

Wykorzystanie markerów genetycznych w doskonaleniu hodowli koni

Dominik Gronet, Ryszard Pikuła

AR w Szczecinie

Badania nad polimorfizmem białek krwi u koni służą nie tylko charakterystyce pod względem immunogenetycznym określonej rasy czy populacji, lecz są również pomocne w praktyce. Znacznym osiągnięciem jest wykorzystanie grupowych układów krwi i polimorficznych białek krwi do identyfikacji osobników, a szczególnie do kontroli pochodzenia. Genetyczny polimorfizm białek krwi u koni jest jednym z większych wśród znanych u zwierząt domowych, co pozwala na skuteczniejszą kontrolę pochodzenia (Pikuła i wsp., 1997a).

W rutynowej genetycznej kontroli pochodzenia koni w Polsce stosuje się badania, które obejmują 15-17 układów, w tym 7 układów grupowych krwi oraz 8-10 wybranych, najbardziej polimorficznych białek i enzymów (Cholewiński, 1999). Trommershausen-Smith i wsp. (1976) wykorzystali układy grupowe krwi, niektóre białka krwi oraz zasady dziedziczenia maści kasztanowatej i siwej do kontroli pochodzenia. Przeanalizowano dziewięć przypadków źrebiąt gniadych pochodzących od kasztanowatych rodziców oraz osiem przypadków źrebiąt siwych pochodzących od niesiwych rodziców. W dziewięciu przypadkach wykluczono ogiera niezależnie od klaczy, w jednym klacz, a w sześciu oboje zapisanych w dokumentach rodziców. Prawdopodobieństwo wykluczenia rodzicielstwa wyniosło 94%.

Tomaszewska-Guszkiewicz i Żurkowski (1984), na podstawie określenia 10 układów białek krwi z 27 allelami u koników polskich, 7 układów z 18 allelami u koni czystej krwi arabskiej oraz 7 układów z 17 allelami u koni pełnej krwi angielskiej przedstawili dla ras następujące prawdopodobieństwa wykluczeń – odpowiednio: 85,3; 67,9 i 56,1%.

Janiszewska (1988), wykorzystując polimorfizm 9 układów białek, obliczyła 71,6% prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa dla koni czystej krwi arabskiej, a Janiszewska i Tomaszewska-Guszkiewicz (1989) dla ardenów z SK Bielin – 82,6% oraz na podstawie polimorfizmu 8 układów – 90,5% dla ardenów z hodowli państwowej (Janiszewska, 1992).

W 1988 roku podczas Kongresu Światowej Organizacji Koni Arabskich (WAHO) podjęto decyzję o ochronie czystości rasy poprzez prawidłowe prowadzenie ksiąg stadnych i wynikający z tego obowiązek kontroli pochodzenia na podstawie badań grup krwi i polimorfizmu białek krwi źrebaków przed ich wpisem do księgi stadnej. Kontrola pochodzenia na podstawie takich badań obowiązuje również konie pełnej krwi angielskiej w siedemnastu krajach zrzeszonych w ramach Międzynarodowego Komitetu Ksiąg Stadnych, czyli ISBC (Żurkowski, 1992).

Począwszy od 1991 roku w Polsce, zgodnie z zaleceniami WAHO, badaniami grup krwi i polimorfizmu białek krwi jest objęta cała populacja koni czystej krwi arabskiej i wszystkie źrebięta przed ich wpisem do księgi stadnej. Kontroli pochodzenia poddawane są także konie pełnej krwi angielskiej, którym objęto wszystkie klacze i ogiery stadne oraz przyszłe ogiery stadne z torów wyścigów konnych (Żurkowski, 1992).

Dużym zainteresowaniem cieszą się badania dotyczące związków pomiędzy genetycznym polimorfizmem białek krwi a zmiennością cech użytkowych. Cechy użytkowe, w kierunku których prowadzona jest selekcja, np. dzielność wyścigowa i sportowa, są cechami trudno wymiernymi i znalezienie markerów powiązanych z tymi cechami mogłoby być wykorzystane w bardziej efektywnej selekcji zwierząt (Andersson i wsp., 1987; Pikuła i wsp., 1997a).

Próbę znalezienia zależności pomiędzy grupami krwi a dzielnością wyścigową koni pełnej krwi angielskiej i czystej krwi arabskiej przeprowadził Siudziński (1970). Autor na podstawie uzyskanych wyników stwierdził istnienie współzależności między dzielnością wyścigową a niektórymi antygenami krwinkowymi i ich kombinacjami. Wykazał zależność między grupą krwi C a dzielnością wyścigową koni pełnej krwi angielskiej oraz między kombinacją antygenów AFCE i AFC a dzielnością wyścigową koni czystej krwi arabskiej.

Ścisłą zależność między wynikami wyścigowymi koni pełnej krwi angielskiej a zespołem wzajemnie uzupełniających się białek krwi – albuminy, transferyny, esterazy zasadowej i 6-PGD wykazała Urbańska-Nicolas (1982). Ponomareva (1979) badała zależność między liczbą wygranych gonitw a fenotypem transferyny u koni czystej krwi arabskiej. Autorka stwierdziła, że najwięcej zwycięstw odniosły osobniki heterozygotyczne o fenotypie transferyny DO i FO, najmniej zaś homozygotyczne – F i H.

Smugała i wsp. (1999a,b), wykorzystując genetyczny polimorfizm białek krwi i współczynnik powodzenia 496 trzyletnich i 310 czteroletnich koni czystej krwi arabskiej stwierdzili, że grupa dzielniejszych koni trzyletnich charakteryzowała się statystycznie istotnie wyższą frekwencją allelu CA^I (q=0,983) i niższą allelu CA^F (q=0,017) w układzie anhydryzy węglanowej. U koni czteroletnich stwierdzono istotne różnice występujące w układzie transferyny między końmi lepszymi a słabszymi oraz szczególnie istotny wzrost heterozygotyczności w grupie koni dzielniejszych (65,9%).

Andersson i wsp. (1987) porównali wyniki wyścigowe ponad 25 000 kłusaków szwedzkich z danymi dotyczącymi sześciu grup krwi i polimorfizmu dziewięciu białek krwi i stwierdzili wysoko istotne powiązanie pomiędzy zmiennością w loci esterazy zasadowej a liczbą koni startujących w wyścigach. Powyższe wnioski nie zostały jednoznacznie potwierdzone w badaniach Andersson-Eklund i wsp. (1989).

Statystycznie istotne zależności pomiędzy fenotypami niektórych białek krwi 426 ogierów z zakładów treningowych a ich dzielnością użytkową stwierdził Pikuła (1995). Dzięki zastosowanemu rankingowi punktowemu fenotypów uzyskano zróżnicowanie w układzie transferyny i esterazy zasadowej. Utworzony na tej podstawie hipotetyczny fenotyp ogiera o najwyższej wartości użytkowej powinien składać się z następujących fenotypów: AIF, TfO, EsFS, GcFS, X_kKS, CAFI.

Poszukiwane są także powiązania między polimorfizmem białek krwi a płodnością koni. Dubrovskaya i Starodumov (1976) w badaniach nad końmi pełnej krwi angielskiej uzys-

kali najwyższy procent zażrebień (ok. 90%), kojarząc osobniki o różnych typach homozygotycznych transferyn. Cholewiński (1988), badając u koni pełnej krwi angielskiej genetyczne markery krwi w powiązaniu z cechami płodności i odchodem źrebiąt, największą rolę w pracy selekcyjnej przypisał układowi grupowym krwi: A, K i P oraz białkom: albuminie, transferynie i 6-PGD.

Znajomość polimorfizmu markerów genetycznych umożliwia poszukiwanie sprzężeń, co jest podstawą w studiach nad mapowaniem genów. Pierwsze sprzężenie u koni pomiędzy loci grupy krwi K i dehydrogenazą fosfoglukonową (6-PGD) wykrył Sandberg (1974). Sandberg i Juneja (1978) opisali sprzężenie u kłusaków szwedzkich między albuminą a białkiem wiążącym witaminę D – Gc. Występowanie sprzężeń pomiędzy tymi białkami surowicy krwi u koników polskich badali Tomaszewska-Guszkiewicz i wsp. (1994), stwierdzając różnice w frekwencjach obu alleli w porównaniu do ich częstości u kłusaków szwedzkich.

Bliski związek białka surowicy krwi – X_k i enzymu ME1 (soluble malic) przedstawili Weitkamp i wsp. (1982), a X_k i izomerazy fosfoheksozowej (PHI) – Andersson i wsp. (1983). Silne sprzężenie pomiędzy układem zgodności tkankowej ELA a układem A antygenów krwinkowych u kłusaków amerykańskich stwierdził Bailey (1983). Andersson i Sandberg (1984) przeanalizowali na ponad 30 000 potomków wpływ wieku i płci na częstość rekombinacji układu krwi K i 6-PGD w pierwszej grupie sprzężeniowej (LG I) oraz wpływ wieku, rasy i płci na częstość rekombinacji w układzie AI – Es w drugiej grupie sprzężeniowej (LG II). Nie stwierdzono wpływu rasy na częstość rekombinacji w układzie AI – Es. Częstość rekombinacji u klaczy była istotnie wyższa w obu układach: AI – Es ($\chi^2=54,10$; $P \leq 0,001$) i K – PGD ($\chi^2=9,21$; $P \leq 0,005$).

Pomimo stwierdzenia związków pomiędzy poszczególnymi genami markerami, żaden z nich nie został wówczas przypisany do konkretnego chromosomu. Deys (1972, za Sandberg i Andersson 1984), wykorzystując technikę hybrydyzacji komórkowej, ustalił loci dla trzech sprzężonych ze sobą enzymów (6-PGD, HGPRT i PGK) na chromosomie X.

Relacje pomiędzy 15 markerami krwi – 6 układami grupowymi krwi, 3 białkami surowicy krwi i 6 enzymami krwinkowymi oraz płcią – prześledzili Sandberg i Andersson (1984), potwierdzając ścisły związek pomiędzy K – PGD (LG I), AI – Es (LG II) i przynależność układu grupy krwi A do LG III i PHI do LG IV. Tak więc, 12 loci zostało przypisanych do czterech autosomalnych grup sprzężeniowych, a trzy loci – do chromosomu X (LGI - K, PGD; LGII - AI, e, Gc, Rn, To; LGIII - A, ELA; LGIV - ME1, PHI, X_k ; chromosom X - 6PGD, HGPRT, PGK).

Badania nad grupami sprzężeniowymi wykazały także istnienie powiązań pomiędzy niektórymi genami maściowości i markerami genetycznymi. Trommershausen-Smith (1978), badając kuce szetlandzkie, stwierdziła w ramach II grupy sprzężenia między genem plamistości *To* a allelem albuminy Al^B .

Bliski związek z locus albuminy i luźny z locus esterazy genów maściowości *e* – warunkującego maść kasztanową i *Rn* – maść dereszową stwierdzili Andersson i Sandberg (1982). Potwierdzili oni przynależność tych genów do II grupy sprzężeniowej i zaproponowali ich kolejność: AI, Gc, Rn, *To*-*e*-Es. Sponenberg i wsp. (1984) wykazali sprzężenie między dwoma genami warunkującymi kolor maści, czyli genu *E*, warunkującego nasycenie czarnego pigmentu oraz genu *Rn*, warunkującego dereszowość ($\chi^2=49,28$) i na podstawie dys-

tansów ustalili ich kolejność: Es-*E*-AI-*Rn*. Trommershausen-Bowling (1987) stwierdziła kolejne ścisłe sprzężenie w ramach II grupy, genu *To*, warunkującego wystąpienie srokatej maści tobiano z allelem białka wiążącego witaminę D Gc^S i z allelem albuminy Al^B (*To*: Gc^S : Al^B).

Knyazev i wsp. (1998), badając populację kłusaków orłowskich i rosyjskich pod względem zależności między maściami – siwą, gniadą, karą i kasztanową a jedenastoma antygenami krwinkowymi z układów A, D, K, stwierdzili możliwość istnienia sprzężenia pomiędzy locus układu grupy krwi D a genem *G*, odpowiadającym za maść siwą u kłusaków orłowskich oraz ich wspólne negatywne działanie na żywotność źrebiąt.

Niezwykle szybki rozwój genetyki molekularnej stwarza ogromne możliwości doskonalenia zwierząt gospodarskich. Ocena wartości genetycznej z wykorzystaniem technik molekularnej analizy DNA umożliwia prowadzenie selekcji na podstawie genotypu u zwierząt w każdym wieku (Charon, 1997). Bayley i wsp. (1991) obserwowali związki pomiędzy allelami transferyny a odcinkiem restrykcyjnym DNA - *MspI* o różnej długości. Bazując na polimorfizmie mikrosatelitów Colling i Kelly (1996) scharakteryzowali strukturę genetyczną dziewięciu ras koni hodowanych w USA, Checa i wsp. (1996) – kuców rasy asturcon, a Cothran (1996) – kuców exmoor.

Prawdopodobieństwo prawidłowego wykluczenia ojcostwa za pomocą testu molekularnego (multiplex PCR – 6 sekwencji mikrosatelitarnych jednocześnie) wynosi 0,99, a za pomocą analizy 11 systemów grupowych krwi – 0,98 (Charon, 1997; Żurkowski i wsp., 2000). Jest to szczególnie zalecana i stosowana metoda uwierzytelnienia pochodzenia koni w krajach zachodnich (Bozzini i wsp., 1996; Martin i wsp., 1996). Jest również pomocna w studiach nad mapowaniem genomu (Bowling i wsp., 1996; Guerin i wsp., 1996) oraz przy ustalaniu kompleksu zgodności tkankowej (Fraser i Bailey, 1996; Horin i Trtkova, 1996). Obecnie w literaturze światowej odnotowanych jest u koni około 500 mikrosatelitarnych markerów genetycznych (Żurkowski i wsp., 2000).

Dzięki badaniom nad polimorfizmem mikrosatelitarnych sekwencji DNA poznano podłoże genetyczne paraliżu spowodowanego okresową hiperkalemią (HYPP) u koni rasy quarter, który uwarunkowany jest mutacją w obrębie genu kanału sodowego mięśni szkieletowych oraz defektu, jakim jest letalny syndrom białych źrebiąt związany z umaszczeniem overo (OLWS), za którego wystąpienie odpowiedzialna jest prawdopodobnie (Żurkowski i wsp., 2000) mutacja wewnątrz genu endotelialnego receptora B (EDNRB).

Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA, który służy głównie w hodowli zwierząt do identyfikacji genotypów determinujących cechy ilościowe ważne z hodowlanego punktu widzenia, został również wykorzystany przez Johanssona i wsp. (1994, za Kriegesmann i wsp., 1996) i Kriegesmann i wsp. (1996) do molekularnej analizy DNA u koni czystej krwi arabskiej w zależności od ich umaszczenia.

Poznanie jak największej liczby markerów genetycznych nabiera szczególnego znaczenia w programach mapowania genów u koni, gdyż jest to jedyna droga rozszyfrowania genomu poprzez identyfikację genów związanych z użytkowością, a następnie wykorzystanie uzyskanych informacji w programach selekcji i doskonalenia różnych ras koni.

73 pozycje literatury w Redakcji i u Autorów.