

Polimorfizm genu białka prionowego PrP w stadach owiec rasy merynos polski i berrichone du cher

ROMAN NIŻNIKOWSKI, ARTUR OPRZĄDEK*, GRZEGORZ CZUB, MARCIN ŚWIĄTEK, KRZYSZTOF GŁOWACZ, MAGDALENA ŚLĘZAK

Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*Agencja Nieruchomości Rolnych, ul. Dolańskiego 2, 00-215 Warszawa

Otrzymano 03.12.2014

Zaakceptowano 07.01.2015

Niżnikowski R., Oprządek A., Czub G., Świątek M., Głowacz K., Ślęzak M.

Polymorphism of the PrP prion protein gene in Polish Merino and Berrichone du Cher sheep

Summary

The study was conducted on ewes and rams of the Polish Merino and Berrichone du Cher breed in the Grotkowo flock (Wielkopolskie Voivodeship). The examined sheep were aged 1 year (152♀ and 32♂ Polish merino 220♀ and 68♂ Berrichone du Cher). All animals were subjected to the identification of the PrP prion protein gene. Based on the study a highly significant effect of breed and no significant effect of sex within the breed on the frequency of alleles and genotypes of classical scrapie in Polish Merino and Berrichone du Cher were found. In Berrichone du Cher five alleles (ARR, ARQ, AHQ, ARQ, VRQ) and in Polish Merino six alleles were found (ARR, ARQ, AHQ, ARQ, VRR, VRQ). What is important, the VRR allele was detected for the first time in a Polish sheep population. 9 genotypes of scrapie in Polish Merino and 7 in Berrichone du Cher were identified. Very high frequencies of the genotype ARR/ARR and ARR/ARQ in Polish Merino and high frequencies of ARR/ARR genotype in Berrichon du Cher were found at a very low level of genotypes, which coded valine in both breeds. The assumptions of breeding work involving the elimination of the presence of animals encoding valine at codon 136 and the introduction of rams to the population containing ARR allele in their genotype was associated with increased frequency of occurrence in the population of ARR/ARR and ARR allele. That indicates the advisability of such breeding work which should be recommended for the genetic improvement of other breeds in the national population of sheep.

Keywords: sheep, PrP, distribution of alleles and genotypes

Parlament UE ustanowił reguły prawne dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (1, 10). U owiec spotykane są dwie formy pasażowalnej encefalopatii gąbczastej, tzn. trzęsawki klasycznej – uwarunkowanej genetycznie oraz atypowej – niuwarunkowanej genetycznie. Jako odpowiedzialne za występowanie trzęsawki klasycznej u owiec zostało uznane białko prionowe PrP. W genie tym zaobserwowano szereg polimorfizmów w kodonach 136, 154 i 171, które uznano za odpowiedzialne za (genetyczną) oporność lub wrażliwość na trzęsawkę (3-5, 7). Za gwarantujący najmniejszą wrażliwość na trzęsawkę uznany został allel ARR, natomiast jako odpowiedzialny za duży stopień wrażliwości genetycznej na tę jednostkę chorobową został uznany allel kodujący walinę – VRQ (3, 4, 7, 8).

W Polsce dotychczas z tej dziedziny prowadzono badania monitorujące występowanie alleli trzęsawki u wielu ras owiec (7, 8, 12). W efekcie udowodniono brak występowania alleli kodujących walinę u wrzo-

sówki polskiej oraz różną frekwencję ich występowania u pozostałych ras (6, 8, 12). Warto więc prowadzić prace hodowlaną zmierzającą do wyeliminowania z poszczególnych populacji owiec allelu VRQ, zmierzając zarazem w kierunku zwiększenia frekwencji występowania allelu ARR. W efekcie poprawi to genetyczną oporność na tę jednostkę chorobową w obrębie poszczególnych stad i ras owiec. Taki kierunek prac badawczych przyjęto w niniejszym opracowaniu, wybierając w tym celu mięsną rasę berrichone du cher i merynosa polskiego.

Materiał i metody

Badaniami objęto maciorki i tryczki hodowlane w wieku do 1 roku, ras: merynos polski (152♀ i 32♂) i berrichone du cher (220♀ i 68♂), pochodzące z owczarni Grotkowo (woj. wielkopolskie), w latach 2009-2013 (tab. 1). Na potrzeby analiz molekularno-genetycznych pobrano krew z żyły jarzmowej zwierząt do próbek zawierających EDTA. DNA izolowano z leukocytów krwi przechowywa-

Tab. 1. Materiał doświadczalny wykorzystany w badaniach

		Rasa			
		Merynos polski		Berrichone du cher	
		♀	♂	♀	♂
Rok pobrania	2009	50	3	89	27
	2010	43	6	14	6
	2011	21	8	41	16
	2012	17	8	24	6
	2013	21	7	52	13
Razem w obrębie płci		152	32	220	68
Razem w obrębie rasy		184		288	

Tab. 2. Startery oraz miejsca genotypowania SNP dla locus białka prionowego

Locus	Startery 3'-5'	SNP	Zmiany genotypowania	Lokalizacja
PRNP prion protein	CACAGTCAGTGGGAACAAGCC/ CTTTGCCAGGTTGGGG	AY909542:g.385A>G	A/G	exon 3
		AY909542:g.386G>T	G/T	exon 3
		AY909542:g.479C>T;	C/T	exon 3
		AY909542:g.534G>A	G/A	exon 3

nej z konserwantem. W celu otrzymania wysokiej jakości DNA nadającego się po zamrożeniu i wielokrotnym rozmrażaniu do wielokrotnego użycia krew została wstępnie oczyszczona z powodujących modyfikacje 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 dla białka prionowego. Genotypowanie alleli trzęsawki prowadzono systemem KASPar®. System ten oraz procedura genotypowania polegają na stosowaniu metody polimorfizmu punktowego SNP z zastosowaniem starterów wymienionych w tab. 2. Wysoką wiarygodność tej metody w porównaniu do metody sekwencjonowania udowodniono w badaniach Green i wsp. (2).

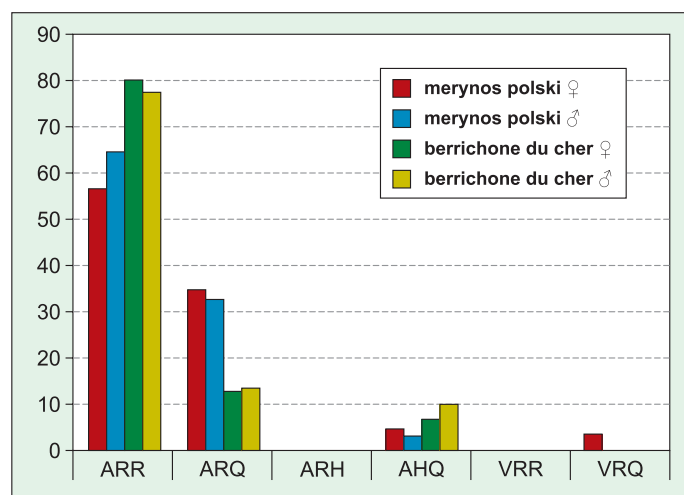
Na podstawie odczytu genotypowanych prób DNA dla maciorek i tryków przedstawiono rozkłady frekwencji alleli i genotypów w obrębie poszczególnych lat badań. Corocznie u wszystkich zwierząt przyjęto zasadę, że osobniki zawierające w genotypie allele kodujące walinę były usuwane z hodowli i przeznaczane na cele pozahodowlane. Dodatkowo w przypadku tryczków pozostawiano do dalszej hodowli jedynie osobniki zawierające allel ARR. Uzyskany w ten sposób materiał oceniono pod względem frekwencji występowania alleli i genotypów pomiędzy rasami, jak również w obrębie ras – pomiędzy płciami i latami badań.

Do obliczeń statystycznych wykorzystano pakiet programu SPSS 21.0 (11). Za pomocą testu χ^2 oceniono wpływ rasy oraz w obrębie ras – płci i roku badań na frekwencję występowania alleli i genotypów. W odniesieniu do wpływu rasy, w przypadku alleli odczytywano wartości graniczne przy 5 stopniach swobody oraz w przypadku genotypów – 11 stopniach swobody. Natomiast wyniki testu w obrębie rasy merynos polski oceniono w przypadku płci przy 5 stopniach swobody dla alleli oraz 8 stopniach dla geno-

typów, jak również w przypadku roku – 20 stopniach dla alleli i 32 stopniach dla genotypów. Z kolei w obrębie rasy berrichone du cher ocenę dla płci przeprowadzono przy 4 stopniach swobody dla alleli i 6 stopniach dla genotypów, jak również w przypadku wpływu roku badań – 16 stopniach dla alleli i 24 stopniach dla genotypów. Wyniki zestawiono w tabelach.

Wyniki i dyskusja

Na ryc. 1 zestawiono rozkłady alleli u ocenianych ras owiec z uwzględnieniem płci. Wykazano wysoko istotne ($P \leq 0,01$) różnice w rozkładach alleli u obu ras, natomiast nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy płciami w obrębie rasy. U merynosa polskiego znaleziono sześć alleli (ARR, ARQ, AHQ, ARH, VRQ i VRR), natomiast w przypadku berrichone du cher pięć (wszystkie takie jak u merynosa polskiego z wyłączeniem allelu VRR). Za ciekawe uznać należy pojawienie się allelu VRR u maciorki merynosa polskiego, który nie jest często spotykany u owiec (3-8, 12). Maciorka ta, ze względu na nosicielstwo tego allelu, podobnie jak nosiciele allelu VRQ, były z populacji natychmiast eliminowane. Porównując rasy pomiędzy sobą w tym zakresie, stwierdzono wysoko istotnie ($P \leq 0,01$) wyższą frekwencję występowania allelu ARR i AHQ oraz niższą ARQ i ARH u rasy berrichone du cher w porównaniu z merynosem polskim. Taki układ jest zbliżony z wynikami innych autorów (7, 12), którzy szczególnie mocno podkreślali wysoką frekwencję występowania opornego genetycznie na trzęsawkę allelu ARR (powyżej 80%) u rasy berrichone du cher w porównaniu do innych ras. Rozkłady frekwencji poszczególnych alleli w obrębie badanych ras w zależności od roku przedstawiono w tab. 3. Oddziaływanie roku na badane rozkłady okazało się wysoko istotne ($P \leq 0,01$) u rasy berrichone du cher i istotne ($P \leq 0,05$) u merynosa polskiego. U obydwu ras stwierdzono



Ryc. 1. Frekwencja występowania alleli PrP u badanych ras owiec

Tab. 3. Frekwencje występowania alleli PrP w obrębie rasy w zależności od roku

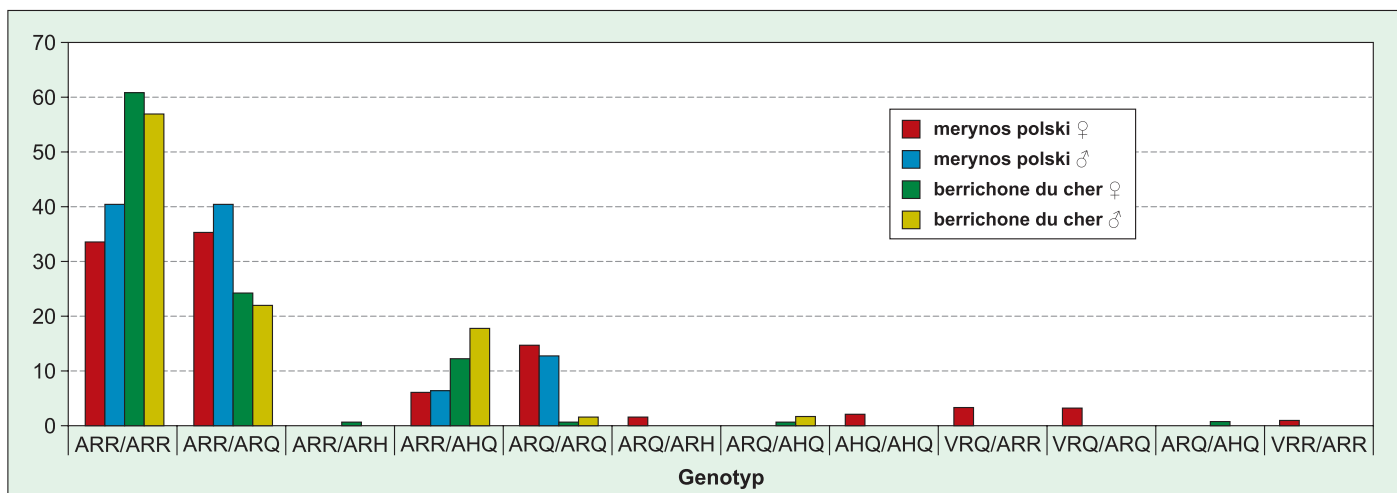
			Allele						Razem	
			ARR	ARQ	ARH	AHQ	VRR	VRQ		
Merynos polski	2009	n	45	53	1	6	0	1	106	
		%	42,5	50,0	0,9	5,7	0,0	0,9	100,0	
	2010	n	54	32	1	6	0	5	98	
		%	55,1	32,7	1,0	6,1	0,0	5,1	100,0	
	2011	n	38	16	0	1	0	3	58	
		%	65,5	27,6	0,0	1,7	0,0	5,2	100,0	
	2012	n	33	14	0	2	1	0	50	
		%	66,0	28,0	0,0	4,0	2,0	0,0	100,0	
	2013	n	42	12	0	1	0	1	56	
		%	75,0	21,4	0,0	1,8	0,0	1,8	100,0	
	Berrichone du Cher	2009	n	181	39	1	10	0	1	232
			%	78,0	16,9	0,4	4,3	0,0	0,4	100,0
2010		n	26	8	0	6	0	0	40	
		%	65,0	20,0	0,0	15,0	0,0	0,0	100,0	
2011		n	86	13	0	15	0	0	114	
		%	75,4	11,4	0,0	13,2	0,0	0,0	100,0	
2012		n	54	5	0	1	0	0	60	
		%	90,0	8,3	0,0	1,7	0,0	0,0	100,0	
2013		n	110	10	0	10	0	0	130	
		%	84,6	7,7	0,0	7,7	0,0	0,0	100,0	
Razem		n	669	202	3	58	1	11	944	
		%	70,9	21,4	0,3	6,1	0,1	1,2	100,0	

Objaśnienia: Wpływ roku w obrębie rasy: berrichone du cher – $P \leq 0,05$; merynos polski $P \leq 0,05$

wzrost frekwencji występowania allelu ARR z roku na rok przy równoczesnym spadku frekwencji występowania pozostałych alleli. Prowadzi to stwierdzenia, że zastosowany program hodowlany przynosi korzystny efekt, jakim jest eliminacja uwarunkowań kodujących walinę oraz wzrost frekwencji występowania opornego genetycznie allelu ARR, co praktycznie we wszystkich pracach uważane jest za zasadne (3-8, 12). Rozkład

frekwencji występowania genotypów trzęsawki przedstawiono na ryc. 2. Płeć w obrębie rasy nie wpłynęła istotnie na rozkłady frekwencji genotypów, natomiast różnice w tym zakresie pomiędzy rasami okazały się wysoko istotne ($P \leq 0,01$). U merynosa polskiego stwierdzono występowanie 9 genotypów, a u rasy berrichone du cher – 7. Duże zróżnicowanie w tym zakresie u merynosów polskich spotęgowane zostało przez znalezienie między innymi allelu VRR. Lista genotypów przedstawia się następująco: ARR/ARR, ARR/ARQ, ARR/AHQ, ARQ/ARQ, ARQ/ARH, AHQ/AHQ, VRQ/ARR, VRQ/ARQ, VRR/ARR. Z kolei u rasy berrichone du cher nie stwierdzono występowania genotypów: ARQ/ARH, AHQ/AHQ, VRQ/ARR, VRQ/ARQ i VRR/ARR, natomiast znaleziono: ARR/ARH, ARQ/AHQ oraz VRQ/AHQ, które nie występowały u merynosa polskiego. Za bardzo ważny wynik uznać należy najwyższą frekwencję występowania genotypu ARR/ARR w porównaniu do frekwencji występowania pozostałych uwarunkowań genetycznych, szczególnie poza grupą, która nie charakteryzowała się brakiem występowania allelu ARR bez kombinacji z VRQ i VRR.

U rasy berrichone du cher frekwencja występowania genotypu ARR/ARR była zdecydowanie wyższą w porównaniu do merynosa polskiego, podobnie jak wykazano w pracy Rejduch i wsp. (8). Zakres zróżnicowania genetycznego zarówno u merynosa polskiego, jak i u rasy berrichone du cher był znacznie większy aniżeli u innych ras opisywanych przez różnych autorów (3-8). Świadczy to o możliwości prowadzenia skutecznej pracy hodowlanej, celem



Ryc. 2. Frekwencja występowania genotypów PrP u badanych ras owiec

Objaśnienia: Wpływ płci w obrębie ras – nieistotny; wpływ rasy – $P \leq 0,01$

Tab. 4. Frekwencje występowania genotypów PrP w obrębie rasy w zależności od roku

			Genotyp											Razem	
			ARR/ARR	ARR/ARQ	ARR/ARH	ARR/AHQ	ARQ/ARQ	ARQ/ARH	ARQ/AHQ	AHQ/AHQ	VRQ/ARR	VRQ/ARQ	VRQ/AHQ		VRR/ARR
Merynos polski	2009	n	13	17	0	2	17	1	0	2	0	1	0	0	53
		%	24,4	32,1	0,0	3,8	32,1	1,9	0,0	3,8	0,0	1,9	0,0	0,0	100,0
	2010	n	18	12	0	5	7	1	0	1	1	4	0	0	49
		%	36,8	24,5	0,0	10,2	14,3	2,0	0,0	2,0	2,0	8,2	0,0	0,0	100,0
	2011	n	10	14	0	1	1	0	0	0	0	3	0	0	29
		%	34,6	48,3	0,0	3,4	3,4	0,0	0,0	0,0	10,3	0,0	0,0	0,0	100,0
	2012	n	9	12	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	25
		%	36,0	48,0	0,0	8,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	100,0
	2013	n	14	12	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	28
		%	50,0	42,8	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	100,0
	Berrichone du cher	2009	n	68	36	1	8	1	0	1	0	0	1	0	116
			%	58,5	31,0	0,9	6,9	0,9	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0
2010		n	8	5	0	5	1	0	1	0	0	0	0	20	
		%	40,0	25,0	0,0	25,0	5,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
2011		n	29	23	0	15	0	0	0	0	0	0	0	57	
		%	50,9	22,8	0,0	26,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
2012		n	24	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	30	
		%	80,0	16,7	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
2013		n	45	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	65	
		%	69,2	15,4	0,0	15,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Razem		n	238	136	1	50	28	2	2	3	5	5	1	472	
		%	50,5	28,8	0,2	10,6	5,9	0,4	0,4	0,6	1,1	1,1	0,2	100,0	

Objaśnienia: Wpływ roku w obrębie rasy: berrichone du cher – $P \leq 0,05$; merynos polski – $P \leq 0,01$

poprawy frekwencji występowania uwarunkowań opornych genetycznie na trzęsawkę. Zestawienie rozkładów frekwencji występowania genotypów trzęsawki w zależności od roku badań w obrębie rasy zostało przedstawione w tab. 4. Czynniki ten wpłynął wysoko istotnie ($P \leq 0,01$) u merynosa polskiego oraz istotnie ($P \leq 0,05$) u rasy berrichone du cher. U obu ras stwierdzono w kolejnych latach wzrosty frekwencji występowania genotypu ARR/ARR i uwarunkowań zawierających allel ARR oraz redukcję postępującą aż do całkowitego wyeliminowania z populacji genotypów zawierających allele VRQ i VRR. Sugestie pojawiające się w wielu pracach o konieczności wyeliminowania uwarunkowań kodujących występowanie waliny w kodonie 136 zostały udowodnione jako możliwe do osiągnięcia poprzez odpowiednią pracę hodowlaną (5-8). Zastosowany program hodowlany został w pełni potwierdzony i warty zalecenia do praktyki celem wyeliminowania z populacji podatnych na trzęsawkę klasyczną uwarunkowań genetycznych, co pozwala na spełnienie założeń przepisów prawnych obowiązujących w Unii Europejskiej (1, 9, 10). Coroczne wprowadzanie do stada remontu maciorek nie będących nosicielami uwarunkowań kodujących występowanie

waliny w kodonie 136 oraz tryków o genotypie ARR/ARR powinno w krótkim czasie spowodować uzyskanie populacji w całości posiadającej allele odporne genetycznie na trzęsawkę klasyczną. Powyższe zalecenia powinny mieć zastosowanie w ramach pracy hodowlanej prowadzonej również na innych rasach owiec. W Polsce stwierdzane są przypadki trzęsawki atypowej u owiec. Być może spowodowane jest to stosunkowo niską frekwencją występowania alleli VRQ lub VRR w porównaniu do znacznie wyższych spotykanych u owiec za granicą (3-5, 7).

Na podstawie przeprowadzonych prac badawczych wykonanych w odniesieniu do dwóch ras owiec utrzymywanych w owczarni Grotkowo (woj. wielkopolskie) stwierdzono:

1. Wysoko istotny ($P \leq 0,01$) wpływ rasy owiec oraz nieistotny płci w obrębie rasy na frekwencje występowania alleli i genotypów trzęsawki klasycznej u merynosów polskich oraz rasy berrichone du cher.

2. Wykazano występowanie sześciu alleli (ARR, ARQ, AHQ, ARQ, VRR i VRQ) u merynosa polskiego, natomiast u rasy berrichone du cher spośród wyżej wymienionych nie znaleziono allelu VRR, który w polskim pogłowiu owiec znaleziony został po raz pierwszy.

3. Zidentyfikowano 9 genotypów białka PrP u merynosa polskiego oraz 7 u rasy berrichone du cher.

4. Stwierdzono bardzo wysoką frekwencję występowania genotypu ARR/ARR i ARR/ARQ u merynosa polskiego oraz wysoką genotypu ARR/ARR u rasy berrichone du cher, przy bardzo niskim poziomie występowania genotypów z kodowaną waliną u obu ras.

5. Przyjęte założenia pracy hodowlanej polegające na eliminacji nosicieli uwarunkowań kodujących występowanie waliny w kodonie 136 oraz wprowadzanie do populacji tryków zawierających w genotypie allelu ARR prowadziło do zwiększenia frekwencji występowania w populacji genotypu ARR/ARR oraz allelu ARR. U merynosa polskiego stwierdzono tę zależność na poziomie wysoko istotnym ($P \leq 0,01$), natomiast u rasy berrichone du cher istotnym ($P \leq 0,05$) statystycznie. Wskazuje to na zasadność prowadzenia takiej pracy hodowlanej, którą warto zalecić przy doskonaleniu genetycznym innych ras owiec występujących w krajowym поголовiu.

Piśmiennictwo

1. Decyzja Komisji z dnia 13 lutego 2003 r. ustanawiająca minimalne wymagania w zakresie tworzenia programów hodowli owiec odpornych na pasażowalne encefalopatie gąbczaste (notyfikowana jako dokument nr C(2003) 498) (Tekst mający znaczenie dla EOG) (2003/100/WE). 2003. Dz. Urz. UE L 41/41: 209-213.
2. Green B. T., Heaton M. P., Clawson M. L., Laegreid W. W.: Linkage disequilibrium across six prion gene regions spanning 20 kbp in U.S. sheep. *Mamm Genome* 2006, 17, 1121-1129.
3. Kaal L. M. T. E., Windig J. J.: Rare sheep breeds and breeding for scrapie resistance in the Netherlands, [w:] Honing Y. v.d. (red.): Book of abstracts of the 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production 11. Wageningen Academic Publishers, Wageningen 2005, s. 375.
4. Kaam J. B. C. H. M. Van, Finocchiaro R., Vitale M., Portolano B., Vitale F., Caracappa S.: PrP allele frequencies in non-infected Valle del Belice and infected cross-bred flocks, [w:] Honing Y. v.d. (red.): Book of abstracts of the 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production 11. Wageningen Academic Publishers, Wageningen 2005, s. 376.
5. Lühken G., Buschmann A., Groschup M. H., Erhardt G.: Prion Protein Allele A136h154q171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Arch. Virol.* 2004, 149, 8: 1571-1580.
6. Niżnikowski R., Głowacz K., Czub G., Ślęzak M., Świątek M.: Polimorfizm genu białka prionowego PrP u krajowych owiec o wulnie mieszanej, merynosa polskiego i muflona europejskiego (*Ovis aries musimon*). *Nauka Przyr. Technol.* 2013, 7, 4, #59.
7. Palthiere I., Brochard M. I., Moazami-Goudarzi K., Laloe D., Amigues Y., Bed'hom B., Neuts E., Leymarie C., Pantano T., Cribiu E. P., Bibe B., Verrier E.: Impact of strong selection for the PrP major gene on genetic variability of four French sheep breeds (Open Access publication). *Genet. Sel. Evol.* 2008, 40, 663-680.
8. Rejduch B., Knapik J., Piestrzyńska-Kajtoch A., Kozubska-Sobocińska A., Krupiński J.: Frequency of genotypes in the PrP prion protein gene locus in the Polish sheep population. *Acta Vet. Hung.* 2009, 57, 30-49.
9. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 260/2003 z dnia 12 lutego 2003 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do zwalczania pasażowalnych encefalopatii gąbczastych u owiec i kóz oraz zasad handlu żywymi owcami, kozami i zarodkami bydłecymi (Tekst mający znaczenie dla EOG). 2003. Dz. Urz. UE L 37/7: 201-205.
10. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. ustanawiające zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych gąbczastych encefalopatii. 2001. Dz. Urz. UE L 147: 1-66.
11. SPSS 21.0 for Windows, IBM Ltd.
12. Wiśniewska E., Mroczkowski S.: Different breeding strategies for scrapie resistance depending on breed-specific PrP allele and genotype frequencies in the Polish Steep. *Züchtungskunde* 2009, 81, s. 180-189.

Adres autora: Prof. dr hab. Roman Niżnikowski, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: roman_niznikowski@sggw.pl