

Przegląd badań genetycznych prowadzonych na gatunku *Bison bonasus*

Marlena Wojciechowska, Zuzanna Nowak, Wanda Olech

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, SGGW w Warszawie

The review of research about molecular genetics about European bison

Abstract: This presentation is a review of scientific reports in the scope of molecular genetics of European bison (*Bison bonasus*), in the years 1994 – 2011. Studies were grouped into chapters referring to coding sequences, non-coding sequences and the mitochondrial DNA. The first chapter includes among others publications concerning sequencing of gene fragments and analysis of their polymorphism. The part relating to non-coding sequences includes reports on microsatellite and single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are valuable genetic markers. This article summarized in a coherent entity the most significant achievements of European bison genome analysis, so this publication can be used as introductory into the world of molecular genetics of European bison.

Key words: European bison, molecular genetics, coding sequences, non-coding sequences, mitochondrial DNA

Żubr (*Bison bonasus*) jest największym dziko żyjącym, ssakiem lądowym w Europie. Na początku XX wieku istnienie gatunku było skrajnie zagrożone. Ostatni wolno żyjący osobnik w Puszczy Białowieskiej został zabity w 1919 roku. W 1924 roku na świecie pozostały jedynie 54 żubry o udokumentowanym pochodzeniu, należące do podgatunku nizinnego (*Bison bonasus bonasus*) oraz mieszańców z podgatunkiem kaukaskim (*Bison bonasus caucasicus*). Współcześnie w obrębie tego gatunku wyróżnia się dwie linie genetyczne: nizinną, zwaną też białowieską oznaczaną w dalszej części artykułu symbolem LB, która wywodzi się od 7 założycieli *B. b. bonasus* oraz nizinno-kaukaską (białowiesko-kaukaską), oznaczaną symbolem LC, której początek dały osobniki obu podgatunków, w tym ostatni i jedyny męski przedstawiciel *B. b. caucasicus* (Olech 1989; Bereszyński 1995; Olech 1999). Linia nizinna jest linią zamkniętą, linia nizinno-kaukaska – otwartą, co oznacza, że w obrębie tej linii znajdują się osobniki będące potomstwem zwierząt z linii nizinnej i nizinno-kaukaskiej. Efektem bardzo małej liczby założycieli jest wysoki poziom inbrodu, a w konsekwencji znaczna utrata zmienności genetycznej. Od początku restytucji prowadzona jest Księga Rodowodowa Żubrów, dzięki czemu możliwa jest wszechstronna analiza rodowodów zwierząt urodzonych w niewoli (Olech 2003). Jednak w populacjach wolno żyjących brak informacji o rodowodzie powoduje potrzebę zastosowania badań molekularnych. Na przestrzeni lat

prowadzono liczne badania zmierzające do poszerzenia wiedzy na temat genomu żubra, służące przede wszystkim określeniu stopnia zmienności, ale i poznaniu funkcjonowania wybranych genów w porównaniu z bydłem domowym.

W pracy przedstawiono przegląd publikacji dotyczących technik badań molekularnych służących ocenie genomu żubra. Zdecydowano się zaprezentować wyniki innych badaczy przy zastosowaniu podziału na sekwencje kodujące i niekodujące oraz zachowano porządek chronologiczny wyników. Prace omówiono z krótkim przedstawieniem celu wykonywanych badań. Opis ten stanowi przegląd badań genetycznych prowadzonych na gatunku *Bison bonasus*.

Sekwencje kodujące

Badania różnych genów przedstawicieli rodziny *Bovidae*, bądź prowadzone na gatunkach spoza tej rodziny przyczyniły się do opisanego wybranych sekwencji kodujących także dla gatunku *Bison bonasus*. W większości przypadków, opisanie sekwencji genów żubra miało charakter porównawczy, jednakże część tych badań była realizowana tylko dla tego gatunku. Opisywanie i identyfikacja genów u żubrów jest ułatwiona, ponieważ ich amplifikacja w większości przypadków jest możliwa z użyciem starterów wykorzystywanych dla gatunku *Bos taurus*, który jest modelowym gatunkiem w badaniach genetycznych przeżuwaczy.

W 1994 roku Udina i współautorzy, zamplikowali z użyciem starterów opisanych dla bydła domowego fragment genu kappa kazeiny- κ -CSN3 (ang.: kappa-casein), [U10379]. W nawiasach kwadratowych podany jest numer akcesyjny sekwencji znajdującej się w banku genów NCBI (National Center of Biotechnology Information). Kappa-kazeina jest najważniejszym białkiem mleka, odgrywa istotną rolę w odżywianiu młodych ssaków, wartość biologiczna κ -kazeiny dorównuje wartości białek mięsa. Badania przeprowadzone u myszy z wyłączonym genem, wykazały, że u tych zwierząt mimo produkcji pozostałych białek mleka, nie dochodziło do laktacji. (Shekar i wsp. 2006). U żubrów wyodrębniono (podobnie jak u bydła domowego) dwa allele tego genu: A i B. Z oczywistych względów, znajomość genotypu żubrów pod względem tego genu nie jest istotna z funkcjonalnego punktu widzenia, badania te jednak były jednymi z pierwszych mających na celu określenie ogólnej zmienności genetycznej. Udina i inni (1994) przebadali 24 osobniki linii białowieskiej (LB) i 14 osobników z linii białowiesko-kaukaskiej (LC) oraz przeprowadzili analizę porównawczą polimorfizmu fragmentu genu kappa kazeiny w obrębie linii genetycznych żubrów, jak również pomiędzy innymi gatunkami z rodziny krętorogich. Podobne badania w grupie 30 żubrów ze stada wolnościowego z Białowieskiego Parku Narodowego (linia nizinna) przeprowadzili w 1995 roku Burzyńska i Topczewski. Wynikiem ich badań było stwierdzenie u wszystkich badanych osobników tylko jednego genotypu – BB, oraz

zamieszczenie sekwencji fragmentu genu w bazie NCBI. Badania ekspresji genu kappa kazeiny przeprowadziła w 2009 roku Tokarska wraz z zespołem (2009a). Przeanalizowała ona 30 osobników linii nizinnej (LB) różnej płci. Badania nie wykazały związku między ekspresją genu a wiekiem, płcią i stanem fizjologicznym zwierząt.

Badania Udiny i współpracowników z 1994 roku miały na celu szacowanie zmienności również w obrębie bardzo ważnej grupy genów głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC (Major Histocompatibility Complex). Zespół analizował dwa geny z licznej rodziny: DQB oraz DRB.

DQB to gen należący do klasy I MHC, odpowiedzialny jest za wewnątrzkomórkową prezentację patogenów. Badaczom udało się jedynie amplifikować jeden fragment tego genu i stwierdzić, że różni się on długością od fragmentów amplifikowanych z pomocą tych samych starterów u bydła. DRB [AJ532828, AJ532829, EU099619-EU099625] jest genem kodującym łańcuch β cząsteczki DR, należącej do klasy II MHC (Łopieńska i in. 2003) i odpowiedzialny jest za pozakomórkową prezentację patogenu. W swoich badaniach Udina i inni (1994) uwzględnili tę samą grupę zwierząt, którą poddają analizie badając zmienność genu kappa kazeiny. Metoda analizy zmienności w obrębie genu DRB zastosowana przez Udinę i współautorów w późniejszych badaniach prowadzonych przez inne zespoły niebyła powtarzana. Badania pod kierunkiem Udiny dowiodły małej zmienności w obrębie genu DRB (uzyskane 2 formy alleliczne) w porównaniu z bydlęciem (7 form allelicznych). W 1998 Udina i Shaikhaev opublikowali pracę dotyczącą zmienności w genie DRB. Analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych w 2 eksonie omawianego genu, przeprowadzili w grupie 21 żubrów należących do dwóch linii genetycznych: białowieskiej (LB) oraz białowiesko-kaukaskiej (LC). W badaniach wykorzystali dwa enzymy restrykcyjne HaeIII oraz RsaI. Po zastosowaniu endonukleazy HaeIII badacze uzyskali trzy wzory cięcia a , b i c , ich frekwencja w obu liniach była rozbieżna. W linii białowieskiej wzór a odnotowano u 18,1% zwierząt, natomiast w linii białowiesko-kaukaskiej wystąpił on aż u 70% żubrów. W przypadku cięcia restryktazą RsaI otrzymali 6 wzorów (a , f , k , m , q , s). U żubrów z linii białowiesko-kaukaskiej pojawiły się cztery z nich: a , f , q oraz s , a najwyższą frekwencją odznaczały się f i s (0,35). Najwyższą frekwencję w linii LB Udina i Shaikhaev (1998) odnotowali dla wzoru a (0,50), z kolei wzór s w tej populacji nie występował. Porównując kombinację wzorów z obu cięć autorzy stwierdzili, że połączenie a (RsaI) i b (HaeIII) występowało najczęściej u zwierząt z linii białowieskiej (0,5), natomiast układ s (RsaI) i a (HaeIII), który odnotowano u 50% żubrów z linii białowiesko-kaukaskiej, nie pojawił się w linii LB.

Łopieńska i wsp. (2003) tą samą metodą, poszerzoną o analizę RFLP z użyciem enzymu BstYI, badali 30 żubrów linii nizinnej i 8 linii nizinno-kaukaskiej. W wyniku trawienia enzymem HaeIII otrzymano 4 wzory restrykcyjne: a , b , f oraz wzór wcześniej nieopisany, który wystąpił u jednego

osobnika. Wśród żubrów linii białowieskiej najwyższą frekwencję odnotowano dla wzoru *b* (0,633), a najniższą dla *f* (0,150). Podobnie w linii białowiesko-kaukaskiej dominował wzór *b* (0,786), natomiast nie stwierdzono obecności wzoru *a*, który w badaniach Udiny i Shaikhaeva z 1998 występował u zwierząt z tej linii z frekwencją 0,7. Zastosowanie endonukleazy RsaI ujawniło 4 wzory cięcia: *a*, *f*, *g* i *s*, ponadto jeden osobnik posiadał wzór nieodnotowany wcześniej w literaturze. Łopieńska i in. (2003) w obu liniach genetycznych odnotowali najwyższą frekwencję dla wzoru *a* (LB – 0,633 oraz LC – 0,857). Wzory *g* i *f* u żubrów z linii białowieskiej występowały z najmniejszą częstością (0,033 i 0,067), a nie stwierdzono ich wśród zwierząt z linii białowiesko-kaukaskiej. W przypadku cięcia enzymem BstYI uzyskano 2 wzory *a* i *b*, z czego u żubrów obu linii dominującym był wzór *a*. Również Radwan i współautorzy w 2007 roku badali zmienność w obrębie genu DRB poprzez sekwencjonowanie fragmentu długości ok. 230 par zasad. Analizie poddano 172 żubry różnej płci z Białowieskiego Parku Narodowego, urodzone w latach 1992–2006. Wynikiem tych badań było opublikowanie 2 sekwencji [DQ785799, DQ785800] będących nowymi haplotypami badanego regionu dla żubra. Badacze szukali również związku pomiędzy obecnością określonego haplotypu (bądź kombinacji haplotypów) a występowaniem nekrotycznego zapalenia napletka (*balanoposthitis*) – choroby diagnozowanej u żubrów w rejonie Puszczy Białowieskiej. Nie stwierdzono powiązania między genotypem a występowaniem schorzenia. W 2011 Łopieńska i wsp. opublikowali wyniki badań polimorfizmu w obrębie genów DQA [EU153369 do EU153374] należących do rodziny MHC. Analizie poddano ekson 2 genów DQA1 i DQA2. W badaniach uwzględniono 200 żubrów linii białowieskiej oraz 56 osobników z linii białowiesko-kaukaskiej. W wyniku zastosowania metody SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism) w przypadku eksonu 2 genu DQA1 otrzymano dwa genotypy homozygotyczne oznaczone kolejno symbolami *a* i *b*). Frekwencja genotypu „*a*” kształtowała się na poziomie 0,494 dla linii białowieskiej oraz 0,513 dla linii białowiesko-kaukaskiej, natomiast frekwencja genotypu „*b*” wynosiła odpowiednio 0,506 i 0,487. Ta sama metoda zastosowana wobec eksonu 2 genu DQA2 pozwoliła ustalić występowanie trzech alleli i czterech genotypów oznaczonych symbolami (*c*, *d*, *e*, *f*), z czego tylko genotyp *f* był heterozygotyczny. W obu liniach genetycznych najwyższą frekwencją charakteryzował się genotyp *c* (LB 0,540 i LC 0,442). U żubrów z linii LB frekwencja pozostałych genotypów wynosiła odpowiednio 0,215, 0,060 oraz 0,185. W przypadku linii LC odnotowano występowanie trzech genotypów *c*, *d* (0,186) oraz *f* (0,72). Analiza statystyczna wykazała, że frekwencje genotypów eksonu 2 genu DQA2 różniły się istotnie między obiema liniami genetycznymi żubrów. Ponadto odnotowano obecność czterech haplotypów (DQA1, DQA2, DQA1/DQA2 oraz DQA1/DQA2-2), z czego dwa były wspólne dla obu linii. Haplotyp DQA1 występował tylko u osobników z linii LC, a jego frekwencja wynosiła 0,232. Unikatowym haplotypem dla żubrów z linii LB był

DQA1/DQA2-2, który posiadało 6% przebadanych zwierząt z tej linii. Różnice w częstości występowania poszczególnych haplotypów w obu liniach genetycznych okazały się wysoko istotne statystycznie.

Informacje na temat kolejnych genów ukazały się dopiero w 2004 roku. Verkaar i współautorzy (2004a) w celu wyjaśnienia organizacji i ewolucji genu TSPY (ang.: testis-specific protein Y-encoded) u bydła, poddali analizie jego fragment obejmujący ekson 5 i 6 oraz rozdzielający je intron 5. Wymienioną sekwencję przeanalizowano u 6 gatunków zwierząt z rodziny *Bovidae*, w tym u żubra [AY347592]. Produkt genu TSPY syntetyzowany jest w spermatogoniach i prawdopodobnie zaangażowany jest we wczesną spermatogenezę. Szacuje się, że u bydła występuje od 50 do 200 kopii genu TSPY. W badaniach zidentyfikowano dwa typy loci: monomeryczne TSPY-M oraz klastry TSPY-C, z których większość zlokalizowana jest w krótkim ramieniu chromosomu Y. Przeanalizowanie wymienionego fragmentu w wariantach TSPY-M1 genu, pozwoliło na identyfikację 5 miejsc polimorficznych odróżniających sekwencję żubra od korespondującej z nią sekwencji bydła domowego [AY347587].

W tym samym roku Verkaar i współautorzy (2004b) na podstawie sekwencji fragmentów genów SRY i ZFY, których loci znajdują się w chromosomie Y oraz genów zlokalizowanych w DNA mitochondrialnym, dokonali analizy filogenetycznej zwierząt należących do plemienia *Bovini*. Gen SRY (ang.: sex determining region Y) nie posiada intronów, a kodowane przez niego białko TDF (testis-determining factor), jest czynnikiem determinującym rozwój jąder. W centralnej części białka znajdują się domena HMG (high mobility group) (Daneau i wsp. 1995). ZFY (ang.: zincfinger protein, Y-linked) koduje białko, które jest czynnikiem transkrypcyjnym, prawdopodobnie działającym aktywnie na transkrypcję. Początkowo uważano, że jest ono czynnikiem determinującym tworzenie się jąder. (źródło internetowe 1). Analiza sekwencji z chromosomu Y żubra [AY079142; AY079134] wskazuje na bliski jego związek z bizonem, co ma również odzwierciedlenie w polimorfizmie długości amplifikowanych fragmentów (AFLP), zbliżonym wyglądzie morfologicznym oraz płodności hybryd (Verkaar i wsp. 2004b). W 2008 roku Nijman i współautorzy opublikowali uaktualnione sekwencje genów SRY [DQ336533, DQ336553] i ZFY [DQ336543] dla żubra. W swych badaniach uzyskali wyniki zbieżne z wcześniej opisanymi przez Verkaar i współautorów (2004b).

Weikard i współautorzy w 2006 roku poddali analizie gen amelogeniny AMEL (ang.: amelogenin). Amelogenina jest białkiem odgrywającym istotną rolę w tworzeniu się szkliwa nazębnego. Gen amelogeniny zlokalizowany jest w obu chromosomach płci, w regionie pseudoautosomalnym. U wielu gatunków zwierząt zaobserwowano różnice w długości sekwencji homologów genu AMEL w zależności od tego, czy znajdują się on w chromosomie X (AMELX) czy też Y (AMELY). Ma to duże znaczenie w identyfikacji płci na poziomie molekularnym. W swych badaniach Weikard i inni (2006) stosując startery opisane dla bydła, amplifikowali fragment genu z DNA pochodzącego od

9 gatunków zwierząt należących do rodziny *Bovidae*, w tym od żubrów. Po rozdziale elektroforetycznym produktu PCR, uzyskali dwa fragmenty różniące się długością zależne od płci, w przypadku samic był to fragment długości 280pz, natomiast u samców były to dwa prążki: 280pz oraz 217pz. W obu przypadkach fragmenty genu zostały wycięte z żelu i oczyszczone oraz poddane sekwencjonowaniu, a otrzymane sekwencje opublikowano w banku genów NCBI [DQ469594; DQ469595].

Maj i Zwierzchowski w 2006 roku przeprowadzili badania mające na celu ujawnienie wewnątrz-i międzygatunkowej zmienności sekwencji genu receptora hormonu wzrostu GRH (ang.: growth hormone receptor) [AY739711, AY243962] w rodzinie krętorogich, oraz zlokalizowanie mutacji, które wystąpiły w toku ewolucji 12 analizowanych gatunków, włączając w to również żubra. Kodowane przez gen białko jest receptorem powierzchniowym komórki, należącym do nadrodziny receptorów cytokin hemopoetycznych. W badanych fragmentach niekodującego eksonu 1A oraz kodującego eksonu 4 genu GRH zaobserwowano różnice między podrodzinami *Bovinae* i *Caprinae*, natomiast nie stwierdzono zmienności w obrębie gatunków należących do *Bovinae*. Kolejne badania genu GRH dotyczyły już bezpośrednio żubrów. Flisikowski i współautorzy w 2007 roku poddali analizie 22 losowo wybrane osobniki (3 samce i 19 samic) z Białowieskiego Parku Narodowego. Badania miały na celu po raz kolejny ocenę polimorfizmu sekwencji nukleotydowej w wybranych *loci* genów, jak również dostarczenie nowych informacji na temat zróżnicowania genetycznego w obrębie gatunku oraz porównanie wybranych sekwencji z korespondującymi sekwencjami bydłęcymi. Analiza niekodującego regionu 5' wykazała obecność zróżnicowanej liczby tandemowych powtórzeń nukleotydów TG (STR-short tandem repeat). Osiemnaście żubrów posiadało allel z 19 powtórzeniami TG, natomiast 4 osobniki były heterozygotyczne i posiadały allele TG14 oraz TG19. W tych samych badaniach analizie poddano gen receptora estrogenowego ER α (ang.: estrogen receptor α) [AY340597], kodowane przez gen białko jest czynnikiem transkrypcyjnym, który po związaniu odpowiedniego ligandu (17 β -estradiolu, estronu lub estriolu) jest zdolny do regulacji transkrypcji genu. (Szreder i Zwierzchowski 2004). W niekodującym regionie 5' genu ER α Flisikowski i wsp. zlokalizował tranzycję A/G. Na 22 badane żubry dwa były heterozygotami AG, natomiast pozostałe osobniki posiadały genotyp GG. Kolejnym badaniem przez Flisikowskiego i wsp. (2007) genem był STAT5A (ang.: signal transducer and activator of transcription 5A) [AY280368] białko kodowane przez ten gen jest czynnikiem transkrypcyjnym należącym do rodziny STAT. Pod wpływem cytokin i czynników wzrostu, białko to ulega fosforylacji. W formie homo-i heterodimerów jest aktywatorem transkrypcji (źródło internetowe 2). Autorzy w regionie promotora i w intronie 1 stwierdzili obecność dwóch miejsc polimorficznych typu STR. W przypadku promotora, było to 8 lub 9 powtórzeń nukleotydów CA. Na 22 badane osobniki, 13 posiadało genotyp CA8/8, dwa żubry były homozygotami CA9/9,

a pozostałe zwierzęta – heterozygotami CA8/9. Ponadto analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych poddano 4 eksony genu β -laktoglobuliny LGB (ang.: β -lactoglobulin), która jest jednym z głównych białek mleka u przeżuwaczy. U krów zbudowane jest ono ze 162 aminokwasów. Jak dotychczas poznano 12 wariantów LGB, z czego największą frekwencją wykazują się A i B, różniące się dwoma aminokwasami (Rachagani i wsp. 2006). Flisikowski i wsp. (2007) w badanej grupie 22 żubrów uzyskali trzy genotypy, wzór AA posiadały trzy osobniki, heterozygotami AB było 13 zwierząt, natomiast sześć żubrów było homozygotami BB.

W 2007 roku Hassanin i Ropiquet przy okazji badań zmierzających do ustalenia statusu taksonomicznego *Bos sauveli* (kuprej) poddali analizie sekwencyjnej m.in. fragmenty genów tyreoglobuliny i beta-fibrynogeny u żubra i 6 innych gatunków z podplemienia *Bovina*. Gen TG (ang.: thyroglobulin) [EF693864] – tyreoglobulina jest glikoproteiną syntetyzowaną w komórkach pęcherzykowych tarczycy. U bydła gen TG zlokalizowany jest w chromosomie 14. Autorzy w fragmencie genu TG zlokalizowali 5 pozycji odróżniających sekwencje nukleotydów żubra od bizona oraz 7 odróżniających go od bydła domowego rasy Limousin. Drugim analizowanym genem był FGB (ang.: beta-fibrinogen) [EF693836] – koduje on jeden z łańcuchów polipeptydowych fibrynogeny, który jest białkiem osocza. Funkcjonalna cząsteczka fibrynogeny jest heteroheksamerem składającym się z dwóch podjednostek, z których każda zawiera 3 łańcuchy polipeptydowe (α , β i γ). Bierze on udział w procesie krzepnięcia krwi. U bydła beta-fibrynogen składa się z 468 aminokwasów (źródło internetowe 3). Hassanin i Ropiquet (2007) w badanym fragmencie genu FGB nie stwierdzili rozbieżności między sekwencją nukleotydową żubra i bizona, natomiast od bydła domowego, żubr różnił się 5 nukleotydami.

Iso-Touru i współautorzy w 2009 dokonali oceny polimorfizmu w sekwencji kodującej cytoplazmatyczną domenę receptora prolaktyny u różnych gatunków zwierząt parzystokopytnych. PRLR (ang.: prolactin receptor) [FJ901278, FJ901279, FJ901280] receptor prolaktyny, podobnie jak GHR należy do klasy I nadrodziny receptorów cytokin. Związanie ligandu, jakim jest prolaktyna indukuje homo- i heterodimeryzację receptorów, powodując przesłanie sygnału do wnętrza komórki. Analizie poddano sekwencję 891 par zasad z 10 eksonu genu PRLP. Na podstawie 5 przebadanych żubrów, w regionie tym czterokrotnie wykazano polimorfizm typu jednonukleotydowych podstawień SNP (ang.: Single Nucleotide Polymorphism). W trzech przypadkach, zamiana pojedynczego nukleotydu spowodowała zmianę sekwencji aminokwasowej receptora prolaktyny, mutacje zostały nazwane: E384K, Q397K, M446V. Odnosząc się do uzyskanych wyników autorzy opracowali dla żubra trzy haplotypy genu: Bbo-PRLR1, Bbo-PRLR2 oraz Bbo-PRLR3, przy czym ostatni jest identyczny z haplotypem Bbi-PRLR3 bizona (Iso-Touru i wsp. 2009).

Jedne z najnowszych opublikowanych badań sekwencji kodujących dotyczyły genów ZP2 i ZP3 (ang.: zona pellucida glycoprotein) [HM631677]

i [HM631709], są to geny kodujące glikoproteiny osłonki przejrzystej. Uważa się, że białka te odpowiedzialne są za ograniczone gatunkowo wiązanie plemników oraz indukowanie reakcji akrosomowej, a tym samym zapobieganie polispermii. U ssaków uniemożliwiają zapłodnienie międzygatunkowe, co prawdopodobnie zapewnia rozrodczą izolację między gatunkami. Ewolucyjny związek między niektórymi przedstawicielami plemienia *Bovini*, pozwala na przekroczenie tej bariery. Chen i współautorzy w 2011 roku przeprowadzili ocenę zmienności genetycznej na poziomie wewnątrz-i międzygatunkowym wśród 7 gatunków reprezentujących plemię *Bovini*, w tym 2 osobników żubra. W obu badanych sekwencjach (310pz z genu ZP2 oraz 279pz z genu ZP3) u żubra nie stwierdzono występowania SNP.

Sekwencje niekodujące

W ciągu ostatnich lat sekwencje mikrosatelitarne stały się najpopularniejszym źródłem markerów genetycznych, wykorzystywanych w wielu dziedzinach genetyki. Są popularne dzięki swojej zawdzięczają wysokiemu stopniowi polimorfizmu. Mikrosatelity są sekwencjami jedno-, dwu-, trzy- lub czternukleotydowymi rozproszonymi równomiernie w całym genomie, w postaci tandemowo powtarzających się motywów podstawowych. Sekwencje te dzięki dużej homologii fragmentów flankujących powtarzający się motyw mogą być stosowane wymiennie dla różnych gatunków z tej samej grupy taksonomicznej.

W 2004 roku Gralak i współautorzy poddali analizie polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych DNA żubra, wykorzystując w tym celu startery stosowane u bydła, oraz rozpatrzyli możliwość ich wykorzystania w badaniu struktury genetycznej populacji żubrów. Materiał użyty do badań pochodził od 22 żubrów z linii LB z Białowieskiego Parku Narodowego: 5 osobników (2 samce i 3 samice) w wieku od 4 do 22 miesięcy z hodowli zamkniętej oraz 17 zwierząt (1 samiec i 16 samic) w wieku od 6 miesięcy do 18 lat, pochodzących ze stada wolnościowego. Do amplifikacji autorzy zastosowali 27 par starterów. Produkt uzyskali w przypadku 21 *loci*, 8 z nich było monomorficznych. Wśród pozostałych mikrosatelit liczba alleli w locus wynosiła od 2 do 3, natomiast współczynnik heterozygotyczności oczekiwanej H_e wahał się od 0,13 do 0,53. W sumie autorzy wyodrębnili 40 alleli, z czego 2 okazały się specyficzne dla żubra. Był to allel 74pz z monomorficznego locus TGLA227 oraz allel 89pz z locus CSRM60.

Kolejne badania sekwencji mikrosatelitarnych w 2005 roku przeprowadzili Luenser i współautorzy. Analizie poddali 38 osobników (20 samców i 18 samic) z Białowieskiego Parku Narodowego, odstrzelonych w latach 2001–2004. W badaniach wykorzystali 18 par starterów opisanych dla bydła domowego, produkt amplifikacji otrzymali w przypadku 14 mikrosatelit, z czego 9 było polimorficznych. Łącznie uzyskali 24 allele, dla poszczególnych loci liczba ta wahała się między 2 a 4. Współczynnik heterozygotyczności oczekiwanej wahał się od 0,251 do 0,663, a obserwowanej od 0,289 do 0,737.

W 2006 roku Roth i współautorzy poddali analizie 35 żubrów z czterech niemieckich ogrodów zoologicznych. Również te badania miały na celu ocenę możliwości wykorzystania markerów mikrosatelitarnych rutynowo stosowanych do kontroli pochodzenia u bydła domowego w analizie zmienności genetycznej żubra. Autorzy zastosowali 11 par starterów, w sumie otrzymując 26 alleli. Współczynnik heterozygotyczności oczekiwanej wynosił od 0,288 do 0,621; a obserwowanej 0,086 – 0,629.

W roku 2008, Nowak i Olech badały zmienność mikrosatelitarną w obrębie chromosomów płci u żubrów. Badania objęły 84 żubry urodzone w latach 1950–70 i 175 żubrów żyjących współcześnie. Wszystkie zwierzęta zostały podzielone na linie ojcowskie i mateczne. W badaniach wykorzystano cztery sekwencje mikrosatelitarne amplifikujące się w regionach pseudoautosomalnych chromosomów płci: INRA30; INRA126; INRA189 i TGLA325. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono jednoznaczną utratę zmienności u zwierząt współczesnych (redukcja identyfikowanych alleli u osobników współczesnych względem żubrów urodzonych w latach 1950–70) i dodatkowo tendencję do „spłaszczenia genetycznego” populacji współczesnych, czyli wyrównywania frekwencji alleli i zaniku alleli charakterystycznych dla linii.

Najnowszym osiągnięciem technik molekularnych w dziedzinie szacowania zmienności genetycznej są stosowane od kilku lat mikromacierze określające polimorfizm jednonukleotydowy (SNP) w różnych miejscach genomu jądrowego. Mutacje te są rozproszone w całym genomie i nierzadko powiązane ze zmiennością miejsc kodujących. Mikromacierze pozwalają na jednoczesną analizę kilkudziesięciu tysięcy takich miejsc. Skanowanie genomu przy zastosowaniu rozbudowanego panelu SNP jest obiecującym narzędziem w genotypowaniu zwierząt. Tokarska i współautorzy (2009b) zastosowali mikromacierze SNP opracowane dla bydła oraz sekwencje mikrosatelitarne dla opisanego i porównania efektywności tych markerów genetycznych, w analizie pokrewieństwa i identyfikacji żubrów z linii białowieskiej. Analiza sekwencji mikrosatelitarnych prowadzona była u 276 żubrów urodzonych na przestrzeni lat 1985–2006, zaś genotypowanie SNP przeprowadzono u 50 żubrów urodzonych w latach 1980–2006. W analizie mikrosatelit zastosowano 20 par starterów opisanych dla bydła domowego i jedną parę starterów stosowanych w badaniach reniferów (*Rangifer tarandus*), wśród nich 17 loci okazało się polimorficznych, liczba zidentyfikowanych alleli w pojedynczym locus wynosiła od 2 do 5, a współczynnik H_e wahał się od 0,008 do 0,654. Analizę SNP przeprowadzono przy użyciu BovineSNP50 BeadChip (Illumina). Z ponad 52,9 tysięcy loci rozlokowanych na mikromacierzy, tylko 960 okazało się polimorficznych u żubra. Średnia heterozygotyczność oczekiwana wynosiła 0,31. Badania te wykazały, że przy bardzo niskiej heterozygotyczności otrzymanej po analizie panelu 17 mikrosatelit, analiza pokrewieństwa i identyfikacja osobnicza nie może być w pełni wykonana. Z kolei symulacja z użyciem panelu złożonego z 80–90 losowo wybranych markerów SNPs, bądź 50–60 markerów z najwyższą

heterozygotycznością wskazuje, że byłoby to wystarczające. Badania z zastosowaniem BovineSNP50 BeadChip (Illumina) kontynuowali Pertoldi i wsp. (2009). Analizie poddano 50 żubrów z Puszczy Białowieskiej, łącznie 51 osobników z dwóch podgatunków bizona oraz w celach porównawczych 216 osobników różnych ras bydła domowego. Spośród 52 978 SNPs rozmieszczonych na mikromacierzy, 929 okazało się polimorficzne u żubra. Oczekiwana heterozygotyczność dla żubra była najniższa wśród badanych gatunków i wynosiła $H_e=0,135$.

DNA mitochondrialny

Genom mitochondrialny (mtDNA) to kolistą cząsteczka DNA o długości ok. 16,5 kilo par zasad, która w wielu kopiach znajduje się w mitochondriach. Ze względu na swoją lokalizację mtDNA koduje 13 podjednostek wewnętrz błonowego kompleksu oddechowego. Ze względu na stosunkowo niewielką długość sekwencji mtDNA wielu gatunków zwierząt zostały już poznane. W 1982 roku Anderson zsekwencjonował genom mitochondrialny bydła domowego (16337pz). Mitochondrialny DNA charakteryzuje się tym, że przekazywany jest potomstwu tylko w linii matecznej (Brown 2001). Ponadto różni się od DNA jądrowego ilością zmian nukleotydowych. Ze względu na brak mechanizmów naprawczych zmiany nukleotydowe zasze tu na skutek mutacji znacznie częściej niż w genomie jądrowym nie podlegają procesom naprawczym. W związku z tym niektóre regiony mtDNA wykazują dużą zmienność międzygatunkową, a inne pozostają wysoce konserwowane. Geny oksydaz cytochromowych i regionu kontrolnego, ze względu na wysoką zmienność wykorzystywane są do identyfikacji gatunkowej, a konserwowane geny podjednostek 12, 16sRNA oraz cytochromu B wykazują podobieństwo nawet u bardzo oddalonych filogenetycznie gatunków.

Geny oksydaz cytochromowych są najczęściej wykorzystywanymi fragmentami genomu mitochondrialnego do identyfikacji gatunkowej. Janecek i współautorzy (1996), zsekwencjonowali podjednostkę II oksydazy cytochromowej COII (ang. cytochrome c oxidase subunit II) [U62567] różnych gatunków rodziny *Bovidae*, w tym dwóch żubrów. Ich celem była ocena wartości filogenetycznej danych uzyskanych na podstawie sekwencji mitochondrialnego DNA w podrodzinie *Bovinae*. Procentowa rozbieżność sekwencji długości 684pz żubra od sekwencji bydła domowego równa się 4,81%, z kolei między sekwencją żubra i bizona różnica ta wynosi 6,21%. W 2004 roku również Verkaar i współautorzy (2004b) poddali analizie filogenetycznej sekwencji w obrębie genów cytochromu b (874pz), oksydazy cytochromowej II (517pz) oraz fragmentu z regionu kontrolnego D-loop (ang. displacement-loop) (522pz) u zwierząt z rodziny krętorogich. Po wykonaniu szeregu analiz autorzy zgrupowali badane sekwencje zwierząt z rodzajów *Bos* i *Bison* w cztery linie. Pierwsza obejmowała bydło domowe (*Bos taurus*) i zebu (*Bos indicus*), do

drugiej zakwalifikowano żubra (*Bison bonasus*), w trzeciej wyodrębniono bizona (*Bison bison*) oraz jaka (*Bos grunniens*), natomiast w czwartej linii znalazły się: gaur (*Bos gaurus*), banteng (*Bos javanicus*) oraz gajal (*Bos frontalis*). Dane uzyskane na podstawie analizy sekwencji COII wskazują, że na drodze ewolucji nastąpiło wczesne odłączenie się gatunku *Bison bonasus*, nie ma to jednak potwierdzenia w danych otrzymanych w przypadku regionu kontrolnego żubra [AY428860] oraz Cyb [AY079126], którego sekwencja jest bliżej związana z sekwencjami zwierząt przypisanych do pierwszej grupy. W 2004 roku Hassanin i Ropiquet przeprowadzili analizę filogenetyczną plemienia *Bovini*, do którego przynależy żubr, w celu ustalenia statusu taksonomicznego gatunku *Bos sawveli*. Jednym z efektów tych badań było opublikowanie w NCBI sekwencji genów żubra: COII [AY689198] i cytochromu b Cyb (ang. cytochrome b) [AY689186]. Na podstawie analizowanych sekwencji DNA mitochondrialnego stwierdzono, że stopień pokrewieństwa między gatunkami *Bos taurus* i *Bison bonasus* jest większy niż między żubrem a bizonem, należącymi do tego samego rodzaju. W roku 2009 Wójcik i współautorzy na podstawie fragmentu sekwencji mitochondrialnego DNA dokonali oceny zmienności genetycznej w wśród 195 żubrów z Puszczy Białowieskiej. Ponadto celem badań było oszacowanie frekwencji występowania heteroplazmii i jej ewentualnego związku z zachorowalnością na nekrotyczne zapalenie napletka. Fragment długości 1429pb amplifikowany był u 87 osobników. W efekcie uzyskano trzy haplotypy, różniące się ilością cytozyn w regionie poli-C. U 81 żubrów stwierdzono obecność 8 cytozyn (Bibo-8C) [EU272053], 5 osobników posiadało haplotyp Bibo-7C [EU272054], natomiast u jednego żubra zaobserwowano dziewięć cytozyn (Bibo-9C) [EU272055]. W dalszych analizach, zaobserwowano obecność heteroplazmii u 43 osobników, w tym u 15 samic, 17 samców ze stwierdzonym *balanoposthitis* i 11 zdrowych samców, jednak nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między występowaniem schorzenia a heteroplazmią.

W 1999 roku Ward i współautorzy opisali sekwencję pętli D [AF083370] w odniesieniu do potencjalnej introgresji bydła domowego u bizonów i żubrów. W doniesieniach Nowak i in. z roku 2005 i 2008 również można znaleźć informacje na temat potencjalnej introgresji między tymi dwoma rodzajami w odniesieniu do ewolucji gatunku *Bison bonasus* z udziałem nieudomowionego przodka europejskiego bydła domowego *Bos primigenius*. Nowak i współautorzy (2008b) opisują badania hiper-zmiennego odcinka d-loop u żubrów i szczątków turów znalezionych na terenie Polski. W badaniach tych opisany fragment pętli D został poddany sekwencjonowaniu i porównany zarówno w obrębie jak i pomiędzy gatunkami takimi jak żubr, tur, bydło domowe i bizon. Badania wykazały, że żubry wykazują większe podobieństwo filogenetyczne do tura niż do współczesnego bydła domowego, podobnie jak bizon wykazuje podobieństwo filogenetyczne z jakiem. Oczywiście zarówno żubr jak i bizon stanowią najbliższą filogenetycznie parę jako przedstawiciele swojego rodzaju. W roku

2009, Wójcik i współautorzy zsekwencjonowali kolejny fragment pętli D [EU272055] i analizowali go pod kątem utraty zmienności u wolno żyjących żubrów Puszczy Białowieskiej. W 2010 roku do bazy NCBI zostały wpisane kompletne sekwencje genomu mitochondrialnego żubra [HM045017; NC-014044; HQ223450], umieszczone niezależnie przez badaczy polskich i amerykańskich.

Historia odtworzenia gatunku *Bison bonasus* wskazuje, że przeszedł on tzw. efekt szyjki od butelki. Opisane w niniejszym przeglądzie badania genetyczne prowadzone na żubrach potwierdzają to zjawisko. Poszerzenie wiedzy na temat zmienności genetycznej w tak specyficznej populacji zwierząt jaką stanowią żubry jest niezwykle ważne m.in. w prowadzeniu programów hodowlanych. Żubry mogą stanowić bowiem idealny model populacji świadomie kontrolowanej przez człowieka, z uwzględnieniem wielu źródeł informacji-rodowodowej i pozyskiwanej poprzez analizę kolejnych obszarów genomu.

Piśmiennictwo:

- Anderson, S., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F., Young, I.G. 1982, The complete sequence of bovine mitochondrial DNA: Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.*, 156: 683 – 717.
- Bereszyński A. 1995, Żubr – polska duma, *Przyroda Polska* 1, p: 5–6
- Brown, T.A. 2001, *Genomy*. Warszawa, PWN
- Burzyńska B., Topczewski J. 1995, Genotyping of *Bison bonasus* β -casein gene following DNA sequence amplification. *Animal Genetics* 26: 335–336.
- Chen S., Costa V., Beja-Pereira A. 2011, Evolutionary patterns of two major reproduction candidate genes (Zp2 and Zp3) reveal no contribution to reproductive isolation between bovine species. *BMC Evolutionary Biology*, 11:24
- Daneau I, Houde A, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW. 1995, Bovine SRY gene locus: cloning and testicular expression. *Biol Reprod.*;52(3):591–599
- Flisikowski K., Krasieńska M., Maj A., Siadkowska E., Szreder T., Zwierzchowski L., Żurkowski M., 2007, Genetic polymorphism in selected gene loci in a sample of Białowieża population of European bison (*Bison bonasus*). *Animal Science Papers and Reports* vol. 25 no. 4, 221–230
- Gralak B., Krasieńska M., Niemczewski C., Krasieński Z.A., Żurkowski M. 2004, Polymorphism of bovine microsatellite DNA sequences in the lowland European bison. *Acta Theriologica* 49 (4): 449–456
- Hassanin A., Ropiquet A. 2007, Resolving a zoological mystery: the kouprey is a real species. *Proc. Biol. Sci.* 274 (1627), 2849–2855
- Iso-Touru T., Kantanen J., Li M.H., Gizejewski Z., Vilkki J. 2009, Divergent evolution in the cytoplasmic domains of PRLR and GHR genes in Artiodactyla. *BMC Evolutionary Biology*, 9:172
- Janecek L.L., Honeycutt R.L., Adkins R.M., Davis, S.K. 1996, Mitochondrial gene sequences and the molecular systematic of the artiodactyl subfamily Bovinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6, 107–119.
- Łopieńska M., Nowak Z., Charon K.M., Olech W. 2003, Ocena polimorfizmu wybranego regionu MHC w dwóch liniach genetycznych żubrów (*Bison bonasus* L.) *Zesz. Nauk. PTZ* 68: 17–24
- Łopieńska M., Nowak Z., Charon K.M., Olech W., 2011, A comparison of polymorphism of DQA genes in European bison belonging to two genetic lines: Lowland and Lowland-Caucasian, *Ann. Warsaw Univ. of Life Sc. – SGGW, Anim. Sci.* 49: 93–102

- Luenser K., Fickel J., Lehnen A., Speck S., Ludwig A. 2005, Low level of genetic variability in European bison (*Bison bonasus*) from the Białowieża National Park in Poland. *Eur J Wildl Res* 51: 84–87
- Maj A. and Zwierzchowski L. 2006, Molecular evolution of coding and non-coding sequences of the growth hormone receptor (GHR) gene in the family Bovidae. *Folia Biol. (Kraków)* 54 (1–2), 31–36
- Nijman I.J., van Bostel D.C.J., van Cann L.M., Marnoch Y., Cuppen E., Lenstra J.A. 2008, Phylogeny of Y chromosomes from bovine species. *Cladistics* 24, 723–726
- Nowak Z., Jagońkowska-Tkaczuk P., Olech W., Charon K.M. 2005, Czy możemy mówić o introgresji gatunku *Bos taurus* w polskiej populacji żubra?, Zmiany w populacji ssaków jako pochodna dynamiki zmian środowiska, Zespół Metod i Organizacji Hodowli Zwierząt Gospodarskich i Wolno Żyjących, 17–24
- Nowak Z., Olech W. 2008, Verification of phylogenetic hypothesis concerning the evolution of genus *Bison*, *Ann. Warsaw Univ. of Life Sci.-SGGW, Anim. Sci.* 45, 65–72
- Nowak Z., Olech W. 2008, Zmienność mikrosatelitarna w obrębie chromosomów płci u żubrów, *European Bison Conservation Newsletter*, 1, 72–78
- Olech W. 1989, The participation of ancestral genes in the existing population of European bison, *Acta Theriologica* vol. 34, 29: 397–407
- Olech W. 1999, The number of ancestors and their contribution to European bison (*Bison bonasus* L.) population, *Ann. Warsaw Agricult. Univ. – SGGW, Anim. Sci.* 35:111–117
- Olech W. 2003, Wpływ inbredu osobniczego i inbredu matki na przeżywalność cieląt żubra (*Bison bonasus*). *Rozprawy Naukowe i Monografie, SGGW Warszawa*, pp: 1–86.
- Pertoldi C., Wójcik J.M., Tokarska M., Kawałko A., Kristensen T.N., Loeschcke V., Gregersen V.R., Coltman D., Wilson G.A., Randi E., Henryon M., Bendixen C. 2009 Genome variability in European and American bison detected using the BovineSNP50 BeadChip. *Conserv Genet* 11:627–634
- Rachagani S., Gupta I.D., Gupta N., Gupta S.C. 2006, Genotyping of β -Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. *BMC Genetics* 7:31
- Radwan J., Kawałko J., Wójcik M., Babik W. 2007, MHC-DRB3 variation in free-living population of the European Bison, *Bison bonasus*. *Molecular Ecology* 16, 531–540
- Roth T., Pfeiffer I., Weising K., Brenig B. 2006, Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of European bison (*Bison bonasus*). *J. Anim. Breed. Genet.* ISSN 0931–2668
- Shekar P. C., Goel S., Rani S.D.S., Sarathi D.P., Alex J.L., Singh S., Kumar S. 2006, Casein-deficient mice fail to lactate. *PNAS* vol. 103, no. 21: 8000–8005
- Szreder T. and Zwierzchowski L. 2004, Polymorphism within the bovine estrogen receptor-alpha gene 5'-region. *J. Appl. Genet.* 45 (2), 225–236
- Tokarska M., Ruczyńska I., Zalewska H., Wójcik A.M. 2009a, Over-Seasonal and Sex-Independent Expression of Kappa Casein Gene (CSN3) in Mammalian Blood Lymphocytes. *Biochem Genet* 47:602–608
- Tokarska M., Marshall T., Kowalczyk R., Wójcik J.M., Pertoldi C., Kristensen T.N., Loeschcke V., Gregersen V.R. and Bendixen C. 2009b, Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison. *Heredity* 103, 326–332
- Udina I.G., Shaikhaev G.O. 1998, Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of exon 2 of the MHC-Bibo-DRB3 gene in European bison *Bison bonasus*. *Acta theriologica, Supp.* 5: 75–82
- Udina I.G., Sipko T.P., Rautian G.S., Badagueva Yu.N., Sulimova G.E. 1994, The study of DNA-polymorphism of European bison by PCR-analysis of kappa-casein gene and loci DQB and DRB of the major histocompatibility complex. 5th wcalp/fao symposium: 147–150

- Verkaar E.L., Nijman I.J., Beeke M., Hanekamp E. and Lenstra J.A. 2004a, Maternal and paternal lineages in cross-breeding bovine species. Has wisent a hybrid origin? *Mol. Biol. Evol.* 21 (7), 1165–1170
- Verkaar E.L., Zijlstra C., van't Veld E.M., Boutaga K., van Boxtel D.C.J., Lenstra J.A. 2004b, Organization and concerted evolution of the ampliconic Y-chromosomal TSPY genes from cattle. *Genomics* 84, 468–474
- Ward T.J., Bielawski J.P., Davis S.K., Templeton J.W., Derr J.N. 1999, Identification of domestic cattle hybrids in wild cattle and bison species: a general approach using mtDNA markers and the parametric bootstrap. *Animal Conservation*, 2: 51 – 57
- Weikard R., Pitra C. and Kuhn C., 2006, Amelogenin cross-amplification in the family Bovidae and its application for sex determination. *Mol. Reprod. Dev.* 73 (10), 1333–1337
- Wójcik J.M., Kawalko A., Tokarska M., Jaarola M., Vallenback P. 2009, Post-bottleneck mtDNA diversity in a free-living population of European bison: implications for conservation, *J. Zool.* 277 (1), 81–87
- Źródło internetowe 1: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZFY>
- Źródło internetowe 2: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT5A>
- Źródło internetowe 3: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02676>