

Polimorfizm genu kodującego brązowe umaszczenie *TYRP-1* w pozycji 215 u krajowych owiec wełnisto-mięsnych i mięsnych

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

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Zakład Hodowli Owiec i Kóz,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Badania przeprowadzono w latach 2009-2013 w stadach owiec wełnisto-mięsnych ras: merynos polski (3 stada z woj. wielkopolskiego, 8 stad z woj. kujawsko-pomorskiego), merynos polski starego typu (1 stado z woj. wielkopolskiego, 5 stad z woj. mazowieckiego, 8 stad z woj. kujawsko-pomorskiego), corriedale (2 stada z woj. podlaskiego), owce żelaźnieńskiej (2 stada z woj. podlaskiego i 1 stado z woj. łódzkiego) oraz stadach owiec mięsnych ras: berri-chonne du cher (1 stado z woj. wielkopolskiego), suffolk (2 stada z woj. wielkopolskiego) i charolaise (2 stada z woj. wielkopolskiego). Ocenie poddano owce w wieku od 2 do 11 lat, łącznie 1732 osobniki (1359 ♀ i 373 ♂). Wszystkie zwierzęta poddane były identyfikacji genotypu pod względem brązowego umaszczenia *TYRP-1*, w zakresie oceny występowania alleli C i T. Podsumowując stwierdzono, że rozkład alleli i genotypów *locus* kodującego brązowe umaszczenie wyraźnie odróżnia owce o innym umaszczeniu głowy i nóg od pozostałych ras owiec mięsnych i wełnisto-mięsnych umaszczonych białą lub jasnokremową. Każda z ras owiec wykazała natomiast specyficzny rozkład alleli i genotypów, co może być dowodem na ich odrębność genetyczną. Wydaje się również, że na podstawie częstości występowania tego uwarunkowania u europejskich ras owiec, można spodziewać się innych dróg ich pochodzenia w porównaniu do owiec hodowanych np. w Azji. Warto również skonfrontować wyniki analizy frekwencji występowania uwarunkowań *TYRP-1* z obiektywnymi pomiarami barwy wełny u owiec.

SŁOWA KLUCZOWE: owce / *TYRP-1* / rozkład alleli i genotypów

Badania dotyczące umaszczenia owiec prowadzono w Polsce na rasach o kolorowej okrywie porównywanych z muflonem europejskim (*Ovis aries musimon*) [7]. W dobie intensywnej produkcji wełny prace hodowlane zostały sprowadzone do jej najbardziej pożądanego typu, czyli o barwie białej lub jasnokremowej. W literaturze zagranicznej można znaleźć wiele opracowań badawczych z tego zakresu, opublikowanych przez genetyków [1, 2, 6, 8]. Ich efektem było znalezienie wielu miejsc w łańcuchu DNA, warunkujących tę cechę u owiec. Szczególnie interesujące są prace dotyczące genu kodującego brązowe

umaszczenie, na co zwrócili uwagę Deng i wsp. [1], prowadząc obserwacje na owcach charakteryzujących się ciemnym umaszczeniem w porównaniu do owiec o umaszczeniu białym. W cytowanej pracy oceniono frekwencję występowania allelu brązowego umaszczenia *TYRP-1* w pozycji 215. W związku z tym, postanowiono zbadać frekwencję alleli *locus TYRP-1* u wybranych ras krajowych [4] owiec wełnisto-mięsnych i mięsnych, charakteryzujących się wełną białą. Informacje uzyskane w niniejszej pracy będą pomocne w opracowaniach dotyczących pochodzenia owiec [3].

Material i metody

Badaniami prowadzonymi w latach 2009-2013 objęto stada owiec wełnisto-mięsnych ras: merynos polski (3 stada z woj. wielkopolskiego, 8 stad z woj. kujawsko-pomorskiego), merynos polski starego typu (1 stado z woj. wielkopolskiego, 5 stad z woj. mazowieckiego, 8 stad z woj. kujawsko-pomorskiego), corriedale (2 stada z woj. podlaskiego), owcy żelaźnieńskiej (2 stada z woj. podlaskiego i 1 stado z woj. łódzkiego) oraz stada owiec mięsnych ras: berri-chonne du cher (1 stado z woj. wielkopolskiego); suffolk (2 stada z woj. wielkopolskiego) i charolaise (2 stada z woj. wielkopolskiego). Ocenie poddano zwierzęta w wieku od 2 do 11 lat (tab. 1). Stada, w których pobierano próby zostały wybrane losowo. Od owiec pobierano krew z żyły jarzmowej do probówek zawierających EDTA, w celu izolacji DNA na potrzeby analiz molekularno-genetycznych. Prowadzono ocenę frekwencji alleli i genotypów *locus* kodującego występowanie brązowego umaszczenia – *TYRP-1* w pozycji 215 [1].

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 została wstępnie oczyszczona z powodujących modyfikacje w DNA związków hemu przez usunięcie produktów lizy erytrocytów. DNA było izolowane z leukocytów metodą chromatografii na minikolumnach silikatowych firmy A&A Biotechnology (Gdańsk, Polska). Frakcja otrzymanego w ten sposób DNA posłużyła jako matryca do amplifikacji polimorficznego fragmentu genu. Genotypowanie alleli prowadzone było systemem KASPar®. System ten (www.kbioscience.co.uk) polega na stosowaniu metody polimorfizmu punktowego SNP z zastosowaniem starterów wymienionych w tabeli 2.

Na podstawie odczytu genotypowanych prób DNA w obrębie maciorek i tryków przedstawione zostały rozkłady frekwencji alleli i genotypów. Powyższe działanie stanowiło czynność przygotowawczą do następných etapów badań.

Do obliczeń statystycznych wykorzystany został pakiet programu SPSS wersja 21.0 [10]. Za pomocą testu χ^2 oceniono wpływ rasy oraz płci w obrębie rasy na frekwencję występowania alleli i genotypów. Określono również dystanse genetyczne, stosując metodę Nei'a, pomiędzy badanymi populacjami [9]. Wyniki przedstawiono w tabelach i na dendrogramie.

Wyniki i dyskusja

Wyniki dotyczące rozkładu alleli genu *TYRP-1* zestawiono w tabeli 3. Istotność statystyczna frekwencji ich występowania w zależności od rasy okazała się wysoka. Frekwencja występowania allelu C znacznie przewyższała frekwencję allelu T u wszystkich

Tabela 1 – Table 1

Charakterystyka ilościowa badanego materiału doświadczalnego w zależności od rasy, płci i roku
 Characterization of the material tested according to breed, sex, and year

Rasa Breed	Płeć Sex		Liczba maciorek i tryków w poszczególnych latach Number of ewes and rams in each year
	♀	♂	
Merynos polski Polish Merino	296	69	2010 – 40 ♀; 6 ♂ 2011 – 109 ♀; 10 ♂ 2012 – 71 ♀; 30 ♂ 2013 – 76 ♀; 23 ♂
Merynos polski w starym typie Old-type Polish Merino	456	72	2009 – 291 ♀; 12 ♂ 2010 – 50 ♀; 18 ♂ 2011 – 34 ♀; 11 ♂ 2012 – 54 ♀; 25 ♂ 2013 – 27 ♀; 6 ♂
Corriedale Corriedale	135	11	2011 – 25 ♀; 5 ♂ 2013 – 110 ♀; 6 ♂
Owca żelaznieńska Żelaznieńska Sheep	284	153	2010 – 47 ♀; 62 ♂ 2011 – 38 ♀; 39 ♂ 2012 – 45 ♀; 27 ♂ 2013 – 154 ♀; 25 ♂
Berrichonne du cher Berrichon du Cher	131	40	2010 – 14 ♀; 6 ♂ 2011 – 41 ♀; 16 ♂ 2012 – 24 ♀; 6 ♂ 2013 – 52 ♀; 12 ♂
Suffolk Suffolk	37	19	2010 – 8 ♀ 2011 – 17 ♀; 8 ♂ 2013 – 12 ♀; 11 ♂
Charolaise Charollais	20	9	2010 – 2 ♀ 2011 – 11 ♀; 4 ♂ 2013 – 7 ♀; 5 ♂
Razem w obrębie płci Total within sex	1359	373	
Razem Total	1732		

Tabela 2 – Table 2

Startery oraz miejsca genotypowania SNP dla locus TYRP-1
 Primers and SNP genotyping of the locus of TYRP-1

Locus	Nazwa Name	Startery 3' do 5' Startes3' do 5' (forward/reverse)	SNP	Lokalizacja Localization
TYRP-1	gen warunkujący brązowe umaszczenie tyrosinase-related protein 1 gene	GCTCCAGGCAGAATGAAATC/ GTGACCAGAGGGTTCTCACAG	AY737511.1:215 C>T*	Ekson 2 Exon 2

*Deng i wsp. [1] – Deng et al. [1]

ras. Najniższe frekwencje allelu C stwierdzono u maciorek i tryków rasy suffolk oraz u maciorek charolaise, natomiast najwyższe u tryków charolaise, berrichonne du cher i corriedale oraz u maciorek corriedale. Frekwencje allelu T układały się odwrotnie niż allelu C. Natomiast układ frekwencji alleli w zależności od płci okazał się istotny statystycznie ($P \leq 0,05$) tylko u ras charolaise i żelaźnieńskiej. U tryków rasy charolaise frekwencja allelu

Tabela 3 – Table 3

Frekwencja alleli *locus TYRP-1* w zależności od rasy i płci

Frequency of alleles of *TYRP-1* locus according to breed and sex

Rasa Breed	Płeć Sex		Allel Allele		Ogółem Total
			C	T	
Merynos polski Polish Merino	♀	n	427	165	592
		%	72,1	27,9	100,0
	♂	n	102	36	138
		%	73,9	26,1	100,0
Merynos polski w starym typie Old-type Polish Merino	♀	n	711	201	912
		%	78,0	22,0	100,0
	♂	n	102	42	144
		%	70,8	29,2	100,0
Corriedale Corriedale	♀	n	220	50	270
		%	81,5	18,5	100,0
	♂	n	19	3	22
		%	86,4	13,6	100,0
Owca żelaźnieńska Żelaźnieńska Sheep	♀	n	431	137	568
		%	75,9	24,1	100,0
	♂	n	210	96	306
		%	68,6	31,4	100,0
Berrichonne du cher Berrichon du Cher	♀	n	208	54	262
		%	79,4	20,6	100,0
	♂	n	67	13	80
		%	83,7	16,3	100,0
Suffolk Suffolk	♀	n	45	29	74
		%	60,8	39,2	100,0
	♂	n	22	16	38
		%	57,9	42,1	100,0
Charolaise Charollais	♀	n	25	15	40
		%	62,5	37,5	100,0
	♂	n	16	2	18
		%	88,9	11,1	100,0
Razem w obrębie płci Total within sex	♀	n	2067	651	2718
		%	76,0	24,0	100,0
	♂	n	538	208	746
		%	72,1	27,9	100,0
Razem Total		n	2605	859	3464
		%	75,2	24,8	100,0

Wpływ rasy istotny statystycznie przy $P \leq 0,01$; wpływ płci istotny statystycznie u rasy charolaise przy $P \leq 0,05$; wpływ płci istotny statystycznie u owcy żelaźnieńskiej przy $P \leq 0,05$

Influence of breed significant at $P \leq 0.01$; influence of sex in Charollais significant at $P \leq 0.05$; influence of sex in Żelaźnieńska Sheep significant at $P \leq 0.05$

C była istotnie wyższa i niższa allele T w porównaniu do maciorek. Natomiast u owcy żelaźnieńskiej stwierdzono u tryków istotnie niższą frekwencję allele C i wyższą allele T w porównaniu do maciorek. Rozkłady frekwencji alleli *TYRP-1* mogą zostać uzupełnione np. pracami nad umaszczeniem okrywy u owiec. W pracy Kuleszy i wsp. [5] zwrócono uwagę na inne pomiary barwy wełny, wykonywane przy zastosowaniu kolorymetru, u owiec żelaźnieńskich w porównaniu do corriedale. Owce żelaźnieńskie charakteryzowały

Tabela 4 – Table 4

Frekwencja genotypów genu *TYRP-1* w zależności od rasy i płci

Frequency of genotypes of *TYRP-1* gene according to breed and sex

Rasa Breed	Płeć Sex		Genotyp Genotype			Ogółem Total
			C:C	C:T	T:T	
Merynos polski Polish Merino	♀	n	152	123	21	296
		%	51,4	41,6	7,0	100,0
	♂	n	39	24	6	69
		%	56,5	34,8	8,7	100,0
Merynos polski w starym typie Old-type Polish Merino	♀	n	273	165	18	456
		%	59,9	36,2	3,9	100,0
	♂	n	34	34	4	72
		%	47,2	47,2	5,6	100,0
Corriedale Corriedale	♀	n	87	46	2	135
		%	64,4	34,1	1,5	100,0
	♂	n	8	3	0	11
		%	72,7	27,3	0,0	100,0
Owca żelaźnieńska Żelaźnieńska Sheep	♀	n	163	105	16	284
		%	57,4	37,0	5,6	100,0
	♂	n	71	68	14	153
		%	46,4	44,4	9,2	100,0
Berrichonne du cher Berrichon du Cher	♀	n	80	48	3	131
		%	61,1	36,6	2,3	100,0
	♂	n	28	11	1	40
		%	70,0	27,5	2,5	100,0
Suffolk Suffolk	♀	n	13	19	5	37
		%	35,1	51,4	13,5	100,0
	♂	n	5	12	2	19
		%	26,3	63,2	10,5	100,0
Charolaise Charollais	♀	n	8	9	3	20
		%	40,0	45,0	15,0	100,0
	♂	n	7	2	0	9
		%	77,8	22,2	0,0	100,0
Razem w obrębie płci Total within sex	♀	n	776	515	68	1359
		%	57,1	37,9	5,0	100,0
	♂	n	192	154	27	373
		%	51,5	41,3	7,2	100,0
Razem Total		n	968	669	95	1732
		%	55,9	38,6	5,5	100,0

Wpływ rasy istotny statystycznie przy $P \leq 0,01$

Influence of breed significant at $P \leq 0,01$

się jasnokremową barwą wełny, natomiast corriedale – śnieżnobiałą. Porównanie tych ras pod względem frekwencji występowania alleli *TYRP-1* wskazuje na duże zróżnicowanie między nimi (tab. 3), co powoduje potrzebę konfrontacji wyników prezentowanych w tej pracy z pomiarami barwy wełny.

W odniesieniu do frekwencji alleli *TYRP-1* stwierdzić należy, że prezentowane rozkłady zdecydowanie odbiegają od tendencji stwierdzonych u muflona europejskiego i wrzosówki [7], potwierdzając tym samym tendencje stwierdzane u innych ras owiec krajowych, takich jak polska owca górska odmiany barwnej i białej oraz świniarka. Tylko u muflona stwierdzono, że allel T występował zdecydowanie częściej aniżeli allel C [7]. Jedynie wrzosówka charakteryzowała się ich równomierną częstością [7]. Oznacza to odmienny układ tego uwarunkowania u owiec dzikich w porównaniu do udomowionych. Relacje te odbiegają od wyników badań innych autorów [1, 6, 8]. Również nie potwierdza rozkładów tego allelu spotykanego u owiec w Chinach [2]. Można więc sądzić, że owce azjatyckie [2], muflony europejskie i wrzosówki [7] charakteryzują się innym pochodzeniem, jak i kształtowaniem się procesów domestykacyjnych, które pokazują inny rozkład alleli aniżeli owce hodowane w Europie [3].

Rozkład genotypów (tab. 4) potwierdza tezę przedstawioną na podstawie rozkładu alleli (tab. 3). Wpływ rasy okazał się wysoko istotny statystycznie. Najwyższa frekwencja genotypu CC dotyczyła obu płci ras corriedale i berrichonne du cher oraz tryków charolaise, a najniższa – obu płci rasy suffolk. Z kolei heterozygoty CT występowały z najwyższą frekwencją u obu płci rasy suffolk, maciorek rasy charolaise oraz tryków owcy żelaźnieńskiej i merynosa starego typu. Najniższa frekwencja występowała u tryków corriedale i charolaise. Natomiast najwyższa frekwencja genotypów TT została stwierdzona u obu płci rasy suffolk i tryków charolaise, przy najniższej u obu płci rasy corriedale i tryków charolaise.

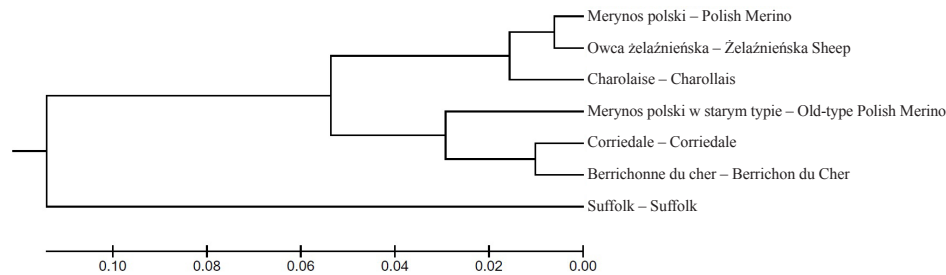
Dane zestawione w tabeli 5 i przedstawione graficznie na dendrogramie (rys.) wskazują z kolei na największą odrębność owiec rasy suffolk w porównaniu do pozostałych, co wykazano na podstawie najwyższych wartości uzyskiwanych wskaźników dotyczących dystansów genetycznych. Analiza literatury wskazuje, że genotypy homozygotyczne, w szczególności w odniesieniu do TT, występowały u muflona europejskiego i czarno umaszczonych ras azjatyckich [2, 7], heterozygoty u wrzosówek i ras o barwnie umaszczonych głowach i nogach [1, 7]. Z kolei homozygoty CC znaleziono u wszystkich grup rasowych uwzględnionych w niniejszej pracy oraz analizowanych w innym opracowaniu krajowym [7]. Analiza porównawcza owiec o umaszczeniu innym aniżeli białe wskazuje związek z frekwencją występowania genotypów *TYRP-1*, w odniesieniu do genotypów TT i CT. Uwzględniając wyniki badań dotyczących oceny barwy wełny u owiec żelaźnieńskich i corriedale [5] oraz inny układ genotypów u muflona europejskiego aniżeli u owiec udomowionych [1, 2, 6, 8], wydaje się zasadne skonfrontowanie wyników analizy molekularnej genu *TYRP-1* z obiektywnymi pomiarami barwy wełny, przynajmniej w odniesieniu do ras wymienionych w pracy Kuleszy i wsp. [5].

Podsumowując można stwierdzić, że rozkład alleli i genotypów *locus* kodującego brązowe umaszczenie wyraźnie odróżnia owce o innym umaszczeniu głowy i nóg od pozostałych ras owiec mięsnych i wełnisto-mięsnych umaszczonych białą lub jasnokremowo. Każda z ras owiec wykazała natomiast specyficzny rozkład alleli i genotypów, co

Tabela 5 – Table 5

Dystanse genetyczne pomiędzy ocenianymi rasami owiec
Genetic distances between breeds

Rasa Breed	Merynos polski Polish Merino	Merynos polski w starym typie Old-type Polish Merino	Corriedale Corriedale	Owca zełaznińska Zelaźnińska Sheep	Berrichonne du cher Berrichon du Cher	Suffolk Suffolk	Charolaise Charollais
Merynos polski Polish Merino		0,06	0,13	0,01	0,11	0,18	0,03
Merynos polski w starym typie Old-type Polish Merino			0,07	0,05	0,05	0,24	0,09
Corriedale Corriedale				0,12	0,02	0,31	0,16
Owca zełaznińska Zelaźnińska Sheep					0,10	0,19	0,04
Berrichonne du cher Berrichon du Cher						0,29	0,14
Suffolk Suffolk							0,15
Charolaise Charollais							



Rys. Dendrogram spokrewnienia badanych owiec
Fig. Dendrogram of genetic distances between breeds

może być dowodem na ich odrębność genetyczną. Wydaje się również, że na podstawie częstotliwości występowania tego uwarunkowania u europejskich ras owiec można spodziewać się innych dróg pochodzenia w porównaniu do owiec hodowanych np. w Azji [2, 3]. Warto również skonfrontować wyniki analizy frekwencji występowania uwarunkowań *TYRP-1* z obiektywnymi pomiarami barwy wełny u owiec.

PIŚMIENNICTWO

1. DENG W.D., YANG S.L., HUO Y.Q., GOU X., SHI X.W., MAO H.M., 2006 – Physiological and genetic characteristics of black-boned sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics* 37, 586-588.
2. GRATTEN J., BERARDI D., LOWDER B.V., MC RAE A.F., VISSCHER P.M., PEMBERTON J.M., SLATE J., 2007 – Compelling evidence that a single nucleotide substitution in *TYRP1* is responsible for a coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* 274 (1610), 619-626.
3. HEINDLEDER S., JANKE A., WABMUTH R., 2001 – Molecular data on wild sheep genetic resources and domestic sheep evolution. *Archiv für Tierzucht*, Special issue, 44, 271-279.
4. Hodowla Owiec i Kóz w Polsce w 2012 roku. Polski Związek Owczarski, Warszawa 2013.
5. KULESZA D., MOZGA K., NIŻNIKOWSKI R., STRZELEC E., ŚWIĄTEK M., ŚLĘZAK M., 2014 – Evaluation of thickness and color of wool in primiparas of Żelaźnieńska and Corriedale Sheep. *Ann. Warsaw Univ. of Life Sci. – SGGW, Ann. Sci.* 53, 37-42.
6. KUSHIMOTO T., VALENCIA, J.C., COSTIN G.-E., TOYOFUKU K., WATABE H., YASUMOTO K.-I., ROUZAUD F., VIEIRA W.D., HEARING, V. J., 2003 – The Melanosome: An Ideal Model to Study Cellular Differentiation. *Pigment Cell Research* 16 (3), 237-244.
7. NIŻNIKOWSKI R., CZUB G., GŁOWACZ K., ŚWIĄTEK M., ŚLĘZAK M., 2013 – Polimorfizm genu kodującego brązowe umaszczenie (*TYRP1*) w pozycji 215 u krajowych ras owiec i muflona europejskiego (*Ovis aries musimon*). *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* 9 (4), 17-23.
8. PARISET L., CAPPUCIO 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 – Characterization of 37 Breed-Specific Single-Nucleotide Polymorphisms in Sheep. *Journal of Heredity* 97 (5), 531-534.
9. RUSZCZYC Z., 1981 – Metodyka doświadczeń zootechnicznych. PWRiL, Warszawa.
10. SPSS 21.0 for Windows, IBM Ltd.

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

Polymorphism of *TYRP-1* at position 215 in domestic wool-and-meat and meat sheep breeds

Summary

The study was conducted in 2009-2013 in flocks of wool-and-meat sheep, i.e. Polish Merino (3 flocks from Wielkopolskie Voivodeship and 8 flocks from Kujawsko-Pomorskie Voivodeship), old-type Polish Merino (1 flock from Wielkopolskie Voivodeship, 5 flocks from Mazowieckie Voivodeship and 8 flocks from Kujawsko-Pomorskie Voivodeship), Corriedale (2 flocks from Podlaskie Voivodeship) and Żelazniańska Sheep (2 flocks from Podlaskie Voivodeship and 1 flock from Łódzkie Voivodeship), and meat sheep flocks, i.e. Berrichon du Cher (1 flock from Wielkopolskie Voivodeship), Suffolk (2 flocks from Wielkopolskie Voivodeship) and Charollais (2 flocks from Wielkopolskie Voivodeship). The total number of genotyped individuals (from 2 to 11 years old) was 1,732 (1,359 ♀ and 373 ♂). Genotypes identification was performed with respect to the occurrence of C and T alleles of the brown colour gene (*TYRP-1*). The distribution of alleles and genotypes of the locus encoding brown colour was found to clearly differentiate sheep with different head and leg colour from the other meat and wool-and-meat breeds, with white or cream-coloured coats. Each of the breeds showed a characteristic distribution of alleles and genotypes, which may be evidence of their genetic distinctiveness. It also appears that, based on the frequency of occurrence of this determinant in European sheep breeds, we can expect different paths of origin for these breeds than in the case of sheep bred e.g. in Asia. Furthermore, it would be worth comparing the frequency of occurrence of *TYRP-1* determinants with objective measurements of sheep wool colour.

KEY WORDS: sheep / *TYRP1* / distribution of alleles and genotypes