

## ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA W POPULACJI KOZY KARPACKIEJ NA PODSTAWIE MARKERÓW GENETYCZNYCH KLASY I\*

Tadeusz Rychlik<sup>1</sup>, Jacek Sikora<sup>2</sup>, Anna Krawczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dział Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt,

<sup>2</sup>Dział Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, 32-083 Balice k. Krakowa

*Celem badań było określenie stopnia zróżnicowania genetycznego na podstawie polimorfizmu grup i białek krwi jedynego w Polsce stada kozy karpackiej znajdującego się w Zakładzie Doświadczalnym IZ PIB w Odrzechowej. Materiał badań stanowiły próbki krwi pobrane od 44 kóz. Antygeny erytrocytarne zostały oznaczone w 4 układach: A, B, C i R przy użyciu 7 wybranych owczych reagentów testowych. Genetyczne warianty hemoglobiny (Hb) i transferyny (Tf) zostały oznaczone za pomocą elektroforezy poziomej w żelu skrobiowym. W poszczególnych loci wyliczono częstości występowania alleli, współczynnik inbrodu ( $F_{IS}$ ), średnie wartości obserwowanego i oczekiwanego stopnia heterozygotyczności (H). Przeprowadzono również analizę równowagi genetycznej opartej na układzie Hb i Tf. Najbardziej polimorficznym układem krwi był układ B, w którym zaobserwowano 12 alleli. Wśród polimorficznych wariantów białek krwi najczęstszym allelem w locus transferyny był  $Tf^B$  (0,693), natomiast w locus hemoglobiny  $Hb^B$  (0,682). Wśród genotypów przeważały  $Hb^{BB}$  (0,54) i  $Tf^{BB}$  (0,54). Średnie wartości obserwowanego stopnia heterozygotyczności oraz współczynnika inbrodu wyniosły odpowiednio 0,2955 i 0,4687. W badanym stadzie wykazano zachwianie stanu równowagi genetycznej w loci białek (przy  $P \leq 0,01$ ). Pod względem wszystkich badanych parametrów, stado kozy karpackiej charakteryzuje niski stopień zróżnicowania genetycznego. Spowodowane może to być małą liczebnością zarówno populacji wyjściowej, z której wprowadzono aktualnie hodowaną linię tej rasy, jak też stada podstawowego.*

Jednym z podstawowych działań FAO jest ochrona zasobów genetycznych zwierząt i roślin będących rezerwuarem cennych genotypów świadczących o różnorodności genetycznej. W tym rozumieniu założeń światowej organizacji cenne są zwłaszcza rodzime rasy, których pogłowie systematycznie maleje na rzecz bardziej wydajnych ras czy odmian (FAO, 2007).

Hodowla kóz w naszym kraju nigdy nie była znaczącą gałęzią rolnictwa. Pogłowie zwierząt w Polsce stanowią w przeważającej liczbie osobniki bezrasowe (Ryniewicz i Krzyżewski, 1997). Wraz ze zmianami polityczno-gospodarczymi w Polsce liczba kóz rosła (np. przed drugą wojną światową) bądź gwałtownie spadała (pod ko-

---

\*Praca finansowana z tematu nr: 08-2.11.9.

niec XX w.). Po drugiej wojnie światowej hodowla kóz bazowała przede wszystkim na importowanych szlachetnych rasach, co doprowadziło do drastycznego spadku i zaniku pogłowia starych polskich lokalnych ras, takich jak sandomierska, kazimierzowska czy karpacka (Kaba i Bagnicka, 2009). Z inicjatywy Instytutu Zootechniki, w 2005 roku podjęto próbę restytucji kozy karpackiej, w oparciu o odnalezione na terenie kraju pojedyncze osobniki, które fenotypem odpowiadały wzorcowi rasowemu. Stado zostało zlokalizowane w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Odrzechowej (ZD IZ PIB Odrzechowa) i w 2007 liczyło 17 kóz matek (Sikora, 2007).

Polimorficzne warianty grup i białek krwi stanowią użyteczny marker do szacowania zmienności genetycznej zwierząt gospodarskich i badania ich struktury genetycznej (Tapio i in., 2003). Ma to istotne znaczenie w planowaniu działań służących skutecznej ochronie gatunków zagrożonych wymarciem (Igarashi i in., 2000).

Biorąc pod uwagę niewielką liczebnie populację kozy karpackiej, niezwykle ważne jest monitorowanie jej zmienności genetycznej. Stąd celem badań było określenie stopnia zróżnicowania genetycznego kozy karpackiej na podstawie polimorfizmu grup i białek krwi.

### Material i metody

Materiał badań stanowiły próbki krwi pobrane od 44 kóz ze stada zachowawczego kozy karpackiej w ZD IZ PIB Odrzechowa.

Oznaczenie antygenów erytrocytarnych przeprowadzono za pomocą testu hemolitycznego wykorzystując 7 owczych reagentów testowych, które pozwoliły na identyfikację u kóz następujących antygenów: A1 (układ A), B2, B3, B8, B15 (układ B), C12 (układ C) oraz R (układ R).

Polimorficzne warianty białek krwi, tj. hemoglobiny (Hb) i transferyny (Tf) zostały oznaczone przy użyciu poziomej elektroforezy w żelu skrobiowym w oparciu o metodę Efremova i Braenda (1964) dla transferyny i metodę Huismana i in. (1958) dla hemoglobiny.

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu GENEPOP (wersja 4.0.10, Raymond i Rousset, 1995; Rousset, 2008). Obejmowała ona obliczenie dla każdego z analizowanych *loci* średniej liczby alleli oraz obserwowanego i oczekiwanego stopnia heterozygotyczności ( $H_{obs}$  i  $H_{ocz}$ ). W oparciu o dwa ostatnie parametry wyliczono współczynnik inbrodu ( $F_{IS}$ ), natomiast na podstawie wartości obserwowanej i oczekiwanej liczby genotypów wyliczonych dla Hb i Tf przeprowadzono ocenę stanu równowagi genetycznej, zgodnie z założeniami prawa Hardy'ego-Weinberga.

### Wyniki

Rezultaty przeprowadzonych badań nad zróżnicowaniem markerów genetycznych w czterech układach grupowych krwi (A, B, C i R) oraz dwóch *loci* białek (Hb i Tf) przedstawiono w tabelach 1–2.

W tabeli 1 przedstawiono częstości występowania cech antygenowych oraz alleli grup i białek krwi w badanej grupie zwierząt.

Tabela 1. Częstość cech antygenowych i alleli w stadzie kozy karpackiej  
Table 1. Frequency of antigenic characters and alleles in the flock of Carpathian goats

Locus	Cecha antygenowa Antigenic character	Częstość Frequency	Allele Alleles	Częstość Frequency
EAA	A1	0,3118	A1	0,3182
			–	0,6818
EAB	B2	0,7272	B2	0,0227
			B2B3	0,0341
			B2B3B8	0,1364
			B2B3B8B15	0,1705
			B2B3B15	0,1818
			B2B8	0,2045
			B3	0,1136
EAC	B3	0,7500	B3	0,1136
			B3B8	0,0455
			B3B8B15	0,0227
EAB	B8	0,5681	B8	0,0227
			B8B15	0,0227
			B15	0,0227
EAC	C12	0,500	B15	0,0227
			C12	0,5227
EAR	R	0,7272	–	0,4773
			R	0,7273
Hb			–	0,2727
			A	0,3068
TF			B	0,6932
			A	0,3182
			B	0,6818

W *locus* grup krwi zidentyfikowano łącznie 18 alleli, spośród których aż 12 zostało wykrytych w układzie grupowym B (EAB). Wśród nich z najwyższą częstością występowały dwa allele: B2B3B15 (0,1818) i B2B8 (0,2045). Najczęściej występującą cechą antygenową w EAB była cecha B3 (0,7500), a najrzadziej B15 (0,2954) (tab. 1).

W populacji kozy karpackiej w obydwu *loci* białek krwi zidentyfikowano dwa allele, spośród których najczęstszymi były Hb<sup>B</sup> (0,6932) i Tf<sup>B</sup> (0,6818).

Tabela 2 zawiera wyniki dotyczące wartości obserwowanych i oczekiwanych liczebności heterozygot i stopnia heterozygotyczności oraz wartości współczynnika inbredu.

Tabela 2. Obserwowana i oczekiwana liczba heterozygot, stopień heterozygotyczności oraz współczynnik inbrodu w badanym stadzie kozy karpackiej  
 Table 2. Observed and expected number of heterozygotes, degree of heterozygosity, and inbreeding coefficient in the investigated flock of Carpathian goats.

Locus	Liczba heterozygot No. of heterozygotes		Stopień heterozygotyczności $H_d$ Degree of heterozygosity		$F_{IS}$
	obserwowana observed	oczekiwana expected	obserwowana observed $H_{obs}$	oczekiwana expected $H_{ocz}$	
A	8	19,310	0,182	0,439	0,5885
B	33	38,115	0,750	0,869	0,1355
C	8	22,207	0,182	0,505	0,6424
R	4	17,655	0,091	0,401	0,7755
Średnia Mean	13,25	24,322	0,341	0,553	0,5355
Hb	13	18,931	0,295	0,430	0,2888
TF	12	19,310	0,273	0,439	0,3813
Średnia Mean	13	22,588	0,295	0,514	0,4687

W loci grup krwi średnia liczba obserwowanych heterozygot (13,25) jest niższa niemal o połowę od wartości oczekiwanych (24,32). Najwyższą wartość obserwowanego stopnia heterozygotyczności odnotowano w układzie grupowym B (0,75) (tab. 2).

Średnie wartości obserwowane stopnia heterozygotyczności wyliczone dla Hb i Tf były niższe (0,295) w porównaniu z wartościami oczekiwanyymi (0,514).

Analizę stanu równowagi genetycznej przeprowadzono w oparciu o obserwowane i oczekiwane wartości stopnia heterozygotyczności w układach Hb i Tf stwierdzając między nimi statystyczną istotność różnic ( $P \leq 0,01$ ).

Wartość współczynnika  $F_{IS}$  wyniosła 0,5355 dla grup krwi i 0,4687 dla białek krwi.

### Omówienie wyników

U kóz zidentyfikowano dotychczas 21 antygenów krwinkowych należących do 6 układów grupowych krwi (A, B, C, E, F, R). Układy A, B, C i R u tego gatunku są homologiczne do odpowiednich układów grupowych krwi owiec. Wykazano również, że niektóre antygeny erytrocytarne kóz mogą być wykrywane przez surowice testowe stosowane do oznaczania grup krwi u owiec (Nguyen, 1990; Kaczor i in., 1999). W przeprowadzonych badaniach z powodzeniem zastosowano owcze reagenty testowe do identyfikacji antygenów erytrocytarnych u kóz, co jest wyrazem wysokiego konserwatywności u gatunków z rodziny Bovidae (Echard i in., 1994; Vaiman i in., 1994).

Dotychczas badania grup krwi u kóz w Polsce przeprowadzono dla rasy białej uszlachetnionej i barwnej (Kaczor i in., 1999). Porównując wyniki dotyczące częstości cech antygenowych najbardziej zróżnicowanego *locus* grup krwi, tj. EAB, można stwierdzić że podobnie jak w pracy własnej cecha B3 dominowała w grupie kóz barwnych. W grupie kóz białych uszlachetnionych cecha B3 występowała natomiast z najniższą frekwencją.

W *locus* Hb wykryto dwa polimorficzne warianty, tj. Hb<sup>A</sup>, Hb<sup>B</sup> i pośredni wariant Hb<sup>AB</sup>. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach Wojdak-Maksymiec (2002), Kaczora i in. (1999) oraz Hrinčá (2010). W innych badaniach przeprowadzonych na populacjach kóz z Azji i Europy wykryto dodatkowo allele Hb<sup>C</sup> oraz Hb<sup>D</sup> (Deza i in., 2000; Nozawa i in., 1978; Rodero, 1997).

Liczba zidentyfikowanych w badanej grupie zwierząt alleli Tf jest tożsama z rezultatami otrzymanymi gdzie indziej (Deza i in., 2000; Wojdak-Maksymiec, 2002; Kaczor i in., 1999). Z kolei w badaniach na populacji kóz hiszpańskich wykryto trzecią formę Tf<sup>C</sup> (Rodero i in., 1997), a forma Tf<sup>D</sup> została zidentyfikowana w rasie afrykańskiej (Osterhoff i Ward-Cox, 1972). Wyniki wielu badań wykazują, że allel Tf<sup>A</sup> jest dominującym allelem genu transferyny u większości ras kóz (Rodero i in., 1997; Deza i in., 2000; Wojdak-Maksymiec, 2002; Kaczor i in., 1999). Wysoka frekwencja allelu Tf<sup>B</sup> charakteryzuje jedynie rasy kóz z terenów południowo-wschodniej Azji (Barker i in., 2001). Stąd zastanawiający jest fakt, że w stadzie zarodowym kóz karpackich przeważał allel Tf<sup>B</sup>. Według niektórych autorów, na terenie Europy allel ten charakteryzuje się najwyższą częstością tylko w rasie saaneńskiej (Watanabe, 1971; Deza, 2000).

Do oszacowania zmienności genetycznej zwierząt wykorzystuje się m.in. takie parametry, jak liczba heterozygot, stopień heterozygotyczności oraz współczynnik inbredu.

Wartość obserwowana stopnia heterozygotyczności w populacji kozy karpackiej jest znacznie niższa od wartości oczekiwanej. Różnica między tymi dwoma parametrami jest istotna statystycznie przy  $P \leq 0,01$ , co wskazuje na brak równowagi genetycznej w populacji.

W badanych *loci* grup i białek krwi wartość współczynnika inbredu była wyższa od 0 ( $F_{IS} > 0$ ), co świadczy o przewadze homozygot w populacji i tym samym zagrożeniu jej inbreдем. Podobne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych na niewielkich liczebnie stadach kóz, które żyją w odseparowanych od siebie terytorialnie grupach (Nyamsamba i in., 2003; Deza i in., 2000; Igarashi i in., 2000). Z kolei w badaniach Rodero i in. (1997) uzyskano wartości  $F_{IS} = 0$  lub  $F_{IS} < 0$  świadczące o przewadze heterozygot w populacji. W badaniach tych analizowano jednak siedem polimorficznych wariantów białek w liczebniejszych populacjach kóz.

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły informacji o występującym polimorfizmie antygenów erytrocytarnych oraz białek krwi (Tf i Hb) w restytuowanym stadzie zachowawczym kozy karpackiej. Obliczone wartości  $H_{ocz}$  i  $H_{obs}$  oraz  $F_{IS}$  wskazują na niewielką zmienność markerów genetycznych w analizowanych *loci*, co przemawia za koniecznością dalszego monitorowania zmienności genetycznej w tej populacji. Otrzymane wyniki mogą być pomocne przy opracowywaniu programów hodowlanych zmierzających do zwiększenia zmienności genetycznej kozy karpackiej.

## Piśmiennictwo

- Barker J.S.F., Tan S.G., Moore S.S., Mukherjee T.K., Matheson J.-L., Selvaraj O.S. (2001). Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (*Capra hircus*). *J. Anim. Breed. Genet.*, 118: 213–233.
- Deza C., Pérez G.T., Gardenal C.N., Varela L., Villar M., Rubiales S., Barioglio C. (2000). Protein polymorphism in native goats from central Argentina. *Small Ruminant Res.*, 35: 195–201.
- Echard G., Broad T.E., Hill D., Pearce P. (1994). Present status of the ovine gene map (*Ovis aries*); comparison with the bovine map (*Bos taurus*). *Mamm. Genome*, 5 (6): 324–332.
- Efremov G., Braend M. (1964). Haemoglobins, transferrins, albumins of sheep and goats. *Proc. IXth Eur. Anim. Blood Grps. and Biochem. Polymorphism*, Prague, 1964, 313–320.
- FAO (2007). Interlaken declaration on animal genetic resources. Annex I. The First International Technical Conference on Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. 3–7.09.2007, Interlaken, Switzerland.
- Hrinčá Gh. (2010). Haemoglobin types in the Carpathian breed and their relevance for goat adaptation. *Lucrări Științifice – Seria Zootehnie*, 54: 110–114.
- Huisman T.H.J., Van Der Vliet G., Sebus T. (1958). Sheep hemoglobins. Some genetic and physiological aspects of two different adult hemoglobins in sheep. *Nature*, 182: 67–73.
- Igarashi M.L.S.P., Machado T.M., Ferro A., Contel E.P.B. (2000). Structure and genetic relationship among Brazilian naturalized and imported goat breeds. *Bioch. Genet.*, 38 (11/12): 353–365.
- Kaba J., Bagnicka E. (2009). Kozy w Polsce, chów i utrzymanie. *Życie Weter.*, 84 (3): 215–219.
- Kaczor U., Rychlik T., Ormian M., Murawski M. (1999). Genetic characteristic of two goat populations kept in Poland with regard to blood groups and protein polymorphism. *Ann. Anim. Sci. – Rocz. Nauk. Zoot.*, 26 (4): 83–91.
- Nguyen T.C. (1990). Genetic systems of red cell blood groups in goats. *Anim. Genet.*, 21: 233–245.
- Nozawa K., Shinjo A., Shotak, T. (1978). Population genetics of farm animals. III. Blood proteins variation in the meat goats in Okinawa Islands of Japan. *Z. Tierz. Zuchtungsbio.*, 95: 60–77.
- Nyamsamba D., Nomura K., Nozawa, Yokohama M., Zagdsuren K.Y., Amano T. (2003). Genetic relationship among Mongolian native goat populations estimated by blood protein polymorphism. *Small Ruminant Res.*, 47: 171–181.
- Osterhoff D.R., Ward-Cox I.S. (1972). Serum polymorphism in three South African goat breeds. *Proc. 12th European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism*, Budapest, Hungary, pp. 579–582.
- Raymond M., Rousset F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86: 248–249.
- Rodero E., de la Haba M.R., Rodero A. (1997). Genetic study of Andalusia's ovine and caprine breeds. *J. Anim. Breed. Genet.*, 114: 143–161.
- Rousset F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.*, 8: 103–106.
- Ryniewicz Z., Krzyżewski J. (1997). Aktualne problemy w hodowli kóz w Polsce. *Zesz. Nauk. Zakł. Hod. Owiec i Kóz SGGW*, 1: 9–28.
- Sikora J. (2007). Wstępne wyniki próby restytucji kozy karpackiej. *Wiad. Zoot.*, 1–2: 31–34.
- Tapio M., Miceikienė I., Vilkki J., Kantanen J. (2003). Comparison of microsatellite and blood protein diversity in sheep: inconsistencies in fragmented breeds. *Mol. Ecol.*, 12: 2045–2056.
- Vaiman D., Imam\_Ghali M., Moazami-Goudarzi K., Guerin G., Grohs C., Leveziel H., Saidi-Mehtar N. (1994). Conservation of a synthetic group of microsatellite *loci* between cattle and sheep. *Mamm. Genome*, 5: 310–314.
- Watanabe S. (1971). Studies on the polymorphism in serum protein of goats. *Mem. Tokyo Univ. Agric.*, 14: 28–69.
- Wojdak-Maksymiec K. (2002). The genetic character of goats breed in Pomerania based on the polymorphism of blood proteins. *Arch. Dummerdorf*, 45 (2): 187–197.

TADEUSZ RYCHLIK, JACEK SIKORA, ANNA KRAWCZYK

**Genetic variation in the Carpathian goat population based on class I genetic markers**

## SUMMARY

The aim of the study was to determine the degree of genetic differentiation based on blood group and protein polymorphism in Poland's only flock of Carpathian goats, raised in the Experimental Station of the National Research Institute of Animal Production in Odrzechowa. Samples of blood drawn from 44 goats were tested. Erythrocyte antigens were determined in 4 systems (A, B, C and R) using 7 selected ovine test reagents. Genetic variants of hemoglobin (Hb) and transferrin (Tf) were determined by horizontal starch gel electrophoresis. Frequency of alleles, the inbreeding coefficient (FIS), and mean values of the observed and expected heterozygosity (H) were calculated for different loci. Genetic equilibrium was analysed based on the Hb and Tf systems. The most polymorphic blood group system was B, in which 12 alleles were observed. Among the polymorphic variants of blood proteins, the most frequent alleles were TfB (0.693) at the transferrin locus and HbB (0.682) at the hemoglobin locus. HbBB (0.54) and TfBB (0.54) predominated among genotypes. The mean values of observed heterozygosity and the inbreeding coefficient were 0.2955 and 0.4687, respectively. In the investigated flock, genetic disequilibrium was found in protein loci ( $P \leq 0.01$ ). In terms of all the parameters analysed, the flock of Carpathian goats is characterized by a low degree of genetic differentiation. This may be due to the small size of both the original population, from which the present line of this breed was developed, and the base flock.

Key words: goats, blood groups, protein polymorphism, genetic variation