PREDMETNO KAZALO PO DESKRIPTORJIH AGROVOC

Tomaž BARTOL ^{a)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Agronomy Dept., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, Ass.Prof., Ph.D., M.Sc., e-mail: tomaz.bartol@bf.uni-lj.si.

- | | |
|--|---|
| adipose tissues: 97–107, 153–159 | land races: 121–130, 131–139, 153–159 |
| anaerobiosis: 141–151 | mares: 131–139 |
| animal fats: 97–107 | meat: 97–107 |
| bacteria: 141–151 | microbial flora: 141–151 |
| body condition: 153–159 | milk: 121–130 |
| body parts: 153–159 | milk production: 109–119 |
| breeds (animals): 121–130, 131–139,
153–159 | milk protein: 109–119 |
| carcass composition: 97–107, 153–159 | milk yield: 109–119 |
| carcasses: 153–159 | mitochondrial genetics: 131–139 |
| casein: 121–130 | molecular genetics: 97–107, 109–119, 121–130,
131–139, |
| croatia: 121–130, 153–159 | provenance: 131–139 |
| dairy cattle: 109–119 | proximate composition: 109–119 |
| designation of origin: 131–139 | quality: 97–107 |
| enzymic activity: 141–151 | rumen: 141–151 |
| fattening: 97–107 | rumen microorganisms: 141–151 |
| gene expression: 109–119 | sheep: 121–130 |
| genetic polymorphism: 121–130 | swine: 153–159, 97–107 |
| genomes: 109–119 | xylanolytic microorganisms: 141–151 |
| horses: 131–139 | xylans: 141–151 |
| lactoglobulins: 121–130 | |

Acta agriculturae slovenica

Letnik 84

Ljubljana, december 2004

Številka 2

SUBJECT INDEX BY AGRIS CATEGORY CODES

VSEBINSKO KAZALO PO PREDMETNIH KATEGORIJAH AGRIS

Nataša SIARD^{a)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Zootechnical Dept., Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia, Ph.D., M.Sc.,
e-mail: natasa.siard@bfro.uni-lj.si.

Animal genetics and breeding – L10	97–107, 109–119, 131–139
Animal ecology – L20	141–151
Animal physiology - Nutrition – L51	141–151
Food science and technology – Q01	109–119, 121–130, 153–159
Food composition – Q04	153–159

Acta agriculturae slovenica

Letnik 84

Ljubljana, december 2004

Številka 2

ABECEDNO KAZALO AVTORJEV

AUTHOR'S INDEX

Št. No.	Avtor Author	Stran primarnega prispevka Page of the primary source
1.	BARTOL Tomaž	161
2.	ČEPELJNIK Tadej	141–151
3.	DOVČ Peter	97–107, 109–119, 121–130, 131–139
4.	ĐIKIĆ Marija	153–159
5.	FIDLER Katarina	141–151
6.	FRAJMAN Polona	109–119
7.	HABE Franc	131–139
8.	IVANKOVIĆ Ante	121–130
9.	JURIĆ Ivan	153–159
10.	KAROLYI Danijel	153–159
11.	KAVAR Tatjana	131–139
12.	KOZMUS Peter	95–96
13.	MARINŠEK-LOGAR Romana	141–151
14.	MILOŠEVIČ BERLIČ Tamara	97–107
15.	POKLUKAR Janez	93–94
16.	RUPIĆ Vlatko	153–159
17.	SALAJPAL Krešimir	153–159
18.	SIARD Nataša	163

NAVODILA AVTORJEM

Prispevki

Sprejemamo izvirne znanstvene članke, predhodne objave in raziskovalne notice s področja zootehnike v slovenskem in angleškem jeziku, znanstveno pregledne članke samo po poprejšnjem dogovoru. Objavljamo tudi prispevke, podane na simpozijih, ki niso bili v celoti objavljeni v zborniku simpozija. Če je prispevek del diplomskega, magistrskega ali doktorskega dela, navedemo to in tudi mentorja na dnu prve strani. Navedbe morajo biti v slovenskem in angleškem jeziku.

Pri prispevkih v slovenskem jeziku morajo biti preglednice, grafikoni, slike in priloge dvojezični, povsod je slovenščina na prvem mestu. Naslovi grafikonov in slik so pod njimi. Slike in grafikoni so v besedilu. Priloženi morajo biti tudi jasno označeni izvorniki slik (fotografije ali ločene grafične datoteke). Na avtorjevo željo jih vračamo. Grafikoni morajo biti črno-beli, brez rastrov. Dovoljeni so vzorci v črno-beli kombinaciji. Latinske izraze pišemo ležeče. V slovenščini uporabljamo decimalno vejico, v angleščini decimalno piko. Prispevki v angleščini morajo imeti povzetek v slovenščini in obratno.

Prispevki naj bodo strnjeni, kratki, največ 12 strani. Uporabljamo Microsoft Word 97 ali novejšo verzijo (Windows); pisava v besedilu in preglednicah je Times New Roman, velikost črk 12, v obsežnih preglednicah je lahko 10, pisava v grafikonih in slikah je Ariel, velikost črk najmanj 9, pisava za primerjave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij je Courier; zunanji rob 2,0 cm, notranji 2,5 cm, zgoraj živa *pagina* v eni vrstici, velikost črk 10 z avtorjem oz. avtorji in naslovom prispevka, zaključenim s piko. Če je naslov daljši, ga smiselno okrajšamo. Primera: Štuhec, I. in Siard, N. Obnašanje prašičev. Stibilj, V. in sod. Določitev maščobno-kislinske sestave ... vzorcev mleka v Sloveniji.

Prva stran

Na prvi strani prispevka na desni strani označimo vrsto prispevka v slovenščini in angleščini, sledi naslov prispevka, pod njim avtorji. Ime avtorjev navedemo v polni obliki (ime in priimek). Vsak avtor naj bo označen z indeksom, ki ga navedemo takoj pod avtorji, in vsebuje polni naslov ustanove ter znanstveni in akademski naslov; vse v jeziku prispevka. Navedemo sedež ustanove, kjer avtor dela. Če je raziskava opravljena drugje, avtor navede tudi sedež te inštitucije. Na željo avtorjev bomo navedli naslov elektronske pošte.

Pod naslovi avtorjev je datum prispetja in datum sprejetja prispevka, ki ostaneta odprta. Sledi razumljiv in poveden izvleček z do 250 besedami. Vsebuje namen in metode dela, rezultate, razpravo in sklepe. Sledijo ključne besede.

Izvlačku v jeziku objave sledi naslov in izvleček s ključnimi besedami v drugem jeziku.

Predlogo za pomoč pri oblikovanju prve strani prispevka najdejo avtorji na domači strani: <http://www.bf.uni-lj.si/aas>.

Viri

V besedilu navajamo v oklepaju avtorja in leto objave: (priimek, leto). Če sta avtorja dva, pišemo: (priimek in priimek, leto), če je avtorjev več, pišemo: (priimek in sod., leto). Sekundarni vir označimo z »navedeno v« ali »cv.«. Seznam virov je na koncu prispevka, neoštevilčen in v abecednem redu. Vire istega avtorja, objavljene v istem letu, razvrstimo kronološko z a, b, c. Primer: 1997a. Navajanje literature naj bo popolno: pri revijah letnik, leto, številka, strani; pri knjigah kraj, založba, leto, strani. Za naslove revij je dovoljena uradna okrajšava, za okrajšanimi besedami naj bodo vedno pike. Navedbo zaključimo s piko. Nekaj primerov:

- Fraser, A.F./ Broom, D.M. Farm animal behaviour and welfare. London, Bailliere Tindall, 1990, 437 str.
- Hvelplund, T. Protein evaluation of treated straws. V: Evaluation of straws in ruminant feeding (ur.: Chenost, M./ Reiniger, A.). London, Elsevier Applied Science, 1989, 66–74.
- Stekar, J.M.A. Vsebnost makro elementov v slovenski mrvi. V: Posvetovanje o prehrani domačih živali »Zadravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 1997-10-27/28. Murska Sobota, Živinorejsko-veterinarski zavod za Pomurje, 1997, 105–117.
- Stekar, J.M.A./ Golob, A./ Stibilj, V./ Koman Rajšp, M. Sestava in hranilna vrednost voluminozne krme v letu 1990. Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. Živin., 58(1991), 149–155.
- Stekar, J.M.A./ Pen, A. Sadržaj natriuma, cinka i mangana u stočnoj hrani sa travnatih površina. Agrohemija, 21(1980)1–2, 7–15.

Oddaja

Avtorji prispevke oddajo v dveh izvodih, enega z dvojnimi razmikom med vrsticami in največ 35 vrstic na strani, in na disketi. Priložijo tudi izjavo s podpisami vseh avtorjev, da avtorske pravice v celoti odstopajo reviji.

Prispevke recenziramo in lektoriramo. Praviloma pošljemo mnenje prvemu avtorju, po želji lahko tudi drugače. Če urednik ali recenzenti predlagajo spremembe oz. izboljšave, vrne avtor popravljeno besedilo v 10 dneh v dveh izvodih, enega z dvojnimi razmikom. Ko prvi avtor vnese še lektorjeve pripombe, odda popravljeno besedilo v enem izvodu in na disketi ter vrne izvod z lektorjevimi popravki.

Prispevke sprejemamo vse leto.

NOTES FOR AUTHORS

Papers

We publish original scientific papers, preliminary communications and research statements on the subject of zootechny in Slovenian and English languages while scientific reviews are published only upon agreement. Reports presented on conferences that were not published entirely in the conference reports can be published. If the paper is a part of diploma thesis, master of science thesis or dissertation, it should be indicated at the bottom of the front page as well as the name of mentor. All notes should be written in Slovenian and English language.

Papers in Slovenian language should have tables, graphs, figures and appendices in both languages, Slovenian language being the first. Titles of graphs and figures are below them. Figures and graphs are part of the text. Clearly marked original figures should be added (photographs or separate graphic files); they can be returned upon request. Latin expressions are written in italics. Decimal coma is used in Slovenian and decimal point in English. Papers in English should contain abstract in Slovenian and *vice versa*.

The papers should be condensed, short and should not exceed 12 pages. Microsoft Word 97 or later version (Windows) should be used, fonts Times New Roman, size 12 in text and tables (in large tables size 10 is allowed), Ariel for graphs and figures (letter size at least 9) and Courier for nucleic- and amino acid sequence alignments should be used; right margin 2.0 cm, left margin 2.5 cm; *pagina viva* in one line, size 10, author(s) and abbreviated title of the paper ending with a full stop. Examples: Štuhec, I. and Siard, N. Pig Behaviour. Stibilj, V. *et al.* Determination of fatty acids composition ... milk samples in Slovenia.

First page

The type of the paper should be indicated on the first page on the right side in Slovenian and English language following by title of the paper and authors. Full names of authors are used (first name and surname). Each name of the author should have been added an index, which is put immediately after the author(s), and contains address of the institution and academic degree of the author, in the language of the paper. The address of the institution in which the author works is indicated. If the research was realised elsewhere, the author should name the headquarters of the institution. E-mail is optional.

Under the address of the authors some space for dates of arrival and acceptance for publishing should be left. A comprehensive and explicit abstract up to 250 words follows indicating the objective and methods of work, results, discussion and conclusions. Key words follow the abstract.

The abstract in the language of the paper is followed by the title, abstract and key words in another language.

Help instructions for first page design can be found on home page:
<http://www.bf.uni-lj.si/aas>.

References

References should be indicated in the text by giving author's name, with the year of publication in parentheses, e.g. (surname, year). If authors are two, the following form is used: (surname and surname, year). If authors are several, we use (surname *et al.*, year). Secondary literary sources should be quoted in the form "cited in". The references should be listed at the end of the paper in the alphabetical order and not numbered. If several papers by the same author and from the year are cited, a, b, c, etc. should be put after the year of the publication: e.g. 1997a.

The following form of citation is used: for journals volume, year, number, page; for books place of publication, publisher, year, pages. For journals official abbreviated forms can be used. A full stop should be put after the abbreviated words. Each reference is also closed by a full stop. Examples:

- Fliegerová, K./ Pažoutová, S./ Hodrová, B. Molecular genotyping of rumen fungi based on RFLP analysis. Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. Zooteh., 72(1998), 95–98.
- Fraser, A.F./ Broom, D.M. Farm animal behaviour and welfare. London, Bailliere Tindall, 1990, 437 p.
- Hvelplund, T. Protein evaluation of treated straws. In: Evaluation of straws in ruminant feeding (Eds.: Chenost, M./ Reiniger, A.). London, Elsevier Applied Science, 1989, 66–74.
- Ristič, M./ Klein, F.W. Schlachtkoerperwert von Broilern verschiedener Herkunft. Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung, Kulmbach, 101(1988), 8045–8051.
- Stekar, J.M.A. Silage effluent and water pollution. In: 6th International Symposium "Animal Sciences Days", Portorož, 1998-09-16/18, Slovenia. Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. Supl., 30(1998), 321–325.

Delivery

Papers should be delivered in two hard copies, one with double-spacing and not more than 35 lines per page and on a floppy disc. A statement signed by all authors transfers copyrights on the published article to the Journal.

Papers are reviewed and edited. First author receives a review. If reviewers suggest some corrections, the author should forward them in 10 days and in two copies, one of them with double space. After the first author considers the editor's notes, the corrected paper should be sent in one copy and on a floppy disc.

Papers are accepted all year.