

Wykorzystanie grup i białek polimorficznych krwi do oceny różnorodności genetycznej w polskich rasach zachowawczych

Tadeusz Rychlik, Anna Krawczyk

*Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Podstawową strategią w genetycznym doskonaleniu zwierząt gospodarskich w minionym stuleciu było ulepszanie niewielkiej liczby ras o wysokiej wydajności w odniesieniu do pojedynczych cech, gdzie selekcja prowadzona była w intensywnych warunkach produkcji. Te wysokoprodukcyjne rasy rozprzestrzeniły się w różnych środowiskach hodowlanych w całym świecie, eliminując równocześnie większość ras lokalnych. Szczególnie szybko wyparte zostały rasy przystosowane do ekstensywnych warunków chowu. Dlatego też, właściwe gospodarowanie istniejącymi obecnie na świecie zasobami genetycznymi zwierząt gospodarskich nabrało zasadniczego znaczenia (Hammond, 1997; Cardellino, 2004; Villanueva i in., 2004; Woolliams i in., 2005; Alderson, 2007; Gancarz i Gibała, 2007). W czerwcu 1992, na Konferencji Narodów Zjednoczonych – Środowisko i Rozwój w Rio de Janeiro, 167 krajów zrzeszonych w ONZ podpisało Konwencję o Różnorodności Biologicznej. Polska ratyfikowała tę konwencję, a Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi powierzyło IZ-PIB koordynowanie działań na rzecz ochrony zasobów genetycznych w Polsce.

W populacji owiec programem ochrony zasobów genetycznych objęto następujące rasy: barwna owca górską, owca rasy Corriedale, merynos barwny, owca kamieniecka, owca olkuska, owca pomorska, owca rasy świniarka, owca uhruska, owca wielkopolska, owca rasy wrzosówka, owca żeleźnińska.

Kryzys, jaki objął polskie owczarstwo w latach 90. ubiegłego stulecia, doprowadził do

znacznego spadku pogłowia owiec, następstwem czego mogło być ograniczenie zmienności genetycznej niektórych ras owiec hodowanych w kraju. Uważa się zatem za celowe podjęcie działań na rzecz odbudowy i doskonalenia wartości hodowlanej krajowego pogłowia owiec, w tym szczególnie ras rodzimych, które mogą stanowić rezerwę genetyczną dla takich cech, jak: zdrowotność, płodność i plenność. Działania te powinny objąć również kompleksową analizę ich struktury genetycznej przy wykorzystaniu możliwie największej liczby markerów genetycznych. Pozwoli to monitorować zmienność genetyczną w badanych rasach, której określenie stanowi ważny element programu ochrony bioróżnorodności. Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ-PIB, dysponując dużą ilością wyników badań grup krwi oraz polimorficznych wariantów transferyny i hemoglobiny, uzyskanych w trakcie wieloletnich prac nad kontrolą pochodzenia owiec, wykorzystał je do przeprowadzenia charakterystyki struktury genetycznej wielu ras, w tym również ras objętych programem ochrony zasobów genetycznych. Dotychczas takie badania wykonano dla 5 ras chronionych, tj.: wrzosówki, owcy olkuskiej, owcy rasy Corriedale, owcy kamienieckiej i merynosa barwnego (tab. 1). W ostatnich latach do podobnych celów zaczęto wykorzystywać markery klasy II, takie jak polimorfizm mikrosatelitarnych sekwencji DNA oraz polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP). Przy użyciu tych metod dotychczas przebadano owce rasy: merynos barwny (Natonek-Wiśniewska i Rychlik, 2007) oraz wrzosówka (Radko i in., 2006).

Tabela 1. Badanie struktury genetycznej owiec polskich ras zachowawczych przeprowadzone w oparciu o polimorfizm grup krwi, transferyny i hemoglobiny
 Table 1. Studies into genetic structure of the conserved sheep breeds raised in Poland, conducted so far based on polymorphism of blood groups, transferrin and hemoglobin

Rasa – Breed	Ilość badanych owiec Number of investigated sheep	Bibliografia References
Owca rasy wrzosówka ¹ – Wrzosówka	294	Janik i in., 1996
Owca olkuska – Olkuska	136	Rychlik i in., 1997
Owca rasy Corriedale – Corriedale	114	Kaczor i Rychlik, 2004
Owca kamieniecka – Kamieniecka	111	Kaczor i Rychlik, 2004
Owca rasy wrzosówka ² – Wrzosówka	204	Rychlik i in., 2006
Owca rasy wrzosówka ³ – Wrzosówka	258	Rychlik i in., 2006
Merynos odmiany barwnej – Coloured Merino	102	Rychlik i in., 2007

¹ Badania wykonane w latach 1990-1995 - studies conducted from 1990 to 1995.

² Badania wykonane w latach 1996-2000 - studies conducted from 1996 to 2000.

³ Badania wykonane w latach 2001-2005 - studies conducted from 2001 to 2005.

Oznaczanie grup krwi i polimorficznych wariantów białek

Materiał badań stanowiły dane dotyczące polimorfizmu antygenów erytrocytarnych w 6 układach grupowych krwi (A, B, C, D, M, R) oraz polimorfizmu transferyny (TF) i hemoglobiny (HBB).

Antygeny krwinek czerwonych oznaczono za pomocą 16 reagentów testowych: *antya, Ab, Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bi, PLB-17, Ca, Cb, Da, Ma, R* i 0 w teście hemolizy i aglutynacji w mikropyłkach. Wszystkie reagenty poddawane były międzynarodowej standaryzacji w testach porównawczych organizowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG (International Society for Animal Genetics). Polimorficzne warianty białek TF i HBB oznaczono za pomocą elektroforezy poziomej w żelu skrobiowym wg zmodyfikowanej metody Smithiesa (1955) oraz Evansa (1956).

Genotypy owiec w analizowanych loci ustalono opierając się na prawach dziedziczenia oraz analizie przekazywania potomstwu badanych markerów genetycznych.

Analiza statystyczna obejmowała obliczenie częstości występowania alleli w poszczególnych loci metodą bezpośredniego zsumowania liczby genów, obliczenie stopnia heterozygotyczności (Nei i Roychoudhury, 1974) oraz efektywnej liczby alleli w locus (Kimura i Crow, 1964).

Polimorfizm grup i białek krwi

Wyniki badań grup krwi oraz polimorfizmu TF i HBB u 5 ras owiec objętych programem ochrony zasobów genetycznych dostarczyły kompleksowej informacji o strukturze i zmienności genetycznej tych populacji zwierząt. U badanych owiec obserwowano różnice rasowe w częstości występowania pewnych grup krwi i białek polimorficznych. W najbardziej rozbudowanym układzie grupowym krwi B oznaczono 8 antygenów erytrocytarnych (*Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bi, PLB-17*), które przekazywane były przez rodziców potomstwu w formie kompleksów antygenowych zwanych fenogrupami. Ilość i częstość występowania B-fenogrup w poszczególnych rasach była zróżnicowana. Wśród najczęściej występujących B-fenogrup zaobserwowano fenogrupy, które były charakterystyczne tylko dla danej rasy. Dla rasy Corriedale była to fenogrupa B^{bef} , dla owcy kamienieckiej - B^{bg} , owcy olkuskiej – $B^{bdfgPLB-17}$, merynosa barwnego – $B^{biPLB-17}$, a wrzosówki – $B^{befiPLB-17}$.

Wśród badanych białek polimorficznych (TF i HBB) również wystąpiło znaczne zróżnicowanie między badanymi rasami. Najczęstszym genotypem TF w rasie Corriedale był *BC*, u olkuskiej *AC*, a u owcy kamienieckiej, merynosa barwnego i wrzosówki – genotyp *CD* (tab. 2). Natomiast najczęstszym genotypem HBB u owcy kamienieckiej i olkuskiej był *AB*, a u pozostałych ras *BB*.

Ocena różnorodności genetycznej

Tabela 2. Niektóre wskaźniki charakteryzujące strukturę genetyczną badanych owiec
 Table 2. Some characteristics of the genetic structure of investigated sheep

Rasa <i>Breed</i>	Grupy krwi <i>Blood groups</i>		Białka polimorficzne – najczęstsze genotypy <i>Polymorphic proteins – most frequent genotypes</i>				N*	$\overline{N_a}$	\overline{H}
	Ilość B-fenogrup <i>Number of B-phenogroups</i>	B-fenogrupy występujące z częstością powyżej 5% <i>B-phenogroups occurring with frequency above 5%</i>	TF		HBB				
Owca rasy Corriedale – <i>Corriedale</i>	40	B^b (0,08), $B^{bdfPLB-17}$ (0,09), B^{bef} (0,06), B^{bi} (0,08), B^c (0,13), B' (0,06)	BC	0,22	BB	0,77	60	3,44	0,414
Owca kamieniecka – <i>Kamieniecka</i>	35	B^b (0,09), B^{bg} (0,10), B^c (0,13), $B^{defPLB-17}$ (0,05), B^{dfi} (0,06), B' (0,12)	CD	0,26	AB	0,49	59	3,81	0,537
Owca olkuska – <i>Olkuska</i>	35	B^b (0,08), $B^{bdfgPLB-17}$ (0,09), B^c (0,05), B' (0,23)	AC	0,16	AB	0,50	70	4,44	0,594
Merynos barwny - <i>Coloured Merino</i>	45	B^b (0,08), $B^{bdfgsPLB-17}$ (0,05), B^{bi} (0,06), $B^{biPLB-17}$ (0,08), B^c (0,25), $B^{cPLB-17}$ (0,06), B' (0,05)	CD	0,29	BB	0,71	67	2,80	0,431
Wrzosówka ¹	66	B^b (0,05), B^c (0,09), $B^{cPLB-17}$ (0,17), $B^{dfPLB-17}$ (0,05)	CD	0,23	BB	0,61	97	4,48	0,559
Wrzosówka ²	60	B^b (0,07), B^c (0,15), $B^{cPLB-17}$ (0,16), B' (0,05)	CD	0,25	BB	0,54	82	3,60	0,537
Wrzosówka ³	46	$B^{befiPLB-17}$ (0,05), $B^{bfPLB-17}$ (0,06), B^c (0,24), B^{PLB-17} (0,11)	CD	0,20	BB	0,62	67	2,90	0,495

N* – liczba alleli ogółem – *total number of alleles*.

$\overline{N_a}$ – średnia efektywna liczba alleli – *mean effective number of alleles*.

\overline{H} – średni stopień heterozygotyczności – *mean degree of heterozygosity*.

Zmienność genetyczna

Jednym z zasadniczych zagadnień w hodowli jest zachowanie biologicznej różnorodności zwierząt gospodarskich. Ważnymi wskaźnikami zmienności genetycznej w obrębie populacji (ras) są stopień heterozygotyczności oraz efektywna liczba alleli w locus. Wskazują one na stopień zróżnicowania ras w odniesieniu do analizowanych loci polimorficznych. Wysokie wartości stopnia heterozygotyczności oraz duża ogólna liczba alleli i efektywna liczba alleli świadczą o większym zróżnicowaniu genetycznym danej rasy. W tabeli 2 przedstawiono średnie wartości tych wskaźników dla analizowanych ras. Największą zmiennością genetyczną w obrębie analizowanych loci charakteryzowała się populacja wrzosówki badana w latach 1990-1995. Stwierdzono w niej ogółem 97 alleli grup i białek krwi; średnia wartość stopnia heterozygotyczności (\bar{H}) wynosiła 0,559, a średnia wartość efektywnej liczby alleli (\bar{N}_a) –4,48. Najmniejsze zróżnicowanie wykazano w rasie Corriedale: $\bar{H}=0,414$, a $\bar{N}_a=3,44$. Średnią wartość stopnia heterozygotyczności poniżej 0,5 wykazano również u merynosa barwnego (0,431) oraz w populacji wrzosówki w badaniach przeprowadzonych w latach 2001-2005. W rasie wrzosówka, gdzie badania przeprowadzono w 3 okresach, stwierdzono zmniejszenie się zmienności genetycznej na przestrzeni 15 lat (Rychlik i in., 2006). Świadczyło o tym zmniejszenie się ogólnej liczby alleli grup i białek krwi, jak również obniżenie się średniej wartości stopnia heterozygo-

tyczności z 0,559 do 0,495.

Podsumowując uzyskane wyniki należy stwierdzić, że badane rasy owiec różnią się między sobą w zakresie zmienności genetycznej badanych markerów. Znalazło to wyraz w ilości i częstości występowania alleli grup krwi i białek polimorficznych krwi, w efektywnej liczbie alleli i wielkości stopnia heterozygotyczności. Obserwowane różnice mogą wynikać z różnego pochodzenia badanych ras, jak również mogą być następstwem prowadzonych prac hodowlanych.

Praca hodowlana nad doskonaleniem różnych ras owiec, wytworzeniem nowych odmian czy też linii syntetycznych, cechuje się intensywną selekcją prowadzoną wyłącznie w oparciu o cechy użytkowe bez uwzględnienia markerów genetycznych. Może to doprowadzić do zwiększenia częstości występowania pewnych genów warunkujących znaczniki krwi, ich znacznej redukcji bądź też całkowitej eliminacji z określonej populacji zwierząt. Badania struktury genetycznej pozwalają określić stopień tych zmian oraz wyjaśnić, które geny ulegają eliminacji równoległe do usuwania niekorzystnych z hodowlanego punktu widzenia cech produkcyjnych.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają dużą przydatność markerów genetycznych użytych do przeprowadzenia charakterystyki struktury genetycznej różnych ras owiec oraz śledzenia zachodzących w niej zmian, przez co mogą stanowić ważne źródło informacji dla podejmowanych działań mających na celu ochronę zasobów genetycznych ras rodzimych.

Literatura

- Alderson L. (2007). The changing role of non-governmental organizations in the conservation of animal genetic resources. Book of Abstracts of International Scientific Conference – Conservation of Animal Genetic Resources in Poland and in Europe – Achievements and Dilemmas, p. 123.
- Cardellino R.A. (2004). Conservation of farm animal resources – a global genetic view.
- Evans J.V., King J.W., Cohen B.L., Harris H., Warren F.L. (1956). Genetics of haemoglobin and potassium differences in sheep. *Nature*, 178, p. 849.
- Gancarz J., Gibała M. (2007). Breeds of horses included in the bio-variety protection program in Podkarpacie Voivodship. Book of Abstracts of International Scientific Conference – Conservation of Animal Genetic Resources in Poland and in Europe – Achievements and Dilemmas, p.95.
- Hammond K. (1997). The global strategy for management of farm animal genetic resources. *Zesz. Nauk. PTZ, Prz. Hod.*, 33: 17-40.
- Janik A., Rychlik T., Duniec M. (1996). Struktura genetyczna krajowych ras owiec pod względem grup krwi i polimorficznych wariantów białek. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 23, 1: 43-57.
- Kaczor U., Rychlik T. (2004). The immunogenetic characteristics of the Kamieniecka sheep variety of



Polskie owce górskie (fot. A. Kawęcka)
*Polish Mountain Sheep (photo A.
Kawęcka)*



Polish longwool sheep. Scientific Messenger of Lviv National Academy of Veterinary Medicine named after S.Z. Gzhytskyj., 6, 2, 1: 114-119.

Kimura M., Crow J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in finite population. *Genetics*, 49: 725-738.

Nei M., Roychoudhury A.K. (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379-390.

Radko A., Rychlik T., Słota E. (2006). Genetyczna charakterystyka owcy rasy wrzosówka na podstawie 14 markerów mikrosatelitarnych DNA. *Med. Wet.*, 62 (9): 1073-1075.

Rychlik T., Kaczor U., Wierzchoś E., Marchwica E. (1997). Characteristics of populations of prolific Olkuska sheep and selected sheep breeds with regard to blood groups and polymorphism of hemoglobin and transferrin. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 24: 23-34.

Rychlik T., Duniec M.J., Kościelny M. (2006). Ocena zmian w strukturze genetycznej owiec rasy wrzosów-

ka w oparciu o badania grup krwi oraz polimorficznych wariantów białek. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 33, 1: 31-40.

Rychlik T., Natonek-Wiśniewska M., Pakulski T. (2007). Charakterystyka struktury genetycznej na podstawie polimorfizmu grup i białek krwi oraz DNA stada rezerwy genetycznej barwnego merynosa (w jęz. ang). *Ann. Anim. Sci., Suppl.*, 1: 59-62.

Smieties C. (1955). Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61, p. 629.

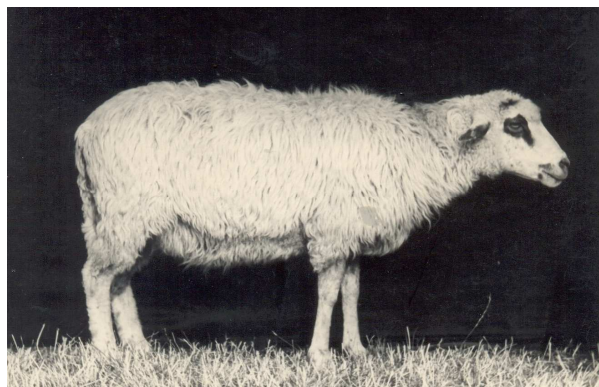
Villanueva B., Pong-Wong R., Woolliams J.A., Avendano S. (2004). Managing genetic resources in selected and conserved population. *Farm Anim. Genet. Res. Brit. Soc. Anim. Sci., Occasion. Publ.*, 30: 113-131.

Woolliams J.A., Berg P., Maki-Tanila A., Meuwissen T.H.E., Fimland E. (2005). Sustainable Management of Animal Genetic Resources. *Nordic Gene Bank Farm Animals*.

USE OF BLOOD GROUPS AND POLYMORPHIC PROTEINS TO EVALUATE GENETIC DIVERSITY IN POLISH CONSERVATION BREEDS

Summary

Five Polish breeds of sheep included in the genetic resources conservation programme (Wrzosówka, Olkuska, Corriedale, Kamieniecka and Coloured Merino) were characterized in terms of genetic structure based on the analysis of the polymorphism of erythrocyte antigens in 6 blood group systems (A, B, C, D, M, R) and electrophoretic variants of transferrin and haemoglobin. The sheep breeds studied differed in the frequency and number of alleles determining particular genetic markers of blood and in the degree of heterozygosity. The greatest differences were found in a flock of Wrzosówka sheep examined in 1990-1995, where 97 alleles of blood groups and proteins were found and the mean heterozygosity was 0.559. The smallest differences were found in the Corriedale breed, where the total number of alleles was 60 and the degree of heterozygosity was 0.414. In the Wrzosówka breed, which were studied in three periods, genetic variation was found to decrease over 15 years, as evidenced by a reduction in the overall number of alleles of blood groups and proteins, and a reduction in the mean degree of heterozygosity.



Cakiel siedmiogrodzki (fot. W. Puchalski)
Transylvanian Zackel (photo W. Puchalski)