

## **Kontrola wiarygodności rodowodów owiec w oparciu o markery genetyczne klasy I**

**Tadeusz Rychlik, Anna Krawczyk**

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

**Z**lokalizowane na erytrocytach genetycznie warunkowane antygeny, zwane grupami krwi, jak również polimorficzne warianty białek krwi stanowią zespół markerów genetycznych klasy pierwszej, wykorzystywanych szeroko

w badaniach zarówno o charakterze poznawczym, jak i praktycznym.

Zootechniczna dokumentacja hodowlana, stanowiąca podstawę doboru zwierząt jako rodziców następnych pokoleń,



Merynos odmiany barwnej (fot. B. Borys) – *Merino sheep of coloured variety (photo: B. Borys)*

zgodna ze stanem faktycznym, gdyż daje to gwarancję uzyskania postępu hodowlanego. W celu jej weryfikacji prowadzi się kontrolę rodowodów i identyfikację zwierząt w oparciu o badania wybranych markerów genetycznych krwi potomka i jego rodziców. Wykorzystanie do tego celu dużej liczby cech antygenowych oraz polimorficznych form białek krwi gwarantuje wiarygodny wynik. Szczególnie ilość i jakość używanych przez laboratorium reagentów testowych do oznaczania antygenów erythrocytarnych w istotny sposób wpływa na rzetelność uzyskiwanych rezultatów. Jakość reagentów testowych pochodzących z różnych laboratoriów świata weryfikowana jest w organizowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (International Society for Animal Genetics - ISAG) międzynarodowych testach porównawczych. Zarówno weryfikacja jakości, jak i ujednoczenie nomenklatury reagentów stanowią o uniwersalności grup krwi przy ustalaniu testów genetycznych dla zwierząt hodowlanych. Testy te mogą być wykorzystywane w każdym państwie, co ma szczególnie istotne znaczenie przy imporcie i eksporcie zwierząt, nasienia oraz transplantowanych zarodków. Można przyjąć, że w efekcie prowadzonej kontroli gwarantowana jest wiarygodność danych, zawartych w dokumentacji hodowlanej dotyczącej pochodzenia.

U owiec najbardziej przydatne do badań zgodności rodowodów okazały się grupy krwi, transferyny, albuminy i hemoglobina. Wieloletnie badania, zapoczątkowane przez Białosuknię i Kączkowskiego (1924) doprowadziły do poznania około 20 czynników antygenowych zaklasyfikowanych do siedmiu układów grupowych krwi: A, B, C, D, M, R i X. Wprowadzenie przez ISAG międzynarodowych testów porównawczych surowic testowych pozwoliło na dokonanie standaryzacji reagentów uzyskanych w różnych laboratoriach oraz ujednoczenie oznaczeń identyfikowanych przez nie antygenów.

Po teście porównawczym w roku 1990 międzynarodowe oznaczenia przyjęto dla 22 antygenów erythrocytów: *Aa, Ab, Ba, Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bh, Bi, Ca, Cb, Cc, Da, Ma, Mb, Mc, R, O, X* i *Z*.

Pierwsze badania dotyczące określenia typów transferyny w surowicy krwi owiec zostały przeprowadzone przez Ashтона (1958),

który początkowo opisał osiem fenotypów. W toku dalszych badań prowadzonych przez wielu badaczy określono ilość alleli występujących w różnych rasach. W roku 1966 przeprowadzono pierwszy międzynarodowy test porównawczy reagentów testowych dla owiec i ustalono nazewnictwo transferyny.

W roku 1990 laboratoria biorące udział w międzynarodowym teście porównawczym organizowanym w ramach ISAG wykazały istnienie u owiec siedemnastu alleli transferyny:  $Tf^A$ ,  $Tf^B$ ,  $Tf^C$ ,  $Tf^D$ ,  $Tf^E$ ,  $Tf^F$ ,  $Tf^G$ ,  $Tf^H$ ,  $Tf^I$ ,  $Tf^K$ ,  $Tf^M$ ,  $Tf^P$ ,  $Tf^Q$ ,  $Tf^V$ ,  $Tf^W$ ,  $Tf^X$  i  $Tf^Z$ .

Zastosowanie badań grup krwi oraz polimorficznych wariantów białek krwi do potwierdzenia pochodzenia u owiec dało obiektywną metodę sprawdzenia wiarygodności rodowodów (Żur i Trela, 1983; Trela i Filipczuk, 1985; Rychlik i in., 1996; Rychlik i in., 2003). Wykorzystanie grup krwi oraz białek występujących w surowicy krwi i erythrocytach do określania niezgodności pochodzenia wiąże się z ich genetycznie uwarunkowanym polimorfizmem, łatwą identyfikacją fenotypów oraz stałością fenotypów w ciągu całego życia osobnika. Wstępne badania nad potwierdzeniem pochodzenia owiec na podstawie grup krwi rozpoczęto w 1973 r. W celu zwiększenia skuteczności badań od 1976 roku rozpoczęto oznaczanie elektroforetycznych wariantów transferyny i hemoglobiny (Żur i Trela, 1983). Polimorfizm transferyny występujący w rasach owiec hodowanych w Polsce obejmuje 5-8 alleli, stąd badanie polimorfizmu TF daje duże możliwości identyfikacji zwierząt, a zastosowanie układu hemoglobiny dodatkowo zwiększa prawdopodobieństwo wyłączeń sztuk o niezgodnym pochodzeniu (Trela i Filipczuk, 1985).

### Ocena przydatności polimorfizmu niektórych markerów genetycznych w kontroli rodowodów owiec

Miarą przydatności poszczególnych markerów genetycznych do weryfikacji pochodzenia jest prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzicielstwa. W przeprowadzonych badaniach polimorfizmu antygenów erythrocytarnych w 6 układach grupowych krwi oraz transferyny (TF) i hemoglobiny (HBB) u owiec rasy Berrichone du Cher (Rychlik i in., 2003)

wykazano, że prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwie podanego rodzica (PE), obliczone przy użyciu loci grup krwi, wyniosło 0,84, natomiast przy wykorzystaniu również polimorfizmu TF i HBB wartość PE wzrosła do 0,92. Podobne badania wykonano na owcach rasy: czarno-

główka, merynos polski, owca olkuska, polska owca długowłnista, polska owca górską, polska owca nizinna i wrzosówka (Rychlik i Kościelny, 2006). Prawdopodobieństwo wykluczenia w tych rasach wahało się od 0,9590 u czarnogłówki do 0,9830 u polskiej owcy górskiej (tab.1).

Tabela 1. Wskaźniki polimorfizmu w badanych rasach owiec i całkowite prawdopodobieństwo wykluczenia  
*Table 1. Polymorphic indices in the investigated sheep breeds and total probability of exclusion*

Wskaźniki polimorfizmu <i>Polymorphic indices</i>	Rasy owiec – <i>Breeds of sheep</i>						
	Czarnogłówka <i>Blackheaded sheep</i>	Merynos polski <i>Polish Merino sheep</i>	Owca olkuska- Olkuska sheep	Polska owca długowłnista <i>Polish Longwool sheep</i>	Polska owca górską <i>Polish Mountain sheep</i>	Polska owca nizinna <i>Polish Lowland sheep</i>	Wrzosówka <i>Wrzosówka sheep</i>
Liczba alleli ogółem <i>Total number of alleles</i>	70	67	36	98	69	92	69
Średni stopień heterozygotyczności (H) <i>Mean degree of heterozygosity (H)</i>	0,4375	0,4698	0,4438	0,4520	0,4810	0,4812	0,4935
Całkowite prawdopodobieństwo wykluczenia (PE <sub>c</sub> ) <i>Total probability of exclusion</i>	0,9590	0,9719	0,9595	0,9760	0,9830	0,9773	0,9725

Przeprowadzone badania dotyczyły istotnych informacji o występującym obecnie polimorfizmie grup krwi, transferyny i hemoglobiny u 7 ras owiec. Wyliczone prawdopodobieństwo, z jakim można wykluczyć niewłaściwego rodzica, wskazuje na dużą przydatność zastosowania analizowanych markerów genetycznych w kontroli rodowodów u podstawowych ras owiec hodowanych w Polsce. Wykrycie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA zainicjowało wiele badań nad możliwością wykorzystania tego polimorfizmu w kontroli rodowodów, szczególnie u koni (Gralak i in., 1998) i bydła (Radko i in., 2002), a także u owiec (Achmann i Brem, 1998; Rychlik i in., 2003; Chan, 2005; Natonek-Wiśniewska i Rychlik, 2008; Glowatzki-Mullis i in., 2007). W pracach wykonanych na owcach rasy

Berrichone du Cher PE wyliczone w oparciu o 8 loci mikrosatelitarnych wynosiło 0,998 (Rychlik i in., 2003), dla owiec rasy merynos polski 0,9962 (Natonek-Wiśniewska i Rychlik, 2008), a dla rasy wrzosówka 0,9998 (Radko i in., 2006).

Wysoki polimorfizm wybranych sekwencji mikrosatelitarnych DNA, jaki stwierdzono w przeprowadzonych badaniach, oraz wyliczone prawdopodobieństwo, z jakim można wykluczyć niewłaściwego rodzica na podstawie tych markerów, wskazują, że ich użycie do weryfikacji rodowodów owiec daje prawie 100% gwarancji wydania prawidłowego orzeczenia. Ewentualne wprowadzenie w przyszłości w Polsce polimorfizmu mikrosatelitarnego do kontroli pochodzenia owiec należałoby poprzedzić szerszymi badaniami na różnych rasach, mającymi

na celu wyznaczenie odpowiedniego zestawu – wysokopolimorficznych loci.

### Potwierdzanie pochodzenia

Ze względu na wysoki koszt badań DNA kontrola wiarygodności rodowodów owiec w Polsce przeprowadzana jest obecnie w oparciu o badanie grup krwi oraz polimorficzne warianty

transferyny i hemoglobiny.

Oznaczenie grup krwi u owiec przeprowadza się w teście hemolitycznym i aglutynacyjnym przy użyciu surowic testowych, wykrywających antygeny erythrocytarne. Obecnie w Dziale Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ-PIB stosuje się 16 surowic testowych, za pomocą których można oznaczyć cechy antygenowe z 6 układów grupowych krwi (tab. 2).

Tabela 2. Owcze reagenty testowe otrzymywane w Dziale Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki-PIB

Table 2. Sheep test reagents obtained at the Department of Immuno- and Cytogenetics of the National Research Institute of Animal Production

Układy grupowe <i>Blood groups</i>	Reagenty testowe <i>Test reagents</i>
A	<i>Aa, Ab</i>
B	<i>Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bi, PLB-17</i>
C	<i>Ca, Cb</i>
D	<i>Da</i>
M	<i>Ma</i>
R	<i>R, 0</i>

W wyniku testu hemolitycznego określa się skład antygenowy krwi badanych osobników, który jest podstawą do analizy dziedziczenia grup krwi. Do przeprowadzenia analizy dziedziczenia grup krwi, potrzebnej do potwierdzenia pochodzenia, niezbędna jest znajomość praw dziedziczenia grup krwi i zależności pomiędzy antygenami krwinkowymi.

Na podstawie dziedziczenia cech antygenowych, przekazywanych przez rodziców na potomstwo, ustalono **trzy prawa dziedziczenia grup krwi**:

**I:** Nie może być potomkiem danej pary rodziców osobnik, który posiada cechę antygenową nie stwierdzoną przynajmniej u jednego z dwu domniemych rodziców;

**II:** Osobnik – homozygota w odniesieniu do dwóch allelicznych cech nie może być potomkiem osobnika homozygoty pod względem cechy przeciwstawnej;

**III:** Każdy osobnik musi posiadać po jednym z dwóch alleli od ojca i matki w każdym układzie grupowym.

Kontrola rodowodów owiec, obok genetycznej analizy wyników badania grup krwi, obejmuje również analizę genetyczną elektroforetycznych wariantów białek – transferyny (TF) i hemoglobiny (HBB). Analiza ta oparta jest na fakcie, że geny warunkujące poszczególne warianty transferyny i hemoglobiny występujące u potomka muszą być obecne przynajmniej u jednego z rodziców.

Analizując uzyskane w latach 1997-2006 wyniki kontroli wiarygodności rodowodów (tab. 3), należy pozytywnie ocenić fakt, że ogólna ilość owiec o niezgodnych rodowodach w ostatnich latach nie przekroczyła granicy 10%. Warto jednak zaznaczyć, że na wynik średniego procentu wykluczeń składają się dane z poszczególnych owczarni, gdzie obok takich, w których wszystkie rodowody były zgodne, spotkano również stada, w których ilość wykluczeń wynosiła powyżej dopuszczalnej granicy 10%. Z owczarni tych do hodowli oprócz osobników o zgodnych rodowodach mogą być wzięte tylko te jagnięta, których rodowody zostały potwierdzone w dodatkowych badaniach. Stada, w których wykluczenia przekroczyły 20%, są pozbawione możliwości produkowania materiału hodowlanego.

Tabela 3. Wyniki badań kontroli rodowodów owiec w latach 1997-2006  
 Table 3. Results of parentage control studies in sheep in the years 1997-2006

Rok Year	Ilość badanych stad <i>Number of investigated flocks</i>	Ilość badanych owiec <i>Number of investigated sheep</i>	Liczba wykonanych ekspertyz <i>Number of expert tests</i>	Ilość wykluczeń <i>Number of incorrect pedigrees</i>	Procent wykluczeń <i>Percentage of incorrect pedigrees</i>
1997	45	1584	831	69	8,3
1998	46	1709	913	60	6,6
1999	28	1078	568	15	2,6
2000	25	1201	618	30	4,8
2001	24	1259	389	27	4,7
2002	20	1252	437	59	7,0
2003	29	1280	673	47	7,0
2004	37	2130	1120	57	5,1
2005	29	1773	958	39	4,1
2006	30	1370	732	46	6,3
1997-2006	313	14636	7257	449	6,2

Systematycznie prowadzona kontrola pochodzenia owiec umożliwia wykrycie niezgodności w ich rodowodach. Wyniki kontroli, przekazywane corocznie do wiadomości Polskiego Związku Owczarskiego oraz Regionalnych Związków Hodowców Owiec i Kóz, pozwalają na podejmowanie decyzji zmierzających do porządkowania dokumentacji zootechnicznej i korygowania błędnych rodowodów. Eliminacja z hodowli zarodowej osobników o niezgodnym pochodzeniu daje gwarancję uniknięcia skutków,

jakie mogłyby wyniknąć w przypadku użycia do rozrodu zwierząt niepochodzących po wartościowych, podanych w rodowodach rodzicach.

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń markerów genetycznych krwi uzyskiwane w trakcie rutynowej kontroli pochodzenia są również wykorzystywane w pracach z dziedziny genetyki populacji, do badań struktury genetycznej różnych ras oraz zmienności genetycznej wewnątrz i między różnymi populacjami owiec.

### Literatura

Achmann R., Brem G. (1998). Parentage control in Austrian domestic mountain sheep (*Ovis aries*) using DNA microsatellite analysis. *Anim. Genet.*, 29: 12–13.

Ashton G.C. (1958). Further  $\beta$ -globulin phenotypes in sheep. *Nature*, 182: 1101–1102.

Białosuknia W., Kączkowski B. (1924). On the differentiation of various breeds of sheep by means of serological methods. *J. Immunol.*, 9: 593.

Chuan Y. (2005). Microsatellite markers for paternity testing of Liangshan semi-fine wool sheep. *Hereditas*

(Beijing), 27 (1): 85–90.

Głowatzki-Mullis M.L., Muntwyler J., Gaillard C. (2007). Cost-effective parentage verification with 17-plex PCR for goats and 19-plex PCR for sheep. *Anim. Genet.*, 38 (1): 86–88.

Gralak B., Kurył J., Łukaszewicz M., Żurkowski M. (1998). Applicability of nine microsatellite DNA sequences vs. eleven polymorphic blood protein and enzyme systems for the parentage control in Polish Arabian and Thoroughbred horse. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 16: 209–218.

Natonek-Wiśniewska M., Rychlik T. (2008). Polimorfizm wybranych sekwencji mikrosatelitarnych DNA u owiec rasy merynos polski oraz ocena ich przydatności w kontroli rodowodów. *Ann. Anim. Sci.*, 8, 1: 23-27.

Radko A., Duniec M., Ząbek T., Janik A., Natonek M. (2002). Polimorfizm 11 sekwencji mikrosatelitarnych DNA i ocena ich przydatności do kontroli pochodzenia bydła. *Med. Wet.*, 58: 708–710.

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., Janik A., Duniec M. (1996). Wykorzystanie badań grup krwi i białek polimorficznych u owiec w praktyce hodowlanej. *Biul. Inf. IZ, R. XXXIV*, 4: 61–67.

Rychlik T., Kościelny M. (2006). Polimorfizm grup krwi, transferyny i hemoglobiny krajowych ras owiec oraz ocena przydatności tych markerów w kontroli rodowodów. *Rocz. Nauk. PTZ*, 2, 2: 27–35.

Rychlik T., Radko A., Duniec M. (2003). Ocena przydatności polimorfizmu niektórych markerów genetycznych w kontroli rodowodów owiec. *Med. Wet.*, 59, 11: 1016–1018.

Trela J., Filipczuk U. (1985). Wykorzystanie polimorfizmu transferyn i hemoglobin w kontroli prawidłowości rodowodów u owiec. *Sprawozdanie z tematu nr 7163*, Kraków.

Żur F., Trela E. (1983). Skuteczność wykrywania niezgodności pochodzenia owiec na podstawie badań grup krwi i typów transferyn. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 265: 215–218.

## SHEEP PARENTAGE CONTROL BASED ON CLASS I GENETIC MARKERS

### Summary

Breeding documentation, which forms the basis for selection of animals as parents of next generations, should be consistent with the actual state to guarantee breeding progress. Breeding records are verified using parentage control and identification of animals based on analysis of selected blood genetic markers of offspring and parents. In Poland, sheep parentage control is carried out based on blood groups and polymorphic variants of transferrin and haemoglobin. The suitability of particular genetic markers for parentage control is measured by the probability of incorrect parentage exclusion. In a study of erythrocyte antigen polymorphism in 6 blood group systems as well as transferrin (TF) and haemoglobin (HBB) using 7 Polish sheep breeds, the probability of exclusion ranged from 0.9590 in Blackheaded sheep to 0.9830 in Polish Mountain sheep. The use of highly polymorphic microsatellite DNA sequences makes it possible to increase the probability of exclusion up to 99.99%. In 1997-2006, a total of 14,636 sheep were subjected to parentage control and 449 of them (6.2%) had incorrect parentage. The elimination of animals with incorrect parentage from pedigree breeding helps to avoid the consequences of breeding animals not born from valuable parents mentioned in their pedigrees.



Owce wrzosówki na wrzosowiskach w północnych Niemczech (fot. B. Borys)

*Wrzosówka sheep on heaths in north Germany.(photo: B Borys)*