

## Polimorfizm genu kodującego brązowe umaszczenie (*TYRPI*) w pozycji 215 u krajowych ras owiec i muflona europejskiego (*Ovis aries musimon*)\*

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

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,  
Wydział Nauk o Zwierzętach, Zakład Hodowli Owiec i Kóz,  
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa

Badania przeprowadzono na 1805 zwierzętach (1165 ♀ i 640 ♂): muflonie europejskim (*Ovis aries musimon*), jego mieszańcach z wrzosówką, owcach czterech ras charakteryzujących się okrywą wełnistą mieszaną (wrzosówka, świniarka, polska owca górska odmiany białej i odmiany barwnej) i merynosie polskim. Wszystkie zwierzęta poddane były identyfikacji genu brązowego umaszczenia (*TYRPI*), w zakresie oceny występowania alleli C i T. Podsumowując badania stwierdzono, że rozkład genów i genotypów genu kodującego brązowe umaszczenie wyraźnie odróżnia muflona europejskiego (dominacja w częstotliwości występowania allelu T i genotypu TT) od pozostałych grup owiec udomowionych. Każda z ras owiec wykazała natomiast specyficzny układ rozkładu alleli i genotypów, co może być dowodem na ich odrębność genetyczną. Na podstawie częstotliwości występowania tego uwarunkowania u europejskich ras owiec można przypuszczać, że są inne drogi ich pochodzenia w porównaniu do owiec hodowanych np. w Azji. Potwierdzenie tej tezy wymaga dalszych prac z tego zakresu, z uwzględnieniem różnych uwarunkowań determinujących umaszczenie u owiec.

**SŁOWA KLUCZOWE:** owce, *TYRPI*, rozkład alleli i genotypów

Umaszczenie owiec, w dobie intensywnej produkcji wełny, zostało sprowadzone w hodowli krajowej do najbardziej pożądanego, tj. białego lub jasnokremowego. W badaniach zagranicznych cecha ta jest częstym tematem opracowań badawczych prowadzonych przez genetyków [1, 2, 4, 5]. Efektem tych badań jest znalezienie wielu miejsc w łańcuchu DNA, warunkujących tę cechę u owiec. Za szczególnie ciekawe uznano badania dotyczące genu kodującego brązowe umaszczenie, na co zwrócili uwagę Deng i wsp. [1], prowadząc obserwacje na owcach charakteryzujących się ciemnym umaszczeniem skóry, mięśni, narządów wewnętrznych i okrywy, w porównaniu do owiec o umaszczeniu białym.

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

W badaniach własnych analizowano częstotliwość występowania uwarunkowań genu brązowego umaszczenia (*TYRPI*) i badano rozkłady jego występowania u przodka – muflona europejskiego (*Ovis aries musimon*), wełnisto-mięsnego merynosa polskiego umaszczonego biało oraz ras owiec o okrywie mieszanej, spośród których wiele charakteryzowało się umaszczeniem daleko odbiegającym od białego czy jasnokremowego. Ponadto uwarunkowanie to może być pomocne w pracach dotyczących badań nad pochodzeniem owiec [4], co również z punktu widzenia tradycji chowu owiec w różnych regionach świata zaczyna budzić coraz większe zainteresowanie.

### Material i metody

Badaniami objęto owce rasy merynos polski (2 stada) z terenu woj. wielkopolskiego, owce o okrywie mieszanej z terenu woj. małopolskiego, łódzkiego i podkarpackiego (29 stad) oraz muflony europejskie (3 stada) i muflonowrzosówki (2 stada) z terenu woj. wielkopolskiego i lubuskiego. Ocenie poddano zwierzęta w wieku od 2 do 11 lat (tab. 1). Stada do pobierania prób wybierano losowo. Krew pobierano z żyły jarzmowej do probówek zawierających EDTA, w celu izolacji DNA genomowego na potrzeby analiz molekular-

**Tabela 1 – Table 1**

Zestawienie liczebności materiału doświadczalnego wykorzystanego w badaniach w latach 2009-2012

Summary of experimental material used in the study in 2009-2012

Rasa Breed	Płeć Sex		Liczba macierek i tryków objętych badaniami Number of ewes and rams in experiments
	♀	♂	
Muflon europejski European mouflon	119	71	2010 – 2 ♂; 2011 – 2 ♀, 6 ♂; 2012 – 117 ♀, 63 ♂
Muflonowrzosówka European mouflon x Polish Heat sheep	8	9	2010 – 4 ♀, 6 ♂; 2011 – 4 ♀, 3 ♂
Wrzosówka Polish Heat sheep	368	400	2009 – 126 ♀, 143 ♂; 2010 – 127 ♀, 128 ♂; 2011 – 115 ♀, 129 ♂
Świniarka Swiniarka sheep	134	29	2009 – 33 ♀, 14 ♂; 2010 – 106 ♀, 16 ♂
Polska owca górską odmiana biała Polish Mountain Sheep – white	145	15	2010
Polska owca górską odmiana barwna Polish Mountain Sheep – colour	173	14	2011
Merynos polski Polish Merino	218	102	2010 – 104 ♀, 43 ♂; 2011 – 97 ♀, 51 ♂; 2012 – 17 ♀, 8 ♂
Suma w obrębie płci Total within gender	1165	640	
Razem Total	1805		

no-genetycznych. W badaniach prowadzono ocenę frekwencji genów i genotypów genu kodującego występowanie brązowego umaszczenia – *TYRP-1*.

DNA izolowano z leukocytów krwi owiec, 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](http://www.kbioscience.co.uk)) polega na stosowaniu metody polimorfizmu punktowego SNP z zastosowaniem starterów wymienionych w tabeli 2.

**Tabela 2 – Table 2**

Startery oraz miejsca genotypowania SNP dla *locus TYRP1*

The primers and SNP genotyping of the locus of *TYRP1*

<i>Locus</i>	Nazwa Name	Startery 3' do 5' (forward/reverse)	SNP	Lokalizacja Localization
<i>TYRP1</i>	gen warunkujący brązowe umaszczenie gene of tyrosinase related protein 1	GCTCCAGGCAGAATGAAATC/ GTGACCAGAGGGTTCTCACAG	AY737511.1:215 C>T*	ekson 2 exon 2

\*Deng i wsp. [1] – Deng et al. [1]

Na podstawie odczytu genotypowanych prób DNA, w obrębie maciorek i tryków przedstawiono rozkłady frekwencji alleli i genotypów. Działanie to stanowiło czynność przygotowawczą do następných etapów badań.

Do obliczeń statystycznych wykorzystano pakiet programu SPSS wersja 12.0 [6]. Za pomocą testu  $\chi^2$  oceniono wpływ rasy i płci na frekwencję występowania alleli i genotypów genu *TYRP1*.

## Wyniki i dyskusja

Wyniki dotyczące rozkładu alleli genu *TYRP1* zestawiono w tabeli 3. Ocena częstotliwości ich występowania w obrębie płci, jak i między płciami okazała się nieistotna statystycznie. W odniesieniu do alleli rozkład ten okazał się wysoko istotny statystycznie ( $P \leq 0,01$ ) i wskazuje na zdecydowane różnice pomiędzy przodkiem owiec, jakim jest muflon europejski, a pozostałymi grupami rasowymi. Tylko u muflona allel T występował zdecydowanie częściej niż allel C, natomiast wrzosówka charakteryzowała się równomierną częstotliwością występowania alleli C i T. W efekcie muflon europejski wykazał odrębny układ częstotliwości występowania obu alleli w odróżnieniu od pozostałych grup, a pośrednie miejsce zajęła wrzosówka. Oznacza to odmienny układ tego uwarunkowania u owiec dzikich w porównaniu z udomowionymi. Relacje te odbiegają od wyników badań

**Tabela 3 – Table 3**Zestawienie alleli genu *TYRPI* (n – liczebność)Summary of gene alleles *TYRPI* (n – number)

Wyszczególnienie Specification		Allel Allele		Ogółem Total
		C	T	
Mufion europejski European mouflon	maciorki ewes	47	191	238
	tryki rams	24	118	142
	n	71	309	380
	%	18,7	81,3	100,0
Muflonowrzosówka European mouflon x Polish Heat sheep	maciorki ewes	12	4	16
	tryki rams	15	3	18
	n	27	7	34
	%	79,4	20,6	100,0
Wrzosówka Polish Heat sheep	maciorki ewes	361	375	736
	tryki rams	415	385	800
	n	776	760	1536
	%	50,5	49,5	100,0
Świniarka Swiniarka sheep	maciorki ewes	183	85	268
	tryki rams	34	24	58
	n	217	109	326
	%	66,6	33,4	100,0
Polska owca górską odmiana biała Polish Mountain Sheep – white	maciorki ewes	224	66	290
	tryki rams	20	10	30
	n	244	76	320
	%	76,3	23,8	100,0
Polska owca górską odmiana barwna Polish Mountain Sheep – colour	maciorki ewes	286	60	346
	tryki rams	24	4	28
	n	310	64	374
	%	82,9	17,1	100,0
Merynos polski Polish Merino	maciorki ewes	304	132	436
	tryki rams	151	53	204
	n	455	185	640
	%	71,1	28,9	100,0
Ogółem Total	maciorki ewes	1417	913	2330
	tryki rams	683	597	1280
	n	2100	1510	3610
	%	58,2	41,8	100,0

**Tabela 4 – Table 4**

Zestawienie genotypów genu *TYRPI* (n – liczebność)

Summary of genotypes *TYRPI* (n – number)

Wyszczególnienie Specification		Genotyp Genotype			Ogółem Total
		C:C	C:T	T:T	
Muflon europejski European mouflon	maciorki ewes	5	37	77	119
	tryki rams	2	20	49	71
	n	7	57	126	190
	%	3,7	30,0	66,3	100,0
Muflonowrzosówka European mouflon x Polish Heat sheep	maciorki ewes	4	4	0	8
	tryki rams	6	3	0	9
	n	10	7	0	17
	%	58,8	41,2	0,0	100,0
Wrzosówka Polish Heat sheep	maciorki ewes	105	151	112	368
	tryki rams	116	183	101	400
	n	221	334	213	768
	%	28,8	43,5	27,7	100,0
Świniarka Swiniarka sheep	maciorki ewes	55	73	6	134
	tryki rams	8	18	3	29
	n	63	91	9	163
	%	38,7	55,8	5,5	100,0
Polska owca górską odmiana biała Polish Mountain Sheep – white	maciorki ewes	88	48	9	145
	tryki rams	6	8	1	15
	n	94	56	10	160
	%	58,8	35,0	6,3	100,0
Polska owca górską odmiana barwna Polish Mountain Sheep – colour	maciorki ewes	115	56	2	173
	tryki rams	11	2	1	14
	n	126	58	3	187
	%	67,4	31,0	1,6	100,0
Merynos polski Polish Merino	maciorki ewes	104	96	18	218
	tryki rams	55	41	6	102
	n	159	137	24	320
	%	49,7	42,8	7,5	100,0
Ogółem Total	maciorki ewes	476	465	224	1165
	tryki rams	204	275	161	640
	n	680	740	385	1805
	%	37,7	41,0	21,3	100,0

innych autorów [1, 4, 5]. Nie potwierdzają również rozkładów tego genu u owiec hodowanych w Chinach [2]. Można zatem przypuszczać, że owce azjatyckie charakteryzują się innym pochodzeniem, jak i kształtowaniem się procesów domestykacyjnych, co pokazuje inny rozkład alleli, aniżeli owce hodowane w Europie [3].

Rozkład genotypów (tab. 4), wskazujący na wysoko istotne statystycznie ( $P \leq 0,01$ ) różnice pomiędzy muflonem a pozostałymi grupami owiec, potwierdza tezę postawioną na podstawie rozkładu alleli (tab. 3). Jedynie u muflona europejskiego stwierdzono dominujący udział homozygot TT. Homozygoty CC znaleziono u wszystkich grup rasowych, jednak u muflonowrzosówek, polskich owiec górskich obu odmian i u merynosa polskiego występowały zdecydowanie najczęściej. Wysoki udział heterozygot genu *TYRPI* stwierdzono u wrzosówki i świniarki. Analiza porównawcza owiec o umaszczeniu innym aniżeli białe nie wskazuje na związek z częstotliwością występowania genotypów *TYRPI*. Daje się jednak zauważyć zdecydowanie inny układ genotypów u muflona europejskiego aniżeli u owiec udomowionych [1, 2, 4, 5].

Podsumowując można stwierdzić, że rozkład genów i genotypów genu kodującego brązowe umaszczenie (*TYRPI*) wyraźnie odróżnia muflona europejskiego od pozostałych grup owiec udomowionych. Każda z ras owiec wykazała natomiast specyficzny układ rozkładu alleli i genotypów, co może być dowodem na ich odrębność genetyczną. Na podstawie częstotliwości występowania tego uwarunkowania u europejskich ras owiec można przypuszczać, że są inne drogi ich pochodzenia w porównaniu do owiec hodowanych np. w Azji [4]. Potwierdzenie tej tezy wymaga dalszych prac z tego zakresu, z uwzględnieniem innych uwarunkowań determinujących umaszczenie 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 REE A.F., VISSER P.M., PEMBERTON J.M., SLATE J., 2007 – Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYP1 is responsible for a coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society* 274, 619-626.
3. HEINDLEDER S., JANKE A., WAßMUTH R., 2001 – Molecular data on wild sheep genetic resources and domestic sheep evolution. *Archiv für Tierzucht*, Special issue, 44, 271-279.
4. 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.
5. 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.
6. Statistical Product and Service Solution base version 12.0 for Windows. SPSS inc. USA 2004.

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

## Polymorphism of brown coat-coding gene (*TYRPI*) in position 215 in national sheep breeds and the European mouflon (*Ovis aries musimon*)

### Summary

The studies were conducted with 1805 animals (1165 ♀ and 640 ♂): the European mouflon (*Ovis aries musimon*), its crossbreeds with Polish Heath sheep, the sheep of four breeds, characterized by mixed wool coat (Polish Heath sheep, Świniarka sheep, Polish Mountain Sheep of white and colour variety) and Polish Merino. All animals were subjected to identification of brown colour coat gene (*TYRPI*) in respect of evaluation of occurrence of C and T alleles. Summing up the studies, it was stated that the distribution of genes and genotypes of brown coat-coding gene clearly differentiated the European mouflon (dominance in the frequency of occurrence of T allele and TT genotype) as compared to the remaining groups of domesticated sheep. Each of the sheep breeds revealed specific system of distribution of alleles and genotypes what may be an evidence of their genetic separateness. On the grounds of the frequency of occurrence of the discussed phenomenon in the European sheep breeds, we may suppose that there are different ways of their origin as compared to the sheep, being bred e.g. in Asia. Confirmation of the mentioned thesis requires further work in the discussed field, with consideration of various conditions that determined the colour of coat of the sheep.

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