

Wpływ procesów domestykacyjnych na frekwencję niektórych alleli i genotypów owiec*

Część 2. Gen czynnika insulinopodobnego 1 (*IGF1*) i gen kodujący brązowe umaszczenie (*TYRP1*)

Roman Niżnikowski, Krzysztof Głowacz, Ewa Strzelec, Grzegorz Czub, Magdalena Ślęzak, Marcin Świątek

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

W badaniach porównywano cztery rasy utrzymywanych w Polsce owiec, charakteryzujących się okrywą wełnistą mieszaną (wrzosówka, świniarka, polska owca górską odmiany barwnej i odmiany białej) oraz wełnisto-mięsnego merynosa polskiego z ich dzikim przodkiem – muflonem europejskim. Prowadzono ocenę frekwencji genów i genotypów odpowiedzialnych za różne cechy użytkowe. Do oznaczeń wybrano geny warunkujące zdrowie owiec, cechy mleczności, rozwój masy ciała i umaszczenie, tj.:

- gen białka prionowego – *PRNP* (prion protein),
- gen kazeiny alfa-s1 – *CSN1S1* (α -s1 casein),
- gen czynnika insulinopodobnego 1 – *IGF1* (insulin like growth factor 1),
- gen kodujący brązowe umaszczenie – *TYRP1* (tyrosinase related protein 1).

Pierwsze dwa geny, tj. gen białka prionowego (*PRNP*) i gen kazeiny alfa-s1 (*CSN1S1*) omówiono w pierwszej części opracowania („Przegląd Hodowlany” nr 6/2013, s. 18-21).

Białko *IGF1* należy do jednego z kluczowych elementów szlaku działania hormonu wzrostu [2]. Jest wytwarzane w wątrobie i odpowiada za wzrost komórek oraz całego organizmu. Przypuszcza się, że działanie hormonu wzrostu na tkanki zachodzi przy udziale lokalnych somatomedyn, m.in. czynnika insulinopodobnego 1 (*IGF1*). *IGF1* stymuluje sekrecję somatostatyny podwzgórzowej i hamuje wydzielanie hormonu wzrostu [7]. Gen czynnika insulinopodobnego wymieniający jest w gronie uwarunkowań umożliwiających identyfikowanie ras, co udowodniono w krajach basenu Morza Śródziemnego [9]. Wskazuje to na możliwość wykorzystania go w badaniach nad pochodzeniem zwierząt, co sygnalizowali Heinleider i wsp. [4]. W związku z powyższym, biorąc pod uwagę fakt, że odnotowano w cytowanej pracy wpływ częstotliwości występowania uwarunkowań genu czynnika insulinopodobnego 1 (*IGF1*), postanowiono zbadać rozkłady jego występowania u krajowych ras owiec [5] o okrywie mieszanej w porównaniu do dzikiego przodka – muflona europejskiego (*Ovis aries musimon*) i wełnisto-mięsnego merynosa pol-

skiego. Ponadto uwarunkowanie to może być pomocne w badaniach pochodzenia owiec [4], co zaczyna budzić coraz większe zainteresowanie.

Gen kodujący brązowe umaszczenie (*TYRP1*) odpowiada za oksydację kwasu 5,6-dihydroxyindolo-2-karboksyowego (DHI-CA) do kwasu indolo-5,6-kwinono-2-karboksyowego. Może regulować lub wpływać na typ syntetyzowanej melaniny; zmiana z koloru czarnego na brązowy bez udziału barwnika rudego [6]. Ekspresja genu *TYRP1* zachodzi w melanocytach i odgrywa rolę życiową, jako enzym w ścieżce syntezy eumelaniny [8]. Ponadto *TYRP1* stabilizuje tyrozynazę (*TYR*), co jest niezwykle ważne w procesach melanogenezy [3]. Badania nad polimorfizmem w genie *TYRP1* u owiec wykonywano ze względu na jego możliwy wpływ na kolor okrywy [3], jak również na kolor mięsa i kości [1].

Badania własne przeprowadzono na materiale doświadczalnym zestawionym w tabeli 1.

Wszystkie grupy potraktowano łącznie ze względu na fakt, iż w wielu przypadkach nie prowadzono dokumentacji hodowlanej (muflony, muflonowrzosówki). Łącznie przebadano 196 muflonów, które pochodziły z dwóch zagród z woj. lubuskiego oraz z Fermy Doświadczalnej PZŁ w Czempiniu. Dla porównania udało się pobrać próby od 17 muflonowrzosówek, pochodzących z dwóch gospodarstw indywidualnych w woj. wielkopolskim. Najlicniejszą grupą były wrzosówki. Badaniami objęto łącznie 773 osobniki pochodzące ze stada w RZD Żelazna, produkującego materiał zarodowy na potrzeby hodowli krajowej. Polskie owce górskie odmiany barwnej (188 osobników) pochodziły z dwóch stad zarodowych w woj. małopolskim, a polskie owce górskie odmiany białej (162 osobniki) z dwóch stad z woj. podkarpackiego. Świniarki (łącznie 166 szt.) pochodziły z dwóch stad w woj. podkarpackim i jednego stada w woj. świętokrzyskim, natomiast merynos polski (łącznie 331 sztuk) z dwóch stad należących do ANR w woj. wielkopolskim i jednego stada z woj. zachodniopomorskiego. Łącznie badaniami objęto 1833 osobniki. Dane zestawione w tabeli 1. nieco odbiegają od przedstawionych w opisie ze względu na fakt, iż w odniesieniu do niektórych genów nie udało się oznaczyć alleli i genotypów na wszystkich allelach. Z tego też względu w zestawieniu podano informacje dotyczące tylko tych prób, które udało się po sprawdzeniu dokładnie oznaczyć, odrzucając te, które mimo kilku powtórzeń nie dały zadowalających wyników.

DNA izolowano z leukocytów krwi konserwowanej za pomocą EDTA. W celu otrzymania wysokiej jakości DNA nadającego się

Tabela 1
Zestawienie materiału doświadczalnego wykorzystanego w badaniach w latach 2009-2012

Wyszczególnienie	Gen/płeć				Zwierzęta doświadczalne w poszczególnych latach
	<i>TYRP1</i>		<i>IGF1</i>		
	♀	♂	♀	♂	
Muflon europejski	119	71	123	73	2010 r. – 2 tryki 2011 r. – 2 maciorki, 6 tryków 2012 r. – 121 maciorek, 73 tryki
Muflonowrzosówka	8	9	8	7	2010 r. – 4 maciorki, 6 tryków 2011 r. – 4 maciorki, 3 tryki
Wrzosówka	368	400	334	355	2009 r. – 129 maciorek, 144 tryki 2010 r. – 128 maciorek, 130 tryków 2011 r. – 116 maciorek, 126 tryków
Świniarka	134	29	109	33	2009 r. – 33 maciorki, 15 tryków 2010 r. – 106 maciorek, 18 tryków
Polska owca górską odmiana biała	145	15	141	15	2010 r.
Polska owca górską odmiana barwna	173	14	168	13	2011 r.
Merynos polski	218	102	210	95	2010 r. – 111 maciorek, 43 tryki 2011 r. – 101 maciorek, 52 tryki 2012 r. – 17 maciorek, 8 tryków
Suma w obrębie płci i rasy	1165	640	1093	591	
Suma w obrębie rasy	1805		1684		

Tabela 2

Startery oraz miejsca polimorfizmu punktowego w wybranych genach owiec

Locus	Nazwa	Startery 3' do 5' (forward/reverse)	SNP	Lokalizacja
<i>IGF1</i>	czynnik insulinopodobny 1	CACACACCTTGGTGGCACTCC/ GCTGAGTTGGTTGGATGCTCT	AY737509: 211 C>T*	ekson 3
<i>TYRP1</i>	gen warunkujący brązowe umaszczenie	GCTCCAGGCAGAATGAAATC/ GTGACCAGAGGGTTCTCACAG	AY737511.1: 215 C>T**	ekson 2

*Pariset i wsp. [9], **Deng i wsp. [1]

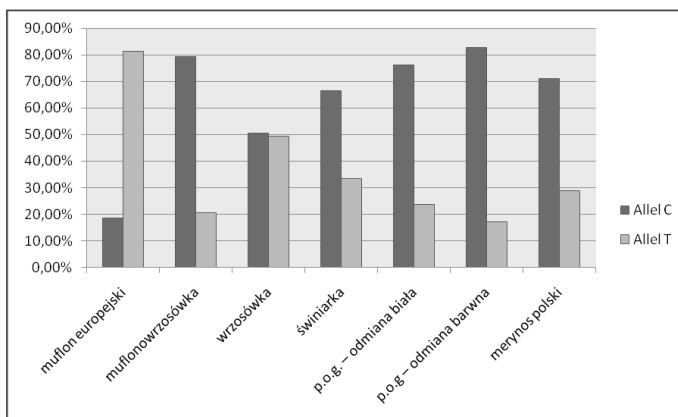
po zamrożeniu i rozmrożeniu do wielokrotnego użycia, krew wstępnie oczyszczono z powodujących modyfikacje w DNA związków hemu przez usunięcie produktów lizy erytrocytów. DNA izolowano z leukocytów metodą chromatografii na minikolumnach silikatowych firmy A&A Biotechnology. Frakcja otrzymanego w ten sposób DNA służyła jako matryca do amplifikacji polimorficznego fragmentu genu. Pozostała część każdego preparatu DNA jest przechowywana w banku w postaci zamrożonej, z możliwością wielokrotnego pobierania próbek do powtórnego użycia. Genotypowanie alleli prowadzono systemem KASPar®, stosując startery oraz miejsca polimorfizmu punktowego SNP (single nucleotide polymorphism) wymienione w tabeli 2.

Na podstawie odczytu genotypowanych prób DNA w obrębie maciorek i tryków przedstawiono rozkłady frekwencji alleli i genotypów osobno dla ras. Frekwencje alleli i genotypów porównano w zależności od rasy za pomocą testu χ^2 przy użyciu programu SPSS.

Odnośnie do genu czynnika insulinopodobnego 1 (*IGF1*), analizy 1684 prób zebranych od badanych owiec wykazały występowanie u wszystkich grup owiec tylko allelu C, przy całkowitym braku allelu T. Stąd pod tym względem nie zaobserwowano żadnego zróżnicowania genetycznego.

Wyniki dotyczące oceny częstotliwości występowania alleli kodujących brązowe umaszczenie zestawiono w tabeli 3. i na rysunku 1. Rozkład ten w zależności od grupy owiec okazał się wysoko istotny statystycznie. Wynika z niego, że jedynie u muflona europejskiego allel T występuje wielokrotnie częściej aniżeli C, u wrzosówki rozkład alleli jest dość zrównoważony, natomiast u pozostałych grup występuje układ odwrotny. Można to tłumaczyć procesem domestykacyjnym. Muflony europejskie bytujące w środowisku naturalnym muszą posiadać suknię maskującą je na tle otoczenia. Również wrzosówka – owca prymitywna i półdzika, charakteryzuje się umaszczeniem siwym, wskazującym na możliwość maskowania się w środowisku. Pozostałe owce (z wyjątkiem polskiej owcy górskiej odmiany barwnej) charakteryzują się wełną białą.

Pogląd ten zdaje się potwierdzać wysoko istotny statystycznie rozkład genotypów przedstawiony w tabeli 4. i na rysunku 2. U

Rys. 1. Częstotliwość występowania alleli genu *TYRP1* kodującego brązowe umaszczenie ($P \leq 0,01$)

muflona europejskiego występuje znacząca przewaga homozygot TT nad heterozygotami CT, przy marginalizacji występowania uwarunkowań CC. Zrównoważony rozkład występowania genotypów homozygotycznych z przewagą heterozygotycznych stwierdzono u wrzosówki, natomiast u świniarki można zauważyć zdecydowaną przewagę genotypu heterozygotycznego nad homozygotycznym CC oraz marginalizację TT. U pozostałych ras owiec stwierdzono zdecydowanie najwyższe częstotliwości występowania genotypu CC, nieco mniejsze u merynosa polskiego, gdzie homozygoty CC nieznacznie przewyższały CT przy zdecydowanej marginalizacji występowania homozygot TT.

Na podstawie przeprowadzonych prac badawczych wykazano duże zróżnicowanie genetyczne pomiędzy badanymi grupami zwierząt w zakresie genu kodującego brązowe umaszczenie (*TYRP1*), w przeciwieństwie do genu czynnika insulinopodobnego 1 (*IGF1*), gdzie stwierdzono występowanie tylko jednego allelu u wszystkich grup badanych owiec.

W genie *TYRP1* u muflona europejskiego stwierdzono zdecydowanie wyższą częstotliwość występowania allelu T nad C, odwrotnie niż u pozostałych grup, spośród których jedynie u wrzosówki wykazano zrównoważony układ częstotliwości występowania obu alleli. Układ ten miał bezpośrednie przełożenie na rozkład

Tabela 3

Zestawienie alleli genu *TYRP1* kodującego brązowe umaszczenie ($P \leq 0,01$)

Wyszczególnienie		Allel		Ogółem
		C	T	
Muflon europejski	n	71	309	380
	%	18,7	81,3	100,0
Muflonowrzosówka	n	27	7	34
	%	79,4	20,6	100,0
Wrzosówka	n	776	760	1536
	%	50,5	49,5	100,0
Świniarka	n	217	109	326
	%	66,6	33,4	100,0
Polska owca górska odmiana biała	n	244	76	320
	%	76,3	23,8	100,0
Polska owca górska odmiana barwna	n	310	64	374
	%	82,9	17,1	100,0
Merynos polski	n	455	185	640
	%	71,1	28,9	100,0
Ogółem	n	2100	1510	3610
	%	58,2	41,8	100,0

n – liczebność; % – procentowy udział allelu w badanej rasie

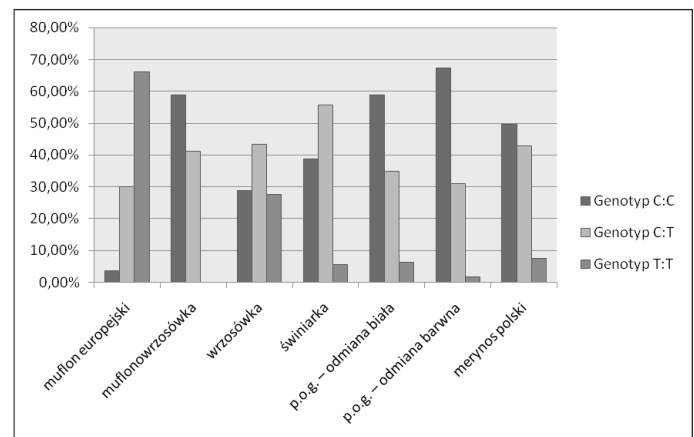
Rys. 2. Częstotliwość występowania genotypów genu *TYRP1* kodującego brązowe umaszczenie ($P \leq 0,01$)

Tabela 4

Zestawienie genotypów genu *TYRP1* kodującego brązowe umaszczenie (P≤0,01)

Wyszczególnienie		Genotyp			Ogółem
		C:C	C:T	T:T	
Muflon europejski	n	7	57	126	190
	%	3,7	30,0	66,3	100,0
Muflonowrzosówka	n	10	7	0	17
	%	58,8	41,2	0,0	100,0
Wrzosówka	n	221	334	213	768
	%	28,8	43,5	27,7	100,0
Świniarka	n	63	91	9	163
	%	38,7	55,8	5,5	100,0
Polska owca górską odmiana biała	n	94	56	10	160
	%	58,8	35,0	6,3	100,0
Polska owca górską odmiana barwna	n	126	58	3	187
	%	67,4	31,0	1,6	100,0
Merynos polski	n	159	137	24	320
	%	49,7	42,8	7,5	100,0
Ogółem	n	680	740	385	1805
	%	37,7	41,0	21,3	100,0

n – liczebność; % – procentowy udział genotypu w badanej rasie

genotypów, może z wyłączeniem wrzosówki i świniarki, u których zdecydowanie dominowały genotypy heterozygotyczne nad homozygotycznymi.

Podsumowując można stwierdzić, że procesy domestykacyjne wywarły wpływ na ilość i rozkład występowania alleli i genotypów w zakresie genu białka prionowego (*PRNP*), genu kazeiny α -s1 (*CSN1S1*) oraz genu kodującego brązowe umaszczenie (*TYRP1*), w przeciwieństwie do genu czynnika insulinopodobnego 1 (*IGF1*), gdzie stwierdzono występowanie tylko jednego allelu u wszystkich grup badanych owiec. W zakresie genu białka prionowego stwierdzono występowanie od 2 do 6 alleli (przy wykazaniu występowania 14 genotypów), których liczba wzrastała od 2 u muflona europejskiego do 6 u polskiej owcy górskiej odmiany barwnej i merynosa polskiego. Natomiast w przypadku genu kazeiny α -s1 stwierdzono występowanie zrównoważonej częstotliwości wystę-

powania alleli C i T u muflona europejskiego, co przekładało się na zrównoważony rozkład występowania genotypów, w odróżnieniu od pozostałych grup, w których allel T i genotyp TT zdecydowanie dominowały w częstotliwości występowania nad allelem C i genotypami CC i TC. Z kolei gen kodujący brązowe umaszczenie (*TYRP1*) wykazał zdecydowanie wyższą częstotliwość występowania allelu T nad C w przeciwieństwie do pozostałych grup, spośród których jedynie u wrzosówki wykazano zrównoważony układ częstotliwości występowania obu alleli. Układ ten miał bezpośrednie przełożenie na rozkład genotypów, z wyłączeniem wrzosówki i świniarki, u których zdecydowanie dominowały genotypy heterozygotyczne nad homozygotycznymi.

Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań z tego zakresu u owiec kulturalnych (np. w porównaniu do merynosa polskiego), charakteryzujących się bardziej wyspecjalizowaną użytkowością (np. mięsną czy wełnistą-mięsną).

*Praca wykonana w ramach projektu międzynarodowego niewspółfinansowanego nr 625/N-WEGRY/2009/0

Literatura: 1. Deng W.D., Yang S.L., Huo Y.Q., Gou X., Shi X.W., Mao H.M., 2006 – Anim. Genet. 37, 586-588. 2. Franco M.M., Antunes R.C., Silva H.D., Goulardt L.R., 2005 – J. Applied Genet. 46 (2), 195-200. 3. Gratten J., Beraldi D., Lowder B.V., McRae A.F., Visscher P.M., Pemberton J.M., Slate J., 2007 – Proc. Biol. Sci., Mar 7, 274 (1610), 619-626. 4. Heindleder S., Janke A., Wassmuth R., 2001 – Archiv für Tierzucht, special issue, 44, 271-279. 5. Hodowla Owiec i Kóz w Polsce w 2011 roku. Polski Związek Owczarski, Warszawa, czerwiec 2012. 6. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TYRP1> 7. Krzymowski T. (red.), 1998 – Fizjologia zwierząt. PWRiL, Warszawa. 8. Kushimoto T., Valencia, J.C., Costin G.-E., Toyofuku K., Watabe H., Yasumoto K.-I., Rouzaud F., Vieira W.D., Hearing, V. J., 2003 – Pigment Cell Research 16(3), 237-244. 9. Pariset L., Cappuccio I., Ajmone-Marsan P., Bruford M., Dunner S., Cortes O., Erhardt G., Prinzenberg E.-M., Gutscher K., Joost S., Pinto-Juma G., Nijman I.J., Lenstra J.A., Perez T., Valentini A. and ECONOGENE Consortium, 2006 – J. Heredity 97 (5), 531-534.

Effect of domestication processes on frequency of certain alleles and genotypes of ewes

Summary

The studies included breeds and crossbred ewes of different breeds and types: 196 mouflons, 773 Polish Heath ewes, 17 hybrids of mouflon and Polish Heath sheep, 188 Polish Mountain Sheep of coloured variety and 162 of white variety, 166 Swiniarka sheep and 331 Polish Merino ewes, i.e. 1833 animals in total. The evaluation of frequency of genes and genotypes responsible for health of the sheep, growth of body weight, traits of milking and coverage (hair), that is, gene of prion protein (*PRNP*), gene of insulin-like growth factor 1 (*IGF1*), gene of alfa-s1 casein (*CSN1S1*) and gene, coding brown hair (*TYRP1* – tyrosinase related protein 1), was carried out. There was revealed a high genetic differentiation between the examined animal groups in respect of gene of prion protein, gene of α -s1 casein and gene, coding the brown colour of hair (*TYRP1*) in contrary to gene of insulin-like growth factor 1 (*IGF1*) where the occurrence of only one allele was found in all groups of the studied ewes. In respect of gene of prion protein, the incidence of 2-6 alleles was recorded (when revealing the occurrence of 14 genotypes), the number of which increased from 2 in case of the European mouflon up to 6 in Polish Mountain Sheep of coloured variety and in Polish Merino sheep. On the other hand, in the case of gene of alfa-s1 casein, the sustainable frequency of the occurrence of alleles C and T in the European mouflon was found; it was reflected in sustainable distribution of genotypes, differently as in the remaining groups where allele T and genotype TT was decisively dominating in the frequency of occurrence in comparison to allele C and genotypes CC and TC. In turn, gene, coding the brown hair (*TYRP1*) revealed considerably higher frequency of occurrence of allele T vs. C in contrary to the remaining groups, from among which only in case of Polish Heath sheep the sustainable system of frequency of occurrence of the both alleles was recorded. The mentioned system was directly reflected in distribution of genotypes, excluding Polish Heath sheep and *świniarka* sheep where heterozygotic genotypes were dominating vs. homozygotic ones. The conducted studies allow to state that domestication processes had an influence on the quantity and distribution of alleles and genotypes in respect of gene of prion protein, gene of alfa-s1 casein and gene, coding the brown colour hair (*TYRP1*) in the contrary to gene of insulin-like growth factor 1 (*IGF1*).

KEY WORDS: sheep, frequency of alleles, frequency of genotypes, genes, origins