

POLIMORFIZMI HEMOGLOBINA, TRANSFERINA I
ALBUMINA U KRVI PAŠKE OVCE

A. Ivanković, P. Caput

Sažetak

Paška ovca, kao jedna od najmanjih ovaca u Hrvatskom primorju, odlikuje se kompaktnošću, otpornošću i skromnošću. Znanstveni interes za ovu pasminu uglavnom se zadržavao na praćenju dinamike promjena tjelesnih mjera i proizvodnih svojstava. Ponukani novijim trendovima u praćenju populacija (određivanje genetskih parametara), utvrđene su frekvencije tri polimorfna proteina krvi. Proteini krvi Hb i Tf kod paške ovce su polimorfni, dok je Alb monomorfan. Zabilježene su dvije alelne varijante Hb i pet alelnih varijanti Tf. Utvrđene frekvencije alela (Hb^A, Hb^B, Tf^A, Tf^B, Tf^C, Tf^D, Tf^E) paške ovce su: 0.3375; 0.6625; 0.1375; 0.2750; 0.5500; 0.0250; 0.0125. Utvrđene frekvencije su pokazatelji genetskog profila paške ovce što može poslužiti za praćenje ove pasmine kao i izradu filogenetske studije na bazi dostupnih podataka o ostalim pasminama.

Ključne riječi: polimorfizam, proteini u krvi, paška ovca, frekvencija gena.

Uvod

Primjenom elektroforetske metodike Harris i Warren (1955.) prvi zapažaju različite tipove hemoglobina (Hb) kod ovaca. Evans i sur. (1956.) navode da dva gena kontroliraju sintezu tipova hemoglobina koji kombinacijom daju tri genotipa, te da je elektroforetski pokretljiviji Hb^A prema Hb^B. Buschmann i sur. (1968.) uočavaju različit afinitet tipova Hb prema kisiku. Kasnija istraživanja (Evans i sur., 1958.) navode na zaključak da je tip Hb^A zastupljeniji kod planinskih populacija ovaca a Hb^B je učestaliji kod nizinskih populacija. Kasnije su otkrivene i druge varijante kao: Hb^F (fetalni hemoglobin), Hb^N (Braend i sur., 1964.), Hb^C (Vliet i sur., 1964.), Hb^D (Vaskov i sur., 1967.), Hb^I (Manca i sur., 1993.). Istraživanja vezanosti tipova Hb s proizvodnim svojstvima (Budnikov i sur., 1979.; Sušić i sur.,

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

1993.; Zanotti i sur., 1990.) dala su proturječne rezultate, što može istodobno biti poticaj za nova istraživanja u tom pravcu.

Polimorfnost transferina (Tf) kod ovaca prvi uočava Ashton (1958a.; 1958b.) identificirajući kod britanskih pasmina ovaca četrnaest genotipova, na osnovi čega zaključuje da transferin kodira pet alela (A, B, C, D, E) koji kombinacijom daju petnaest genotipova. Svako alelnoj varijanti svojstvene su dvije trake različitog intenziteta. Kasnije su otkrivane nove varijante alela Tf, tako da je zabilježeno devetnaest nasljedno determiniranih varijanti transferina (Erhardt, 1986.). Potaknuti polimorfizmom Tf neki su istraživači (Evans i sur., 1965.; Sušić i sur., 1992.) pokušali naći vezu polimorfni tipova i proizvodnih obilježja ovaca te su došli do stanovitih zaključaka koje bi svakako trebalo dopuniti novim istraživanjima.

Albumin (Alb) kao protein osmoregulacije i transporta u krvi najzastupljeniji je u proteinima plazme. Kodiran je s tri alela (S, V, W) koji kodiraju šest genotipova. Poradi njegove niske polimorfnosti rijetki su podatci o frekvencijama Alb u populacijama ovaca.

Spoznaje o paškoj ovci pokazuju da je jedna od najmanjih ovaca u našem priobalju. Obitavajući stoljećima na škrtim pašnjacima otoka Paga, u surovim klimatskim uvjetima poprimila je obilježja manje, živahne i izuzetno otporne ovce. Tijekom proteklog stoljeća pokušaji popravljivanja veličine okvira križanjem s "Merino Negretti" pasminom nisu urodili očekivanim rezultatima, osim što je popravljena kvaliteta vune. U cilju jasnijeg definiranja pasmine, osim praćenja promjena eksterijera, odnosno tjelesnih parametara, nužno je pobliže odrediti genetski profil čemu svakako doprinose spoznaje o frekvencijama polimorfni proteina. Ovo istraživanje ima za cilj određivanje frekvencija Hb, Tf i Alb čime ćemo dobiti prve spoznaje o frekvencijama ovih proteina kod paške ovce. Nužno je proširiti istraživanje i na druge populacije ovaca u Hrvatskoj, na veći broj polimorfni proteina kao i na veći broj životinja.

Materijal i metode rada

Analizom je obuhvaćeno 40 ovaca paške pasmine kojima su uzeti uzorci krvi. Eritrociti su izolirani centrifugiranjem i ispiranjem fiziološkom otopinom nakon čega je hemolizat zamrznut na -20°C i tako čuvan do analize. Serum za analizu polimorfizama Tf i Alb pripremljen je centrifugiranjem (3000 r.p.m.) nakon čega je zamrznut na -20°C i čuvan do analize.

Genetske varijante Hb određene su elektroforetski na "cellogel" trakama u kontinuiranom puferском sustavu. Kao gel pufer koji je ujedno i elektrolit,

korišten je tris-glicinski pufer pH 9,0. Elektroforeza je trajala 60 min. na 250 V, nakon čega su direktno očitani rezultati.

Genetske varijante Tf određene su elektroforezom na "cellogel" trakama u kontinuiranom puferском sustavu. Korišten je tris-glicinski pufer pH 9,0. Elektroforeza je trajala 60 min. na 300 V, nakon čega su trake izvađene, označene i potopljene u pripremljenu otopinu boje (Amido Black) u kojoj su ostale 10 minuta. Nakon trokrotnog odbojavanja slijedilo je očitavanje i spremanje traka u 5%-tnu octenu kiselinu.

Genetske varijante Alb određene su elektroforezom na "cellogel" trakama u diskontinuiranom puferском sustavu (Gahne, 1962.). Elektroforeza je trajala 150 min. na 96 V, nakon čega su trake bojane i očitavane kao i kod određivanja Tf.

Genetske varijante genotipova Hb, Tf i Alb nasljeđuju se kodominantno, odnosno svi se aleli jednako manifestiraju, pa se genotipovi mogu direktno identificirati i na osnovi njih odrediti frekvencije alela.

Rezultati istraživanja i rasprava

Rezultati analize istraživanih polimorfniх proteina ukazuju na polimorfnost Hb i Tf kod paške ovce dok smo za albumin zabilježili jedan genotip odnosno jednu alelnu varijantu. Prikaz rezultata analize dat je na tablici 1.

Tablica 1. - RASPODJELA Hb, Tf I Alb TIPOVA I FREKVENCIJA GENA PAŠKE OVCE (N = 40)
Table 1. - DISTRIBUTION OF Hb, Tf AND Alb TYPES AND GENE FREQUENCIES OF PAŠKA SHEEP

Sistem System	Genotip Genotype	Broj Number	χ^2	Frekvencija gena Gene frequencies		s. d.
Hemoglobin Hemoglobin	AA	6	1.042	Hb ^A	0.3375	± 0.0529
	AB	15		Hb ^B		
	BB	19		Hb ^B	±0.6625	
Transferin Transferrin	AA	1	3.636			
	AB	2		Tf ^A	0.1375	±0.0545
	AC	7		Tf ^B	0.2750	±0.0706
	BB	3		Tf ^C	0.5500	±0.0787
	BC	14		Tf ^D	0.0250	±0.0247
	CC	10		Tf ^E	0.0125	±0.0176
	CD	2				
CE	1					
Albumin Albumin	SS	40	-	Alb ^S	1.00	0
				Alb ^V	0	
				Alb ^W	0	

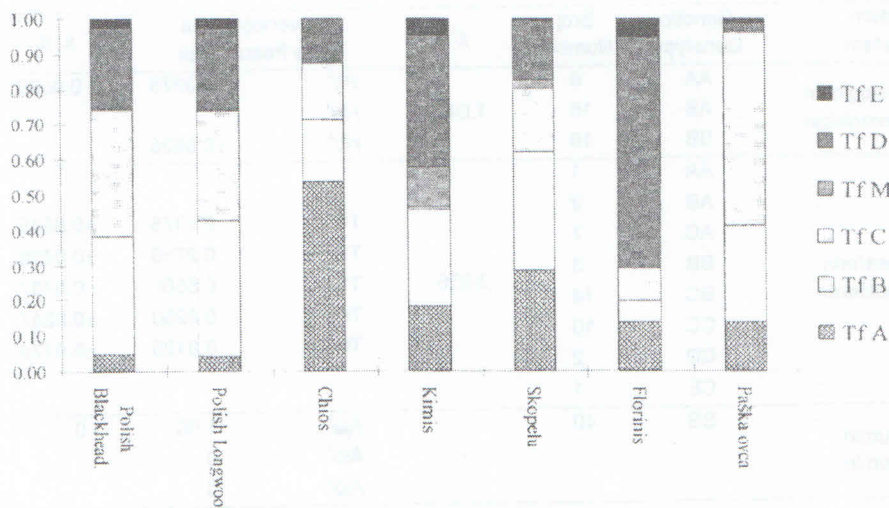
χ^2 test je pokazao da odstupanje utvrđenih frekvencija genotipova spram očekivanih vrijednosti nije statistički značajno.

Sukladno očekivanju najveći stupanj varijabiliteta utvrđen je na Tf lokusu, na kome je zabilježeno pet alelnih varijanti (A, B, C, D, E). Nekoliko genotipova Tf nije zabilježeno (Tf^{AD}, Tf^{AE}, Tf^{BD}, Tf^{BE}, Tf^{DD}, Tf^{DE}, Tf^{EE}). Pregled frekvencija gena na Tf lokusu nekih populacija prikazan je na tablici 2. Vrijednosti frekvencija Tf varijanti paške ovce spram drugih populacija znatnije su različite s obzirom na dvije alelne varijante (C i D), što je uočljivo i na grafikonu 1.

Tablica 2. - FREKVENCIJA GENA NA Tf LOKUSU OVACA
Table 2. - GENE FREQUENCIES OF SHEEP TRANSFERRIN (Tf)

Populacija Population	Frekvencija gena - Gene frequencies						Autor Author
	Tf ^A	Tf ^B	Tf ^C	Tf ^M	Tf ^D	Tf ^E	
Polish Blackheaded	0.050	0.333	0.358	-	0.233	0.025	Szczepanski i sur., 1994.
Polish Longwool	0.042	0.386	0.313	-	0.232	0.027	Kmieć, M., 1993.
Chios	0.538	0.178	0.159	-	0.125	-	Rogdakis i sur., 1995.
Kimis	0.183	0.277	0.005	0.114	0.371	0.050	Rogdakis i sur., 1995.
Skopelu	0.286	0.334	0.183	0.023	0.168	0.006	Rogdakis i sur., 1995.
Florinis	0.139	0.058	0.096	-	0.654	0.053	Rogdakis i sur., 1995.
Paška ovca	0.138	0.275	0.550	-	0.025	0.012	aktualno istraživanje

Grafikon 1. - DISTRIBUCIJE FREKVENCIJA Tf ALELA RAZLIČITIH POPULACIJA OVACA
Gfaph 1. - Tf ALLELES FREQUENCIES OF DIFFERENT SHEEP BREEDS



S obzirom na visoki udio varijante Tf^c (0.55), paškoj ovci su najbliže populacije "Polish Blackheaded" i "Polish Longwool" (Szczepanski i sur., 1994.; Kmiec, M., 1993.). Udio varijante Tf^p paške ovce (0.025) ispod je vrijednosti kod promatranih populacija za isti alel, a najveće odstupanje je spram populacija "Florinis" i "Kimis" iz Grčke (Rogdakis i sur., 1995.) Vrijednosti frekvencija ostalih zabilježenih varijanti Tf (A, B i E) znatnije ne odstupaju od promatranih populacija. Na Hb lokusu utvrđene su dvije alelne varijante (A, B), pošto su zabilježena tri genotipa. S obzirom na frekvencije populacija ovaca navedenih na tablici 3, paška ovca ima iste frekvencije kao i populacija "Ostfriesisches Milchschaft" iz Njemačke.

Tablica 3. - FREKVENCIJA GENA NA HB LOKUSU U OVACA
Table 3. - GENE FREQUENCIES OF SHEEP HEMOGLOBIN (HB)

Populacija Population	Frekvencija gena - Gene frequencies		Autor Author
	Hb ^A	Hb ^B	
Karakul	0.00	1.00	Meyer i sur., 1967.
Leicester	0.01	0.99	Evans i sur., 1958.
Wiltshire	0.04	0.96	Evans i sur., 1958.
Leine	0.08	0.92	Meyer i sur., 1967.
Polish Blackheaded	0.12	0.88	Szczepanski i sur., 1994.
Suffolk	0.12	0.88	Evans i sur., 1958.
Merinoschaf	0.13	0.87	Meyer i sur., 1967.
Paška ovca	0.34	0.66	aktualno istraživanje
Ostfriesisches Milchschaft	0.34	0.66	Meyer i sur., 1967.
Southdown	0.48	0.52	Evans i sur., 1958.
Rhon	0.48	0.52	Meyer i sur., 1967.
Barbary	0.80	0.20	Meyer i sur., 1967.
Bentheim	0.88	0.12	Meyer i sur., 1967.

Frekvencije Hb alela su u širokom rasponu. Na tablici 3. uočavamo monomorfnu populaciju "Karakul" (Meyer i sur., 1967.) s jednom Hb varijantom (Hb^B=1) dok u populaciji "Bentheim" (Meyer i sur., 1967.) varijanta Hb^A dominira (0.88). Pašku ovcu bi mogli prema Evansu i sur. (1958.) svrstati u nizinske populacije ovaca budući da dominira Hb^B alelna varijanta (0.66).

Na Alb lokusu zabilježen je jedan genotip (Alb^{SS}) odnosno jedna alelna varijanta (Alb^S), te zaključujemo da je u populaciji paške ovce albumin monomorfan. Frekvencije alela Alb populacija prikazane su na tablici 4.

Tablica 4. - FREKVENCIJA GENA NA ALB LOKUSU OVACA
 Table 4. - GENE FREQUENCIES OF SHEEP ALBUMIN (ALB)

Populacija Population	Frekvencija gena - Gene frequencies			Autor Author
	Alb ^s	Alb ^v	Alb ^w	
Skopelu	1.000	-	-	Rogdakis i sur., 1995.
Florinis	1.000	-	-	Rogdakis i sur., 1995.
Paška ovca	1.000	-	-	aktualno istraživanje
Frisarta	0.974	0.026	-	Rogdakis i sur., 1995.
Chios	0.924	0.043	0.033	Rogdakis i sur., 1995.

Iz tabličnog prikaza vidljivo je da su populacije "Skopelu" i "Florinis" (Rogdakis i sur., 1995.) monomorfne kao i populacija paške ovce. Uočljiva je također i visoka frekvencija alela Alb^s u polimorfnim populacijama. Zamjetno je da u literaturi postoji malo podataka o frekvencijama albumina, što nas navodi na zaključak da je ovaj protein poradi svoje male polimorfnosti malo informativan te stoga i rijetko istraživano.

Poradi nepostojanja podataka o frekvencijama alela polimorfnih proteina ostalih populacija ovaca u Hrvatskoj nismo mogli utvrditi njihove međusobne genetske distance i što bi bilo informativno u daljnjoj selekciji. Stoga treba nastaviti istraživati polimorfne proteine ostalih populacija ovaca na području Hrvatske, što će uz korištenje rezultata studija susjednih zemalja, predstavljati kvalitetnu bazu podataka za izradu filogenetske studije o populacijama ovaca u Hrvatskoj.

Zaključak

Na osnovi istraženih proteinskih polimorfizama krvnih proteina paške ovce možemo zaključiti:

- proteini krvi Hb i Tf kod paške ovce su polimorfni, dok je Alb monomorfan.
- zabilježene su dvije alelne varijante Hb i pet alelnih varijanti Tf.
- utvrđene frekvencije alela (Hb^A, Hb^B, Tf^A, Tf^B, Tf^C, Tf^D, Tf^E) paške ovce su: 0.3375; 0.6625; 0.1375; 0.2750; 0.5500; 0.0250; 0.0125.
- istraživanjem ostalih populacija moći ćemo utvrditi filogenetske odnose između naših pasmina ovaca, a time ujedno odrediti mjesto naših populacija spram populacija u susjednim zemljama.

REFERENCES

1. Ashton, G. C. (1958a): Polymorphism in the (β -globulins of sheep. *Nature*, 181: 849-850.
2. Ashton, G. C. (1958b): Further (β -globulin phenotypes in sheep. *Nature*, 182: 1101-1102.
3. Braend, M., G. Efremov, O. Helle (1964): Abnormal haemoglobin in sheep. *Nature*, 204:700.
4. Budnikov, A. B., F. Bashkeev (1979): Genetic analysis of herd structure of sheep of Kujbishev breed by some polymorphic blood systems and their connection with productivity. Proceedings of the 16th international conference on animal blood groups and biochemical polymorphism, 4: 47-51.
5. Buschman, H., D. O. Schmid (1968): Serumgruppen bei Tieren. Paul Parey, Berlin
6. Erhardt, G. (1986): Transferrin variants in sheep: separation and characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Animal Genetics*, 17: 343-352.
7. Evans, J. V., H. Harris, F. L. Warren (1958): The distribution of haemoglobin and blood potassium types in British breeds of sheep. *Proceedings of the Royal society*, 148: 249-262.
8. Evans, J. V., J. B. King, L. B. Cohen, H. Harris, F. L. Warren (1956): Genetics of haemoglobin and blood potassium differences in sheep. *Nature*, 178: 849-850.
9. Evans, J. V., N. H. Turner (1965): Haemoglobin type and reproductive performance in Australian Merino sheep. *Nature*, 207: 1396-1397.
10. Harris, H., F. L. Warren (1955): Occurrence of electrophoretically distinct haemoglobins in ruminants. *Bioch. J.*, 60: XXIX.
11. Gahne, B. (1962): Recent studies on serum protein polymorphism in cattle. 8th European Anim. Blood Group Conf., Ljubljana.
12. Kmiec, M. (1993): Segregation of transferrin alleles in a flock of long-wool sheep. *Genetica Polonica*, 34: 273-285.
13. Manca, L., A. Luccia, E. Pieragostini, S. Naitana, B. Masala (1993): Haemoglobin I: a new β -globin chain variant found in sheep of Italian breeds. *Animal Genetics*, 24: 203-204.
14. Meyer, H., B. Lohse, M. Groning (1967): Ein Beitrag zum Haemoglobin und Blutkalium polymorphismus beim schaf. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 84: 340-357.
15. Rogdakis, E., P. Kutsuli, I. Surdis, E. Panopulu (1995): Untersuchungen zur genetischen Struktur der wichtigsten Schafrassen Griechenlands. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 112: 255-266.
16. Sušić, V., K. Mikulec, Vlasta Šerman, S. Bencetić, D. Matičić (1993.): Genotipovi hemoglobina i njihova povezanost s proizvodnjom mlijeka kod sardinjske ovce i njezinih križanaca. *Stočarstvo*, 47: 291-297.
17. Sušić, V., K. Mikulec, Vlasta Šerman S. Bencetić (1992.): Tjelesne mjere ovaca s različitim transferinским fenotipovima-genotipovima. *Krmiva*, 34: 119-126.
18. Szczepanski, W., S. Czarniawska-Zajac, S. Milewski (1994): Charakterystyka zmian frekwencji typow hemoglobin i transferyn u owiec rasy czarnoglowka i mieszancow z udzialem rasy Suffolk. *Acta Academiae Agriculturae ac Technicae Olstenensis, Zootechnica*, 41: 23 - 28.
19. Vaskov, B., G. Efremov (1967): Fourth haemoglobin type in sheep. *Nature*, 216: 593-594.

20. Vliet, G. Van, T. H. J. Huisman (1964): Changes in the haemoglobin types of sheep as a response to anaemia. *Bioch. J.*, 93: 401-409.
21. Zanotti Casati, M., R. Rizzi, G. Pagnacco, F. Luzi, G. Rognoni (1990.): Marker genes and their association with production and reproduction in "delle Langhe" sheep. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 107: 96-103.

POLYMORPHISMS OF BLOOD HEMOGLOBIN, TRANSFERRIN AND ALBUMIN OF PAŠKA SHEEP

Summary

Frequencies of polymorphic blood proteins (Hb, Tf, Alb) of the Paška sheep were studied. The Paška sheep, one of the smallest sheep in Croatian coastal area, is characterized by compactness, resistance and modesty. The interest of scientists in this breed was mainly restricted to monitoring the dynamic of the change in body measurements and production properties. Encouraged by new trends in monitoring populations (determining genetic parameters) frequencies of three polymorphic blood proteins were established. Hemoglobin and transferin are polymorphic while albumin is monomorphic. Two variants of Hb alleles and five variants of Tf alleles have been determined. The established allele frequencies (Hb^A, Hb^B, Tf^A, Tf^B, Tf^C, Tf^D, Tf^E) paška sheep are: 0.3375; 0.6625; 0.1375; 0.2750; 0.5500; 0.0250; 0.0125. The established frequencies are parameters of the genetic profile of the Paška sheep, which may serve for monitoring this breed as well as for phylogenetic studies based on available data on other breeds.

Key words: polymorphisms, blood proteins, Paška sheep, gene frequencies

Primljeno: 10. 5. 1999.