

# Wpływ procesów domestykacyjnych na frekwencję niektórych alleli i genotypów owiec\*

## Część 1. Gen białka prionowego (PRNP) i gen kazeiny $\alpha$ -s1 (CSN1S1)

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

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Poszukiwania dróg przekształcania owiec od ich dzikich przodków do ras kulturalnych koncentrują się na badaniu związków z cechami użytkowymi u form przejściowych, jakimi są rasy szerszne i o wełnie mieszanej. Heindleder i wsp. [4], wykorzystując zdobycze genetyki molekularnej, określali związki pomiędzy dzikimi przodkami owiec (muflonem europejskim, azjatyckimi owcami górskimi i stepowymi) a ich współczesnymi potomkami, hodowanymi jako rasy użytkowe w Niemczech. Przekształcenia te wpływały w sposób bezpośredni na frekwencję genów i genotypów cech użytkowych występujących u współcześnie hodowanych ras, co ma bezpośredni związek z wykazywaniem odpowiedniego poziomu cech użytkowych, charakterystycznych dla konkretnej rasy czy typu użytkowego. Ciekawym materiałem porównawczym są stadia przejściowe procesów ewolucji i przekształcania kierunków użytkowania tych zwierząt gospodarskich, a więc rasy o okrywie mieszanej. Wyróżnia się ich wiele, w zależności prawdopodobnie od praprzodków [9].

W Polsce spośród praprzodków owiec występują jedynie muflony europejskie, żyjące w stanie dzikim lub w warunkach chowu zagrodowego (populacja szacowana na ok. 1000 szt.). Są one uznawane za protoplastów współcześnie hodowanych owiec północno-wschodnioeuropejskich krótkoogoniastych. W tej grupie ras znajduje się wrzosówka (stan pogłowia macierek zarodowych w 2011 r. – 8429 szt., 11,71% pogłowia), charakteryzująca się okrywą mieszaną i użytkowścią kozuchową. Spośród innych ras o okrywie mieszanej występują również polskie owce górskie odmiany barwnej (1259 szt., 1,75% pogłowia) i białej (4849 szt., 6,73% pogłowia), charakteryzujące się użytkowaniem mleczno-wełnistym oraz świniarki (1140 szt., 1,58% pogłowia) o użytkowości wszechstronnej. Wymienione rasy, oprócz wrzosówki, nie mają jednoznacznie określonego przodka, stąd potrzeba prowadzenia badań porównawczych w tym zakresie. Jako grupę kontrolną użyto wełnisto-mięsnego merynosa polskiego (6851 szt., 9,51% pogłowia), rasę kulturalną o okrywie jednolitej, do której można odnosić wszelkie wskaźniki badanych uwarunkowań [5].

W badaniach prowadzono ocenę frekwencji genów i genotypów odpowiedzialnych za różne cechy użytkowe. Do ozna-

czeń wybrano geny warunkujące zdrowie owiec, cechy mleczności, rozwój masy ciała i umaszczenie, tj.:

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

Gen białka prionowego (*PRNP*) odpowiada za tworzenie się białka prionowego, którego nieprawidłowa forma odpowiedzialna jest za powstawanie chorób z grupy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych. Do chorób tych należy między innymi BSE u bydła i trzęsawka (scrapie) u owiec. Gen *PRNP* występuje u wszystkich gatunków zwierząt, w swej strukturze składa się z ok. 750 pz i zbudowany jest z dwóch lub trzech eksonów oraz z jednego bądź dwóch intronów, w zależności od gatunku [7]. Stwierdzono, że ekspresja genu *PRNP* zachodzi przede wszystkim w tkance nerwowej [2]. U owiec gen ten znajduje się na chromosomie 13 [2]. Wykazano naturalną podatność owiec o określonych genotypach na samorzutne wystąpienie trzęsawki. Przeprowadzenie szeregu badań [3, 6, 8] pozwoliło na wyodrębnienie polimorfizmów w kodonach: 136 (A/V), 141 (L/F), 154 (R/H) i 171 (Q/R/H) – tabela 1. Na tej podstawie wyselekcjonowano genotypy o różnym stopniu wrażliwości na wystąpienie trzęsawki. Wyniki te znalazły odbicie m. in. w rozporządzeniach regulujących zwalczanie chorób prionowych u zwierząt [10].

Tabela 1

Aminokwasy alternatywne determinowane w poszczególnych kodonach

Kodon	Aminokwasy alternatywne	Kod jednoliterowy
136	walina	V
	alanina	A
141	leucyna	L
	fenyloalanina	F
154	arginina	R
	histydyna	H
171	histydyna	H
	glutamina	Q
	arginina	R
	lizyna (rzadko)	K

Stwierdzono, że allel ALRR gwarantuje najmniejszą wrażliwość na trzęsawkę. Allele ALRQ, AFRQ i ALHQ są odpowie-

Tabela 2

Zestawienie materiału doświadczalnego wykorzystanego w badaniach w latach 2009-2012

Wyszczególnienie	Gen/pleć				Zwierzęta doświadczalne w poszczególnych latach
	<i>PRNP</i>		<i>CSN1S1</i>		
	♀	♂	♀	♂	
Muflon europejski	120	73	122	70	2010 r. – 2 tryki 2011 r. – 2 maciorki, 6 tryków 2012 r. – 121 macierek, 73 tryki
Muflonowrzosówka	8	9	7	9	2010 r. – 4 maciorki, 6 tryków 2011 r. – 4 maciorki, 3 tryki
Wrzosówka	356	374	373	390	2009 r. – 129 macierek, 144 tryki 2010 r. – 128 macierek, 130 tryków 2011 r. – 116 macierek, 126 tryków
Świniarka	136	30	136	30	2009 r. – 33 maciorki, 15 tryków 2010 r. – 106 macierek, 18 tryków
Polska owca góraska odmiana biała	147	15	144	15	2010 r.
Polska owca góraska odmiana barwna	174	14	172	13	2011 r.
Merynos polski	228	103	221	100	2010 r. – 111 macierek, 43 tryki 2011 r. – 101 macierek, 52 tryki 2012 r. – 17 macierek, 8 tryków
Suma w obrębie płci i rasy	1169	618	1175	627	
Suma w obrębie rasy	1787		1802		

Tabela 3

## Startery oraz miejsca polimorfizmu punktowego w wybranych genach owiec

Locus	Nazwa	Startery 3' do 5' (forward/reverse)	SNP	Lokalizacja
PRNP_1	białko prionowe	CACAGTCAGTGGAAACAAGCC/ CTTTGCCAGGTTGGGG	AY909542: 479 C>T	kodon 136
PRNP_2			AY909542: 493 C>T	kodon 141
PRNP_3			AY909542: 534 G>A	kodon 154
PRNP_4			AY909542: 385 A>G	kodon 171
PRNP_5			AY909542: 386 G>T	kodon 171
CSN1S1	kazeina alfa-s1	CACTGATGCCCCCTCATT/ TGAGGAACTCCACAATTATGG	X03237: 663C>T*	ekson 17

\*Według Ceriotti i wsp. [1]

dzielne za duży stopień wrażliwości na trzęsawkę, natomiast allel VLRQ występuje najczęściej u owiec ze stwierdzonymi klinicznymi objawami trzęsawki. Dlatego też selekcja na allel ALRR jest podstawowym narzędziem eliminowania i kontroli trzęsawki u owiec.

Białka mleka można podzielić na kazeinowe (tworzące skrzep serowarski) oraz serwatkowe. Wyróżnia się cztery rodzaje białek kazeinowych:  $\alpha$ -s1,  $\alpha$ -s2,  $\beta$  oraz  $\kappa$ . Białka te determinowane są przez geny z pojedynczego *locus* i są ze sobą sprzężone. Białko alfa-s1 kazeiny należy do głównych białek kazeinowych mleka owczego.

Badania przeprowadzono na materiale doświadczalnym zestawionym w tabeli 2. 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 Fermi Doświadczalnej PZŁ w Czempiniu. Dla porównania udało się pobrać próby od 17 muflonowrzosówek, pochodzących z dwóch gospodarstw indywidualnych w woj. wielkopolskim. Najliczniejszą 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 2. 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 po zamrożeniu i rozmrożeniu do wielokrotnego użycia, krew wstępnie oczyszczono z powodujących modyfikacje w DNA związków hemu przez usunięcie produktów lizy erytrocytów. DNA izo-

lowano 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 3.

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  $\chi^2$  przy użyciu programu SPSS.

Wyniki badań dotyczące genu białka prionowego (PRNP) przedstawiono w tabelach 4. i 5. oraz na rysunku 1. U badanych grup owiec wykazano 6 alleli trzęsawki. Częstotliwość występowania alleli w zależności od rasy okazała się wysoko istotna statystycznie. Na uwagę zwraca fakt występowania tylko 2 alleli u muflona europejskiego, z dominacją allelu ALRQ (99%), charakterystycznego dla zwierząt dzikich. Proces domestykacyjny wpływał na zwiększanie liczby alleli u ras owiec domowych, spośród których wrzosówka charakteryzowała się występowaniem trzech alleli, z dominacją allelu ALRR (59,5%) i najniższą częstotliwością występowania allelu ALHQ (9,5%) – tabela 4. W miarę podnoszenia stopnia udomowienia (specjalizacja użytkowości uzyskiwana na drodze pracy hodowlanej) liczba alleli wzrastała, tak że u świniarki stwierdzono ich już cztery, u polskiej owcy górskiej odmiany białej – pięć, a u polskiej owcy górskiej odmiany barwnej i merynosa polskiego już po sześć. W kodonie 141 pojawił się allel F u polskiej owcy górskiej odmiany barwnej i u merynosa polskiego, natomiast u świniarki, polskiej owcy górskiej obu odmian barwnych oraz u merynosa polskiego stwierdzono allel VLRQ. Podsumowując, w rozkładzie alleli trzęsawki można zauważyć wzrost liczby alleli w zależności od wyższej specjalizacji użytkowości badanych grup rasowych owiec. Generalnie u form zbliżonych do muflona dominuje allel ALRQ

Tabela 4

Zestawienie alleli białka prionowego dla badanych ras owiec (P $\leq$ 0,01)

Wyszczególnienie		Allel						Ogółem
		ALRR	ALRQ	AFRQ	ALHQ	ALRH	VLRQ	
Muflon europejski	n	4	382	0	0	0	0	386
	%	1,0	99,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Muflonowrzosówka	n	7	27	0	0	0	0	34
	%	20,6	79,4	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Wrzosówka	n	868	452	0	139	1	0	1460
	%	59,5	31,0	0,0	9,5	0,0	0,0	100,0
Świniarka	n	202	113	0	3	0	14	332
	%	60,8	34,0	0,0	0,9	0,0	4,2	100,0
Polska owca górska odmiana biała	n	126	152	0	34	4	8	324
	%	38,9	46,9	0,0	10,5	1,2	2,5	100,0
Polska owca górska odmiana barwna	n	170	185	1	7	8	5	376
	%	45,2	49,2	0,3	1,9	2,1	1,3	100,0
Merynos polski	n	408	177	3	25	1	48	662
	%	61,6	26,7	0,5	3,8	0,2	7,3	100,0
Ogółem	n	1785	1488	1488	208	14	75	3574
	%	49,9	41,6	41,6	5,8	0,4	2,1	100,0

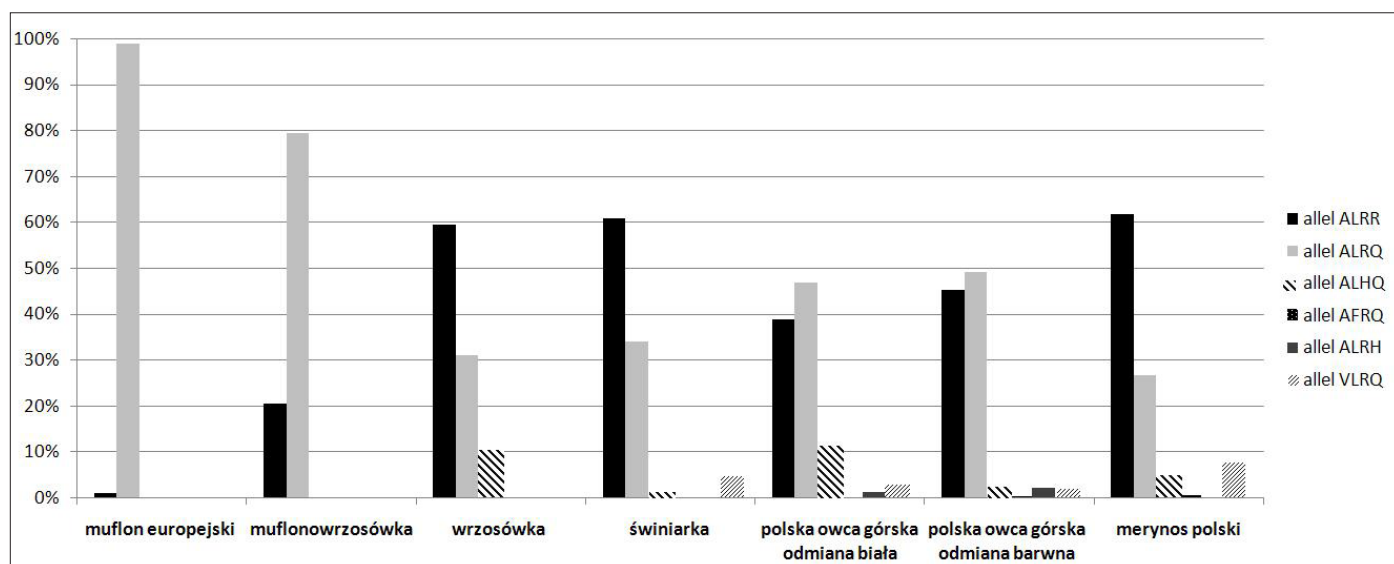
n – liczebność; % – procentowy udział allelu w badanej rasie

Tabela 5

Zestawienie genotypów białka prionowego dla badanych ras owiec ( $P \leq 0,01$ )

Wyszczególnienie		Genotyp														Ogółem
		ALRR/ ALRR	ALRR/ ALRQ	ALRR/ AFRQ	ALRR/ ALHQ	ALRQ/ ALRQ	ALRQ/ ALHQ	ALHQ/ AFRQ	ALRQ/ ALRH	ALHQ/ ALHQ	VLRQ/ ALRR	VLRQ/ AFRQ	VLRQ/ ALRQ	VLRQ/ ALHQ	VLRQ/ VLRQ	
Muflon europejski	n	1	2	0	0	190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	193
	%	0,5	1,0	0,0	0,0	98,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Muflonowrzosówka	n	0	7	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
	%	0,0	41,2	0,0	0,0	58,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Wrzosówka	n	199	370	0	100	28	25	0	1	7	0	0	0	0	0	730
	%	27,3	50,7	0,0	13,7	3,8	3,4	0,0	0,1	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Świniarka	n	55	79	0	3	15	0	0	0	0	10	0	4	0	0	166
	%	33,1	47,6	0,0	1,8	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	2,4	0,0	0,0	100,0
Polska owca górska odmiana biała	n	27	55	0	14	37	16	0	4	2	3	0	3	0	1	162
	%	16,7	34,0	0,0	8,6	22,8	9,9	0,0	2,5	1,2	1,9	0,0	1,9	0,0	0,6	100,0
Polska owca górska odmiana barwna	n	35	94	0	4	39	2	1	8	0	2	0	3	0	0	188
	%	18,6	50,0	0,0	2,1	20,7	1,1	0,5	4,3	0,0	1,1	0,0	1,6	0,0	0,0	100,0
Merynos polski	n	126	110	2	18	24	5	0	1	0	26	1	13	2	3	331
	%	38,1	33,2	0,6	5,4	7,3	1,5	0,0	0,3	0,0	7,9	0,3	3,9	0,6	0,9	100,0
Ogółem	n	443	717	2	139	343	48	1	14	9	41	1	23	2	4	1787
	%	24,8	40,1	0,1	7,8	19,2	2,7	0,1	0,8	0,5	2,3	0,1	1,3	0,1	0,2	100,0

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

Rys. 1. Częstotliwość występowania alleli białka prionowego u badanych ras owiec ( $P \leq 0,01$ )

(również w formie homozygotycznej genotypu), natomiast u ras hodowlanych allel ALRR. Wyniki te potwierdzono danymi dotyczącymi rozkładu genotypów trzęsawki, ocenionej jako wysoko istotny statystycznie (tab. 5).

Wyniki dotyczące rozkładu alleli genu kazeiny  $\alpha$ -s1 (*CSN1S1*) zestawiono w tabeli 6. i na rysunku 2. Rozkład ten okazał się wysoko istotny statystycznie i wskazuje na zdecydowane różnice pomiędzy przodkiem owiec, jakim jest muflon, a pozostałymi grupami rasowymi. Tylko u muflona stwierdzono podobną częstotliwość występowania allelu C i T. U pozostałych grup występuje zdecydowana dominacja w częstotliwości występowania allelu T nad C, który tylko u wrzosówki przekroczył poziom 20%. Rozkład genotypów (wysoko istotny statystycznie) potwierdza przedstawioną tezę (tab. 7). Równomierny rozkład genotypów homozygotycznych z przewagą heterozygotycznego stwierdzono jedynie u muflona europejskiego. Homozygoty CC znaleziono jeszcze u wrzosówki i w śladowych ilościach u polskiej owcy

górskiej odmiany białej. W pozostałych grupach przeważały zwierzęta o genotypie TT, w niewielkim stopniu występowały również osobniki heterozygotyczne. Potwierdza to stwierdzenie, że również w odniesieniu do genu kazeiny procesy domestykacyjne wpłynęły na zmianę częstotliwości występowania alleli, na rzecz podniesienia częstotliwości występowania allelu T.

Na podstawie przeprowadzonych prac badawczych wykazano duże zróżnicowanie genetyczne pomiędzy badanymi grupami zwierząt w zakresie genu białka prionowego i genu kazeiny  $\alpha$ -S1. W zakresie genu białka prionowego stwierdzono występowanie od 2 do 6 alleli (14 genotypów), których ilość wzrastała od 2 u muflona europejskiego do 6 u polskiej owcy górskiej odmiany barwnej i merynosa polskiego. Odnośnie do genu kazeiny  $\alpha$ -s1 stwierdzono występowanie zrównoważonej częstotliwości występowania alleli C i T u muflona europejskiego, co przekładało się na zrównoważony rozkład genotypów w przeciwieństwie do pozostałych

Tabela 6

Zestawienie alleli genu kazeiny  $\alpha$ -s1 (*CSN1S1*) ( $P \leq 0,01$ )

Wyszczególnienie		Allel		Ogółem
		C	T	
Muflon europejski	n	191	193	384
	%	49,7	50,3	100,0
Muflonowrzosówka	n	4	28	32
	%	12,5	87,5	100,0
Wrzosówka	n	344	1182	1526
	%	22,5	77,5	100,0
Świniarka	n	20	312	332
	%	6,0	94,0	100,0
Polska owca górska odmiana biała	n	49	269	318
	%	15,4	84,6	100,0
Polska owca górska odmiana barwna	n	35	335	370
	%	9,5	90,5	100,0
Merynos polski	n	41	601	642
	%	6,4	93,6	100,0
Ogółem	n	684	2920	3604
	%	19,0	81,0	100,0

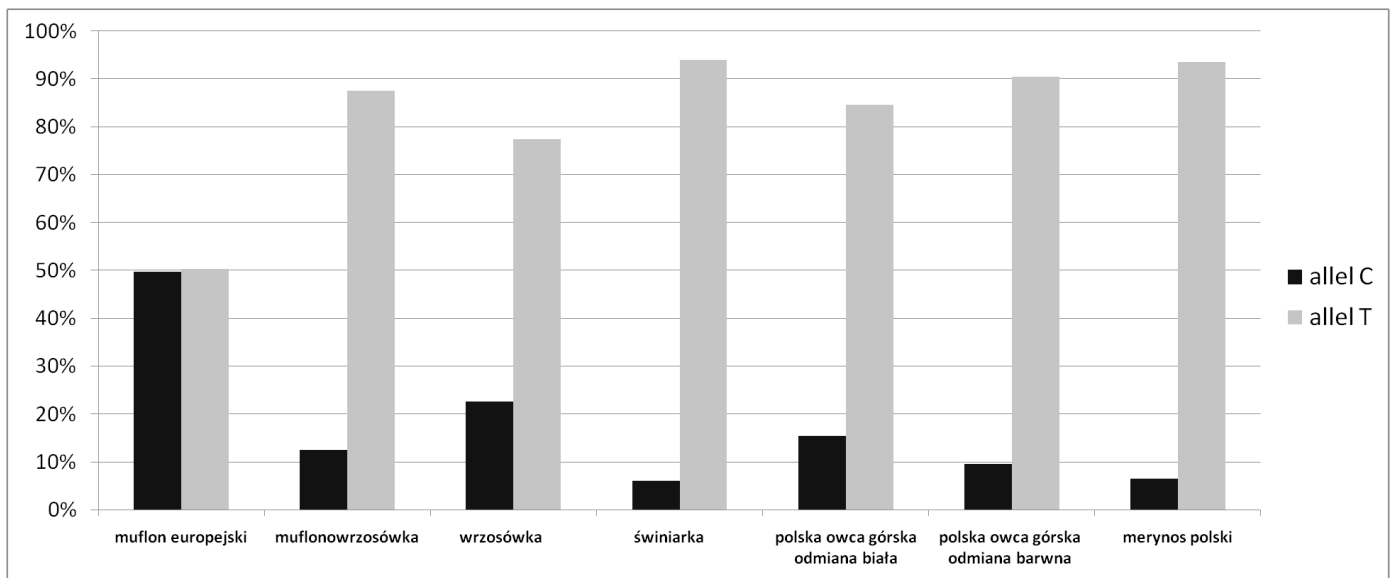
n – liczebność; % – procentowy udział allelu w badanej rasie

Tabela 7

Zestawienie genotypów genu kazeiny  $\alpha$ -s1 (*CSN1S1*) ( $P \leq 0,01$ )

Wyszczególnienie		Genotyp			Ogółem
		C:C	C:T	T:T	
Muflon europejski	n	55	81	56	192
	%	28,6	42,2	29,2	100,0
Muflonowrzosówka	n	0	4	12	16
	%	0,0	25,0	75,0	100,0
Wrzosówka	n	35	274	454	763
	%	4,6	35,9	59,5	100,0
Świniarka	n	0	20	146	166
	%	0,0	12,0	88,0	100,0
Polska owca górska odmiana biała	n	2	45	112	159
	%	1,3	28,3	70,4	100,0
Polska owca górska odmiana barwna	n	0	35	150	185
	%	0,0	18,9	81,1	100,0
Merynos polski	n	0	41	280	321
	%	0,0	12,8	87,2	100,0
Ogółem	n	92	500	1210	1802
	%	5,1	27,7	67,1	100,0

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

Rys. 2. Częstość występowania alleli kazeiny  $\alpha$ -s1 (*CSN1S1*) u badanych ras owiec ( $P \leq 0,01$ )

grup, u których allel T i genotyp TT zdecydowanie dominował w częstości występowania nad allelem C i genotypami CC i TC.

Przeprowadzone badania upoważniają do stwierdzenia, że procesy domestykacyjne wywarły wpływ na ilość i rozkład występowania alleli i genotypów w zakresie genu białka prionowego i genu kazeiny  $\alpha$ -s1. Wynik ten wskazuje na potrzebę przeprowadzenia dalszych badań z tego zakresu u owiec kulturalnych (np. w porównaniu do merynosa polskiego), charakteryzujących się bardziej wyspecjalizowaną użytkowością (np. mięsną, czy wełnisto-mięsną).

Ocena frekwencji genu czynnika insulinopodobnego 1 (*IGF1*) i genu kodującego brązowe umaszczenie (*TYRP1*) zostanie przedstawiona w drugiej części opracowania.

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

Literatura: 1. Ceriotti G., Chessa S., Bolla P., Budelli E., Bianchi L., Duranti E., Caroli A., 2004 – J. Dairy Sci. 87, 2606-2613. 2. Dybus A., 1999 – Prace i Mat. Zoot. 55, 31-39. 3. French D.J., Jones D., McDowell D.G., Thomson J.A., Debenham P.G., 2007 – BMC Infectious Diseases 7, 90-99. 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. Kipanyula M.J., Chuma I.S., Brundtland E., Bårdsen K., Ulvund M.J., 2008 – Small Rum. Res. 79, 146-151. 7. Liberski P., Bartosiewicz J., 1996 – Postępy Biochemii 42 (4), 320-330. 8. Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L., 2005 – J. General Virology 86, 231-235. 9. Niżnikowski R., Głowacz K., Strzelec E., Czub C., Ślęzak M., Świątek M., 2013 – Raport końcowy projektu międzynarodowego niewspółfinansowanego nr 625/N-WĘGRY/2009/0 pt. „Poprawa metod zachowania i rozwoju rodzimych ras owiec wytworzonych w efekcie udomowienia dzikich przodków”. 10. WE NR 727/2007 – Rozporządzenie Komisji z 26 czerwca 2007 r. zmieniające załączniki I, III, VII i X do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 ustanawiającego zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych gąbczastych encefalopatii.