

CHARAKTERYSTYKA STRUKTURY GENETYCZNEJ POLSKIEJ OWCY GÓRSKIEJ ODMIANY BARWNEJ*

Aldona Kawęcka¹, Katarzyna Piórkowska²

¹Dział Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt, ²Dział Genetyki i Hodowli Zwierząt,
Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, 32-083 Balice k. Krakowa

W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę charakterystyki struktury genetycznej polskiej owcy górskiej odmiany barwnej na podstawie sekwencji mikrosatelitarnych DNA. Do analizy wykorzystano 15 markerów zalecanych przez FAO do oceny bioróżnorodności owiec: DYMS1, INRA063, ILSTS28, OarAE129, OarFCB20, OarFCB226, OarFCB304, OarHH47, OarJMP29, OarJMP58, OarVH72, MAF65, MAF214, MCM527, SRCRSP5. U polskiej owcy górskiej odmiany barwnej zidentyfikowano 129 alleli w 15 loci. Średnia liczba alleli obserwowanych dla rasy wynosiła 8,6, a efektywnych 5,28. Średnia heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana osiągnęła wysokie wartości, które wynosiły odpowiednio 0,709 i 0,795. Wyliczony współczynnik inbredu wynosił 0,108. Uzyskane wyniki wskazują na stosunkowo duże zróżnicowanie genetyczne badanej populacji. Wykorzystując narzędzie, jakim są markery mikrosatelitarne, można porównywać poziom zmienności rodzimych ras owiec i monitorować zmiany zachodzące w tych niewielkich populacjach.

Produkcja owczarska w Polsce charakteryzuje się ogromną różnorodnością na tle innych krajów europejskich. Obecnie użytkowanych jest ponad trzydzieści ras owiec i innych grup genetycznych, takich jak linie hodowlane i mieszańce pełne. Zmiany zachodzące w skutek pracy hodowlanej stwarzają niebezpieczeństwo ograniczenia tej różnorodności. Coraz większego znaczenia nabierają zatem badania struktury genetycznej tego gatunku służące monitorowaniu zmian zachodzących w populacjach. Wiele ośrodków naukowych na świecie wykorzystuje w tym celu markery mikrosatelitarne, szczególnie do szacowania zmienności genetycznej rodzimych ras owiec, często zagrożonych wyginięciem (Oliveira i in., 2003; Paiva i in., 2005; Bozzi in., 2009). Działania takie przewidziane są również w ramach Światowego Planu działań na rzecz Zasobów Genetycznych Zwierząt (Global Plan of Action). W programie MoDAD (Measurement of Domestic Animal Diversity – Analiza Różnorodności Biologicznej Zwierząt Gospodarskich) zaproponowano zestaw markerów przydatnych do badań struktury genetycznej zwierząt gospodarskich (FAO, 2004). Na podstawie frekwencji alleli w loci mikrosatelitarnych szacuje się zmienność genetyczną.

* Praca wykonana w ramach działalności statutowej IZ-PIB, Temat 1333.1.

W badaniach przeprowadzonych w Instytucie Zootechniki PIB podjęto próbę charakterystyki struktury genetycznej barwnej owcy górskiej na podstawie sekwencji mikrosatelitarnych DNA.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 96 maciorkach polskiej owcy górskiej odmiany barwnej. Zwierzęta pochodziły z dwóch największych stad biorących udział w programie ochrony zasobów genetycznych, zlokalizowanych na terenie powiatu nowotarskiego.

Izolację DNA z krwi przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do izolacji genomowego DNA Wizard® *Genomic DNA Purification Kit*. Do analizy polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA wykorzystano 15 markerów zalecanych przez FAO do oceny bioróżnorodności owiec (FAO, 2004): *DYMS1*, *INRA063*, *ILSTS28*, *OarAE129*, *OarFCB20*, *OarFCB226*, *OarFCB304*, *OarHH47*, *OarJMP29*, *OarJMP58*, *OarVH72*, *MAF65*, *MAF214*, *MCM527*, *SRCRSP5*.

Do każdego markera mikrosatelitarnego dobrano sekwencje starterowe wyznaczone znacznikami fluorescencyjnymi typu „well red”. Sekwencje starterowe pozyskano z internetowej bazy danych (<http://www.projects.roslin.ac.uk/sheepmap>). Amplifikację wyizolowanego DNA przeprowadzono w trzech reakcjach typu multiplex. Pierwszy zestaw reakcyjny zawierał startery dla fragmentów mikrosatelitarnych: *OarJMP29*, *OarJMP58*, *OarFCB226*, *INRA063*, *OarVH72*; drugi: *OarHH47*, *DYMS1*, *SRCRSP5*, *ILSTS28*; trzeci: *MAF65*, *OarFCB20*, *OarFCB304*, *OarAE129*, *MAF214*, *MCM527*. Reakcję dla pojedynczej próbki DNA przeprowadzono w objętości 10 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała: 100 ng DNA, 1,2 μ l 25 mM $MgCl_2$, 0,4 μ l 10mM dNTP, 1 μ l buforu (10 \times), 0,2–0,9 10mM primerów i 2 U polimerazy AmplitaqGold. Amplifikację dla wybranych sekwencji mikrosatelitarnych przeprowadzono w następujących warunkach: wstępna denaturacja 95°C – 10 min, 31 cykli: 94°C – 30 s, 55°C – 30 s, 72°C – 1 min, wydłużanie: 72°C – 5 min. Produkty PCR poddano rozdzielowi w sekwenatorze kapilarnym Beckman Coulter CEQ8000. Wielkość analizowanych fragmentów mikrosatelitarnych określono w parach zasad, a uzyskane dane stanowiły podstawę do przeprowadzenia analiz statystycznych. Analizy przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego POPGENE 3.2 (www.ualberta.ca/~fyeh/). Na podstawie częstości alleli obliczono parametry zmienności genetycznej: heterozygotyczność obserwowaną (H_o) i oczekiwaną (H_e), liczbę alleli obserwowanych (N_o) i efektywnych (N_e) dla poszczególnych *loci*, indeks stopnia polimorfizmu (PIC) oraz współczynnik inbrodu (F_{IS}).

Wyniki

U polskiej owcy górskiej odmiany barwnej zidentyfikowano 129 alleli w 15 *loci*. Wszystkie badane sekwencje mikrosatelitarne były polimorficzne. Największą liczbą alleli (12) o długości od 126 do 154 pz charakteryzował się *locus OarHH47*, w któ-

Tabela 2. Obserwowana liczba alleli (No), efektywna liczba alleli (Ne), heterozygotyczność obserwowana (Ho) i oczekiwana (He), indeks stopnia polimorfizmu (PIC) i wartość F_{IS} dla badanych loci i średnia dla rasy

Table 2. Observed number of alleles (No), effective number of alleles (Ne), observed (Ho) and expected heterozygosity (He), polymorphic information content (PIC), and F_{IS} value at the loci and mean for breed

Locus	No	Ne	Ho	He	PIC	F_{IS}
DYMS1	10	8,13	0,906	0,882	0,865	-0,033
INRA063	9	4,91	0,479	0,801	0,770	0,398
ILSTS28	9	5,12	0,739	0,809	0,778	0,081
OarAE129	5	3,35	0,406	0,705	0,647	0,421
OarFCB20	10	5,73	0,635	0,829	0,807	0,230
OarFCB226	9	5,21	0,760	0,812	0,779	0,059
OarFCB304	7	2,95	0,656	0,665	0,621	0,008
OarHH47	12	6,15	0,865	0,842	0,821	-0,032
OarJMP29	11	5,04	0,729	0,806	0,783	0,09
OarJMP58	10	6,65	0,760	0,854	0,832	0,105
OarVH72	8	6,39	0,750	0,848	0,824	0,111
MAF65	7	4,46	0,635	0,779	0,737	0,181
MAF214	8	3,82	0,812	0,742	0,698	-0,100
MCM527	10	8,45	0,895	0,886	0,870	-0,016
SRCRSP5	4	2,92	0,615	0,661	0,608	0,066
	8,6	5,28	0,709	0,795	0,763	0,108

Średnia liczba alleli obserwowanych dla rasy wynosiła 8,6, a efektywnych 5,28. Średnia heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana osiągnęła wysokie wartości, które wynosiły odpowiednio $Ho = 0,709$ i $He = 0,795$. Wyliczony współczynnik in-bredu wynosił 0,108.

Omówienie wyników

Trzynaście rodzimych ras owiec objęto w Polsce programem ochrony zasobów genetycznych, ponieważ uznano je za zagrożone wyginięciem. Należą do nich wspomniana już barwna owca górską, korideil, owca kamieniecka, olkuska, pomorska, uhruska, wielkopolska, żelaźnieńska, świniarka, wrzosówka, merynos barwny, merynos polski w starym typie i cakiel podhalański.

Barwna owca górską jest rodzimą odmianą starej, prymitywnej i licznej grupy rasowej cakiel, występującej od wieków na terenie polskich Karpat. Ceniono ją szczególnie ze względu na kolorową, ciemną wełnę i skóry, które wykorzystywano do produkcji strojów regionalnych i elementów dekoracyjnych. Owce te są doskonale przystosowane do surowych warunków klimatycznych, odporne na choroby, mają niewielkie wymagania paszowe i silnie rozwinięty instynkt stadny. Użytkowane są w kierunku wełnisto-mlecznym. Obecnie populacja barwnych owiec górskich liczy około 600 osobników.

Na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnych podejmowano próby oceny struktury genetycznej rodzimej rasy wrzosówki (Radko i in., 2006) i merynosa barwnego (Rychlik i in., 2007). Wśród 57 europejskich ras owiec, których strukturę genetyczną analizowali Peter i in. (2007), znalazły się takie polskie rodzime rasy jak wrzosówka, owca kamieniecka, pomorska, żelaźnieńska oraz polska owca górską. Badania te stanowią część większego projektu ECONOGENE (<http://www.econogene.eu>), finansowanego przez Unię Europejską, którego celem było pogłębienie istniejącej wiedzy na temat bioróżnorodności owiec i kóz Europy i Środkowego Wschodu, przy pomocy technik biologii molekularnej, z uwzględnieniem socjo-ekonomicznych warunków w regionach ich występowania.

Zastosowane w badaniach własnych sekwencje mikrosatelitarne charakteryzowały się wysokim polimorfizmem. Indeks stopnia polimorfizmu (PIC) dla wszystkich *loci* przekraczał 0,76. Wskazuje to na przydatność zastosowanych markerów w badaniach struktury genetycznej owiec. Średnia liczba alleli dla barwnej owcy górskiej wynosiła 8,6. Peter (2005) uzyskała dla polskiej owcy górskiej podobną liczbę alleli (8,42). Pozostałe polskie lokalne rasy wymienione przez autorkę charakteryzowały się niższymi wartościami: No = 7,6 dla owcy pomorskiej i kamienieckiej, 6,84 dla wrzosówki i 6,16 dla owcy żelaźnieńskiej. W badaniach Rychlika i in. (2007) średnia liczba alleli dla najmniej licznej rasy rodzimej – barwnego merynosa, była znacznie wyższa i wynosiła 9,4. Liczba alleli w populacjach cakła występujących na terenie Rumunii (Ruda), Albanii (Ruda, Bardhoke), Turcji (Sakiz, Gokceada) i Serbii (Pramenka) wahała się od 5,9 do 7,8, a u bułgarskiej rasy Martiza wyniosła 8,6 (Kusza i in., 2008). Dalvit i in. (2008) badając genetyczną strukturę ośmiu alpejskich ras owiec zaobserwowali od 7,4 (Tiroler Bergschaf) do 9 alleli (Biellese). Pomimo wysokiej liczby obserwowanych alleli u owcy barwnej, liczba efektywnych alleli była dużo niższa w poszczególnych *loci*. Niską liczbę alleli efektywnych u merynosa barwnego ($N_e = 4,2$) stwierdził również we wspomnianej już pracy Rychlik i in. (2007).

W badaniach własnych uzyskano wysokie wartości heterozygotyczności obserwowanej (H_o) i oczekiwanej (H_e), z wyjątkiem *loci OarAE129* i *INRA063*, gdzie H_o nie przekroczyła 0,5. Średnia heterozygotyczność obserwowana u barwnej owcy górskiej wynosiła 0,71. Zbliżoną wartość H_o dla polskiej owcy górskiej (0,7) uzyskała Peter (2005). Inne polskie rodzime rasy w badaniach tej autorki charakteryzowały się również stosunkowo wysokimi wartościami H_o : 0,65 dla owcy pomorskiej i żelaźnieńskiej oraz 0,75 dla kamienieckiej. Barwna owca górską charakteryzowała się wyższą heterozygotycznością niż większość ras zaliczanych do grupy rasowej cakiel występującej na terenie Europy południowo-wschodniej. Heterozygotyczność obserwowana dla różnych odmian cakła zaobserwowana przez Kusza i in. (2008) była znacznie niższa i wahała się od 0,4 u owiec rasy Pramenka do 0,57 dla bułgarskiej rasy Martiza. Według Peter (2005) dla innych ras zaliczanych do grupy rasowej cakiel, H_o wynosiła 0,62 u greckiej owcy Skopelos do 0,75 u albańskiej rasy Ruda. Zbliżone wartości heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej wskazują na równowagę w populacji owcy barwnej.

Uzyskane w pracy wyniki świadczą o dużej zmienności genetycznej rodzimej rasy. Do podobnych wniosków doszli Rychlik i Krawczyk (2009), którzy analizowali polimorfizm markerów klasy I u polskiej owcy górskiej odmiany barwnej.

Narastające spokrewnienie osobników i wynikający stąd inbred jest problemem zarówno małych, zamkniętych populacji, jak i większych, poddanych intensywnej selekcji. Wzrost inbredu jest przeważnie zjawiskiem niekorzystnym, może powodować spadek żywotności, zdrowotności i użytkowości. W hodowli owiec najczęściej powoduje on obniżenie masy ciała i tempa wzrostu jagniąt, płodności i plenności maciorek. Miarą stopnia zimbredowania populacji jest współczynnik inbredu (F_{IS}), który określa proporcję heterozygotyczności obserwowanej do oczekiwanej w populacji. Wartości współczynnika inbredu stwierdzone dla większości europejskich ras owiec wynosiły od 0,07 do 0,2 (Peter, 2005; Dalvit i in., 2008). Znacznie wyższy poziom tego wskaźnika dla kilkunastu populacji cygaja i cakla ($F_{IS} = 0,3$) zaobserwowali Kusza i in. (2008). Niskie prawdopodobieństwo inbredu (wartości $F_{IS} < 0$) dla ukraińskich i rosyjskich ras owiec zaobserwowali natomiast Ozerov i in. (2004). Wyliczony w badaniach własnych współczynnik inbredu przyjmował stosunkowo niską wartość. Z powodu ograniczonej liczebności populacji barwnej owcy górskiej należy zwracać w pracy hodowlanej szczególną uwagę na właściwy dobór tryków, z zachowaniem rotacji między stadami, tak aby nie dopuścić do wzrostu zimbredowania.

Uzyskane wyniki pokazały stosunkowo duże zróżnicowanie genetyczne badanej populacji barwnej owcy górskiej. Jednak ze względu na zagrożenie, jakie niesie za sobą wzrost inbredu, szczególnie w niewielkich populacjach rodzimych ras owiec, wskazane jest okresowe monitorowanie tych zmian przy użyciu markerów mikrosatelitarnych.

Piśmiennictwo

- Bozzi R., Degl'Innocenti P., Rivera Diaz P., Nardi L., Crovetto A., Sargentini C., Giorgetti A. (2009). Genetic characterization and breed assignment in five Italian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Res.*, 85, 1: 50–57.
- Dalvit C., Saccà E., Cassandro M., Gervaso M., Pastore E., Piasentier E. (2008). Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. *Small Ruminant Res.*, 80, 1–3: 45–51.
- FAO (2004). Secondary Guidelines for Development of National Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers. FAO, Rome (Italy).
- Kusza S., Nagy I., Sasvári Z., Stágel A., Németh T., Molnár A., Kume K., Bösze Z., Jávör A., Kukovics S. (2008). Genetic diversity and population structure of Tsigai and Zackel type of sheep breeds in the Central-, Eastern- and Southern-European regions. *Small Ruminant Res.*, 78, 1–3: 13–23.
- Oliveira C., Barbosa E., Oliveira J., Arranz J.J., Bayon Y., Brito N.V., San Primitivo F. (2003). Genetic variability in Bordaleira de Entre Douro e Minho and Serra da Estrela Portuguese sheep breeds using microsatellites. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, 2, 4: 484–486.
- Ozerov M., Marzanov N., Tapió M., Kiselyova T., Kantanen J. (2004). Microsatellite analysis of genetic diversity in Russian and Ukrainian sheep breeds. *Animal breeding in the Baltics. Proc. 10th Baltic Animal Breeding Conference, Tartu (Estonia), 13–14.05.2004.*
- Paiva S.R., Faria D.A., Silvério V.C., McManus C., Egito A.A., Dergam J.A., Guimarães S.E.F., Castro S.R., Albuquerque M.S.M., Mariante A.S. (2005). Genetic variability among Brazilian sheep using microsatellites. *Proc. Conf.: The role of Biotechnology, Villa Gualino, Turin (Italy), 5–7.03.2005*, pp. 195–196.
- Peter C. (2005). Molekulargenetische Charakterisierung von schaffrasen Europas und des nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten, PhD Thesis no 2729, Justus-Liebig-Universität Giessen (<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2006/2729/pdf/PeterChristina-2005-12-01.pdf>).

- Peter C., Bruford M., Perez T., Dalamitra S., Hewitt G., Erhardt G. (2007). Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Anim. Genet.*, 38: 37–44.
- Radko A., Rychlik T., Słota E. (2006). Genetyczna charakterystyka owcy wrzosówka na podstawie 14 markerów mikrosatelitarnych DNA. *Med. Wet.*, 62, 9: 1073–1075.
- Rychlik T., Natonek-Wiśniewska M., Pakulski T. (2007). Characteristics of the genetic structure of a Coloured Merino genetic reserve flock. *Ann. Anim. Sci.*, Suppl., 1: 63–67.
- Rychlik T., Krawczyk A. (2009). Class I marker polymorphism in Polish Mountain Sheep of coloured and white varieties. *Ann. Anim. Sci.*, 9, 4: 385–393.

Zatwierdzono do druku 19 IV 2011

ALDONA KAWĘCKA, KATARZYNA PIÓRKOWSKA

Characteristics of the genetic structure of Polish Coloured Mountain sheep

SUMMARY

This study attempted to characterize the genetic structure of Polish Coloured Mountain sheep based on microsatellite DNA sequences. Analysis was made using 15 markers recommended by FAO for evaluation of biodiversity in sheep: DYMS1, INRA063, ILSTS28, OarAE129, OarFCB20, OarFCB226, OarFCB304, OarHH47, OarJMP29, OarJMP58, OarVH72, MAF65, MAF214, MCM527, and SRCRSP5. A total of 129 alleles at 15 loci were identified in Polish Coloured Mountain sheep. The mean number of observed and effective alleles for the breed was 8.6 and 5.28, respectively. The mean observed and expected heterozygosity reached high values of 0.709 and 0.795, respectively. The coefficient of inbreeding was 0.108. The results show relatively high genetic variation of the analysed population. Microsatellite markers can be used as a tool to compare the level of variation in the native sheep breeds and to monitor changes taking place in these small populations.

Key words: sheep, genetic structure, microsatellites