

## GENETSKI POLIMORFIZMI PROTEINA KRVI MAGARACA U HRVATSKOJ

A. Ivanković, P. Caput

### Sažetak

Frekvencije polimorfnih krvnih bjelančevina, omogućujući određivanje biokemijskog profila individua, a time i populacija, znatno doprinose, uz istraživanje eksterijernih svojstava, potpunom određenju populacija na terenu. Na području Hrvatske uočljivo je postojanje više tipova magaraca koji se fenotipski značajno razlikuju. Određivanjem frekvencija alela polimorfnih proteina uočenih tipova upotpunjujemo determiniranje populacija te time umanjujemo nedoumice o posebnosti, odnosno autohtonosti tipova. Primjerenim elektroforetskim tehnikama odredili smo frekvencije alela transferina (Tf) i albumina (Alb) kod 75 magaraca koje smo razvrstali u tri tipa: primorsko-dinarski, sjeverno-jadranski i istarski tip. Rezultati istraživanja prikazani su u narednoj tablici.

		Primorsko-dinarski tip	Sjeverno-jadranski tip	Istarski tip
Tf	Tf <sup>Ad</sup>	0,5000	0,2800	0,2826
	Tf <sup>Bd</sup>	0,3519	0,4600	0,6087
	Tf <sup>Cd</sup>	0,1296	0,1200	0,0652
	Tf <sup>Dd</sup>	0,0185	0,1400	0,0435
Alb	Alb <sup>Cd</sup>	0,9630	0,98	1,00
	Alb <sup>Dd</sup>	0,0370	0,02	0

Frekvencije Tf alela upućuju na filogenetsku srodnost istarskog i sjeverno-jadranskog tipa magarca, kao i na značajnu različitost primorsko-dinarskog tipa spram populacija koje obitavaju na području Kvarnerskog otočja i Istre. Frekvencije Alb alela nisu pokazale značajnu razliku između tipova. Standardna genetska distanca je najveća između primorsko dinarskog i istarskog tipa a najmanja između sjeverno-jadranskog i istarskog tipa magarca, što odgovara i zemljopisnoj udaljenosti područja na kojima ove populacije obitavaju. U cilju dobivanja sigurnijih informacija, nužno je usmjeriti dalja istraživanja određivanju frekvencija ostalih polimorfnih proteina i direktnom tipiziranju DNA.

Rad je priopćen na "XXXV znanstvenom skupu hrvatskih agronoma" Opatija, 1999.

Mr. sc. Ante Ivanković i Prof. dr. Pavo Caput, Zavod za specijalno stočarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska cesta 25.

## Uvod

U Hrvatskoj, socijalna i agrarna kretanja svela su populaciju magaraca na nekoliko tisuća grla. Unutar populacije razbire se više tipova magaraca koji međusobno značajno odstupaju veličinom okvira kao i drugim istraženim eksterijernim svojstvima.

Veličina populacija, pojedinih tipova te njihova ugroženost različite su i uvelike ovise o podnebljima u kojima obitavaju. Populacija magaraca u Dalmaciji, iako smanjena još uvijek broji više tisuća grla, dok su populacije u području Kvarnerskog otočja i Istre svedene na nekoliko desetaka životinja.

Poradi cjelovitijeg determiniranja populacija (tipova), uz istraživanje fenotipa, odnosno morfoloških osobitosti nužno je odrediti pasminu i na molekularno-genetskoj razini. Mogućnost determiniranja genotipova polimorfni tkivnih bjelančevina primjerenim elektroforetskim tehnikama osigurala je iskoristivost polimorfni bjelančevina kao genetskih markera. Polimorfne bjelančevine, kao genetski markeri brzo su našle teoretsku i praktičnu primjenu pri utvrđivanju biokemijskog profila individue, populacije, pasmine i vrste, kao i u filogenetskim studijama za određivanje genetskih distanci pojedinih pasmina i populacija (Caput i sur., 1992.). Tako nas frekvencije alela polimorfni lokusa upućuje na osobitosti populacija, što je bitan pokazatelj filogenetske bliskosti spram drugih populacija.

Predmet ovog istraživanja su genetski polimorfizmi serumskih bjelančevina transferina i albumina. Transferin (Tf) pripada grupi  $\beta$ -globulina i glikoprotein je po sastavu a nasljeđuje se kodominantno. Polimorfizam transferina kod magaraca prvi spominje Osterhoff (1966.), a Niece i sur. (1967.) identificirali su četiri alelne varijante Tf kod magaraca koje kombinacijom daju deset genotipova te ih označili slovima A, B, C i D. Svaku varijantu Tf karakteriziraju dvije trake jednakog intenziteta.

Tablica 1. - FREKVENCIJA GENA NA Tf LOKUSU U MAGARACA

Table 1. - GENE FREQUENCY OF DONKEY TRANSFERRIN (Tf)

Pasmına Breed	Frekvencija gena-Gene frequency				Autor Author
	Tf <sup>Ad</sup>	Tf <sup>Bd</sup>	Tf <sup>Cd</sup>	Tf <sup>Dd</sup>	
Feral donkeys (Australia)	0.831	0.072	0.095	0.002	Bell (1994)
Donkeys in Marocco	0.550	0.291	0.115	0.044	Ouragh i sur. (1997.)
Feral donkeys (USA)	0.744	0.052	0.130	0.074	Blake i sur. (1981.)
Catalonian donkey	0.397	0.217	0.114	0.272	Folch i sur. (1996.)

Albumin je najzastupljeniji u bjelančevinama plazme a služi za osmoregulaciju i transport u krvi. Genetske varijante albumina (Alb) kod konja prvi spominju Stormont i sur. (1963.), uočivši dva alela C i D, koja kombinacijom daju tri različita genotipa. O dvije specifične albuminske varijante Alb<sup>C</sup> i Alb<sup>D</sup> kod magaraca izvještavaju u svom radu Blake i sur. (1978.). Varijante albumina nasljeđuju se kodominantno.

Tablica 2. - FREKVENCIJA GENA NA Alb LOKUSU U MAGARACA  
Table 2. - GENE FREQUENCY OF DONKEY ALBUMIN (Alb)

Pasmina Breed	Frekvencija gena - Gene frequency		Autor- Author
	Alb <sup>Cd</sup>	Alb <sup>Dd</sup>	
Feral donkeys (Australia)	0.945	0.055	Bell (1994)
Donkeys in Marocco	0.935	0.065	Ouragh i sur. (1997.)
Feral donkeys (USA)	0.976	0.024	Blake i sur. (1981.)
Catalonian donkey	1.000	0	Folch i sur. (1996.)

Hemoglobin (Hg) je kod magaraca monomorfan za razliku od konja kod kojih možemo naći dva tipa Hg kao proizvod djelovanja dva vezana gena (Bangham i sur., 1958.). Isti autori navode kako se pri određivanju genotipa Hg križanaca između konja i magarca mogu naći tri trake na gelu, od kojih su dvije tipične za konja a treća za magarca. Postalbumin (A1B) je također monomorfan što ga čini različitim od E. Caballusa (Patterson i sur., 1991.).

Ovo je istraživanje sastavni dio projekta: "Phenotypic and genetic characteristics of donkeys in Croatia", kojim se nastoji objektivno i cjelovito procijeniti aktualno stanje populacije magaraca u Hrvatskoj. U prvoj fazi programa obišli smo teren, procijenili veličinu i strukturu populacija, utvrdili fenotipska odnosno eksterijerna svojstva na osnovi analize jedanaest tjelesnih mjera. Druga faza provedbe programa obuhvaća utvrđivanje genetskih odlika populacije određivanjem frekvencija polimorfa krvi i tipiziranjem DNA. U završnoj fazi programa standardizirat ćemo pasminska obilježja na osnovi rezultata istraživanja fenotipa i genotipa, potvrditi opravdanost razdvajanja pasminskih tipova, prijaviti pasmine u FAO registar, te izraditi adekvatne programe očuvanja pasmina, primjerene aktualnom stanju populacija.

#### *Materijal i metode rada*

Analizom je obuhvaćeno 75 magaraca čiji su uzorci krvi u epruveti konzervirani s EDTA. Isti je dan uzorak centrifugiran 30 minuta pri 3000

obrtaja, odvojen serum koji je potom zamrznut na  $-20^{\circ}\text{C}$  i tako čuvan do analize.

Genetske varijante transferina određene su elektroforezom na "cellogel" trakama u kontinuiranom puferskom sustavu (High Diagnostic Value). Korišten je tris-glicinski pufer (pH 9,0) kao gel pufer i kao elektrolit. Elektroforeza je trajala 60 min na 300V. Nakon elektroforeze, trake su izvađene, označene i potopljene u pripremljenu otopinu boje (0,5 g Amido Black 10B + 45 ml metanol + 45 ml destilirana voda + 10 ml octena kiselina) u kojoj su ostale 10 minuta. Slijedilo je prvo odbojavanje (15 min) u otopini (475 ml metilni alkohol + 475 ml destilirane vode + 50 ml octene kiseline), nakon čega se postupak ponovio još tri puta u trajanju od 3-4 minute. Nakon očitavanja i trake su spremljene u 5%-tnu octenu kiselinu.

Genetske varijante albumina određene su elektroforezom na "cellulose acetate" trakama 5,7x14cm u nepovezanom, isprekidanom puferskom sustavu (Gahne, 1962.). Elektroadni pufer (pH 8,18) pripremljen je od 1,2 g litijeva hidroksida + 11,8 g borne kiseline + 1000 ml destilirane vode. Mostni pufer je pripremljen od 1 vol. elektrodnog pufera + 5,25 vol. pufera (pH 5,7) (8,67 g trishydroxymethylaminometane + 1,33 g limunske kiseline + 1000 destilirane vode). Elektroforeza je trajala 150 min na 96 V. Postupak bojenja i odbojavanja traka nakon elektroforeze bio je isti kao i kod određivanja transferina.

Genetske varijante krvi nasljeđuju se kodominantno odnosno svi se aleli jednako manifestiraju, pa se stoga fenotipovi određenog lokusa mogu direktno identificirati i izbrojiti te odrediti frekvencije alela. Na osnovi frekvencija alela izračunali smo Nei' standardne genetske distance između populacija (D) te genetsku istovjetnost (I).

#### *Rezultati istraživanja i rasprava*

Rezultati istraživanja frekvencija alela serumskih proteina (Tf, Alb) tipova magaraca u Hrvatskoj potvrdili su njihovu posebnost. Raspodjele Tf i Alb genotipova i frekvencije populacija prikazane su na tablicama 4 i 5. Test  $\chi^2$  pokazuje da odstupanje utvrđenih frekvencija genotipova od očekivanih vrijednosti nije značajno.

Frekvencije Tf alela upućuju na različitosti između domaćih tipova magaraca. Primorsko-dinarski tip pokazuje značajnu razliku spram istarskog tipa osobito u frekvenciji alela  $\text{Tf}^{\text{Bd}}$  ( $P < 0.05$ ), te u frekvenciji  $\text{Tf}^{\text{Ad}}$  ( $P < 0.10$ ). Ovaj tip pokazuje značajnu razliku spram sjeverno-jadranskog tipa u frekvencijama alela  $\text{Tf}^{\text{Ad}}$  i  $\text{Tf}^{\text{Dd}}$  ( $P < 0.10$ ).

Tablica 3. - RASPODJELA TRANSFERINSKIH I ALBUMINSKIH TIPOVA I FREKVENCIJA GENA ISTARSKOG TIPA

Table 3. - DISTRIBUTION OF TRANSFERRIN AND ALBUMIN TYPES AND GENE FREQUENCY OF ISTRIAN TYPE

Sistem – System (n=23)	Genotip Genotype	Broj Number	$\chi^2$	Frekvencija gena Gene frequency		
Transferinski tipovi Transferrin types	AA	1	7,81211	Tf <sup>Ad</sup>	0,2826	±0,0613
	AB	7		Tf <sup>Bd</sup>	0,6087	±0,0664
	AC	2		Tf <sup>Cd</sup>	0,0652	±0,0336
	AD	2		Tf <sup>Dd</sup>	0,0435	±0,0287
	BB	10				
	BC	1				
	BD	0				
	CC	0				
	CD	0				
	DD	0				
Albuminski tipovi Albumin types	CC	23	-	Alb <sup>Cd</sup>	1,00	0
	CD	0		Alb <sup>Dd</sup>	0	
	DD	0				

Tablica 4. - RASPODJELA TRANSFERINSKIH I ALBUMINSKIH TIPOVA I FREKVENCIJA GENA SJEVERNO JADRANSKOG TIPA

Table 4. - DISTRIBUTION OF TRANSFERRIN AND ALBUMIN TYPES AND GENE FREQUENCY OF NORTHERN-ADRIATIC TYPE

Sistem – System (n=25)	Genotip- Genotype	Broj- Number	$\chi^2$	Frekvencija gena Gene frequency		
Transferinski tipovi Transferrin types	AA	2	6,03013	Tf <sup>Ad</sup>	0,2800	±0,0611
	AB	5		Tf <sup>Bd</sup>	0,4600	±0,0678
	AC	3		Tf <sup>Cd</sup>	0,1200	±0,0442
	AD	2		Tf <sup>Dd</sup>	0,1400	±0,0472
	BB	6				
	BC	1				
	BD	5				
	CC	1				
	CD	0				
	DD	0				
Albuminski tipovi Albumin types	CC	24	0,01041	Alb <sup>Cd</sup>	0,9800	±0,01980
	CD	1		Alb <sup>Dd</sup>	0,0200	
	DD	0				

Tablica 5. - RAŠPODJELA TRANSFERINSKIH I ALBUMINSKIH TIPOVA I FREKVENCIJA GENA PRIMORSKO-DINARSKOG TIPIA

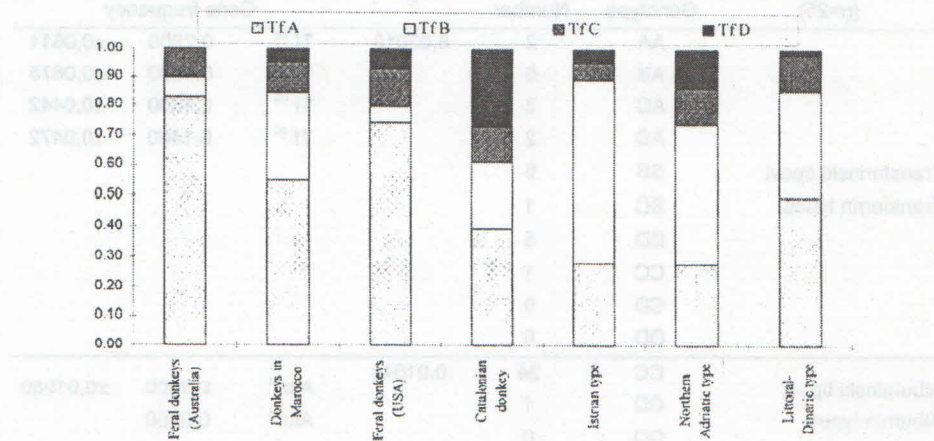
Table 5. - DISTRIBUTION OF TRANSFERRIN AND ALBUMIN TYPES AND GENE FREQUENCY OF LITTORAL-DINARIC TYPE

Sistem – System (n=25)	Genotip- Genotype	Broj Number	$\chi^2$	Frekvencija gena Gene frequency		
Transferinski tipovi Transferrin types	AA	8	3,24867	Tf <sup>Ad</sup>	0,5000	±0,0680
	AB	8		Tf <sup>Bd</sup>	0,3519	±0,0650
	AC	3		Tf <sup>Cd</sup>	0,1296	±0,0457
	AD	0		Tf <sup>Dd</sup>	0,0185	±0,0183
	BB	4				
	BC	2				
	BD	1				
	CC	1				
	CD	0				
	DD	0				
Albuminski tipovi Albumin types	CC	25	0,04002	Alb <sup>Cd</sup>	0,9630	±0,0257
	CD	2		Alb <sup>Dd</sup>	0,0370	
	DD	0				

Frekvencije Tf alela istarskog i sjeverno-jadranskog tipa pokazuju visoku ali ne i statistički značajnu razliku, što se posebno odnosi na frekvencije alela Tf<sup>Bd</sup> i Tf<sup>Dd</sup>. Ovome svakako doprinosi mali broj uzoraka, što je posljedica malog broja životinja tog tipa na terenu.

Grafikon 1. - DISTRIBUCIJE FREKVENCIJA Tf ALELA RAZLIČITIH POPULACIJA MAGARACA

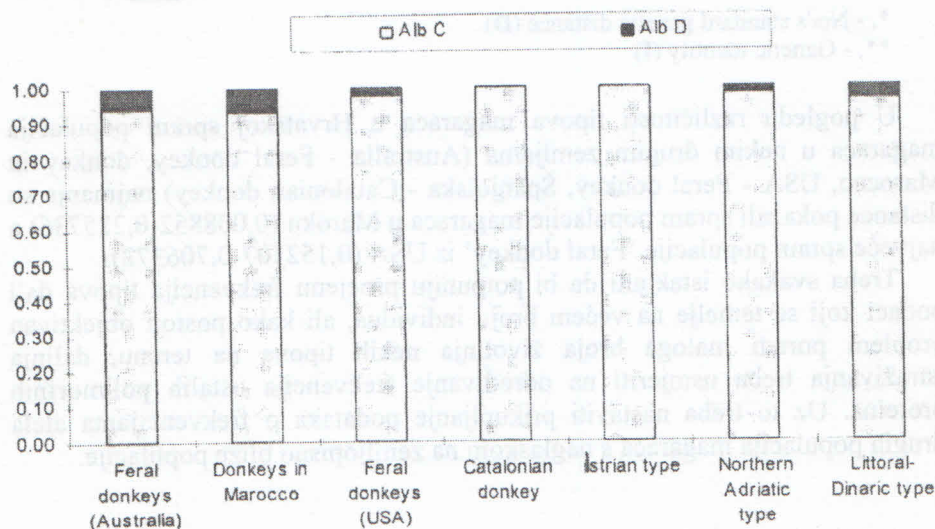
Graph 1. - Tf ALLELE FREQUENCY OF DIFFERENT DONKEY BREEDS



Istražene frekvencije Alb alela nisu značajno različite između domaćih tipova magaraca. Uočili smo da je istarski tip homozigotan za Alb alel, odnosno frekvencija  $Alb^c = 1$ . Populacija magaraca iz Katalonije je također homozigotna za Alb alel.

Napominjemo da u istraživanim populacijama nismo zabilježili genotipove  $Tf^{CD}$ ,  $Tf^{DD}$  i  $Alb^{DD}$ .

Grafikon 2. - DISTRIBUCIJE FREKVENCIJA Alb ALELA RAZLIČITIH POPULACIJA MAGARACA  
Graph 2. - Alb ALLELE FREQUENCY OF DIFFERENT DONKEY BREEDS

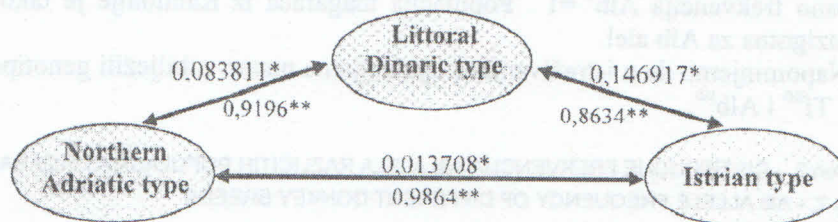


Genetska istovjetnost populacija (I) kao i Nei' genetska distanca (D) mjerodavno upućuje na genetsku bliskost tipova. Standardna Nei' genetska distanca između primorsko-dinarskog i istarskog tipa je najveća (0,146907), dok primorsko-dinarski i sjeverno-jadranski tip pokazuju manju vrijednost distance (0,083811). Najmanja vrijednost genetske distance uočena je između sjeverno-jadranskog i istarskog tipa magaraca (0,013708). Genetska istovjetnost tipova (I) upućuje na iste odnose tipova kao i genetske distance, što je prikazano na grafikonu 3.

Genetske distance upućuju na činjenicu da je primorsko-dinarskom tipu bliskija populacija sjeverno-jadranskog tipa od istarskog tipa, što je s obzirom na zemljopisni položaj bilo i za očekivat. Najmanja genetska distanca populacija istarskoga tipa i sjeverno-jadranskoga tipa upućuju na činjenicu da su se ove dvije populacije diferencirale kasnije uz znatan utjecaj genoma primorsko-dinarskog tipa i populacija magaraca s područja sjeverne Italije.

Grafikon 3. - GENETSKE DISTANCE TIPOVA MAGARACA U HRVATSKOJ.

Graph. 3. - GENETIC DISTANCES OF DIFFERENT DONKEY BREEDS IN CROATIA



\*,- Nei's standard genetic distance (D)

\*\*,- Genetic identity (I)

U pogledu različitosti tipova magaraca u Hrvatskoj spram populacija magaraca u nekim drugim zemljama (Australia - Feral donkey, donkey in Marocco, USA - Feral donkey, Španjolska - Catalanian donkey) najmanje su distance pokazali spram populacije magaraca u Maroku (0,008852-0,225736) a najveće spram populacije 'Feral donkey' iz USA (0,152107-0,706372).

Treba svakako istaknuti da bi potpuniju procjenu frekvencija tipova dali podaci koji se temelje na većem broju individua, ali kako postoji objektivni problem poradi maloga broja životinja nekih tipova na terenu, daljnja istraživanja treba usmjeriti na određivanje frekvencija ostalih polimorfni proteina. Uz to treba nastaviti prikupljanje podataka o frekvencijama alela drugih populacija magaraca s naglaskom na zemljopisno bliže populacije.

### Zaključak

Na osnovi istraživanja proteinskih polimorfizama serumskih bjelančevina više tipova magaraca u Hrvatskoj može se zaključiti sljedeće:

- utvrđene frekvencije alela su prvi pokazatelji genetskog profila tipova, što uz istražena eksterijerna svojstva pomaže jasnijem definiranju tipova magaraca;
- frekvencije Tf alela upućuju na filogenetsku bliskost istarskog i sjeverno-jadranskog tipa magarca kao i na različitost primorsko-dinarskog tipa spram populacija koje obitavaju na području Kvarnerskog otočja i Istre;
- frekvencije Alb alela ne pokazuju signifikantnu različitost tipova magaraca;
- hemoglobin (Hg) i postalbumin (A1B) su kod magaraca monomorfni;



- standardne genetske distance upućuju na najveću različitost između primorsko-dinarskog i istarskog tipa ( $D = 0,146917$ ) kao i činjenicu da je različitost najmanja između istarskog i sjeverno-jadranskog tipa magarca ( $0,013708$ ).
- genetske distance pokazuju da je sjeverno-jadranski tip znatno bliži istarskom tipu magarca ( $D=0,013708$ ) nego primorsko-dinarskom tipu ( $D=0,083811$ ).
- nužno je nastaviti daljnja i cjelovitija istraživanja na koliko je to moguće većem broju životinja uključujući i istraživanje i druge polimorfne bjelančevine, te pristupiti tipiziranju DNA kao najpouzdanijoj metodi određivanja genetskog profila tipova.

#### LITERATURA

1. Bell, K. (1994): Blood protein polymorphisms in the donkey (*Equus A.sinus*). *Animal Genetics*, 25: 109-113.
2. Bangham, A. D., H. Lehmann (1958): 'Multiple' haemoglobins in the horse. *Nature*, 181:267-268.
3. Blake, J. G., C. L. Douglas (1978): Albumin polymorphism in the feral donkey of Death Valley National Monument, California. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 9: 9-12.
4. Blake, J. G., C. L. Douglas, L. F. Thompson (1981): Spatial variation in transferrin allele frequencies among herds of feral donkeys in Death Valley National Monument, California. *J. Mamm.*, 62: 58-63.
5. Caput, P., M. Posavi, M. Kapš, Jasmina Lukač-Havranek, M. Ernoić, Zlata Gašpert (1992): Genetski polimorfizmi krvi i mlijeka nekih pasmina goveda. *Stočarstvo*, 46: 323-336.
6. Folch, P., J. Jordana, A. Sanchez (1996): Genetic variation of the endangered Catalanian donkey breed. *Animal Genetics*, 27 (Suppl. 2), 17 - 14.
7. Gahne, B. (1962): Recent studies on serum protein polymorphism in cattle. 8<sup>th</sup> European Anim. Blood Group Conf. Ljubljana.
8. Niece, R. L., D. W. Kracht (1967): Genetics of transferrins in burros (*Equus asinus*). *Genetics* 57, 837-841.
9. Osterhoff, D. R. (1966): Haemoglobin, transferrin and albumin types in Equidae (horses, mules, donkeys and zebras). Proceedings of the 10th European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphisms (Paris, 1966), pp. 345-350. Junk, The Hague.
10. Ouragh, L., M. Ouassat, M., Machmoum (1997): Polymorphisme des proteines sanguines chez l'ane (*Eguus asinus*) au Maroc. *Revue Elev. Med. vet. Pays trop.* 50(2): 171-174.
11. Patterson, S. D., K. Bell, D. C. Shaw (1991): Donkey and horse  $\alpha 1$  B-glycoprotein: partial characterization and new alleles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98 B: 523-528.
12. Stormont, C., Y. Suzuki (1963): Genetic control of albumin phenotypes in horses. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 114: 673-675.

## GENETIC BLOOD PROTEIN POLYMORPHISMS OF DONKEYS IN CROATIA

## Summary

Polymorphic blood protein frequencies, by enabling biochemical profile determination of individual animals and thus of populations, contribute considerably, by research into exterior properties, to complete determinations of populations in the field. In Croatia there are several types of donkey that differ significantly in phenotype. By determining polymorphic protein allele frequencies in the observed types we complete the populations determination, thus decreasing doubts on the specificity, i.e. autochthony of the types. By relevant electrophoretic techniques transferrin (Tf) and albumine (Alb) allele frequencies were determined in 75 donkeys classified into three types: the Littoral-Dinaric, the North-Adriatic and the Istrian types. The results of the research are presented in the following table:

		Littoral-Dinaric type	North-Adriatic type	Istrian type
Tf	Tf <sup>A<sub>d</sub></sup>	0,5000	0,2800	0,2826
	Tf <sup>B<sub>d</sub></sup>	0,3519	0,4600	0,6087
	Tf <sup>C<sub>d</sub></sup>	0,1296	0,1200	0,0652
	Tf <sup>D<sub>d</sub></sup>	0,0185	0,1400	0,0435
Alb	Alb <sup>C<sub>d</sub></sup>	0,9630	0,98	1,00
	Alb <sup>D<sub>d</sub></sup>	0,0370	0,02	0

Tf allele frequencies indicate phylogenetic connection between the Istrian and the North-Adriatic types of donkey.

To obtain more accurate information it is necessary to aim further research to determining the frequencies of other polymorphic proteins and direct DNA typing.

Primljeno: 2. 2. 1999.