

Wykorzystanie badań genetycznych w rekonstrukcji historii gatunku koń domowy

Natalia Pycińska, Jakub Cieślak

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt,
Pracownia Hodowli Koni

Piętnaście lat od ukazania się w czasopiśmie *Science* publikacji opisującej pełną sekwencję nukleotydową genomu konia (2009) można z całą stanowczością uznać, że był to istotny kamień milowy, który nie tylko pomógł poznać samą strukturę genomu, ale umożliwił stworzenie wielu nowych narzędzi badawczych. Narzędzia te pozwalają na opisywanie molekularnego podłoża zmienności ważnych cech (umaszczenia, choroby dziedziczne, predyspozycje sportowe itp.), a korzystanie z nich staje się nieodzownym elementem nowoczesnej hodowli koni. Okazuje się jednak, że dzięki stosunkowo dużej trwałości kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), wiele z technik molekularnych można zastosować również na materiale archiwalnym, w tym pochodzącym z wykopalisk, co pozwala naukowcom w sposób bardzo precyzyjny rekonstruować dzieje gatunku koń domowy (łac. *Equus caballus*) oraz jego interakcji z człowiekiem. Ostatnie lata przyniosły szereg interesujących odkryć z zakresu zooarcheologii, które m.in. rzuciły nowe światło na proces udomowienia koni. Najważniejsze z nich zostały przedstawione w niniejszym artykule.

W porównaniu do materiału pozyskanego z żywej komórki wyizolowanie dobrej jakości DNA z materiału kopalnego jest o wiele trudniejsze. Odpowiedzialne za taką rolę rzeczy są degradacyjne czynniki zewnętrzne, między innymi obecne w środowisku enzymy nukleolityczne oraz wspomagające rozkład mikroorganizmy glebowe [33]. Nie można pominąć również wpływu takich czynników jak temperatura, pH czy wilgotność danego środowiska, których oddziaływanie również może znacząco wpłynąć na trwałość materiału [32]. Oprócz czynników zewnętrznych znaczący wpływ na jakość pozyskanego DNA mają również procesy biochemiczne, które zachodzą pod wpływem czasu. Jednym z takich procesów jest rozrywanie wiązań N-glikozydowych łączących cukier (deoksyrybozę) z zasadą azotową, co w efekcie doprowadza do oderwania puryny lub pirymidyny. Reakcja ta w konsekwencji prowadzi do utraty ciągłości łańcucha DNA [10]. Pomimo powyższych trudności, istnieją na świecie zespoły na-

ukowe specjalizujące się w analizach DNA pochodzącego ze szczątków kopalnych. Zespoły te nieustannie pracują nad doskonaleniem laboratoryjnych i bioinformatycznych protokołów umożliwiających prowadzenie badań na często już w znacznym stopniu zdegradowanym materiale biologicznym [26].

Za swoisty początek badań nad DNA pochodzącym z materiału archiwalnego zwierząt należących do rodziny koniowatych uznaje się rok 1984, kiedy to zespół amerykańskich naukowców wyizolował i zsekwencjonował fragment genomu mitochondrialnego kwaggi (łac. *Equus quagga quagga*) – podgatunku zebry stepowej wymarłego około 100 lat wcześniej. Materiał biologiczny do badań wyekstrahowano z mięśnia muzealnego okazu kwaggi. Naukowcy stwierdzili, że analizowana sekwencja o długości 229 nukleotydów różni się w 12 miejscach w porównaniu do sekwencji mitochondrialnego DNA żyjącego współcześnie gatunku zebry górskiej (łac. *Equus zebra*). Liczba i lokalizacja różnic w sekwencji nukleotydowej pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że oba taksony miały wspólnego przodka, żyjącego około 3-4 milionów lat wcześniej. Wniosek ten był zgodny z dostępną wiedzą o ewolucji koniowatych pochodzącą z analiz zooarcheologicznych [14].

Nowe technologie stosowane w genetyce molekularnej są bardzo ważnym uzupełnieniem badań wykopaliskowych mających na celu określenie czasu i miejsca udomowienia koni. Do niedawna uważano, że najstarsze ślady udomowienia pochodzą z okresu około 3500 lat p.n.e. z regionu północnego Kazachstanu [2]. W okresie tym (epoka miedzi) wspomniane tereny zamieszkiwała tzw. ludność Botai (określenie to pochodzi od nazwy jednej z osad zlokalizowanych na tym obszarze). W roku 2009 na łamach czasopisma *Science* międzynarodowy zespół naukowców opisał wyniki badań wykopaliskowych dowodzących, że w osadzie Botai znajdowały się liczne zagrody, w których utrzymywano konie. Oprócz materiału biologicznego (głównie kości i zęby) odkryto tam również narzędzia służące do obróbki skór, a we fragmentach naczyń wydobytych z ziemi stwierdzono obecność pozostałości mleka kłaczki [24, 27]. Biometryczne pomiary kości śródreżca pochodzących z czterech różnych stanowisk archeologicznych (Botai, Tersek, Kumkeshu i Knet) wskazały, że konie z Botai miały delikatniejszy kościec niż dziko żyjące konie z tego samego okresu, a wykryte charakterystyczne uszkodzenia szkliwa zębów (prawdopodobnie na skutek wykorzystania wędzidla) pozwoliły na wysnucie hipotezy, że mogły one być użytkowane wierzchowo [5, 28].

Wiedza dotycząca udomowienia koni w Kazachstanie została w pewien sposób zaburzona w roku 2018, kiedy to opublikowano bardzo interesujące wyniki badań genetycznych. Porównano w nich sekwencję DNA koni pochodzących z Botai oraz innych koni z terenów żyjących w tamtym okresie w Eurazji, z opublikowanymi wcześniej genomami: konia Przewalskiego, dzikich

koni z okresu przed udomowieniem oraz współczesnych koni domowych. Na podstawie analizy głównych składowych (PCA) oraz wykreślonego drzewa filogenetycznego stwierdzono, że konie z Botai grupują się w jeden klaster z końmi Przewalskiego, natomiast pozostałe zwierzęta tworzą odrębną, monofiletyczną grupę oznaczoną symbolem *DOM2*. Przeprowadzono także dodatkowe badania, które potwierdziły bezpośrednie spokrewnienie koni z osady Botai z końmi oznaczonymi symbolem *Borly4*, które są uznawane za przodków koni Przewalskiego [13]. Wyniki te uznano za zaskakujące z kilku powodów. Po pierwsze do momentu ich opublikowania twierdzono, że konie Przewalskiego są ostatnimi dziko żyjącymi końmi [9]. Tymczasem okazało się, że są one de facto wtórnie zdziczałymi potomkami zwierząt już wcześniej udomowionych. Po drugie wyniki te wskazały, że skoro w rejonie Botai został udomowiony koń Przewalskiego (łac. *Equus przewalskii*), to miejsca i czasu udomowienia gatunku nazywanego dzisiaj przez nas koniem domowym (łac. *Equus caballus*) należy poszukiwać dalej.

Najstarsza próbka materiału biologicznego, z której udało się wyizolować DNA o sekwencji zbliżonej do tej obecnej u współczesnych koni, została znaleziona na Węgrzech i ma około 4100 lat. Wraz z innymi genomami koni z okresu sprzed 4000 lat, tworzy ona wspomnianą wyżej linię *DOM2*, której oddzielenie od linii *Borly4* nastąpiło prawdopodobnie między 35, a 55 tysiącleciem p.n.e. [25]. Warto podkreślić, że naukowcy nie wykluczają, iż udomowienie koni mogło nastąpić w kilku miejscach na świecie w podobnym czasie. Za jedno z prawdopodobnych miejsc równoległego udomowienia koni, uznaje się tereny Półwyspu Iberyjskiego, gdzie podczas prac archeologicznych odkryto malowidła naskalne, przedstawiające relacje między koniem a człowiekiem datowane na okres paleolitu [3]. Sekwencjonowanie materiału pozyskanego ze znalezionych w tamtym regionie szczątków koni, których wiek datuje się na 4000-4800 lat p.n.e., pozwoliło na wydzielenie osobnej linii oznaczanej w pracach naukowych symbolem *IBE*. Przyjmuje się, że linia ta, która nie przetrwała do dzisiejszych czasów, wyodrębniła się około 285 tysięcy lat temu, a jej wkład w dominującą w Eurazji linię *DOM2* był niewielki [11]. Oprócz wspomnianej linii iberyjskiej do dzisiejszych czasów nie przetrwała jeszcze jedna linia – *Equus lenensis* (16 000-43 000 lat p.n.e.). Pierwotnie występowała ona na terenie północnej oraz południowej Syberii i charakteryzowała się unikalnym haplotypem DNA [4]. Dzięki badaniom prowadzonym na materiale pochodzącym z wykopalisk wiemy, że przetrwała epokę holocenu, a po raz ostatni haplotyp ten opisano na bazie szczątków z terenów Jakucji, których wiek szacuje się na 5200 lat. Pomimo przeprowadzenia dużej ilości analiz DNA kopalnego pochodzącego ze szczątków prehistorycznych koni, naukowcom nie udało się w pełni wypełnić luki w historii udomowienia (okres od 44426 do 202 p.n.e.). Dlatego też postanowiono ponownie ze-

brać w jednym miejscu próby DNA pochodzące z różnych terenów tj. Iberia, Anatolia, Zachodnia Eurazja i Azja środkowa, a następnie przy pomocy metod laboratoryjnych i przekształceń bioinformatycznych usunąć uszkodzenia na matrycy DNA powstałe *post mortem*. Po ponownej analizie sekwencji wykreślono raz jeszcze drzewo filogenetyczne. Na jego podstawie wyodrębniono cztery grupy monofiletyczne [20]. Pierwszą z nich była wspomniana wyżej linia *Equus lenensis*, pochodząca z terenów Syberii. Kolejna skupiała w sobie materiał pochodzący z terenów Europy (Rumunia, Belgia, Francja, Wielka Brytania, Hiszpania, Węgry, Czechy i Polska), z okresu 6000-3000 lat p.n.e. Do trzeciej grupy należały konie z Botai oraz konie Przewalskiego (5000-3000 lat p.n.e.), natomiast ostatnią grupę *DOM2* reprezentowały haplotypy najbardziej zbliżone do współcześnie występujących koni. Przyjmuje się, że osobniki z grupy *DOM2* żyły na stepach zachodniej Eurazji, na ograniczonym terenie – na zachodzie do dolnego Dunaju, a na południu do Karpat (3000 lat p.n.e.). W populacji żyjącej w regionie dolnego brzegu Wołgi i Donu po raz pierwszy dominowała linia genetyczna *DOM2*, co sugeruje, że właśnie ten teren należy uznać za prawdopodobne miejsce udomowienia współczesnych koni. Gwałtowną ekspansję haplotypu *DOM2* datuje się na około 2200-2000 p.n.e. – początkowo w Czechach, nad dolnym Dunajem i w środkowej Anatolii. Następnie linia ta objęła cały region euroazjatycki i wyparła całkowicie lokalną populację koni z innych linii genetycznych. Przytaczane badania pozwoliły również odpowiedzieć na zadawane od lat przez naukowców pytania o pochodzenie tarpana (*Equus gmelini*). Na ich podstawie stwierdzono bowiem, że tarpan był najprawdopodobniej zdziczałą krzyżówką lokalnych koni europejskich z osobnikami linii *DOM2* i nie powinno się go traktować jako dzikiego przodka konia domowego [20].

Innym ciekawym zagadnieniem nurtującym naukowców, było zróżnicowanie umaszczeń koni na przestrzeni wieków. Znajomość wariantów genetycznych odpowiadających za zmienność umaszczeń pozwala na ich precyzyjne genotypowanie – zarówno u współcześnie żyjących koni, jak i w DNA pochodzącym z wykopalisk. Badania genetyczne przeprowadzone na materiale archiwalnym ujawniły, że w naturze konie nie były tak „kolorowe”, jak dzisiaj, a obserwowana obecnie ogromna zmienność umaszczeń jest wynikiem selekcji prowadzonej przez człowieka od czasów udomowienia [21]. Jak w takim razie jak wyglądały konie przed udomowieniem? By odpowiedzieć na to pytanie, wykorzystano szczątki dziko żyjących koni, pochodzące z okresu plejstocenu i holocenu z terenów Europy, Syberii oraz Półwyspu Iberyjskiego i na ich podstawie wysnuć to interesujące wnioski. Stwierdzono, że najstarsze z badanych koni z okresu przed udomowieniem były gniade lub bułane (ostatecznie potwierdzono to w roku 2016, kiedy to opisano mutację w genie *TBX3* odpowiadającą za rozjaśnienie bułane) [15, 23]. Kolejnym typem

umaszczenia, który pojawił się jeszcze przed udomowieniem gatunku była maść kara. Szczątki zwierząt z okresu 7000-6000 lat p.n.e. wskazują, że konie wschodnioeuropejskie w 76% posiadały umaszczenie gniade, a w 24% umaszczenie kare. Jednak w okresie plejstocenu maść kara nie była obecna w populacjach koni z terenów zarówno Syberii, jak i Europy Wschodniej i Środkowej, a wzrost częstości jej występowania zanotowany został dopiero w okresie holocenu. Domniemywa się, że był to efekt migracji polodowcowej lub skutek naturalnej selekcji związanej ze zmieniającym się środowiskiem np. pojawieniem się większej ilości lasów. Maść kasztanowata zaliczana do maści podstawowych po raz pierwszy opisana została na podstawie szczątków pochodzących z Syberii. Opisała ją również u koni rumuńskich, pochodzących z siódmego tysiąclecia p.n.e. [23], ale jej największe rozpowszechnienie datuje się na epokę brązu (po udomowieniu koni). Sukcesywnie z biegiem lat zaczęły pojawiać się nowe mutacje powodujące rozjaśnianie maści oraz tzw. wzory białej sierści. Przykładowo, warianty związane z maścią srokatą typu sabino i tobiano występowały powszechnie już w epoce żelaza. Jednak ich liczebność wyraźnie spadła w średniowieczu, gdzie większą popularnością cieszyły się konie o maści jednolitej [34].

Oprócz materiału DNA pochodzącego z jądra komórkowego, interesującym obiektem badań jest DNA mitochondrialny (mtDNA). Genom mitochondrialny dziedziczony jest wyłącznie po matce, dlatego analiza jego sekwencji jest użytecznym narzędziem w badaniach filogenetycznych linii żeńskich. W roku 2010 opublikowano wyniki oparte na sekwencjonowaniu mtDNA pochodzącego z 85 starożytnych próbek z różnych regionów Europy i Azji. Na podstawie analizy sekwencji regionu kontrolnego (pętli D) stwierdzono obecność aż 87 różnych haplotypów. U współcześnie występujących koni odnotowano segregację jedynie 38 z nich, co doprowadziło do wniosku, że na przestrzeni wieków różnorodność genetyczna w liniach żeńskich spadła o 55%. Naukowcy są zgodni co do stwierdzenia, że stosunkowo wysokie zróżnicowanie haplotypów mtDNA obserwowane w materiale kopalnym jest efektem udomowienia wielu klaczy posiadających odmienne haplotypy. Nie jest więc ono skutkiem pracy hodowlanej prowadzonej przez człowieka [7, 16]. W badaniach opublikowanych dwa lata później przeanalizowano 83 genomy mitochondrialne segregujące we współczesnych rasach koni. Analizy pozwoliły sklasyfikować podobne do siebie haplotypy do 18 haplogrup oznaczanych literami alfabetu: od A do R. W kolejnych badaniach stwierdzono, że kontynentem charakteryzującym się największą zmiennością sekwencji genomu mitochondrialnego jest Azja, na której terenie najczęściej spotykanymi haplogrupami są: G, Q i A. Warto zauważyć, że te same haplogrupy występują z o wiele niższą częstością na terenach Bliskiego Wschodu i Europy, gdzie dominuje haplogrupa L [1]. Należy nadmienić, że analizy mito-

chondrialnego DNA pozwalają na ocenę rzeczywistej żeńskiej różnorodności genetycznej, co jest szczególnie ważne w przypadku ras objętych programami ochrony (np. konik polski, koń huculski) oraz takich, u których kultywuje się tradycyjną klasyfikację koni do poszczególnych linii żeńskich i rodów męskich (np. konie arabskie). Bardzo często analizy te pozwalają na skonfrontowanie zapisów rodowodowych z historią zapisaną w materiale genetycznym. Przykładowo, w badaniach Cieślak i wsp. opublikowanych w roku 2017 stwierdzono, że w populacji koników polskich segreguje 19 haplotypów mtDNA, które można zaklasyfikować do 10 znanych haplogrup (A, B, E, G, J, M, N, P, Q i R) [6]. Natomiast w badaniach naukowców z Texas A&M University nad populacją koni arabskich udało się wyodrębnić 14 różnych haplogrup (A, B, C, D, E, G, I, J, L, M, N, P, Q i R) [18]. Obydwa przytoczone artykuły wskazały na istnienie znacznych rozbieżności pomiędzy informacją rodowodową i danymi wynikającymi z analiz molekularnych. Świadczy to o istnieniu wielu błędnych zapisów rodowodowych, które pojawiły się w bliższej bądź dalszej przeszłości i często powielane są do dzisiaj.

Biorąc pod uwagę fakt, że chromosom Y dziedziczony jest wyłącznie od strony ojcowskiej, postanowiono przy pomocy analizy jego sekwencji nukleotydowej prześledzić kształtowanie się rodów męskich u koni. W 2011 roku naukowcy bazujący na dziesięciu starożytnych próbkach z różnych części świata i różnych okresów historycznych wykazali, że przed udomowieniem zróżnicowanie sekwencji chromosomu Y było znacząco większe, a przyczyną jego obniżenia była prawdopodobnie niewielka liczba udomowionych ogierów [22, 31]. Wykorzystanie wysokoprzepustowego sekwencjonowania chromosomu Y umożliwiło zidentyfikowanie sześciu głównych haplotypów charakterystycznych dla współczesnych koni domowych. Haplotyp występujący z największą częstotliwością to *HT1*, uważany za tzw. haplotyp przodków. Pozostałe haplotypy są jego kopiami, w których to doszło do licznych mutacji oraz konwersji genów. U koni ras europejskich największy udział przypada haplotypom *HT2* oraz *HT3*. Stwierdzono, że prawdopodobnym „protoplastą” haplotypu *HT3* był ogier pełnej krwi angielskiej *Eclipse* lub któryś z jego potomków [30]. Ogiery pełnej krwi w XIX wieku cieszyły się dużą popularnością, co skutkowało powszechnym wykorzystaniem ich do doskonalenia innych ras. Przypuszcza się, że właśnie ten okres znacząco wpłynął na zmniejszenie się męskiej różnorodności genetycznej, gdyż haplotypy obecne u ogierów pełnej krwi stopniowo wypierały pozostałe haplotypy występujące w populacji. Warto podkreślić, że nie była to jedyna taka fala „udoskonalenia” ras, którą zanotowano w ostatnich 300 latach [19]. Wyróżnić można przynajmniej jeszcze dwie: „falę neapolitańską”, gdzie zaobserwowano znaczący napływ ogierów iberyjskich (XV-XVIII wiek) oraz „falę orientálną” (koniec XVIII wieku), w której głównym mate-

riałem reprodukcyjnym były ogiery arabskie i należące do innych ras orientalnych.

Szczegółowe badania sekwencji chromosomu Y z wykorzystaniem najnowszych technik molekularnych pozwoliły stworzyć drzewo filogenetyczne, na którym szczególnie dobrze widoczne jest oddzielenie gałęzi *N* (reprezentowanej przez kuca szetlandzkiego i konia norweskiego) oraz *I* (koń islandzki) od gałęzi grupujących pozostałe rasy koni północnoeuropejskich. Blisko spokrewnioną z gałęzią *I*, okazała się grupa sekwencji zwana koroną (ang. *Crown*), w której to można wyróżnić kilka podgałęzi (*A*, *L*, *S* i *T*). Podgałąź *A* reprezentowana była przez konie arabskie, trakeńskie oraz kuce Connemara, a gałęzie *L* i *S* skupiały ogiery iberyjskie oraz lipicańskie. Do podgrupy *T* należały konie o potwierdzonym pochodzeniu od pełnej krwi angielskiej [29]. Badania te w sposób niepodważalny uwidoczniły silny wpływ ogierów orientalnych na obserwowaną obecnie różnorodność ras. W kolejnych latach z powodzeniem zwiększono region poszukiwań polimorficznych markerów genetycznych na chromosomie Y oraz rozszerzono grupę badawczą o kolejne rasy koni z gałęzi *Crown* [34]. Na podstawie tych badań wyróżniono 76 haplotypów, z których 71 należało do gatunku koń domowy, a pozostałe 5 segregowało u koni Przewalskiego [12]. Uzyskane wyniki spowodowały dezorganizację wcześniej ustalonego porządku w grupie „Crown”. Oprócz wcześniej opisanych haplogrup *A* i *T* zidentyfikowano nową haplogrupę *HG H*, w której skład weszły między innymi podgrupy *S* – konie rasy Sorraia, *L* – konie lipicańskie, *Hs* – konie berberyjskie oraz *C* – konie chińskiej rasy Chakoyi. Analiza historii ras wchodzących w skład haplogrupy *Hs*, pozwala pokusić się o stwierdzenie, że konie te zostały sprowadzone do Europy przez introdukcję koni północnoafrykańskich [17]. Jednak najliczniejsza okazała się haplogrupa *HG Tb*, do której przypisano największą liczbę próbek pochodzących od koni pełnej krwi angielskiej, kłusaków amerykańskich, American Quarter Horse, Franches-Montagnes oraz ogierów lipicańskich i achał-tekińskich. Oprócz wyżej wymienionych podgałęzi, do kładu *Tb* zaliczamy również: *Tb-oB3a*, *Tb-oB2a* oraz *Tb-oL*, kumulujące w sobie takie rasy jak: koń achał-tekiński, koń Morgan, czy koń lipicański, co może sugerować, że wywodzą się one ze wspólnego pnia [12].

Opublikowana w roku 2020 praca międzynarodowego zespołu naukowców rzuciła nowe światło na historię koni czystej krwi arabskiej oraz ich związek z końmi pełnej krwi. Opublikowane wyniki pozwoliły między innymi obalić długoletni mit o pochodzeniu folblutów od założycieli reprezentujących rasę arabską. Okazuje się, że tzw. ojcowie założyciele, czyli ogiery: *Darley Arabian*, *Godolphin Arabian* i *Byerley Turk* reprezentowali rasy orientalne, ale z pewnością nie były to konie arabskie czystej krwi. Ponadto, wyniki dotyczące analizy haplotypów segregujących w chromosomie Y dostarczyły niezbitych dowodów na nieodległe w czasie krzyżowanie koni arabskich (z linii rywalizujących w goni-

twach płaskich) z końmi pełnej krwi angielskiej, prawdopodobnie celem poprawy prędkości w galopie. Najbardziej przekonującym dowodem świadczącym o takiej „domieszce” była obecność w sekwencji nukleotydowej niektórych koni arabskich haplotypu *Tb-dW1* (znanego również jako *Whalebone*), który powstał w wyniku mutacji około roku 1800 i jest charakterystyczny dla folblutów. Wynik ten odbił się szerokim echem w mediach branżowych, gdyż zgodnie z wymogami księgi stadnej, krzyżowanie koni arabskich jest całkowicie zabronione [8].

Podsumowując, wiedza na temat historii gatunku koń domowy nieustannie ewoluuje. Przytoczone przykłady przekonują, że zastosowanie nowych technik molekularnych na materiale archiwalnym – zarówno tym pochodzącym z wykopalisk, jak i bardziej współczesnym, może w sposób istotny wspomóc poszukiwanie odpowiedzi na wiele pytań dotyczących dziejów koni i ich interakcji z ludźmi na przestrzeni wieków.

Literatura: 1. Achilli A., Olivieri A., Soares P., Lancioni H., Kashani B.H., Perego U.A., Nergadzeb S.G., Carossa V., Santagostino M., Capomaccio S., Felicetti M., Al-Achkar W., Penedo M.C.T., Verini-Supplizi A., Houshmandh M., Woodwardd S.R., Semino O., Silvestrelli M., Giullottob E., Pereira L., Bandelt H.-J., Torroni A., 2012 – Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(7): 2449-2454. 2. Anthony D.W., 2010 – In *The Horse, the Wheel, and Language*. Princeton University Press. 3. Bicho N., Carvalho A. F., González-Sainz C., Sanchidrián J.L., Villaverde V., Straus L.G., 2007 – The upper Paleolithic rock art of Iberia. *Journal of Archaeological Method and Theory* 14(1): 81-151. 4. Boeskorov G.G., Potapova O.R., Protopopov A.V., Plotnikov V.V., Masheden E.N., Shchelchkova M.V., Petrova E.A., Kowalczyk R., van der Plicht J., Tikhonov A.N., 2018 – A study of a frozen mummy of a wild horse from the Holocene of Yakutia, East Siberia, Russia. *Mammal Research* 63(3): 307-314. 5. Brown D., Anthony D., 1998 – Bit wear, horseback riding and the Botai site in Kazakstan. *Journal of Archaeological Science* 25(4): 331-347. 6. Cieślak J., Wodas Ł., Borowska A., Cothran E.G., Khanshour, A. M., Mackowski M., 2007 – Characterization of the Polish Primitive Horse (Konik) maternal lines using mitochondrial D-loop sequence variation. *PeerJ* 5, e3714. 7. Cieslak M., Pruvost M., Benecke N., Hofreiter M., Morales A., Reissmann M., Ludwig A., 2010 – Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLoS One* 5(12): e15311. 8. Cosgrove, E.J., Sadeghi, R., Schlamp, F., Holl H.M., Moradi-Shahrbabak M., Miraei-Ashtiani S.R., Abdalla S., Shykind B., Troedsson M., Stefaniuk-Szmukier M., Prabhu A., Bucca S., Bugno-Poniewierska M., Wallner B., Malek J., Miller D.C., Clark A.G., Antczak D.F., Brooks S.A., 2020 – Genome Diversity and the Origin of the Arabian Horse. *Scientific Reports* 10(1): 9702. 9. Der Sarkissian C., Ermini L., Schubert M., Yang M.A., Librado P., Fumagalli M., Jónsson H., Bar-Gal G.K., Albrechtsen A., Vieira F.G., Petersen B., Ginolhac A., Seguin-Orlando A., Magnussen K., Fages A., Gamba C., Lorente-Galdos B., Polani S., Steiner C., Neuditschko M., Jagannathan V., Feh C., Greenblatt C.L., Ludwig A., Natalia I. Abramson, Zimmermann W., Schafberg R., Tikhonov A., Sicheritz-Ponten T., Willerslev E., Marques-Bonet T.,

- Ryder O.A., McCue M., Rieder S., Leeb T., Slatkin M., Orlando L., 2015 – Evolutionary genomics and conservation of the endangered Przewalski's horse. *Current Biology* 25(19): 2577-2583. 10. Dylewska M., Listos P., Dudzińska E., Gryzińska M., 2016 – Wykorzystanie badań DNA w archeozoologii. *Życie Weterynaryjne* 91(12): 904-908. 11. Fages A., Hanghøj K., Khan N., Gaunitz C., Seguin-Orlando A., Leonardi M., McCrory C., Gamba C.C., Al-Rasheid K., Albizuri S., Alfarhan A., Allentoft M., Alquraishi S., Anthony D., Baimukhanov N., Barrett J., Bayarsaikhan J., Benecke N., Bernáldez-Sánchez E., Berrocal-Rangel L., Biglari F., Boessenkool S., Boldgiv B., Brem G., Brown D., Burger J., Crubézy É., Daugnera L., Davoudi H., de Barros Damgaard P., de los Ángeles de Chorro y de Villa-Ceballos M., Deschler-Erb S., Detry C., Dill N., do Mar Oom M., Dohr A., Ellingvåg S., Erdenebaatar D., Fathi H., Felkel S., Fernández-Rodríguez C., García-Viñas E., Germonpré M., Grando J., Hallsson J., Hemmer H., Hofreiter M., Kasparov A., Khasanov M., Khazaeli R., Kosintsev P., Kristiansen K., Kubatbek T., Kuderna L.F.K., Kuznetsov P., Laleh H., Leonard J., Lhuillier J., Liesau von Lettow-Vorbeck C., Logvin A., Lõugas L., Ludwig A., Luís C., Arruda A.M., Marquès-Bonet T., Matoso Silva R., Merz V., Mijiddorj E., Miller B.K., Monchalov O., Mohaseb F.A., Morales A., Nieto-Espinet A., Nistelberger H., Onar V., Pálsdóttir A., Pitulko V., Pitskhelauri K., Pruvost M., Rajić Šikanjić P., Rapan Papeša A., Roslyakova N., Sardari A., Sauer E., Schafberg R., Scheu A., Schibler J., Schlumbaum A., Serrand N., Serres-Armero A., B. Shapiro, Seno S.S., Shevnina I., Shidrang S., Southon J., Star B., Sykes N., Taheri K., Taylor W., Teegen W.-R., Trbojević Vukičević T., Trixl S., Tumen D., Undrakhbold S., Usmanova E., Vahdati A., Valenzuela-Lamas S., Viegas C., Wallner B., Weinstock J., Zaibert V., Clavel B., Lepetz S., Mashkour M., Helgason A., Stefánsson K., Barrey E., Willerslev E., Outram A., Librado P., Orlando L., 2019 – Tracking five millennia of horse management with extensive ancient genome time series *Cell* 177(6): 1419-1435. 12. Felkel S., Vogl C., Rigler D., Dobretsberger V., Chowdhary B.P., Distl O., Fries R., Jagannathan V., Janečka J.E., Leeb T., Lindgren G., McCue M., Metzger J., Neuditschko M., Rattei T., Raudsepp T., Rieder S., Rubin C.-J., Schaefer R., Schlötterer C., Thaller G., Tetens J., Velie B., Brem G., Wallner B., 2019 – The horse Y chromosome as an informative marker for tracing sire lines. *Scientific Reports* 9(1): 1-12. 13. Gaunitz C., Fages A., Hanghøj K., Albrechtsen A., Khan N., Schubert M., Seguin-Orlando A., Owens I.J., Felkel S., Bignon-Lau O., de Barros Damgaard P., Mittnik A., Mohaseb A.F., Davoudi H., Alquraishi S., Alfarhan A.H., Al-Rasheid K.A.S. Crubézy E., Benecke N., Olsen S., Brown D., Anthony D., Masy K., Pitulko V., Kasparov A., Brem G., Hofreiter M., Mukhtarova G., Baimukhanov N., Lõugas L., Onar V., Stockhammer P.W., Krause J., Boldgiv B., Undrakhbold S., Erdenebaatar D., Lepetz S., Mashkour M., Ludwig A., Wallner B., Merz V., Merz I., Zaibert V., Willerslev E., Librado P., Outram A.K. Orlando L., 2018 – Ancient genomes revisit the ancestry of domestic and Przewalski's horses. *Science*, 360(6384): 111-114. 14. Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O.A., Wilson A.C., 1984 – DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312, 282-284. 15. Imsland F., McGowan K., Rubin C.J., Henegar C., Sundström E., Berglund J., Schwachow D., Gustafson U., Imsland P., Lindblad-Toh K., Lindgren G., Mikko S., Millon L., Wade C., Schubert M., Orlando L., Penedo M.C.T., Barsh G.S., Andersson L., 2016 – Regulatory mutations in TBX3 disrupt asymmetric hair pigmentation that underlies Dun camouflage color in horses. *Nature Genetics* 48(2): 152-158. 16. Jansen, T., Forster, P., Levine, M.A., Oelke, H., Hurles M., Renfrew C., Weber J., Olek K., 2002 – Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(16): 10905-10910. 17. Kelekna P., 2009 – The Horse in Human History. Cambridge University Press. 18. Khanshour A.M., Cothran E.G., 2013 – Maternal phylogenetic relationships and genetic variation among Arabian horse populations using whole mitochondrial DNA D-loop sequencing; *BMC Genetics* 14, 83. 19. Librado P., Fages A., Gaunitz C., Leonardi M., Wagner S., Khan N., Hanghøj K., Alquraishi S.A., Alfarhan A.H., Al-Rasheid K.A., Sarkisian C.D., Schubert M., Orlando L., 2016 – The Evolutionary Origin and Genetic Makeup of Domestic Horses. *Genetics* 204(2): 423-434. 20. Librado P., Khan N., Fages A., Kusliy M. A., Suchan T., Tonasso-Calvière L., Schiavinato S., Alioğlu N.D., Fromentier A., Perdereau A., Aury J.-M., Gaunitz C., Chauvey L., Seguin-Orlando A., Der Sarkisian C., Southon J., Shapiro B., Tishkin A., Kovalev A., Alquraishi S., Alfarhan A.H., Al-Rasheid K.A.S., Seregély T., Klassen L., Iversen R., Bignon-Lau O., Bodu P., Olive M., Castel J.-C., Boudadi-Maligne M., Alvarez N., Germonpré M., Moskal-del Hoyo M., Wilczyński J., Pośpuła S., Lasota-Kuś A., Tunia K., Nowak M., Rannamäe E., Saarma U., Boeskorov G., Lõugas L., Kyselý R., Peske L., Balasescu A., Dumitraşcu V., Dobrescu R., Gerber D., Kiss V., Szécsényi-Nagy A., Mende B.G., Gallina Z., Somogyi K., Kulcsár G., Gal E., Bendrey R., Allentoft M.E., Sirb G., Dergachev V., Shephard H., Noémie T., Grouard S., Kasparov A., Basilyan A.E., Anisimov M.A., Nikolskiy P., Pavlova E.Y., Pitulko V., Brem G., Wallner B., Schwall C., Keller M., Kitagawa K., Bessudnov A.N., Bessudnov A.A., Taylor W., Magail J., Jamiyan-Ombo G., Jamsranjav B., Erdenebaatar D., Tabaldiev K., Mijiddorj E., Boldgiv B., Tsagaan T., Pruvost M., Olsen S., Makarewicz C.A., Valenzuela-Lamas S., Albizuri S., Nieto Espinet A., Iborra M.P., Garrido J.L., González E.R., Pérez S.C., Olària C.R., Arsuaga J.L., Kotova N., Pryor A., Crabtree P.J., Zhumatayev R., Toleubaev A., Morgunova N., Kuznetsova T., Lordkipanize D., Marzullo M., Prato O., Bagnasco Gianni G., Tecchiati U., Clavel B., Lepetz S., Davoudi H., Mashkour M., Berezina N., Stockhammer P.W., Krause J., Haak W., Morales-Muñiz A., Benecke N., Hofreiter M., Ludwig A., Graphodatsky A.S., Peters J., Kiryushin K.Y., Iderkhangai T.-O., Bokovenko N.A., Vasiliev S.K., Seregin N.N., Chugunov K.V., Plasteeva N., Baryshnikov G., Petrova E.A., Sablin M., Ananyevskaya E., Logvin A., Shevnina I., Logvin V., Kalieva S., Loman V., Kukushkin I., Merz I., Merz V., Sakenov S., Varfolomeyev V., Usmanova E., Zaibert V., Arbuckle B.S., Belinskiy A.B., Kalmykov A., Reinhold S., Hansen S., Yudin A., Vybornov A.A., Epimakhov A., Berezina N.S., Roslyakova N., Kosintsev P.A., Kuznetsov P.F., Anthony D., Kroonen G.J., Kristiansen K., Wincker P., Outram A., Orlando L., 2021 – The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature* 598(7882): 634-640. 21. Linderholm A., Larson G., 2013 – The role of humans in facilitating and sustaining coat color variation in domestic animals. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 24, 6-7. Academic Press. 22. Lippold S., Knapp M., Kuznetsova T., Leonard J.A., Benecke N., Ludwig A., Rasmussen M., Cooper A., Weinstock J., Willerslev E., Shapiro B., Hofreiter M., 2011 – Discovery of lost diversity of paternal horse lineages using ancient DNA. *Natu-*

re Communications 2(1): 1-6. **23. Ludwig A., Pruvost M., Reissmann M., Benecke N., Brockmann G.A., Castaños P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L., Malaspinas A., Slatkin M., Hofreiter M.**, 2009 – Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science* 324(5926): 485-485. **24. Olsen S. L., Grant S., Choyke A.M., Bartosiewicz L.**, 2006 – Horses and humans: the evolution of human-equine relationships. Oxford, UK: Archaeopress. **25. Orlando L.**, 2020 – Ancient genomes reveal unexpected horse domestication and management dynamics. *BioEssays*, 42(1): 1900164. **26. Orlando L., Allaby R., Skoglund P., Der Sarkissian C., Stockhammer P.W., Avila-Arcos M.C., Fu Q., Krause J., Willerslev E., Stone A.C., Warinner C.**, 2021 – Ancient DNA analysis. *Nat Rev Methods Primers* 1, 14. **27. Outram A., Stear N.A., Bendrey R., Olsen S.L., Kasparov A., Zaibert V., Thorpe N., Evershed R.**, 2009 – The earliest horse harnessing and milking. *Science* 323(5919): 1332-1335. **28. Taylor W.T.T., Bayarsaikhan J., Tuvshinjargal T., Bender S., Tromp M., Clark J., Bryce Lowry K., Houle J-L., Staszewski D., Whitworth J., Fitzhugh W., Boivin N.**, 2018 – Origins of equine dentistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(29): E6707-E6715. **29. Wallner B., Palmieri N., Vogl C., Rigler D., Bozlak E., Druml T., Jagannathan V., Leeb T., Fries R., Tetens J., Thaller G., Metzger**

J., Distl O., Lindgren G., Rubin C.-J., Andersson L., Schaefer R., McCue M., Neuditschko M., Rieder S., Schlötterer C., Brem G., 2017 – Y chromosome uncovers the recent oriental origin of modern stallions. *Current Biology* 27(13): 2029-2035. **30. Wallner B., Vogl C., Shukla P., Burgstaller J.P., Druml T., Brem G.**, 2013 – Identification of genetic variation on the horse Y chromosome and the tracing of male founder lineages in modern breeds. *PLoS One* 8(4): e60015. **31. Warmuth V., Eriksson A., Bower M.A., Barker G., Barrett E., Hanks B., Li S., Lomitashvili D. Ochir-Goryaeva M., Sizonov G.V., Soenov V., Manica A.**, 2012 – Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(21): 8202-8206. **32. Wasiak T., Strózik T.**, 2021 – Badania kopalnego DNA – możliwości i ograniczenia. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 75.1: 599-610. **33. Witas H.K.**, 2007 – Kopalny DNA źródłem informacji w badaniach archeologicznych. *Archeologia Polski* 52.1-2: 15-33. **34. Wutke S., Benecke N., Sandoval-Castellanos E., Döhle H.J., Friederich S., Gonzalez J., Hallsson J.H., Hofreiter M., Lõugas L., Magnell O., Morales-Muniz A., Orlando L., Pálsdóttir A.H., Reissmann M., Ruttkay M., Trinks A., Ludwig A.**, 2016 – Spotted phenotypes in horses lost attractiveness in the Middle Ages. *Scientific Reports* 6:38548.

Zmiany zawartości witaminy D w mleku owiec wypasanych na terenach górskich

**Edyta Molik, Ewelina Żelazik,
Krystyna Stękała, Zuzanna Flis**

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
Katedra Żywnienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa

Wstęp

Jednym z najbardziej wartościowych produktów pozyskiwanych metodami tradycyjnymi jest mleko owcze. Zmiany zawartości składu chemicznego mleka owczego zależą m.in. od stadium laktacji, wieku, rasy, żywienia oraz środowiska [3]. Podstawowymi składnikami mleka owczego są: tłuszcz, białko, laktoza, sucha masa beztłuszczowa. W Polsce rasą użytkowaną mlecznie na terenach górskich jest najczęściej polska owca górską oraz cakiel podhalański. Skład chemiczny mleka wraz z upływem laktacji ulega zmianom, w końcowym okresie laktacji zawartość tłuszczu może wynosić nawet 10,81%, laktozy 6,41%, a białka 8,44% oraz su-

chej masy beztłuszczowej 11,71% [9]. Ważnymi składnikami prozdrowotnymi mleka owczego są antyoksydanty oraz witaminy np. witamina D [1, 16, 17]. Średnia zawartość witaminy D w mleku owczym wynosi około 0,18 µg/100 g, czyli około trzy razy więcej w porównaniu z mlekiem krowim (0,08 µg/100 g) oraz mlekiem kozim (0,06 µg/100 g) [23].

Zarówno niedobór, jak i nadmiar witaminy D może być bardzo szkodliwy dla organizmu. W sezonie letnim, kiedy mamy znacznie większy dostęp do tej cennej witaminy nie jest konieczne, aby tak zwracać uwagę na jej zawartość w diecie. W sezonie jesienno-zimowym, mamy do czynienia z mniejszą ilością światła słonecznego, dlatego warto zadbać, aby witamina D pojawiła się w naszej diecie poprzez spożywanie produktów pozyskiwanych z mleka owczego. Witamina D odpowiada m.in. za prawidłową mineralizację kości; bierze udział w harmonizowaniu funkcji wewnątrzwydzielniczych trzustki, nadnerczy, tarczycy oraz przysadki [6]. Hamuje namnażanie się komórek nowotworowych, w tym czerniaka, raka piersi, prostaty, jelita grubego oraz okrężnicy. Do jej funkcji należy również przyspieszenie różnicowania oraz spowalnianie apoptozy keratynocytów, fibroblastów i melanocytów skóry. Wspomaga układ immunologiczny, funkcjonowanie układu krążenia oraz nerwowego [8, 11, 13, 14, 15, 21, 25]. Proces przekształcania witaminy D do 25-hydroksywitaminy D odbywa się w wątrobie, jej metabolizm następuje w wielu komórkach oraz narządach do 1,25-hydroksywitaminy D₃ (1,25(OH)₂D₃), która w połączeniu z jądrowym receptorem witaminy D, uczestniczy w transkrypcji genów prawidłowych i nieprawidłowych. Niewystarczają-