

**ZESZYTY NAUKOWE  
UNIwersYTETU PRZYRODNICZEGO  
WE WROCŁAWIU**

**NR 622**

**BIOLOGIA I HODOWLA ZWIERZĄT**

**BIOLOGY AND ANIMAL BREEDING**

**LXXXII**



**ZESZYTY NAUKOWE  
UNIwersYTETU PRZYRODNICZEGO  
WE WROCŁAWIU**

**NR 622**

**BIOLOGIA I HODOWLA ZWIERZĄT**

**BIOLOGY AND ANIMAL BREEDING**

**LXXXII**



**WROCŁAW 2016**

*Redaktor merytoryczny*  
dr hab. inż. Wojciech Kruszyński

*Redaktor statystyczny*  
dr Roman Dąbrowski

*Redakcja i korekta*  
Elżbieta Winiarska Grabosz  
Magdalena Kozińska

*Łamanie*  
Teresa Alicja Chmura

*Projekt okładki*  
Grażyna Kwiatkowska

Covered by: Agro, Index Copernicus, EBSCO, Zoological Record

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2016

Print edition is an original (reference) edition

ISSN 1897-208X  
ISSN 1897-8223

**WYDAWNICTWO UNIwersytetu PRZYRODniczego WE WROCLAWIU**

**Redaktor Naczelny – prof. dr hab. inż. Andrzej Kotecki**  
**ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax 71 328 12 77**  
**e-mail: [wyd@up.wroc.pl](mailto:wyd@up.wroc.pl)**

---

Nakład 100 + 17 egz. Ark. druk. 3,25. Ark. wyd. 3,0  
Druk i oprawa: PRINT sp. j. Z. Przyborowski, H. Ambroży  
ul. Wykładowa 62, 51-520 Wrocław

## SPIS TREŚCI

|   |    |
|---|----|
| Słowo wstępne .....   | 7  |
| 1. B. Kosowska, T. Strzała – Analiza filogenetyczna <i>in silico</i> sekwencji aminokwasowych cytochromu P450C21 (CYP21A1) wybranych gromad kręgowców .....   | 9  |
| 2. T. Orlański, P. Nowakowski, E. Pawlina – Zróżnicowanie masy tusz oraz masy trofeów kozłów saren ( <i>Capreolus capreolus</i> L.) z obwodów łowieckich polnych i leśnych powiatu legnickiego (Dolny Śląsk)..... | 27 |
| 3. J. Para, K. Danielewicz, B. Marszałek-Kruk, A. Mucha – Analiza molekularna eksonu 10 genu <i>TCOF1</i> u dziewczynek i chłopców z zespołem Treachera Collinsa .....  | 35 |
| 4. E. Pawlina, S. Trochowski – Związek przyczyn brakowania krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej z ich cechami użytkowymi .....  | 45 |

## CONTENTS

|   |    |
|---|----|
| Introduction.....   | 8  |
| 1. B Kosowska, T. Strzała – <i>In silico</i> phylogenetic analysis of cytochrome P450C21 (CYP21A1) amino acid sequences from choosen groups of vertebrates.....   | 9  |
| 2. T. Orłański, P. Nowakowski, E. Pawlina – Diversity in carcass weight and trophy mass of roe deer ( <i>Capreolus capreolus</i> L.) bucks from field and forest hunting areas of Legnica district (Lower Silesia)..... | 27 |
| 3. J. Para, K. Danielewicz, B. Marszałek-Kruk, A. Mucha – Molecular analysis of exon 10 of the <i>TCOF1</i> gene in girls and boys with Treacher Collins syndrome.....  | 35 |
| 4. E. Pawlina, S. Trochowski – Relationship of reasons of culling cows of Polish holstein-friesian with their productions traits .....  | 45 |

**Szanowni Czytelnicy,**

Oddajemy do Waszych rąk kolejny zeszyt LXXXII/2016 *Biologia i Hodowla Zwierząt*, publikowany w serii *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu*. Zeszyt ten, tak jak poprzednie, poświęcony jest szerokiej tematyce przyrodniczej.

Zamieszczone prace uzyskały pozytywną recenzję naukową wydaną przez uznane autorytety w każdej z dziedzin.

Czasopismo naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu jest kwartalnikiem. Podstawową formą wydawniczą czasopisma jest tradycyjna forma drukowana, lecz jest ono także widoczne w Internecie, a jego upowszechnianie wspierają światowe instytucje indeksujące takie jak: *Agro*, *Index Copernicus*, *EBSCO*, *Zoological Record*. Obecnie w rankingu Komitetu Badań Naukowych polskich czasopism naukowych czasopismo zostało wycenione na 5 pkt.

Zachęcamy Państwa do współpracy z naszą serią oraz do jej upowszechniania w szerokim środowisku naukowym i zawodowym.

Z poważaniem,

Wydawnictwo

**Dear Readers,**

It is our great pleasure to present you the latest issue of the Scientific Journal of Wrocław University of Environmental and Life Sciences: LXXXII/2016 Biology and Animal Breeding. Like the previous issues, it contains publications on a wide range of topics from the field of natural sciences.

All published papers received positive non-anonymous reviews of relevant scientific authorities.

The Scientific Journal of Wrocław University of Environmental and Life Sciences is a quarterly. Our journal is available not only in a printed format, but also on the Internet and it may be accessed via such database services as *Agro*, *Index Copernicus*, *EBSCO*, *Zoological Record*. In recognition of our achievements, we have been granted 5 points in the scientific journal ranking of the State Committee for Scientific Research.

We kindly invite you to cooperate with us and we would like to encourage you to promote our journal among the members of your scientific and professional community.

With best regards,  
Publishing House Team



**Barbara Kosowska, Tomasz Strzala**

**ANALIZA FILOGENETYCZNA *IN SILICO* SEKWENCJI  
AMINOKWASOWYCH CYTOCHROMU P450C21 (CYP21A1)  
WYBRANYCH GROMAD KRĘGOWCÓW**

***IN SILICO* PHYLOGENETIC ANALYSIS OF CYTOCHROME  
P450C21 (CYP21A1) AMINO ACID SEQUENCES  
FROM CHOOSEN GROUPS OF VERTEBRATES**

*Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy  
we Wrocławiu*

*Department of Genetics, Faculty of Biology and Animal Science,  
University of Environmental and Life Sciences*

W pracy przeprowadzono analizę filogenetyczną, opierając się na sekwencjach aminokwasowych (aa) białka 21 hydroksylazy steroidowej (21HS), pochodzących z genomów 89 kręgowców należących do różnych gromad. Białko enzymatyczne 21HS będące cytochromem P450C21 (CYP21A1) jest kluczowym enzymem steroidogenezy nadnerczowej, niezbędne w syntezie mineralo- i glikokortykoidów. Sekwencje pochodziły od współcześnie żyjących zwierząt i były zdeponowane w bazie danych GenBank. Celem badań było przeprowadzenie analizy filogenetycznej poprzez omówienie topologii drzewa, wartości istotności węzłów, od których dywergowały sekwencje oraz przeanalizowanie długości gałęzi, na które miały wpływ: iloczyn czasu i liczby mutacji typu substytucji w sekwencji. Drzewo sekwencji aa 21HS wygenerowano metodami największej wiarygodności (ML – Maksimum likelihood) oraz Bayesowską. Drzewo zostało ukorzenione za pomocą sekwencji *Latimeria chalumnae*, której szczątki kopalne oszacowano na dewon (około 400 mln lat temu). Sekwencje zgrupowane zostały w odpowiednich kładach: ryb, płazów, gadów, ptaków oraz ssaków. Topologia drzewa odzwierciedlała najbardziej prawdopodobną drogę ewolucji sekwencji 21 HS począwszy od pierwszych kręgowców (ryb) aż po młode ewolucyjnie ssaki, tym samym przybliżając zrozumienie jej rzeczywistego przebiegu w odniesieniu do kluczowego enzymu steroidogenezy nadnerczowej.

**SŁOWA KLUCZOWE:** 21-hydroksylaza steroidowa, analiza filogenetyczna, sekwencje aminokwasowe, ewolucja, kręgowce

## WSTĘP

Enzymy rodziny cytochromu P450 (CYP) są białkami wiążącymi hem, które posiadają zdolność wykorzystywania NADPH jako dawcy elektronów do redukcji tlenu cząsteczkowego. Przekaznikiem elektronów z NADPH na substrat jest oksydoreduktaza cytochromu P450. Pierwsze białka CYP odkryto w mikrosomach wątroby szczura (Klingenberg 1958), które później scharakteryzowano funkcjonalnie jako monooksygenazy (Omura i Sato 1962). Enzymy te przyłączają jeden z dwóch atomów tlenu cząsteczkowego do substratu, co w większości przypadków powoduje hydroksylację. Geny kodujące formy cytochromu P450 stanowią rodzinę składającą się z wielu spokrewnionych ze sobą genów. Rodzina genów lub białek jest zdefiniowana jako zbiór ich sekwencji nukleotydowych (nk) bądź aminokwasowych (aa) identycznych w stopniu wyższym niż 40%. Z kolei każda rodzina składa się z podrodziny, czyli sekwencji nk lub aa o tożsamości wyższej niż 55%. Geny CYP występują u kręgowców, bezkręgowców, roślin, grzybów, a nawet niektórych Prokaryota (Kawashima i Satta 2014). Liczba znanych genów CYP genomów metazoa, roślin i grzybów jest zróżnicowana. Na przykład, w ludzkim genomie opisano 115 genów CYP, u zachwy przejrzystka (*Ciona intestinalis*), (Nelson 1999, <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) 97 genów, natomiast u jeżowca (*Strongylocentrotus purpuratus*) 120 genów (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium 2006). U Prokaryota poznano dotychczas niewielką liczbę genów CYP, np. u archeobakterii opisano 33 (*Streptomyces avermitilis*) (Nelson i wsp. 2013), a u *Escherichia coli* (eubakterie) nie stwierdzono żadnego. Interesujące, że w genomach prokariotów wykazano obecność eukariotycznych genów CYP. Sugeruje to, że pojawienie się genów CYP poprzedzało powstanie eukariotów (Qi i wsp. 2006). Jest prawdopodobne, że bakteryjne geny CYP powstały poprzez transfer boczny z roślin (Nelson 1999), bowiem na przykład prokariotyczny homolog genu CYP51B1 wykryto w genomie *Mycobacterium tuberculosis* (Quaderer i wsp. 2006). Gen ten wśród genów CYP metazoa bierze udział w syntezie cholesterolu, który wchodzi w skład błon komórek eukariotycznych. Zatem, nieobecność genów CYP u pewnych bakterii, takich jak *E. coli*, oznacza, że nie są one niezbędne dla prokariotów (Kawashima i Satta 2014).

Geny/białka CYP, dzięki którym katalizowane są odpowiednie substraty, podzielono na dwa rodzaje: geny typu detoksykacji (D) oraz typu biosyntezy (B) (Gotoh 2012, Kawashima, Satta 2014). U ludzi enzymy typu D oczyszczają komórki z ksenobiotyków, głównie leków. Z kolei enzymy typu B biorą udział w biosyntezie fizjologicznie aktywnych substancji chemicznych, takich jak steroidy, cholesterol, witamina D3 i kwasy żółciowe. Obecnie sądzi się, że podczas ewolucji geny typu B pojawiły się przed genami typu D. Na przykład u drożdży zlokalizowano dwa geny typu B (CYP51F1 i CYP61A3), natomiast nie stwierdzono żadnego genu D. Sugeruje to, że w organizmach eukariotycznych geny typu B uległy metamorfozie i z nich powstały geny typu D (Kawashim i Satta 2014). Liczne studia wykazały, że enzymy CYP są niezwykle elastyczne i są w stanie dostosować swoje miejsca wiązania do szerokiego zakresu ligandów pod względem zarówno ich wielkości, jak i chemizmu (Stoll i wsp. 2011, Teague 2003).

W celu wyjaśnienia procesu narodzin i śmierci genów cytochromu P450 Kawashima i Satta (2014) przeprowadzili analizę filogenetyczną kilkuset sekwencji CYP z genomów różnych kręgowców. Wykazali m.in., że geny typu biosyntezy są silniej zakonserwowane ewolucyjnie niż geny typu detoksykacji. Ponadto stwierdzili, że prarodowymi, najstarszymi

genami CYP kręgowców są CYP17A1 i CYP21A1, które zostały zduplikowane, generując w ten sposób przodków rodzin CYP1 i CYP2 (Kawashima i Satta 2014).

Jeden z wymienionych wyżej najstarszych genów CYP kręgowców – CYP21A1, z powodu kluczowego znaczenia swego produktu podczas steroidogenezy, był i jest przedmiotem wielu badań oraz analiz filogenetycznych (Kosowska i wsp. 2012, 2013, Stoll i wsp. 2011, Speiser i wsp. 2010, Teague 2003). Produktem genu CYP21A1, który należy do typu B, jest 21-hydroksylaza steroidowa (21HS), jeden z najważniejszych enzymów steroidogenezy nadnerczowej, niezbędny w procesie biosyntezy zarówno mineralokortykoidów, jak i glikokortykoidów, zlokalizowany w siateczce endoplazmatycznej gładkiej głównie w dwóch warstwach komórek kory nadnerczy (Kosowska i Zdrojewicz 1991). Enzym ten dokonuje konwersji progesteronu i jego pochodnej, 17-hydroksyprogesteronu, do metabolitów, jakimi są 11-deoksykortykosteron i 11-deoksykortyzol, realizując tym samym istotny etap biosyntezy głównych hormonów kory nadnerczy: kortykosteronu, aldosteronu oraz kortyzolu. Ponadto wykazano, iż 21 HS jest aktywna także w keranocytach skóry, leukocytach, kardiomyocytach, komórkach centralnego układu nerwowego, nerkach i gonadach męskich (Barg i wsp. 2003).

W naszych dotychczasowych badaniach ewolucji *locus* 21HS (2 prace) analizowaliśmy relacje filogenetyczne sekwencji genu i białka CYP21 pochodzące od kilkunastu gatunków kręgowców (Kosowska i wsp. 2012, 2013). Obecnie, wskutek znaczącego postępu technologii sekwencjonowania, a także stałego wzrostu mocy obliczeniowych, jesteśmy w stanie uzyskać znacząco większą liczbę danych i w ten sposób rozszerzyć dotychczasową analizę filogenetyczną. Większość badaczy uznaje, iż w badaniach filogenetycznych najbardziej przydatne są sekwencje aa (Cavalli-Sforza 1998, Corneli 2002, Kawashima i Satta 2014), bowiem podlegając bezpośrednio doborowi naturalnemu, na drodze selekcji naturalnej wyznaczają główny kierunek ewolucji. Zgodnie z tym poglądem, w niniejszej pracy poświęconej ewolucji białka 21HS (CYP21A1, cytochrom P450c21) w świecie kręgowców, prezentujemy wyniki analizy filogenetycznej *locus* CYP21, opracowanej na podstawie dużo większej niż w poprzednich badaniach liczby sekwencji aa. Celem niniejszych badań było przeprowadzenie analizy filogenetycznej sekwencji aa pochodzących z 89 genomów kręgowców, należących do wybranych gromad, poprzez omówienie topologii drzewa, wartości istotności węzłów, od których dywergowały sekwencje oraz przeanalizowanie długości gałęzi, na które miały wpływ: iloczyn czasu oraz liczby mutacji typu substytucji w badanej sekwencji.

## MATERIAŁ I METODY

W niniejszej pracy materiał badawczy stanowiło 89 sekwencji aminokwasowych genu 21 hydroksylazy steroidowej pochodzących od 88 gatunków zwierząt (załącznik 1) pobranych z bazy danych Genbank. Pozyskane sekwencje zostały przyrównane za pomocą algorytmu Muscle (Edgar 2004), a następnie przycięte w celu uzyskania zwartego bloku danych o finalnej długości 456 aminokwasów. W celu określenia powiązań filogenetycznych między sekwencjami utworzono drzewo filogenetyczne za pomocą metod najwyższej wiarygodności (ang. maximum likelihood (ML)) oraz Bayesowskiej. Do wykonania drzew wykorzystano model JTT +G +I (Jones i Malik 1992), wskazany jako najlepiej dopasowany do danych przez program MEGA 7 (Kumar i wsp. 2016). Drzewo metodą najwyższej wiarygodności wykonano przy użyciu programu PhyML (Guindon

i Gascuel 2003, Guindon i wsp. 2010), wykorzystując metodę bootstrap (1000 replikacji) do weryfikacji istotności węzłów. Drzewo wykonane metodą Bayesowską oszacowano za pomocą programu MrBayes 3.2 (Ronquist i wsp. 2012), używając dwóch robotów składających się z czterech łańcuchów Markowa każdy. Analizy przeprowadzono przez 10 000 000 generacji, a zakończono gdy dla całego zbioru drzew po okresie burn-in wartość odchylenia standardowego logarytmu prawdopodobieństwa (ang. log likelihood) była niższa niż 0,01.

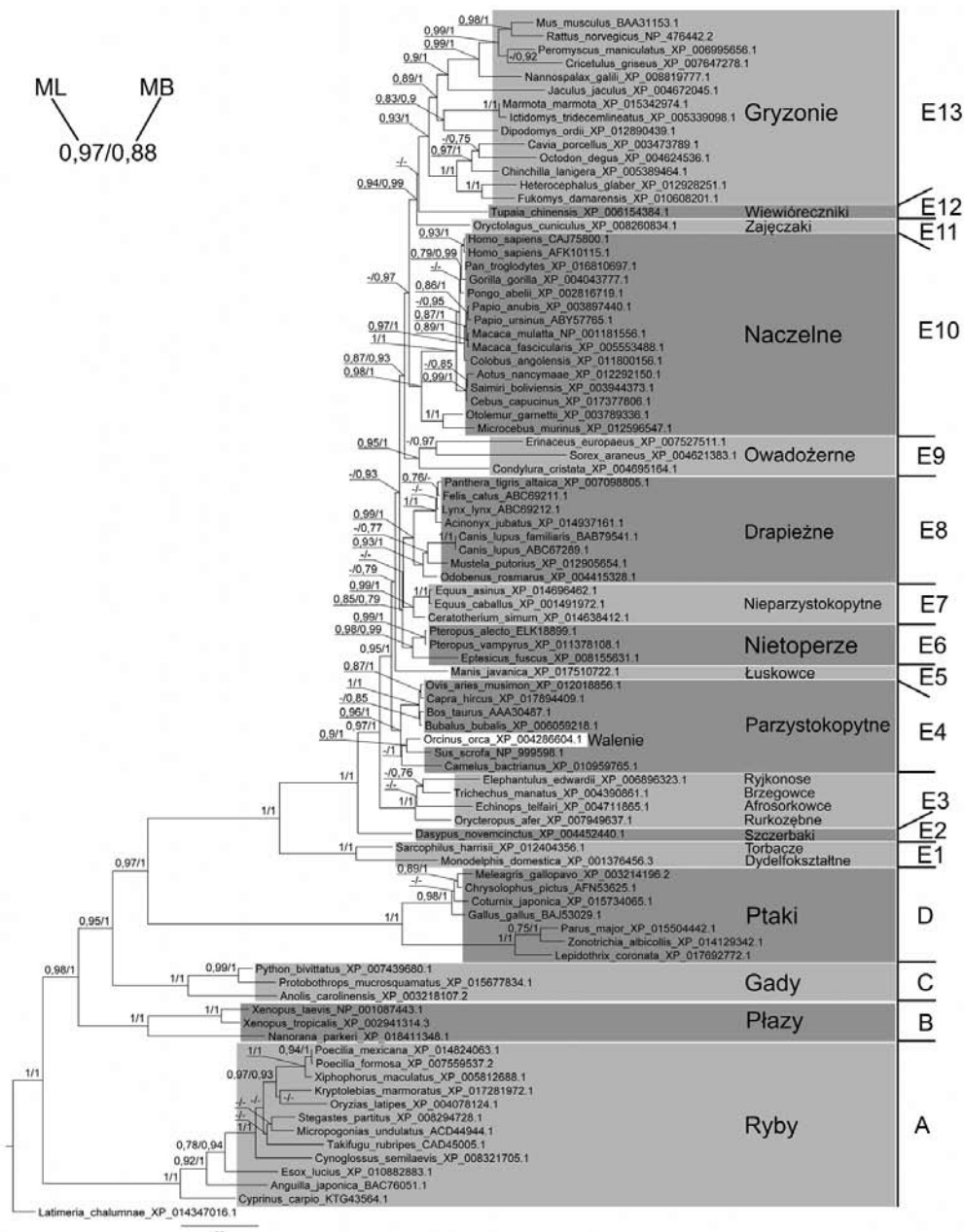
W celu określenia dystansu genetycznego w obrębie oraz pomiędzy poszczególnymi kładami uzyskanymi na drzewie sekwencji CYP21 oszacowano średni dystans pomiędzy grupami sekwencji (będących składowymi kładów na drzewie), wyrażony jako liczba substytucji aminokwasowych pomiędzy parami sekwencji w obrębie każdej grupy lub pomiędzy poszczególnymi grupami. Analizy zostały wykonane przy użyciu modelu JTT (Jones i Malik 1992), z wykorzystaniem rozkładu gamma do określenia tempa zmienności pomiędzy miejscami w sekwencjach. Powyższe szacunki wykonano w programie MEGA7 (Kumar i wsp. 2016).

## WYNIKI I DYSKUSJA

### Analiza filogenetyczna sekwencji aa 21HS

Drzewa filogenetyczne uzyskane w niniejszej pracy za pomocą metody ML oraz Bayesowskiej przyjęły tę samą topologię z różnicami w istotności węzłów (rys. 1). Metoda ML zakłada, że generowane drzewa filogenetyczne, których najważniejszymi parametrami są topologia, długość gałęzi oraz matematyczne modele powstawania mutacji, mogą stworzyć układ sekwencji, który odzwierciedla z największym prawdopodobieństwem rzeczywisty przebieg historycznego procesu rozgałęziania się drzewa sekwencji, w tym wypadku sekwencji aminokwasowych 21HS. Sekwencje aa pochodzą z 89 genomów kręgowców należących do wybranych gromad (załącznik 1). Drzewo posiada grupę zewnętrzną ukorzeniającą cały graf, w postaci najstarszej ewolucyjnie sekwencji 21HS. Obecność korzenia oprócz wzajemnych relacji pokrewieństwa sekwencji tworzy porządek związany z przepływem czasu.

Sekwencja ukorzeniająca pochodzi z genomu bardzo starej ewolucyjnie ryby *Latimeria chalumnae* z rzędu *Coelacanthiformes* (celanoksształtnych -> (latimerioksształtnych) należącego do gromady mięśniopłetwych). W zapisie kopalnym ryby te są znane od dolnego dewonu (około 400 mln lat temu) (Zhu i wsp. 2012). Wszystkie pozostałe sekwencje umieszczone na drzewie są od niej młodsze ewolucyjnie. Gdy znane jest położenie korzenia, znane są kierunek ewolucji i kolejność dziedziczenia sekwencji. Można śledzić drogę od korzenia do dowolnej sekwencji. Całe drzewo jest więc monofiletycznym układem sekwencji aa 21HS. Topologię drzewa konstituuje układ gałęzi łączących kolejno spokrewnione ze sobą sekwencje i węzły. Wszystkie sekwencje potomne określonego węzła wewnętrznego stanowią kład. Najstarsze ewolucyjnie klady grupujące sekwencje 21HS pochodzą kolejno z genomów ryb (kład A), płazów (B), gadów (C), ptaków (D) oraz ssaków (E), co ogólnie odzwierciedla topologię drzewa gatunków. W obrębie ww. kładów sekwencje połączone są gałęziami o bardzo różnej długości. Im dłuższa gałąź łącząca węzeł i analizowaną sekwencję, tym więcej różnic (mutacji) w porównywanych sekwencjach. Z kolei krótkie gałęzie wskazują na niewielkie zróżnicowanie między sekwencjami.



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne 89 sekwencji aminokwasowych genu CYP21 wykonane metodą najwyższej wiarygodności. Wartości przy węzłach zawierają informację i ich istotności: ML – wynik analizy bootstrap (metoda najwyższej wiarygodności), MB – wynik prawdopodobieństwa z programi MrBayes. Jako grupy zewnętrznej użyto sekwencji gatunku *Latimeria chalumnae*

Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree of 89 amino acid CYP21 sequences. Values along nodes show information about their significance – bootstrap value for Maximum Likelihood and posterior probability for MrBayes. *Latimeria chalumnae* CYP21 sequence was used as outgroup

Między niektórymi kładami występują różnice, np. długość gałęzi łączącej płazy (kład B) węzłami wewnętrznymi z sekwencją ukorzeniającą jest mniejsza niż długość gałęzi łączącej sekwencję latimerii z rybami kładu A. Oznacza to, że sekwencja 21HS pochodząca z genomu płaza – afrykańskiej (zachodniej) żaby szponiastej (*Xenopus tropicalis*) wykazuje mniej różnic w stosunku do sekwencji korzenia niż starsze ewolucyjnie sekwencje ryb, takich jak karp (*Cyprinus carpio*), węgorz japoński (*Anguilla japonica*) i szczupak pospolity (*Lesox lucius*), które grupują się w kładzie A. Mniejszy dystans genetyczny wyznaczony między korzeniem drzewa a płazami niż między korzeniem a rybami może sugerować, iż podczas ewolucji na Ziemi pojawiły się najpierw płazy, a dopiero po nich ryby. Wynika to z braku na grafie w kładzie A sekwencji pochodzących z genomów ewolucyjnie starszych ryb o zapisie kopalnym zbliżonym do latimerii, np. *Euselachii*, taksonu ryb chrzęstnoszkieletowych (*Chondrichthyes*), który obejmuje współcześnie występujące rekiny oraz płaszczki. Rekiny znane są z zapisów kopalnych datowanych na dewon (Long i wsp. 2015), zaś płaszczki na jurę (około 200 milionów lat temu) (Ginter 2012). Niestety, w bazach danych nie znaleziono sekwencji 21HS starszych ewolucyjnie ryb, choć częściowo zbliżonych do latimerii. Zaistniała na drzewie luka stanowi pewną analogię do braku wielu pośrednich form wyższych taksonów w zapisie kopalnym. Eldredge (1989) stwierdził, że większość gromad, klas, rzędów i typów pojawia się w kopalnym zapisie nagle, często bez anatomicznych form pośrednich gładko łączących ewoluujące taksony z ich domniemanymi przodkami. Podobnie Hickman i wsp. (2001) wskazali, iż zapis kopalny wczesnych kręgowców jest często niekompletny i mówi nam o wiele mniej, niż chcielibyśmy wiedzieć. Z kolei Raff i Kaufman (1991) stwierdzili „iż luki pomiędzy wyższymi taksonami są duże i regularne”.

Kłady płazów (B) oraz gadów (C) łączą się wewnętrznymi węzłami z kładem ryb (A) bardzo długimi gałęziami, które odzwierciedlają czas ewolucji od dywergencji sekwencji między kładami, a także ewolucji między sekwencjami 21HS wewnątrz kładów.

Kład C grupujący sekwencje gadów zawiera tylko 3 sekwencje, z których najstarszą jest sekwencja jaszczurki, anolisa zielonego (*Anolis carolinensis*), a w dalszej kolejności żmii plamistej brunatnobrzuchej (*Protobothrops mucrosquamatus*) oraz pytona birmańskiego (*Python bivittatus*).

Kład D grupujący sekwencje 21HS pochodzące z genomów ptaków zawiera 2 grupy sekwencji: pierwszą, która obejmuje blisko ze sobą spokrewnione sekwencje ptaków grzebiących: znajdującej się najbliżej sekwencji ukorzeniającej – bażanta złocistego (*Chrysolophus pictus*), indyka (*Meleagris gallopavo*), przepiórki japońskiej (*Coturnix japonica*) oraz kura dzikiego bankiwa (*Gallus gallus*), a także drugą, której sekwencje pochodzą z genomów ptaków latających: gorzyczka czepeczkowego (*Lepidothrix coronata*) oraz bliżej ze sobą spokrewnionych dwóch sekwencji: sikory bogatki (*Parus major*) i pasówki białogardłej (*Zonotrichia albicollis*).

Kładem grupującym najwięcej sekwencji 21HS jest kład E obejmujący ssaki. Niektóre z sekwencji ułożyły się tuż obok siebie, tworząc ciasne zgrupowania, jak np. naczelnę, drapieżną czy parzystokopytną. Pozostałe sekwencje, z braku bliżej z nimi spokrewnionych, pozostały zdystansowane w stosunku do reszty. Z tego powodu sekwencje kładu E zgrupowane blisko siebie wyodrębniono jako subklady, oznaczone literami od E1 do E13. Najstarsze ewolucyjnie sekwencje 21HS spośród wszystkich zgrupowanych w kładzie ssaków należą do torbaczy oraz dydelfokształtnych, a następną z kolei jest sekwencja pancernika dziewięciopaskowego (szczerbaki).

Subklad E1 zawiera tylko 2 sekwencje, z których jedna pochodzi od diabła tasmańskiego (*Sarcophilus harrisi*), torbacza z rodziny niełazowatych, druga zaś od oposa krótkoogonowego (*Monodelphis domestica*), gatunku ssaka z rzędu dydelfokształtnych, który zamieszkuje lasy tropikalne Ameryki Południowej. Miejsce usytuowania sekwencji diabła tasmańskiego na drzewie wskazuje, że jest ona starsza ewolucyjnie od sekwencji oposa, natomiast torbacze i dydelfokształtne mają między sobą długie relacje pokrewieństwa. Zapis kopalny wskazuje, że korzenie torbaczy sięgają dziesiątków milionów lat, do czasów gdy na półkuli południowej leżał superkontynent Gondwana. Uważa się, że torbacze powstały na ziemiach obecnie leżących w Ameryce Południowej, po czym migrowały do Australii poprzez Antarktydę, na której panował wówczas klimat umiarkowany. Dane molekularne wskazują na rozdzielenie przodków diabła tasmańskiego i niełazów (*Dasyurus*) pomiędzy 10 a 15 milionami, kiedy to w Australii nastąpiły poważne zmiany klimatyczne (Owen i Pemberton 2011). Następnym w kolejności jest subklad E2, który prezentuje tylko jedną sekwencję pochodzącą z genomu pancernika dziesięcio-paskowego (dawniej długoogonkowego), pochodzącego z Ameryki Południowej. Z kolei kład E3 grupuje jedynie 4 sekwencje: mrównika afrykańskiego (*Orycteropus afer*) rzędu rurkozębnych, tenreczynka jeżowatego (tenreka mniejszego) (*Echinops telfari*) z rzędu afrosorkowców, wyodrębnionego niedawno z owadożernych dzięki badaniom molekularnym (Myers i wsp. 1999), a także dwie blisko ze sobą spokrewnione sekwencje manata karaibskiego (*Trichechus manatus*) z rzędu brzegowców (Bauer i wsp. 2010) oraz ryjokoczka (*Elephantus edwardii*) z rzędu ryjkonosych, występującego w Afryce.

Duży subklad E4 grupuje sekwencje 21HS pochodzące z genomów blisko ze sobą spokrewnionych parzystokopytnych: muflona śródziemnomorskiego (*Ovis ariel musimon*) i kozy domowej (*Capra hircus*), bydła domowego (*Bos taurus*) i woła domowego (*Bubalus bubalis*). Zaskoczeniem może się wydać usytuowanie sekwencji orki oceanicznej (*Orcinus orca*) w parze z dzikiem euroazjatyckim (*Sus strofa*). Jednakże w ostatnich latach prace wielu badaczy (Boissere i wsp. 2005) doprowadziły na podstawie badań molekularnych ssaków do utworzenia nowego rzędu *Cetartiodactyla* (brak jeszcze nazwy polskiej), którego rozwinięcie jest następujące: -> wielbłądokszałtne (wielbłądy + wymarli krewni) -> łozyskowce -> nowy takson: *Cetruminantia*, który obejmuje przeżuwacze (*Ruminantia*) oraz *Cetacea* (nazwa rzędu waleni) (Spaulding i wsp. 2009).

W niniejszej analizie sekwencją najbliższą spokrewnioną z parą orka oceaniczna – dzik eurazjatycki jest sekwencją aa 21HS z genomu wielbłąda baktriana (*Camelus bactrianus*), co potwierdza słuszność dokonania zmian przez systematyków. Tylopody (wielbłądy i ich wymarli krewni) okazały się na tyle specyficzne molekularnie, genetycznie i morfologicznie, iż zaliczono je bezpośrednio do *Cetartiodactyla* (Waddell i wsp. 1999).

Subklad E5 zawiera tylko jedną sekwencję z genomu łuskowca jawańskiego lub też pangolina jawańskiego (*Manis javanica*) z rzędu łuskowców.

Subklad E6 grupuje trzy sekwencje pobrane z genomów blisko ze sobą spokrewnionej pary rzędu nietoperzy: rudawki żałobnej (*Pteropus alecto*) oraz rudawki malajskiej (*Pteropus vampyrus*), a także sekwencji młodszej ewolucyjnie od powyższej pary, używanej od mrocza brunatnego (*Eptesicus fuscus*).

Subklad E7 grupuje również 3 sekwencje z genomów rzędu nieparzystokopytnych: konia domowego (*Equus caballus*), osła domowego (*Equus asinus*) oraz sekwencji starszej i oddalonej ewolucyjnie od ww. pary i należącej do nosorożca białego (*Ceratotherium simum*).

Subklad E8 skupia 8 sekwencji aa 21HS drapieżnych. Najbliżej sekwencji ukorzeniającej usytuowała się sekwencja morsa arktycznego (*Odobenus rosmarus*), najbliższej spokrewniona z sekwencją tchórza zwyczajnego (*Mustela putorius*), a ta z kolei z sekwencjami wilka (*Canis lupus*) i psa domowego (*Canis lupus familiaris*). Sekwencje psa i wilka domowego są tożsame, na co wskazują wartość węzła i ta sama długość gałęzi. Wynik ten (dotyczący psa oraz wilka) jest analogiczny do efektów pracy Kosowskiej i wsp. (2012) uzyskanych na podstawie własnych sekwencji nukleotydowych oraz aminokwasowych wilka i psa domowego.

W dalszej kolejności równolegle ułożyły się trzy sekwencje pochodzące od: tygrysa azjatyckiego (*Panthera tigris*), kota domowego (*Felis catus*) oraz rysia euroazjatyckiego (*Lynx lynx*). Badania molekularne na podstawie uzyskanych oryginalnych sekwencji 21HS rysia i kota domowego prowadzili Kosowska i wsp. (2013). Obecne badania *in silico* potwierdzają wyniki badań dotyczące bardzo bliskiego pokrewieństwa obu sekwencji uzyskanych z genomów tych gatunków, zdeponowanych następnie w GenBanku (Kosowska i wsp. 2012). Wśród omawianych kotowatych sekwencją najbardziej zdystansowaną do pozostałych jest zapis aa 21HS geparda grzywiastego (*Acinonyx jubatus*), który wykazuje największe podobieństwo do sekwencji rysia euroazjatyckiego, kota domowego, a najmniejsze do tygrysa azjatyckiego. Odnalezione szczątkowe ilości materiału kopalnego wskazują na możliwość pochodzenia przodka (lub krewnego) tygrysa azjatyckiego, nazwanego *Panthera palaeosinensis*, z wczesnego plejstocenu (Mazák 1981).

Subklad E9 skupia trzy sekwencje należące do owadożernych, w zapisie aminokwasowym bardzo zróżnicowane w stosunku do siebie. Najstarszą ewolucyjnie jest sekwencja gwiazdonosa amerykańskiego (*Condylura cristata*), a węzeł z którego się wywodzi, ma wartość istotną. Kolejny węzeł z którego dywergowały następne sekwencje – jeża zachodniego (*Erinaceus europaeus*) oraz ryjówki aksamitnej (*Sorex araneus*), wskazuje na jego niepełną istotność (0,96/-). Zatem, usytuowanie sekwencji wywodzących się z tego węzła nie jest do końca pewne. Jeża oraz ryjówkę dzieli spory dystans genetyczny, długości ich gałęzi wskazują, iż sekwencja ryjówki różni się bardzo znacznie od sekwencji jeża. Przyczyną była duża ilość mutacji sekwencji aa 21HS ryjówki w stosunku do zmian sekwencji jeża oraz niezbędny czas, który minął od ostatniego węzła (ostatniej dywergencji sekwencji) do powstania współczesnych postaci sekwencji, co obrazuje znacząca długość gałęzi.

Subklad E10 grupuje 15 sekwencji aa 21HS naczelnych. Jest to największe zgrupowanie sekwencji wśród ssaków na grafie. Naczelne stanowią częsty obiekt badań, stąd wiele ich sekwencji białkowych oraz nukleotydowych jest dostępnych w różnych bazach danych. Sekwencje naczelnych na grafie są silnie skupione. Najbardziej zróżnicowane genetycznie wobec pozostałych są sekwencje pochodzące od mikrusa uszatego (*Microcebus murinus*) oraz galago małouchego (*Otolemur garnetti*). Zaznaczona niewielka odmienność występuje także między grupą 3 sekwencji: kapucynki czarno-białej (*Cebus capucinus*) saimiriczarnogłowej (*Saimiri boliviensis*) oraz ponocnicy Nancy (*Aotus nancymae*) a pozostałymi sekwencjami 21HS naczelnych. Sekwencjami pośrednimi



między omawianymi powyżej a zapisami aa hominidów (*Hominidae*) są sekwencje 21HS pochodzące od gerezy angolańskiej (*Colobus angolensis*), makaka królewskiego (*Macaca mulatta*) oraz makaka krabożernego (*Macaca fascicularis*), pawiana niedźwiedziego (*Papio ursinus*) i pawiana oliwkowego (*Papio anubis*). Najwyżej na krótkich gałęziach usytuowane są sekwencje człowiekowatych: orangutana sumatrzeńskiego (*Pongo abelii*), goryla zachodniego (*Gorilla gorilla*), szympansa zwyczajnego (*Pan troglodytes*) oraz 2 sekwencje człowieka rozumnego (*Homo sapiens*).

Dokładniejsza analiza wskazuje, iż ewoluowanie sekwencji naczelnych było dosyć szybkie i nie prowadziło do dużego zróżnicowania. Węzły wewnętrzne tych sekwencji są przeważnie istotne; na 15 sekwencji tylko przy 2 węzłach ich wartość szacowana metodą ML była nieistotna (natomiast wg metody MrBayesa była wysoka i istotna) oraz w jednym przypadku wartość węzła była nieistotna według obu metod. Gałęzie są krótkie, a więc różnice w sekwencjach aa są małe, co utrudnia ustalenie ich kolejności. Oznacza to, iż pewien wzór sekwencji aa 21HS powstał już u pierwszych naczelnych i ulegał potem jedynie zmianom przystosowawczym. Kawashima i Satta (2014) przeprowadzili analizę filogenetyczną kilkuset sekwencji CYP z genomów różnych kręgowców. Wykazali, że ewolucja genów CYP typu biosyntezy (do nich należy gen CYP21A1A, którego produktem genowym jest enzym 21HS) jest napędzana substratami dla tych enzymów. Steroidogeneza jest u wszystkich naczelnych procesem, który prowadzi w korze nadnerczy do syntezy hormonów steroidowych, gliko- oraz mineralokortykoidów, z udziałem m.in. kluczowego w biosyntezie steroidów enzymu 21HS. Enzym ten u wszystkich naczelnych ma albo bardzo zbliżony, albo jak u hominidów prawie identyczny skład aminokwasowy (tab. 2 dystansów genetycznych wewnątrz kładów). Większe zróżnicowanie w zakresie biosyntezy steroidów występuje np. między hominidami a gryzoniami. Na przykład głównym glikokortykoidem szczura nie jest kortyzol, jak ma się to u człowiekowatych, lecz kortykosteron (Kosowska i Zdrojewicz 1991). Zmniejszona aktywność 21HS (np. na drodze zmiany jej sekwencji aa) uniemożliwia prawidłową konwersję 17-hydroksyprogesteronu do 11-dezoksykortykosteronu. Skutkami tego mogą być niewystarczająca synteza kortyzolu i aldosteronu oraz nadmierne wydzielanie androgenów. Tego typu zmiany mogą prowadzić do nowych ścieżek przemian biosyntezy steroidów u różnych taksonów (Kosowska i wsp. 2012, 2013).

Kolejny subklad E11 – obejmuje tylko jedną sekwencję rzędu zajęczaków, pochodzącą od królika europejskiego (*Oryctolagus cuniculus*). Jest ona najbardziej spokrewniona z sekwencją wiewiórecznika chińskiego (*Tupaia chinensis*), ssaka z rzędu wiewióreczników, reprezentującego samotnie subklad E12. Węzeł wewnętrzny, który łączy sekwencję wiewiórecznika z sekwencjami subkladu E13 obejmującego gryzonie, nie jest istotny (wg obu metod zarówno ML, jak i MrBayesa), zatem usytuowanie sekwencji wiewiórecznika w tym miejscu drzewa jest raczej przypadkowe.

Subklad E13 obejmuje sekwencje aa 21HS pochodzące od gryzoni zamieszkujących bardzo różne środowiska, nisze ekologiczne oraz geograficzne, w których występuje zróżnicowana i przeważnie silna presja środowiska, w tym antropopresja. Sekwencje aa 21HS wewnątrz zestawionych par są bardzo podobne, a między parami odmienne i zdystansowane. Dół subkladu E13 zajmuje para sekwencji pochodzących od zęboszczura z Damary (*Fukomys damarensis*), żyjącego dziko pod ziemią w płd. Afryce oraz golca piaskowego (*Heterocephalus glaber*), żyjącego również pod ziemią pustyń wschodniej

Afryki. Gałęzie sekwencji są podobnej długości. Węzeł, z którego dywergowały, jest istotny. Wyżej na grafie znajdują się 3 blisko ze sobą spokrewnione sekwencje; starsza z genomu szynszyli małej (*Chinchilla lanigera*), z Ameryki Płd. (Chile) oraz dwie młodsze, wywodzące się z sekwencji szynszyli, bliżej ze sobą spokrewnione sekwencje koszatniczki pospolitej (*Octodon degus*), żyjącej w warunkach naturalnych w Ameryce Płd. (Chile), oraz świnki morskiej (*Cavia porcellus*) z Peru i Kolumbii. Wartość węzła łączącego dwie ostatnie sekwencje szacowana metodą ML okazała się jednak nieistotna.

Wyższe gałęzie w tym subkladzie tworzą sekwencje: szczuroskoczek białostopego (*Dipodomys ordii*) żyjącego w Ameryce Płn. (do Meksyku) oraz świstaka alpejskiego (*Marmota marmota*) z Europy, a także blisko spokrewniona z poprzednią – sekwencja paskosusła lamparciego (*Ictidomys tridecemlineatus*) z Ameryki Płn.

Najwyżej, na szczycie drzewa znajduje się sześć sekwencji aa 21HS, z których ewolucyjnie najstarszą jest pochodząca z genomu podskoczek egipskiego (*Jaculus jaculus*), następnie ślepca z Galilei (*Nannospalax galili*) oraz dwóch par sekwencji, młodszych od sekwencji ślepca o dwa rozgałęzienia (węzły): chomika chińskiego (*Cricetulus griseus*) z Azji oraz myszaka leśnego (*Peromyscus maniculatus*), z Ameryki Płn. (wartość jego węzła jest tylko połowicznie istotna wg MrBayesa), a także pary sekwencji: myszy domowej (*Mus musculus*) i młodszej ewolucyjnie sekwencji szczura norweskiego (*Rattus norvegicus*). Sekwencja szczura norweskiego posiada dłuższą niż u myszy gałąź, świadczącą o częstych zmianach sekwencji wiodących do formy występującej współcześnie u szczurów, które stale pozostają pod niezwykle silną presją środowiska, co wpływa na tempo mutacji w zapisie aa 21HS.

### Średnie dystanse genetyczne między analizowanymi sekwencjami

W tabeli 1 przedstawiono wartości średniego dystansu genetycznego między kladami sekwencji drzewa filogenetycznego z rysunku 1.



Najdłuższy dystans genetyczny o wartości względnej 1,32 odnotowano między kładem A (ryby) i subkladem E9 ssaków (owadożerne). Najkrótszy dystans ewolucyjny ma szacunkową wartość 0,14 i podzielił następujące subklady ssaków: E6 (nietoperze) z E7 (nieparzystokopytne) i E6 (nietoperze) z E4 (parzystokopytne). Wartości miar dystansów między pozostałymi kładami zawierały się pomiędzy przedstawionymi wyżej długościami.

W tabeli 2 przedstawiono wartości średniego dystansu genetycznego między sekwencjami aa 21HS wewnątrz kładów sytuowanych na drzewie filogenetycznym z rysunku 1.

Tabela 2  
Table 2

Wartości średniego dystansu ewolucyjnego między sekwencjami aa 21HS wewnątrz poszczególnych kładów drzewa filogenetycznego z rysunku 1  
Average within clades evolutionary distance from the 21HS phylogenetic tree from Figure 1

| Grupa<br>Group                                 | Średni dystans wewnątrz grupy<br>Average distance inside the group |
|--|--|
| A Ryby – A Fishes                              | 0,216  |
| B Płazy – B Amphibians                         | 0,353  |
| C Gady – C Reptiles                            | 0,308  |
| D Ptaki – D Birds                              | 0,291  |
| E1   | 0,29   |
| E2 Szczerbaki – E2 Xenarthra                   | b/d  |
| E3   | 0,19   |
| E4 Parzystokopytne<br>E4 Even-toed ungulates   | 0,084  |
| E5 Łuskowce – E5 Pangolins                     | b/d  |
| E6 Nietoperze – E6 Bats                        | 0,087  |
| E7 Nieparzystokopytne<br>E7 Odd-toed ungulates | 0,046  |
| E8 Drapieżne – E8 Carnivora                    | 0,092  |
| E9 Owadożerne – E9 Insectivora                 | 0,427  |
| E10 Naczelne – E10 Primates                    | 0,08   |
| E11 Zajączaki – E11 Lagomorphs                 | b/d  |
| E12 Wiewióreczniki<br>E12 Treeshrews           | b/d*   |
| E13 Gryzonie – E13 Rodents                     | 0,301  |

Najdłuższy dystans genetyczny dzieli sekwencje wewnątrz subkladu ssaków owadożernych (E9). Jego wartość wyniosła 0,427. Najkrótszy dystans genetyczny wystąpił między sekwencjami wewnątrz kładu naczelnych (E10) i wyniósł 0,08. Wewnątrz pozostałych kładów wartości dystansów ewolucyjnych między sekwencjami aa 21HS mieszczą się w granicach podanych wyżej odległości ewolucyjnych.

## PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy wygenerowano drzewo filogenetyczne sekwencji aa 21HS metodami największej wiarygodności (ML) oraz Bayesowską. Sekwencje te pochodziły z 89 genomów żyjących współcześnie kręgowców i były zdeponowane w bazie danych GenBank. Szczegółowa analiza wykonana w pracy wyjaśniła powiązania ewolucyjne między sekwencjami, a macierze dystansów ewolucyjnych umożliwiły wyznaczenie stopnia i zakresu ich pokrewieństwa. Topologia drzewa odzwierciedliła najbardziej prawdopodobne ułożenia sekwencji różnych kręgowców podczas ewolucji, tym samym przybliżając zrozumienie jej rzeczywistego przebiegu w odniesieniu do kluczowego enzymu steroidogenezy nadnerczowej. Jednakże, na drzewie pozostały liczne miejsca wolne oraz węzły o wartości nieistotnej, które lokowały część sekwencji w sposób przypadkowy. Te niedostatki obecnej analizy, wynikające częściowo z braku większej liczby sekwencji 21HS wielu gatunków w bazach danych oraz niedoskonałości obecnie istniejących metod, w kolejnych badaniach będzie można stopniowo eliminować.

## WNIOSKI

1. Niniejsza analiza filogenetyczna sekwencji aa 21HS jest wstępnym, obszernym oraz przybliżonym obrazem ewolucji pierwszorzędowej struktury cytochromu P450c21 (CYP21a1) kręgowców.
2. W celu zwiększenia prawdopodobieństwa odzwierciedlenia rzeczywistej drogi ewolucji zapisu aa21HS należy istotnie zwiększyć wykorzystanie informacji zawartej w sekwencjach oraz uwzględnić w badaniach większą liczbę sekwencji.

## PIŚMIENNICTWO

- Barg E., Tokarska M., Wikiera B., Kosowska B., 2003. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Advances in Diagnosis. Adv. Clin. Exp. Med.*, 12: 507–515.
- Bauer G.B., Colbert D.E., Gaspard III J.C., 2010. Learning About Manatees: Na collaborative program between New College of Florida and mote Marine Laboratory to Conduct Laboratory Research for Manatee Conservation. *Int. J. Comp.Psych.*, 23: 811–825.
- Boissere J.R., Lihoreau F., Brunet M., 2005. The position of Hippopotamidae within Cetartiodactyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 1537–1541.
- Cavalli-Sforza L., 1998. The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet.*, 14: 60–65.
- Corneli P.S., 2002. Complete Mitochondrial Genomes and Eutherian Evolution. *J. Mammal. Evol.*, 9: 281–305.
- Edgar R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.*, 32 (5): 1792–1796.
- Eldredge N., 1989. *Macro-Evolutionary Dynamics: Species, Niches, and Adaptive Peaks*, McGraw-Hill Publishing Company, New York: 22
- Ginter M., 2012. *Ryby kopalne*. Warszawa, Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego: 141.
- Gotoh O., 2012. Evolution of cytochrome p450 genes from the viewpoint of genome informatics. *Biol. Pharm. Bull.*, 35: 812–817.

- Guindon S., Dufayard J., Lefort V., 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum – Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.*, 59 (3): 307–321.
- Guindon S., Gascuel O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.*, 52 (5): 696–704.
- Hickman C.P., Roberts L.S., Larson A., 2001. *Integrated Principles of Zoology*, McGraw Hill, New York: 499–505.
- Jones D.G., Malik J., 1992. Determining three-dimensional shape from orientation and spatial frequency disparities. *Computer Vision – ECCV'92*. Volume 588 of the series *Lecture Notes in Computer Sciences*: 661–669.
- Klingenberg M., 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 75: 376–386.
- Kawashima A., Satta Y., 2014. Substrate-Dependent Evolution of Cytochrome P450: Rapid Turnover of the Detoxification-Type and Conservation of the Biosynthesis-Type. *PLoS ONE*. June: 30.
- Kosowska B., Strzała T., Brzezińska T., Grabowski K., Dobosz T., Lebioda A., 2013. Molecular phylogenetic analysis of the domestic cat and the Eurasian lynx based on Cyp21 gene. *Med. Wet.*, 69 (3): 174–180.
- Kosowska B., Zdrojewicz Z., 1991. The role of genetic variability in the hormonal adaptive mechanisms. Part II. Histometric changes in the width of glomerular and fascicular layers of adrenal cortex in rats under the influence of inbreeding and stress. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 108: 154–160.
- Kosowska B., Zdrojewicz Z., 1991. The role of genetic variability in the hormonal adaptive mechanisms. Part I. The effect of various homozygosity level on the adrenal cortex hormone concentrations (corticosterone and aldosterone) in the blood serum of rats exposed to two types of stress. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 108: 147–153.
- Kosowska B., Strzała T., Brzezińska K., Grabowski K., Moska M., Dobosz T., Lebioda A., 2012. Phylogenetic analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) of the wolf and selected breeds of dogs in connection with the role of this enzyme. *Med. Wet.*, 68 (9): 513–576.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33 (7): 1870–1874.
- Long J.A., Burrow C.J., Ginter M., Maisey J.G., 2015. First Shark from the Late Devonian (Frasnian) Gogo Formation, Western Australia Sheds New Light on the Development of Tessellated Calcified Cartilage *PLoS ONE*, 10 (5).
- Mazák V., 1981. *Panthera tigris*. *Mammalian Species*, 152: 1–8.
- Myers P., 1999. *Afrosoricida*. *Animal Diversity Web*.
- Nelson D., 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 369: 1–10.
- Nelson D.R., Goldstone J.V., Stegeman J.J., 2013. The cytochrome P450 genesis locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Phil Trans R Soc B* 368: 20120474.
- Omura T., Sato R., 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 237: PC1375–PC1376.
- Owen D., Pemberton D., 2011. *Tasmanian devil: a unique and threatened Animals*. Allen & Unwin: 16.
- Qi X., Bakht S., Qin B., Leggett M., Hemmings A., Mellon F., Eagles J., Werck-Reichhart D., Schaller H., Lesot A., Melton R., Osbourn A., 2006. A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 18848–18853.
- Quaderer R., Omura S., Ikeda H., Cane D.E., 2006. Pentalenolactone biosynthesis. Molecular cloning and assignment of biochemical function to PtlI, a cytochrome P450 of *Streptomyces avermitilis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 13036–13037.
- Raff R.A., Kaufman T.C., 1991. *Embryos, Genes, and Evolution: The Developmental-Genetic Basis of Evolutionary Change*, Indiana University Press, 35.

- Ronquist F., Teslenko M., van Mark P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst. Biol.*, 61 (3): 539–542.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 314: 941–952.
- Spaulding M., O’Leary M.A., Gatesy J., 2009. Relationships of Cetacea (Artiodactyla) Among Mammals: Increased Taxon Sampling Alters Interpretation of Key Fossils and Character Evolution. *PLoS One*, 4 (9).
- Stoll F., Goller A.H., Hillisch A., 2011. Utility of protein structures in overcoming ADMET-related issues of drug-like compounds. *Drug. Discov. Today*, 16: 530–538.
- Teague S., 2003. Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Disc.* 2, 527–541.
- Waddell P.J., Okada N., Hasegawa M., 1999. Towards resolving the interordinal relationships of placental mammals. *Systematic Biology*, 48 (1): 1–5.
- Speiser P.W., Azziz R., Baskin L.S., Ghizzoni L., Hensle T.W., Merke D.P., Meyer-Bahlburg H.F., Miller W.L., Montori V.M., Oberfield S.E., Ritzen M., White P.C., 2010. Endocrine Society: Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 95: 4133–4160.
- Zhu M., Xiaobo Y., Jing L., Tuo Q., Wenjin Z., Liantao J., 2012. Earliest known coelacanth skull extends the range of anatomically modern coelacanths to the Early Devonian. *Nature Communications*, 3: 772–775.

### Załączniki – Supplementary materials:

- Załącznik 1. Nazwy gatunkowe oraz numery dostępne sekwencji aminokwasowych wykorzystanych w niniejszej pracy
- Supplementary material 1. Species name along with GenBank accession number of the sequences used in this paper

| Lp. No. | Nazwa gatunkowa<br>Species name | Numer dostępowy GenBank<br>GenBank accession number |
|---------|---------------------------------|---|
| 1       | 2                               | 3   |
| 1.      | <i>Acinonyx jubatus</i>         | XP014937161.1                                       |
| 2.      | <i>Anguilla japonica</i>        | BAC76051.1  |
| 3.      | <i>Anolis carolinensis</i>      | XP003218107.2                                       |
| 4.      | <i>Aotus nancymaeae</i>         | XP012292150.1                                       |
| 5.      | <i>Bos taurus</i>               | AAA30487.1  |
| 6.      | <i>Bubalus bubalis</i>          | XP006059218.1                                       |
| 7.      | <i>Camelus bactrianus</i>       | XP010959765.1                                       |
| 8.      | <i>Canis lupus</i>              | ABC67289.1  |
| 9.      | <i>Canis lupus familiaris</i>   | BAB79541.1  |
| 10.     | <i>Capra hircus</i>             | XP017894409.1                                       |
| 11.     | <i>Cavia porcellus</i>          | XP003473789.1                                       |
| 12.     | <i>Cebus capucinus</i>          | XP017377806.1                                       |
| 13.     | <i>Ceratotherium simum</i>      | XP014638412.1                                       |
| 14.     | <i>Chinchilla lanigera</i>      | XP005389464.1                                       |
| 15.     | <i>Chrysolophus pictus</i>      | AFN53625.1  |
| 16.     | <i>Colobus angolensis</i>       | XP011800156.1                                       |

## Załącznik 1 cd.

| 1   | 2                                 | 3             |
|-----|-----------------------------------|---------------|
| 17. | <i>Condylura cristata</i>         | XP004695164.1 |
| 18. | <i>Coturnix japonica</i>          | XP015734065.1 |
| 19. | <i>Cricetulus griseus</i>         | XP007647278.1 |
| 20. | <i>Cynoglossus semilaevis</i>     | XP008321705.1 |
| 21. | <i>Cyprinus carpio</i>            | KTG43564.1    |
| 22. | <i>Dasyopus novemcinctus</i>      | XP004452440.1 |
| 23. | <i>Dipodomys ordii</i>            | XP012890439.1 |
| 24. | <i>Echinops telfairi</i>          | XP004711865.1 |
| 25. | <i>Elephantulus edwardii</i>      | XP006896323.1 |
| 26. | <i>Eptesicus fuscus</i>           | XP008155631.1 |
| 27. | <i>Equus asinus</i>               | XP014696462.1 |
| 28. | <i>Equus caballus</i>             | XP001491972.1 |
| 29. | <i>Erinaceus europaeus</i>        | XP007527511.1 |
| 30. | <i>Esox lucius</i>                | XP010882883.1 |
| 31. | <i>Felis catus</i>                | ABC69211.1    |
| 32. | <i>Fukomys damarensis</i>         | XP010608201.1 |
| 33. | <i>Gallus gallus</i>              | BAJ53029.1    |
| 34. | <i>Gorilla gorilla</i>            | XP004043777.1 |
| 35. | <i>Heterocephalus glaber</i>      | XP012928251.1 |
| 36. | <i>Homo sapiens</i>               | CAJ75800.1    |
| 37. | <i>Homo sapiens</i>               | AFK10115.1    |
| 38. | <i>Ictidomys tridecemlineatus</i> | XP005339098.1 |
| 39. | <i>Jaculus jaculus</i>            | XP004672045.1 |
| 40. | <i>Kryptolebias marmoratus</i>    | XP017281972.1 |
| 41. | <i>Latimeria chalumnae</i>        | XP014347016.1 |
| 42. | <i>Lepidothrix coronata</i>       | XP017692772.1 |
| 43. | <i>Lynx lynx</i>                  | ABC69212.1    |
| 44. | <i>Macaca fascicularis</i>        | XP005553488.1 |
| 45. | <i>Macaca mulatta</i>             | NP001181556.1 |
| 46. | <i>Manis javanica</i>             | XP017510722.1 |
| 47. | <i>Marmota marmota</i>            | XP015342974.1 |
| 48. | <i>Meleagris gallopavo</i>        | XP003214196.2 |
| 49. | <i>Microcebus murinus</i>         | XP012596547.1 |
| 50. | <i>Micropogonias undulatus</i>    | ACD44944.1    |
| 51. | <i>Monodelphis domestica</i>      | XP001376456.3 |
| 52. | <i>Mus musculus</i>               | BAA31153.1    |
| 53. | <i>Mustela putorius</i>           | XP012905654.1 |



## Załącznik 1 cd.

| 1   | 2                                 | 3             |
|-----|-----------------------------------|---------------|
| 54. | <i>Nannospalax galili</i>         | XP008819777.1 |
| 55. | <i>Nanorana parkeri</i>           | XP018411348.1 |
| 56. | <i>Octodon degus</i>              | XP004624536.1 |
| 57. | <i>Odobenus rosmarus</i>          | XP004415328.1 |
| 58. | <i>Orcinus orca</i>               | XP004286604.1 |
| 59. | <i>Orycteropus afer</i>           | XP007949637.1 |
| 60. | <i>Oryctolagus cuniculus</i>      | XP008260834.1 |
| 61. | <i>Oryzias latipes</i>            | XP004078124.1 |
| 62. | <i>Otolemur garnettii</i>         | XP003789336.1 |
| 63. | <i>Ovis aries musimon</i>         | XP012018856.1 |
| 64. | <i>Pan troglodytes</i>            | XP016810697.1 |
| 65. | <i>Panthera tigris altaica</i>    | XP007098805.1 |
| 66. | <i>Papio anubis</i>               | XP003897440.1 |
| 67. | <i>Papio ursinus</i>              | ABY57765.1    |
| 68. | <i>Parus major</i>                | XP015504442.1 |
| 69. | <i>Peromyscus maniculatus</i>     | XP006995656.1 |
| 70. | <i>Poecilia formosa</i>           | XP007559537.2 |
| 71. | <i>Poecilia mexicana</i>          | XP014824063.1 |
| 72. | <i>Pongo abelii</i>               | XP002816719.1 |
| 73. | <i>Protothrops mucrosquamatus</i> | XP015677834.1 |
| 74. | <i>Pteropus alecto</i>            | ELK18899.1    |
| 75. | <i>Pteropus vampyrus</i>          | XP011378108.1 |
| 76. | <i>Python bivittatus</i>          | XP007439680.1 |
| 77. | <i>Rattus norvegicus</i>          | NP476442.2    |
| 78. | <i>Saimiri boliviensis</i>        | XP003944373.1 |
| 79. | <i>Sarcophilus harrisii</i>       | XP012404356.1 |
| 80. | <i>Sorex araneus</i>              | XP004621383.1 |
| 81. | <i>Stegastes partitus</i>         | XP008294728.1 |
| 82. | <i>Sus scrofa</i>                 | NP999598.1    |
| 83. | <i>Takifugu rubripes</i>          | CAD45005.1    |
| 84. | <i>Trichechus manatus</i>         | XP004390861.1 |
| 85. | <i>Tupaia chinensis</i>           | XP006154384.1 |
| 86. | <i>Xenopus laevis</i>             | NP001087443.1 |
| 87. | <i>Xenopus tropicalis</i>         | XP002941314.3 |
| 88. | <i>Xiphophorus maculatus</i>      | XP005812688.1 |
| 89. | <i>Zonotrichia albicollis</i>     | XP014129342.1 |

## PHYLOGENETIC ANALYSIS *IN SILICO* AMINO ACID SEQUENCE OF CYTOCHROME P450C21 (CYP21A1) SELECTED CLUSTERS OF VERTEBRATES

### S u m m a r y

In this paper, the phylogenetic analysis based on the amino acid sequences (aa) of the steroid 21-hydroxylase (21HS), derived from the genomes of the 89 vertebrates belonging to different groups, was done. The enzyme of 21HS is a cytochrome P450C21 (CYP21A1) and is a key enzyme during adrenal steroidogenesis necessary for the synthesis of mineralocorticoid and glucocorticoid. Sequences analysed in this paper were derived from a modern living animals and deposited in GenBank database. The aim of the study was to conduct a phylogenetic analysis and to discuss the tree topology, including the significance of the nodes and to analyse the length of the branches, which were the results of divergence time and the number of substitution mutations in the sequence. The 21HS trees were generated with method maximum likelihood (ML) and the Bayesian methods. The tree was rooted with the sequence of *Latimeria chalumnae*, whose fossil remains were estimated at Devonian (about 400 million years). The sequences were grouped in the following manner: fishes, amphibians, reptiles, birds and mammals. The tree topology reflects the most likely evolutionary path sequence of 21 HS from the first vertebrates (fish) to the evolutionary youngest mammals, thereby bringing an understanding of its actual course in relation to the key enzyme adrenal steroidogenesis.

KEY WORDS: steroid 21-hydroxylase, phylogenetic analysis, amino acid sequences, evolution, vertebrates

Tadeusz Orłański<sup>1</sup>, Piotr Nowakowski<sup>2</sup>, Edward Pawlina<sup>2</sup>

**ZRÓŻNICOWANIE MASY TUSZ ORAZ MASY TROFEÓW  
KOZŁÓW SAREN (*CAPREOLUS CAPREOLUS* L.)  
Z OBWODÓW ŁOWIECKICH POLNYCH I LEŚNYCH  
POWIATU LEGNICKIEGO (DOLNY ŚLĄSK)  
DIVERSITY IN CARCASS WEIGHT AND TROPHY MASS  
OF ROE DEER (*CAPREOLUS CAPREOLUS* L.) BUCKS  
FROM FIELD AND FOREST HUNTING AREAS  
OF LEGNICA DISTRICT (LOWER SILESIA)**

<sup>1</sup> *Dolnośląski Ośrodek Doradztwa Rolniczego, Wrocław*

*Lower Silesian Centre for Agricultural Advisory, Wrocław*

<sup>2</sup> *Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

*The Faculty of Biology and Animal Science, Wrocław University of Environmental  
and Life Sciences*

Ocenę jakości osobniczej kozłów saren w różnym wieku przeprowadzono na podstawie analizy masy tuszy i masy poroży ( $n = 775$  osobników), pozyskanych w sezonach łowieckich od 1999/2000 do 2011/2012 w powiecie legnickim. Analizowano również wpływ ekosystemu – bonitacyjnej oceny zasobności gleb na badane cechy kozłów saren. Zmienność masy tuszy i masy poroża kozłów była znacząco ( $P \leq 0,05$ ) uzależniona od ich wieku. Współczynnik korelacji między masą tuszy a wiekiem kozłów wynosił  $r = 0,36$ , zaś między masą tuszy a masą trofeum  $r = 0,51$ . Mimo braku istotnych różnic między cechami kozłów z różnych środowisk stwierdzono wyższe jakościowo tyki kozłów według wyceny CIC ze środowiska leśnego (2,20/ 2,24 pkt. CIC) w porównaniu z najlepszym polnym (2,10/ 2,03 pkt. CIC) ( $P \leq 0,05$ ). W większości analizowanych trofeów tyki lewe były wyceniane wyżej od tyk prawych.

SŁOWA KLUCZOWE: sarna, kozły, tusza, poroża, biotop polny i leśny

## WSTĘP

Ocenę jakości osobniczej zwierząt najczęściej przeprowadza się na podstawie analizy masy ciała (Kjellander i wsp. 2006). U zwierząt wolno żyjących (saren) ocenę przeprowadza się na podstawie masy tuszy. Zmienność masy tuszy saren jest odzwierciedleniem warunków środowiskowych, w których przebywają (Flis 2015, Marzec 2012). Największy wpływ na zmienność masy tuszy ma ilość i jakość bazy pokarmowej. Sarny żyjące w warunkach leśnych i polnych (prawie idealne warunki żerowe i osłonowe) określane są jako zwierzęta ekotonowe (Pielowski 1999, Sporek 2012). W środowiskach o większym zagęszczeniu zwierząt i niskiej zasobności w składniki odżywcze masa tuszy zwierząt jest niższa (Flis 2015). Natomiast wskaźnik masy tuszy w określonym środowisku ściśle związany jest z wiekiem zwierząt (Dziedzic 1991, Dziedzic i Flis 2006, Flajšman i wsp. 2014, Flis 2005). Dodatkowymi wskaźnikami jakościowymi samców jeleniowatych są masa i wielkość poroży (trofeum) (Pélabon i Van Breukelen 1998).

Celem pracy była analiza zmienności masy tuszy i masy poroża u kozłów saren żyjących na terenie łowisk polnych i leśnych powiatu legnickiego w sezonach łowieckich od 1999/2000 do 2011/2012.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań jakości osobniczej kozłów saren pozyskano z dokumentacji kół łowieckich z powiatu legnickiego (Dolny Śląsk). Do badań użyto danych pochodzących od 775 osobników o regularnym porożu. Materiał badawczy uzyskano z arkuszy oceny prawidłowości odstrzału, pozyskiwanych w kolejnych sezonach łowieckich od lat 1999/2000 do 2011/2012. Po przeprowadzonych odstrzałach kozłów ich masa tusz i trofeum są ujmowane w protokołach (komisyjnie ważone tusze z dokładnością do 0,5 kg i poroża do 1 g – masa brutto). Jakość poroży (trofeum) przyjęto na podstawie oceny CIC (Conseil Internationale de la Chasse – Międzynarodowa Rada Łowiectwa) (Trense 1981). Wiek kozłów został określony na podstawie stopnia zużycia uzębienia (Pielowski 1999, Przybylska 2008).

Uwzględniając pochodzenie kozłów saren, w analizie populacji rozróżniono obwody polne (n = 4) i leśne (n = 2). Obwody łowieckie leśne należą do Nadleśnictwa Legnica i wchodzą w skład Borów Dolnośląskich. Do obwodów leśnych (według kategoryzacji) zalicza się obwody, w których łączna powierzchnia leśna stanowi co najmniej 40% ogólnej powierzchni obwodu (Prawo łowieckie 1995).

Większość obwodów łowieckich na terenie powiatu legnickiego stanowią obwody polne (71,75% gruntów) (EKO-PROJEKT 2009). Analizowane obwody polne położone są na terenie gmin: Chojnów, Krotoszyce i Miłkowice. Oprócz użytków zielonych (10–25% UR) na polach uprawiane są zboża, rośliny przemysłowe, okopowe, motylkowe i warzywa. Rejon ten obejmuje kompleksy glebowe: żytni (gleby pseudobielicowe) i pszenny (brunatne, mady i czarne ziemie) (Fatyga 2008). Zasobność gleb w makroelementy i kwasowość przyjęto za OSCH-R (2012). W zależności od zasobności gleby w makroelementy (P, K, S, Mg, Cu) obwody łowieckie polne przydzielono do trzech kategorii jakości środowiska rolniczego: dobrego, średniego i ubożego.

Zgromadzony materiał pozwolił na dokonanie analizy kształtowania się masy tusz i poroży (trofeum) oraz jakości poroży (ocena pkt. CIC) w relacji do wieku i typu środowiska, w którym przebywały sarny.

Obliczono średnią arytmetyczną ( $\bar{x}$ ) i odchylenie standardowe (sd) dla każdej badanej cechy, a w celu określenia istotności różnic cech kozłów uzyskane dane poddano testowi Tukeya.

## WYNIKI I Dyskusja

Masa tusz kozłów saren wraz z wiekiem ulegała zwiększeniu (tab. 1). U kozłów w młodszej grupie wiekowej (2–4-letnich) średnie masy tusz w kolejnych latach wynosiły: 13,12, 14,88 i 16,78 kg i różniły się statystycznie istotnie ( $P \leq 0,05$ ). W grupie kozłów 6- i 7-letnich masa tusz istotnie się zwiększyła – odpowiednio do 17,11 i 17,46 kg. Wraz z wiekiem ulegała zwiększeniu również masa poroża (trofeum) osobników. Analizując masy poroża kozłów, stwierdzono, że różniły się one istotnie od 2. do 6. roku życia ( $P \leq 0,05$ ). U starszych kozłów 6- i 7-letnich, u których masa poroży była największa (357,67 i 379,40 g), ze względu na większą zmienność masy poroży, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Liczba odnóg na tykach brana pod uwagę do oceny w młodszych grupach wiekowych (2–4-letnich) wynosiła od 1 do 2 odnóg. Różnice między tymi grupami wiekowymi pod względem oceny CIC były istotne statystycznie ( $P \leq 0,05$ ). W późniejszym wieku wyceniano większą liczbę odnóg (2–3) i nie stwierdzono istotnych różnic między kozłami 4- i 5-letnimi oraz 6- i 7-letnimi. Natomiast ocena kozłów najstarszych (6-, 7-letnich) była istotnie wyższa od kozłów z poprzednich dwóch klas wiekowych. W większości analizowanych trofeów tyki lewe były wyceniane wyżej od tyk prawych (tab. 1 i 3).

Otrzymane własne wyniki mas tusz są zbliżone do wyników uzyskanych przez Fruzińskiego i wsp. (1982) w populacjach kozłów ze środowisk leśnych i polnych, natomiast są niższe od wyników uzyskanych przez Dziedzica i Flisa (2007) na Wyżynie Lubelskiej w 2005 r. (masa tuszy 14,4–18,5 kg).

Tabela 1

Table 1

Charakterystyka populacji kozłów saren pozyskanych w powiecie legnickim w latach 1999–2012  
Roe deer stag population characteristics – game obtained in Legnica district from 1999 to 2012

| Wiek (lata)<br>Age<br>(years) | n   | Masa tuszy<br>(kg)<br>Carcass weight |      | Masa trofeum<br>(g)<br>Trophy mass |       | Ocena CIC<br>Lewa tyka<br>(pkt)<br>CIC grade<br>Left antler |      | Ocena CIC<br>Prawa tyka<br>(pkt)<br>CIC grade<br>Right antler |      |
|-------------------------------|-----|--------------------------------------|------|------------------------------------|-------|---|------|---|------|
|                               |     | $\bar{x}$                            | sd   | $\bar{x}$                          | sd    | $\bar{x}$   | sd   | $\bar{x}$   | sd   |
| Ogółem – Total                | 775 | 16,31                                | 2,30 | 305,77                             | 87,32 | 2,09  | 0,74 | 1,87  | 0,74 |
| 2                             | 34  | 13,12 <sup>a</sup>                   | 1,80 | 147,26 <sup>a</sup>                | 42,69 | 1,09 <sup>a</sup>   | 0,29 | 1,06 <sup>a</sup>   | 0,24 |
| 3                             | 171 | 14,88 <sup>b</sup>                   | 1,97 | 247,85 <sup>b</sup>                | 60,15 | 1,81 <sup>b</sup>   | 0,62 | 1,69 <sup>b</sup>   | 0,56 |
| 4                             | 170 | 16,78 <sup>c</sup>                   | 1,93 | 294,06 <sup>c</sup>                | 60,45 | 2,08 <sup>b</sup>   | 0,70 | 1,74 <sup>b</sup>   | 0,70 |
| 5                             | 151 | 16,55 <sup>c</sup>                   | 1,77 | 320,11 <sup>d</sup>                | 58,05 | 2,15 <sup>b</sup>   | 0,72 | 1,93 <sup>b</sup>   | 0,78 |
| 6                             | 148 | 17,11 <sup>d</sup>                   | 2,30 | 357,67 <sup>c</sup>                | 80,19 | 2,35 <sup>c</sup>   | 0,71 | 2,13 <sup>c</sup>   | 0,78 |
| 7                             | 101 | 17,46 <sup>d</sup>                   | 2,19 | 379,40 <sup>c</sup>                | 85,41 | 2,44 <sup>c</sup>   | 0,68 | 2,25 <sup>d</sup>   | 0,76 |

a, b, c, ... – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie  $P \leq 0,05$

a, b, c, ... – means denoted with different letters differ at  $P \leq 0.05$

Współczynnik korelacji (tab. 2) dla populacji saren kozłów pomiędzy masą tusz a masą poroży wyniósł  $r = 0,51$  i był porównywalny z wynikami badań przeprowadzonymi na Wyżynie Lubelskiej  $r = 0,61$  (Dziedzic i Flis 2006).

Tabela 2

Table 2

Współczynniki korelacji między masą tuszy i wybranymi cechami kozłów ( $P \leq 0,05$ ) ( $n = 775$ )  
Correlation coefficients between carcass weight and some buck traits ( $P \leq 0.05$ ) ( $n = 775$ )

| Cecha<br>Trait               | Wiek<br>Age | Masa trofeum<br>Trophy<br>mass | Ocena CIC<br>Lewa tyka<br>CIC grade<br>Left antler | Ocena CIC<br>Prawa tyka<br>CIC grade<br>Right antler |
|------------------------------|-------------|--------------------------------|--|--|
| Masa tuszy<br>Carcass weight | + 0,36      | + 0,51                         | + 0,28   | + 0,26   |

Według Anderson i Linnell (2000) na jakość osobniczą saren decydująco wpływa środowisko (ilość pokarmu i wskaźnik zagęszczenia). Przy wyższym zagęszczeniu zwierzęta otrzymują mniejszą ilość pokarmu. W powiecie legnickim na 1000 ha lasów i pól wskaźnik zagęszczenia kozłów saren określa się w granicach 40–56 osobników (Budny i wsp. 2011). W środowisku leśnym kozły nie były istotnie lżejsze od kozłów przebywających w środowisku polnym (tab. 3). Masa poroży natomiast była nieznacznie wyższa w stosunku do kozłów z uboższych siedlisk polnych. Zasoby ilości paszy w środowisku polnym są zróżnicowane w zależności od urodzajności gleb. Najwyższą masę tusz osiągały kozły przebywające na urodzajnych (dobrych) glebach (17,68 kg). Masa poroży kozłów saren na glebach dobrych była również najwyższa (tab. 3).

Tabela 3

Table 3

Porównanie masy tusz i jakości poroża kozłów saren w zależności od jakości środowiska

( $n = 755$ )

Comparison of carcass weight and trophy quality of roe deer bucks due to environment grading

( $n = 755$ )

| Środowisko<br>Environment                      | n   | Masa tuszy<br>(kg)<br>Carcass<br>weight |      | Masa poroża<br>(g)<br>Trophy mass |       | Ocena tyk (pkt CIC)<br>Antler grade (CIC pt) |      |                   |      |
|--|-----|---|------|-----------------------------------|-------|--|------|-------------------|------|
|  |     | $\bar{x}$                               | sd   | $\bar{x}$                         | sd    | Lewa<br>Left                                 |      | Prawa<br>Right    |      |
|  |     |   |      |                                   |       | $\bar{x}$                                    | sd   | $\bar{x}$         | sd   |
| Leśne<br>Forest                                | 158 | 16,50                                   | 2,18 | 352,50                            | 50,00 | 2,20 <sup>a</sup>                            | 0,74 | 2,24 <sup>a</sup> | 0,76 |
| Dobre rolnicze<br>Rich soil agric. land        | 108 | 17,68                                   | 2,07 | 356,01                            | 85,83 | 2,10 <sup>b</sup>                            | 0,76 | 2,03 <sup>b</sup> | 0,77 |
| Średnie rolnicze<br>Medium soil agric.<br>land | 425 | 16,94                                   | 2,53 | 328,25                            | 77,04 | 1,78 <sup>c</sup>                            | 0,90 | 1,70 <sup>c</sup> | 0,88 |
| Ubogie rolnicze<br>Poor soil agric. land       | 64  | 17,03                                   | 1,69 | 302,00                            | 51,68 | 1,64 <sup>c</sup>                            | 0,74 | 1,62 <sup>c</sup> | 0,74 |

a, b, c, ... – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie  $P \leq 0,05$

a, b, c, ... – means denoted with different letters differ at  $P \leq 0.05$

Mimo braku istotnych różnic między masą tusz i trofeów kozłów z różnych środowisk stwierdzono istotnie wyższe jakościowo tyki kozłów według wyceny CIC ze środowiska leśnego (2,20/ 2,24 pkt. CIC) w porównaniu z najlepszym polnym (2,10/ 2,03 pkt. CIC) ( $P \leq 0,05$ ). Kozły ze środowiska polnego uboższego charakteryzowały się nieco gorszymi trofeami (1,64/ 1,62 pkt. CIC) w stosunku do kozłów ze środowiska średnio zasobnego (1,78/ 1,70 pkt. CIC), a te z kolei nieco gorszymi trofeami w stosunku do środowiska dobrego. W większości analizowanych trofeów tyki lewe były wyceniane wyżej od tyk prawych.

Na podstawie analizy masy tusz kozłów środowisko leśne i polne nie różniło się istotnie pod względem zasobności w podstawowe składniki pokarmowe, pozwalając na osiąganie podobnych wskaźników wzrostu. Z uwagi na większą różnorodność szaty botanicznej w obwodach leśnych, które również zawierały do 60% powierzchni pól, środki biologicznie czynne zawarte w bardziej urozmaiconej karmie prawdopodobnie wpłynęły na tendencję uzyskiwania wyżej wycenionych parostków z obwodów leśnych. Jak podają Majewska i wsp. (1982), sarny zamieszkujące środowisko polne i leśne różnią się pod względem poziomu procesów biochemicznych i to mogło się przekładać na inne jakościowo trofea (wycena CIC) z obwodów leśnych i polnych w niniejszych badaniach.

## PODSUMOWANIE

Warunki środowiskowe, a zwłaszcza czynniki troficzne, wpływają na wzrost i masę trofeum (poroży) kozłów saren. Dokonana analiza kozłów saren żyjących na terenach polnych i leśnych powiatu legnickiego (Dolny Śląsk) wskazuje na ich zróżnicowanie. Stwierdzono, że kozły saren w wieku od dwóch do siedmiu lat sukcesywnie powiększały masę tusz i masę poroży, a wiek kozłów saren decydująco wpływał na masę tuszy i poroża (trofeum). Wartość współczynnika korelacji pomiędzy masą tusz a wiekiem kozłów wynosiła  $r = 0,36$ , zaś między masą tusz i masą poroży  $r = 0,51$ .

Największą masę tusz (17,7 kg) osiągały kozły przebywające na urodzajnych (dobrych) glebach obwodów polnych. Masa poroży kozłów saren na glebach dobrych była również najwyższa. Natomiast stwierdzono wyższe jakościowo tyki kozłów według wyceny CIC ze środowiska leśnego (2,20/ 2,24 pkt. CIC) w porównaniu z najlepszym polnym (2,10/ 2,03 pkt. CIC) ( $P \leq 0,05$ ).

## PIŚMIENNICTWO

- Anderson R., Linnell J.D.C., 2000. Irruptive potential in roe deer: density – dependent effects on body mass and fertility. *Journal of Wildlife Management*, 64: 698–706.
- Budny M., Bresiński W., Kamieniarz R., Kolanoś B., Mąka H., Panek M., 2011. Sytuacja zwierząt łownych w Polsce w roku łowieckim 2010/2011 (wyniki monitoringu) Stacji Badawczej w Czempieniu, 8: 19–23.
- Dziedzic R., 1991. Ocena wybranych cech fenotypowych samców saren (*Capreolus capreolus* L.) oraz wpływ na nie czynników środowiskowych na przykładzie makroregionu środkowo-wschodniej Polski. Rozpr. nauk. AR w Lublinie. Wyd. AR Lublin.

- Dziedzic R., Flis M., 2006. Charakterystyka wybranych cech jakości osobniczej samców saren (*Capreolus capreolus* L., 1758) z Wyżyny Lubelskiej. *Annales UMCS.*, sec. EE. XXIV: 415–422.
- Dziedzic R., Flis M., 2007. Zmienność w czasie jakości osobniczej samców saren (*Capreolus capreolus* L., 1758) z Wyżyny Lubelskiej. *Annales UMCS.*, sec. EE, vol. XXV(2): 17–25.
- EKO-PROJEKT, 2009. Wykonanie badań skażeń gleb w powiecie legnickim. Zakład Inżynierii Środowiskowej: 8.
- Fatyga J., 2008. Raport z wykonania zadania pt: Elektroniczna baza danych o czynnikach przyrodniczych numerycznych model terenu jako podstawa kształtowania granicy rolno-leśnej w powiecie legnickim.
- Flajšman K., Jelenko I., Pokorny B., 2014. Reproductive potential of roe deer in Slovenia. *Balkan Journal of Wildlife Research*, 1 (1): 20–25.
- Flis M., 2005. Funkcjonowanie populacji kopytnych w wybranych kompleksach leśnych Lubelszczyzny. Część II – Ocena jakości osobniczej samców jeleniowatych. *Annales UMCS*, sec. EE, XXIII: 221–229.
- Flis M., 2015. Zmienność jakości osobniczej i wskaźników wydajności poubojowej saren na Wyżynie Lubelskiej. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 11 (4): 53–63.
- Fruziński B., Kałuziński J., Baksalary J., 1982. Weight and body measurements of forest and field roe deer. *Acta Theriologica*, 27, 33: 479–488.
- Kjellander P., Gaillard J.M., Hewison A.J.M., 2006. Density-dependent responses of fawn cohort body mass in two contrasting roe deer populations. *Oecologia*, 146 (4): 521–530.
- Majewska B., Pielowski Z., Łabędzki L., 1982. The level of some metabolism indices in forest and field populations of roe deer. *Acta Theriologica*, 27, 32: 471–477.
- Marzec B., 2012. Kozioł jak byk. *Łowiec Polski*, 8: 32–39.
- OSCH-R., 2012. Wyniki badań na zawartość makroelementów. Okręgowa Stacja Chemiczno-Rolnicza we Wrocławiu.
- Pélabon C., Van Breukelen L., 1998. Asymmetry in antler size in roe deer (*Capreolus capreolus*): index of individual and population conditions. *Oecologia*, 116 (1–2): 1–8.
- Pielowski Z., 1999. Sarna. Wydawnictwo Świat. Warszawa.
- Prawo łowieckie, 1995. Ustawa z dnia 13. października 1995 roku – Prawo łowieckie, (Dz.U. z 2004 r. Nr 92, poz. 880, Nr 172, poz. 1802, Nr 173, poz. 1808).
- Przybylska A., 2008. Klucz do oznaczania wieku jeleni, danieli, saren, muflonów i dzików. Wydawnictwo Zachodni Poradnik Łowiecki, Piła.
- Sporek M., 2012. The body mass of the roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in the foothills of the East Sudety Mountains. *Annales UMCS*, EE, Vol. XXX, 4: 96–105.
- Trense W., 1981. The game-trophies of the world. Hamburg und Berlin. Verlag Paul Parey.

**DIVERSITY IN CARCASS WEIGHT AND TROPHY MASS  
OF ROE DEER (*CAPREOLUS CAPREOLUS* L.) BUCKS FROM FIELD  
AND FOREST HUNTING AREAS OF LEGNICA DISTRICT  
(LOWER SILESIA)**

**S u m m a r y**

Evaluation of the quality of roe deer bucks at different age (2–7 years) was performed based on carcass weight and trophy mass and quality of roe deer (*Capreolus capreolus* l.) bucks (n = 775) from field and forest hunting areas of Legnica district (Lower Silesia) obtained in years 1999 to 2012. The effect of the quality of the ecosystem – soil fertility grade, was taken into consideration while analyzing bucks traits. Diversity of carcass weight and trophy mass was significantly ( $P \leq 0,05$ ) affected by age. Correlation coefficient between carcass weight and the age of buck was



$r = +0.36$ , while between carcass weight and trophy mass was  $r = +0.51$ . Despite lack of significant differences in carcass and trophy mass between field and forest ecosystems antlers quality was significantly affected. Bucks from forest hunting area had the highest score of antler quality (2,20/2,24 pt CIC) when compared to bucks from the field environment described as rich soil agriculture land (2,10/2,03 pt CIC). In most trophies left antlers were graded higher than right ones.

KEY WORDS: roe deer, bucks, carcass, trophy, field and forest biotope



**Justyna Para, Karina Danielewicz,  
Bożena Marszałek-Kruk, Anna Mucha**

**ANALIZA MOLEKULARNA EKSONU 10 GENU *TCOF1*  
U DZIEWCZYNEK I CHŁOPCÓW Z ZESPOŁEM  
TREACHERA COLLINSA**

**MOLECULAR ANALYSIS OF EXON 10 OF THE *TCOF1* GENE  
IN GIRLS AND BOYS WITH TREACHER  
COLLINS SYNDROME**

*Katedra Genetyki, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

*Department of Genetics, Wrocław University of Environmental and Life Sciences*

Zespół Treachera Collinsa (TCS), zwany również zespołem Franceschettiego, jest chorobą genetyczną dziedziczną w sposób autosomalny dominujący, warunkującą zaburzenia rozwoju w obrębie twarzoczaszki. Zaliczana jest do dyzostoz zuchwowo-twarzowych (ang. *mandibulofacial dysostosis*, MFD1) i objawia się silnymi deformacjami twarzy powstającymi na skutek zaburzeń różnicowania we wczesnej embriogenezie.

Powszechnie uważa się, że chorobę powodują przede wszystkim mutacje genu *TCOF1* (dotychczas opisano ich około 200). Niedawno opisano, że mutacje w genach – *POLRIC* i *POLRID* – mogą być również związane z TCS.

Celem pracy była analiza substytucji c.1347C>T (rs2071238) w obrębie eksonu 10 genu *TCOF1* (Gene ID: 6949) w grupie dziewczynek oraz chłopców z typowymi objawami zespołu Treachera Collinsa oraz grupie kontrolnej osób zdrowych, a ponadto określenie częstotliwości występowania allelu c.1347C i ustalenie, jakie genotypy występują w omawianych grupach. Analizę molekularną wykonano za pomocą metody PCR, RFLP, analizy statystycznej przy użyciu testów asocjacji alleli (dokładnego testu Fishera, testu chi-kwadrat).

Po przeprowadzeniu analiz stwierdzono obecność substytucji c.1347C>T w obu badanych grupach. Częstość allelu c.1347C u chorych wynosiła: 40% u dziewczynek i 50% u chłopców oraz 46% u zdrowych kobiet i 92% u zdrowych mężczyzn. Na podstawie badanej grupy osób przypuszcza się, że genotyp heterozygotyczny ma istotny wpływ na występowanie choroby TCS.

**SŁOWA KLUCZOWE:** zespół Treachera Collinsa, gen *TCOF1*, ekson 10, substytucja c.1347C>T

## WSTĘP

Zespół Treachera Collinsa (TCS – ang. *Treacher Collins syndrome*, OMIM 154500) jest rzadką, genetyczną chorobą objawiającą się u chorych deformacjami twarzoczaszki o różnym stopniu nasilenia. Do najczęstszych zaburzeń charakteryzujących chorobę należą: niedorozwinięcie kości jarzmowych oraz żuchwy, skośne ustawienie powiek, a także rozszczep podniebienia, wargi oraz powiek (Marszałek-Kruk i wsp. 2006, 2012, Wójcicki i wsp. 2005). Anomalie dotyczące głowy i twarzy zazwyczaj występują obustronnie, a stopień nasilenia choroby nie postępuje wraz z wiekiem (Andrade i wsp. 2006, Roberts i wsp. 1975).

TCS występuje w populacji ogólnej z częstością 1 na 50 000 żywych urodzeń (Dixon i wsp. 1992). Uważa się, że główną przyczyną są mutacje w obrębie genu *TCOF1* (Treacher Collins – Franceschetti 1, OMIM 606847), jednakże nie występują one w 100% przypadków – u niektórych pacjentów z zespołem Treachera Collinsa, u których nie wykryto mutacji w genie *TCOF1*, zmiany zlokalizowano w genach *POLRIC* czy *POLRID* (Dauwerse i wsp. 2011).

Gen *TCOF1* opisany został po raz pierwszy w 1996 r. przez Treacher Collins Syndrome Collaborative Group (TCSCG 1996), zlokalizowany jest w chromosomie 5 w pozycji q32–33.1, ma wielkość 43 kpz (NT 029289) i składa się z 26 eksonów, o długości od 49 do 561 pz. Większość sekwencji kodującej znajduje się w eksonach 2–24 (Marszałek i wsp. 2002, Marszałek-Kruk i wsp. 2006). W 2004 roku So i wsp. odkryli dwa nowe eksony – 6A oraz 16A. W genie *TCOF1* opisano do tej pory około 200 mutacji odpowiedzialnych za zespół Treachera Collinsa (Hao i wsp. 2016, Vincent i wsp. 2016). Większość mutacji zlokalizowanych jest w eksonach 7, 10, 13, 15, 16, 23 i 24, z czego najwięcej znajduje się w eksonie 23 i 24 (Marszałek-Kruk i wsp. 2006, Wójcicki i wsp. 2005). Najczęstszymi mutacjami są delecje, stanowiące około 70% rozpoznanych mutacji (Marszałek-Kruk i wsp. 2014); kolejnymi pod względem częstości występowania są insercje. Transkrypt genu *TCOF1* koduje białko zwane *treacle* złożone z 1411 aminokwasów. Jest to fosfoproteina jądrowa zbudowana z 3 domen (N-końcowa, C-końcowa oraz domena centralna) (Winokur i wsp. 1998, Wise i wsp. 1997). Ponadto, w *TCOF1* opisano ponad 20 polimorfizmów w eksonach 7, 8, 10, 11, 13, 16, 20, 21 i 23 (Marszałek-Kruk i wsp. 2006).

## CEL PRACY

Celem pracy była analiza substytucji c.1347C>T w obrębie eksonu 10 genu *TCOF1* w grupie dziewczynek i chłopców z typowymi objawami zespołu Treachera Collinsa, u których nie wykryto mutacji w genie *TCOF1*, oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych. Tranzycja c.1347C>T nie powoduje zamiany aminokwasowej (p.P449P). Praca badawcza skupiła się na próbie określenia, w jaki sposób poszczególne genotypy mają wpływ na występowanie choroby TCS.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowił DNA pochodzący od 10 chłopców i 5 dziewczynek z zespołem Treachera Collinsa oraz od 12 zdrowych mężczyzn i 27 zdrowych kobiet stanowiących grupę kontrolną. DNA został wyizolowany z leukocytów krwi obwodowej metodą wysalania.

Ekson 10 genu *TCOF1* amplifikowano za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z wykorzystaniem specyficznych starterów firmy *Sigma Life Science* o następujących sekwencjach:

F:5'-ACTCCCTCCCTAATCTTGTC-3'

R:5'-GAAAGAGCCTTACAGGAAGG-3'

Długość produktu PCR amplifikowanego eksonu 10 wyniosła 279 pz.

W celu sprawdzenia, czy w grupach badanych występuje substytucja c.1347C>T, wykonano analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. *restriction fragments length polymorphism*) przy użyciu enzymu restrykcyjnego *SmaI* (*Thermo Scientific*), którego charakterystykę przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1  
Table 1

Charakterystyka enzymu restrykcyjnego *SmaI*  
Characteristics of restriction enzyme *SmaI*

| Nazwa enzymu<br>Name of enzyme | Rozpoznawana sekwencja<br>Recognizable sequence | Optymalna temperatura<br>Optimum temperature |
|--------------------------------|---|--|
| <i>SmaI</i>                    | 5' – CCCGGG – 3'<br>3' – GGGCCC – 5'            | 37°C   |

Analiza statystyczna została wykonana w pakiecie statystycznym R (R Core Team, 2015). W analizie statystycznej test Fishera był stosowany w celu zweryfikowania statystycznej istotności wpływu pojawienia się określonego wariantu genu na pojawienie się choroby w grupie kobiet i mężczyzn.

Dokładny test Fishera używany był ze względu na niską liczebność analizowanych podgrup. Statystyczna istotność wpływu pojawienia się określonego wariantu genu na występowanie choroby w całej grupie badanych weryfikowana była przy wykorzystaniu testu  $\chi^2$  z poprawką Yatesa.

W przypadku stwierdzenia istotnego statystycznie wpływu określonego genotypu na częstotliwość pojawiania się choroby traktowano ten genotyp jako czynnik ryzyka oraz szacowano ryzyko zachorowania w grupie narażonej na działanie czynnika (danego genotypu), ryzyko zachorowania w grupie nienarażonej na działanie czynnika (danego genotypu) i względne ryzyko zachorowania (Petrie i Sabin 2006). Korzystano przy tym z następujących formuł:

$$\text{ryzyko dla grupy narażonej} = \frac{\text{liczba chorych narażonych}}{\text{liczba badanych narażonych}}$$

$$\text{ryzyko dla grupy nienarażonej} = \frac{\text{liczba chorych nienarażonych}}{\text{liczba badanych nienarażonych}}$$

$$\text{ryzyko względne} = \frac{\text{ryzyko dla grupy narażonej}}{\text{ryzyko dla grupy nienarażonej}}$$

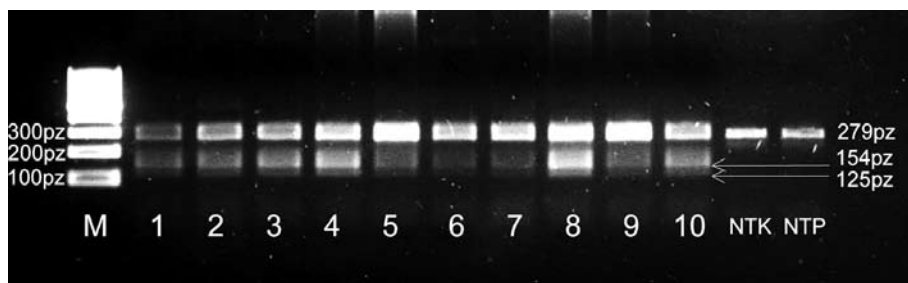
## WYNIKI

Próby poddane analizie RFLP zwizualizowano na żelu agarozowym w celu oceny genotypów na podstawie ilości i długości otrzymanych prążków.

W analizie restrykcyjnej eksonu 10 przy użyciu enzymu restrykcyjnego *SmaI* otrzymano następujące genotypy: homozygoty TT (279 pz), homozygoty CC (154 pz, 125 pz) oraz heterozygoty CT (279 pz, 154 pz, 125 pz) (Marszałek-Kruk i wsp. 2006).

Wśród analizowanej grupy chorych dziewczynek otrzymano 4 heterozygoty CT oraz jedną homozygotę TT, zaś w grupie kontrolnej dziewczynek zdrowych 23 heterozygoty CT, 3 homozygoty TT i jedną homozygotę CC.

W grupie chłopców z zespołem Treachera Collinsa wystąpiło 10 heterozygot CT (ryc. 1), natomiast w grupie 12 zdrowych mężczyzn: 11 homozygot CC oraz jedna homozygota TT.



Ryc. 1. Analiza restrykcyjna eksonu 10 przy użyciu enzymu *SmaI*: (M – marker, 1–10 – heterozygoty C/T, NTK – nietrawiona próba kontrolna, NTP – nietrawiona próba jednego z pacjentów)

Fig. 1. Restriction analysis of exon 10 with the use of *SmaI* enzyme (M – marker, 1–10 heterozygotes C/T, NTK – non-digested control probe, NTP – non-digested probe of a patient)

Zestawienie liczebności osób chorych i zdrowych z podziałem ze względu na posiadany genotyp i allel przedstawiono w tabeli nr 2.

Tabela 2  
Table 2

Rozkład genotypów oraz częstości alleli  
Distribution of genotypes and allele frequencies

| Genotyp<br>Allele<br>Genotype<br>alleles | Osoby chore<br>Patients |                  | Osoby zdrowe<br>Healthy |                  |
|--|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
|  | kobiety<br>women        | mężczyźni<br>men | kobiety<br>women        | mężczyźni<br>men |
| CC                                       | 0                       | 0                | 1                       | 11               |
| CT                                       | 4                       | 10               | 23                      | 0                |
| TT                                       | 1                       | 0                | 3                       | 1                |
| C  | 46,7%                   |                  | 60,3%                   |                  |
| T  | 53,3%                   |                  | 39,7%                   |                  |

W pierwszej kolejności testy asocjacji przeprowadzono wyłącznie z podziałem na grupę chorych i grupę kontrolną (*case-control*), nie stwierdzając istotnego wpływu pojawienia się określonego allelu na zachorowanie (test  $\chi^2$  z poprawką Yatesa, p-wartość = 0,2895). Natomiast statystycznie istotny okazał się wpływ genotypu na zachorowanie (dokładny test Fishera, p-wartość = 0,02157). W związku z tym posiadanie genotypu heterozygotycznego uznano za czynnik ryzyka oraz oszacowano ryzyko zachorowania w grupie narażonej na działanie czynnika (genotypu heterozygotycznego).

Ze względu na stwierdzenie statystycznej istotności wpływu posiadanego genotypu na zachorowanie genotyp heterozygotyczny CT uznano za czynnik ryzyka oraz oszacowano ryzyko zachorowania w grupie narażonej na działanie czynnika, ryzyko zachorowania w grupie nienarażonej na działanie czynnika i względne ryzyko zachorowania. Wyniki oszacowań przedstawia tabela 3.

Tabela 3  
Table 3

Ryzyko zachorowania w poszczególnych grupach badanych osób  
Risk of illness in particular groups of examined persons

| Ryzyko zachorowania w grupie osób posiadających genotyp heterozygotyczny<br>Risk of illness in group of people with heterozygous genotype | Ryzyko zachorowania w grupie osób posiadających genotyp homozygotyczny<br>Risk of illness in group of people with homozygous genotype | Względne ryzyko zachorowania<br>Relative risk of illness |
|---|---|--|
| 37,84%  | 5,88%   | 6,43%  |

Względne ryzyko zachorowania wskazuje, że prawdopodobieństwo pojawienia się choroby było ponad sześciokrotnie wyższe w grupie narażonej na działanie czynnika ryzyka (w grupie osób z genotypem heterozygotycznym) niż w grupie na ten czynnik nienarażonej (genotyp homozygotyczny).

Następnie sprawdzono, czy można mówić o statystycznie istotnym wpływie na zachorowanie w przypadku układu dominującego (CC vs CT+TT) i recesywnego (CC+CT vs TT). Statystycznie istotny był wyłącznie wpływ układu dominującego (dokładny test Fishera, p-wartość = 0,02389). W tym układzie ryzyko zachorowania wśród osób z genotypem CC jest równe 0, natomiast w grupie z przynajmniej jednym allelem T wynosi ono 35,71%. W przypadku układu recesywnego nie można mówić o wpływie jakiegokolwiek układu genotypów na zachorowanie ( $p = 1$ ).

W badanych grupach stwierdzono istotne odchylenie od równowagi Hardy'ego-Weinberga ( $p = 0,001734$ ). W związku z tym posiadanie genotypu heterozygotycznego uznano za czynnik ryzyka.

## OMÓWIENIE I WNIOSKI

W eksonie 10 genu *TCOF1* zostało opisanych m.in. 5 mutacji (tab. 4), a także dwa polimorfizmy (tab. 5).

Tabela 4  
Table 4

Zestawienie mutacji znalezionych w eksonie 10 genu *TCOF1*  
Summary of mutations found in exon 10 of *TCOF1* gene

| Lp. No. | Ekson Exon | Mutacje Mutations          | Efekt fenotypowy<br>Phenotype effect                      | Piśmiennictwo<br>Literature |
|---------|------------|----------------------------|---|-----------------------------|
| 1.      | 10         | c.1406_1409del <b>AGAG</b> | Przesunięcie ramki odczytu<br>Change of the reading frame | Splendore i wsp. (2000)     |
| 2.      | 10         | c.1408_1409del <b>AG</b>   | Przesunięcie ramki odczytu<br>Change of the reading frame | Wise i wsp. (1997)          |
| 3.      | 10         | c.1326_1327ins <b>A</b>    | Przesunięcie ramki odczytu<br>Change of the reading frame | TCSCG (1996)                |
| 4.      | 10         | c.1442_1443ins <b>GG</b>   | Przesunięcie ramki odczytu<br>Change of the reading frame | TCSCG (1996)                |
| 5.      | 10         | c.1287_1288ins <b>G</b>    | Przesunięcie ramki odczytu<br>Change of the reading frame | Splendore i wsp. (2002)     |

Tabela 5  
Table 5

Zestawienie polimorfizmów znalezionych w eksonie 10 genu *TCOF1*  
Summary of polymorphisms found in exon 10 of *TCOF1* gene

| Lp. No. | Ekson Exon | Mutacje Mutations | Efekt fenotypowy<br>Phenotype effect | Piśmiennictwo<br>Literature |
|---------|------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1.      | 10         | c.1316C>T         | p.P439L                              | Wise i wsp. [1997]          |
| 2.      | 10         | c.1347C>T         | p.P449P                              | Wise i wsp.[1997]           |



Celem pracy było sprawdzenie, czy w eksonie 10 genu *TCOF1* u osobników badanych grup znajduje się substytucja c.1347C>T oraz określenie, w jaki sposób poszczególne genotypy mają wpływ na występowanie choroby TCS.

Diagnostyka eksonu 10 wykonana została z wykorzystaniem techniki izolacji DNA, reakcji łańcuchowej polimerazy oraz analizy restrykcyjnej.

Poszukiwana w eksonie 10 substytucja należy do jednych z najczęstszych polimorfizmów *TCOF1*. W badaniach Wise i wsp. (1997) jej frekwencja wynosiła 77%, u Splendore i wsp. (2000) częstość allelu C wynosiła 74,5%, zaś u Marszałek-Kruk i wsp. (2006) frekwencja allelu C wynosiła 87,1% dla grupy pacjentów z TCS i 86% dla osób zdrowych. Odnosząc się do powyższych wyników badań, częstotliwość substytucji c.1347C>T u kobiet osiągnęła niższą wartość od wspomnianych (u zdrowych 46%, u chorych 40%). W przypadku mężczyzn częstość allelu C wynosiła u zdrowych 92%, u chorych 50%.

Dodatkowo w grupie tej zaobserwowano także istnienie pewnej zależności w występowaniu konkretnych genotypów – homozygoty CC oraz TT to genotypy, które wystąpiły jedynie u zdrowych mężczyzn, natomiast heterozygoty CT odnotowano wyłącznie u mężczyzn z TCS. Być może relacja obserwowana w niniejszej pracy występuje wyłącznie u osób płci męskiej, jednak liczba osób poddanych badaniom była zbyt niska, aby można to było jednoznacznie stwierdzić.

Na podstawie uzyskanych wyników możemy wnioskować, że występowanie genotypu heterozygotycznego może mieć wpływ na pojawienie się objawów zespołu TCS. Jednak należy to sprawdzić na większej grupie badanych.

## PIŚMIENNICTWO

- Andrade E.C., Junior V.S., Didoni A.L.S., Freitas P.Z., Carneiro A.F., Yoshimoto F.R., 2006. Treacher Collins syndrome with choanal atresia: a case report and review of disease features. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, 71 (1): 107–110.
- Dixon M.J., Dixon J., Raskova D., Le Beau M.M., Williamson R., Klinger K., Landes G.M., 1992. Genetic and physical mapping of the Treacher Collins syndrome locus: refinement of the localization to chromosome 5q32-33.2. *Hum. Mol. Genet.*, 1 (4): 249–253.
- Hao S., Jin L., Wang H., Li C., Zheng F., Ma D., Zhang T., 2016. Mutational Analysis of *TCOF1*, *GSC*, and *HOXA2* in Patients With Treacher Collins Syndrome. *J. Craniofac. Surg.*, 27 (6): e583–586.
- Dauwerse J.G., Dixon J., Seland S., Ruivenkamp C.A., van Haeringen A., Hoefsloot L.H., Peters D.J., Boers A.C., Daumer-Haas C., Maiwald R., Zweier C., Kerr B., Cobo A.M., Toral J.F., Hoogeboom A.J., Lohmann D.R., Hehr U., Dixon M.J., Breuning M.H., Wieczorek D., 2011. Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome. *Nat. Genet.*, 43 (1): 20–22.
- Marszałek B., Wójcicki P., Kobus K., Trzeciak W.H., 2002. Clinical features, treatment and genetic background of Treacher Collins syndrome. *J. Appl. Genet.*, 43 (2): 223–233.
- Marszałek-Kruk B., Wójcicki P., Kobus K., Trzeciak W.H., 2006. Genetic polymorphism of *TCOF1* does not correlate with symptoms of Treacher Collins syndrome. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 78, 11: 1239–1251.
- Marszałek-Kruk B.A., Wójcicki P., Śmigiel R., Trzeciak W.H., 2012. Novel insertion in exon 5 of the *TCOF1* gene in twin sisters with Treacher Collins syndrome. *J. Appl. Genet.*, 53: 279–282.

- Marszałek-Kruk B.A., Śmigiel R., Szaśiadek M.M., 2014. Novel mutation in the *TCOF1* gene in a patient with Treacher Collins syndrome. *Pediatrics Polska*, 89: 462–465.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM., 154500. Baltimore, MD: Johns Hopkins University, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM., 606847. Baltimore, MD: Johns Hopkins University, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- Petrie A., Sabin C., 2006. *Statystyka medyczna w zarysie*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- R Core Team., 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Roberts F.G., Pruzansky S., Aduss H., 1975. An x-radiocephalometric study of mandibulofacial dysostosis in man. *Arch. Oral Biol.*, 20 (4): 265–281.
- So R.B., Gonzales B., Henning D., Dixon J., Dixon M.J., Valdez B.C., 2004. Another face of the Treacher Collins syndrome (*TCOF1*) gene: identification of additional exons. *Gene*, 328: 49–57.
- Splendore A., Silva E.O., Alonso L.G., Richeri-Costa A., Alonso N., Rosa A., Carakushanky G., Cavalcanti D.P., Brunoni D., Passos-Bueno R.R., 2000. High mutation detection rate in *TCOF1* among Treacher Collins syndrome patients reveals clustering of mutations and 16 novel pathogenic changes. *Hum. Mutat.*, 16: 315–322.
- Treacher Collins Syndrome Collaborative Group (TCSCG), 1996. Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. *Nat Genet.*, 12: 130–136.
- Vincent M., Geneviève D., Ostertag A., Marlin S., Lacombe D., Martin-Coignard D., Coubes C., David A., Lyonnet S., Vilain C., Dieux-Coeslier A., Manouvrier S., Isidor B., Jacquemont M.L., Julia S., Layet V., Naudion S., Odent S., Pasquier L., Pelras S., Philip N., Pierquin G., Prieur F., Aboussair N., Attie-Bitach T., Baujat G., Blanchet P., Blanchet C., Dollfus H., Doray B., Schaefer E., Edery P., Giuliano F., Goldenberg A., Goizet C., Guichet A., Herlin C., Lambert L., Leheup B., Martinovic J., Mercier S., Mignot C., Moutard M.L., Perez M.J., Pinson L., Puechberty J., Willems M., Randrianaivo H., Szakszon K., Toutain A., Verloes A., Vigneron J., Sanchez E., Sarda P., Laplanche J.L., Collet C., 2016. Treacher Collins syndrome: a clinical and molecular study based on a large series of patients., *Genet. Med.*, 18 (1): 49–56.
- Winokur S.T., Shiang R., 1998. The Treacher Collins syndrome (*TCOF1*) gene product, treacle, is targeted to the nucleolus by signals in its C-terminus. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 1947–1952.
- Wise C.A., Chiang L.C., Paznekas W.A., Sharma M., Musy M.M., Ashley J.A., Lovett M., Jabs E.W., 1997. *TCOF1* gene encodes a putative nucleolar phosphoprotein that exhibits mutations in Treacher Collins syndrome throughout its coding region. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 3110–3115.
- Wójcicki P., Marszałek-Kruk B., 2005. Uwarunkowania genetyczne oraz zasady leczenia zespołu Treachera Collinsa. *Dent. Med. Probl.*, 42, 4: 619–626.

## MOLECULAR ANALYSIS OF EXON 10 OF THE *TCOF1* GENE IN GIRLS AND BOYS WITH TREACHER COLLINS SYNDROME

### Summary

Treacher Collins syndrome (TCS) also known, as Franceschetti syndrome is a disorder transmitted as an autosomal dominant trait and manifested by facial disorders. The disease belongs to the category of mandibulofacial dysostoses (MFD1) and is manifested by severe facial deformations due to differentiation disorders in early phases of embryogenesis.

The afore mentioned disorders are linked to the mutations of gene *TCOF1* (close to 200 were found), as well as other genes like *POLRIC* and *POLRID*, which could also be related to TCS.

The purpose of the work was to locate transition of c.1347C>T (rs2071238) in the 10th exon on the *TCOF1* gene (Gene ID: 6949) in two groups. The first group consisted of boys with TCS and the control group including healthy adults. The second group consisted of girls with TCS and the control group including healthy adults. Additionally, we aimed at determining C allele frequency and the kind of genotypes occurring in the two examined groups.

Molecular analysis was conducted using PCR and RFLP methods. For statistical purposes, chi-squared test and the exact Fisher test were performed.

There was determined that transition c.1347C>T was present in both analyzed groups. The frequency of the C allele in the group with TCS was 40% in girls and 50% in boys; in contrast, the frequency of the allele in the control group was 46% for healthy females and 92% in healthy males. Based on the tested group it is believed, that heterozygous genotype has a significant influence on the presence of disease TCS.

**KEY WORDS:** Treacher Collins syndrome, *TCOF1* gene, exon 10, c.1347C>T substitution



**Edward Pawlina, Szymon Trochowski**

**ZWIĄZEK PRZYCZYN BRAKOWANIA KRÓW RASY  
POLSKIEJ HOLSZTYŃSKO-FRYZYJSKIEJ  
Z ICH CECHAMI UŻYTKOWYMI**

**RELATIONSHIP OF REASONS OF CULLING COWS  
OF POLISH HOLSTEIN-FRIESIAN WITH THEIR  
PRODUCTIONS TRAITS**

*Katedra Genetyki, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

*Department of Genetics, Wrocław University of Environmental and Life Sciences*

Badania zostały przeprowadzone na wybrakowanych w latach 2011–2013 krowach rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej w wysoko wydajnym stadzie znajdującym się na terenie Dolnego Śląska. Celem badań była analiza związków pomiędzy przyczynami brakowania krów a ich cechami użytkowymi. Główną grupą przyczyn brakowania krów w badanym stadzie były choroby metaboliczne oraz wady budowy ciała. Stwierdzono, że niektóre przyczyny brakowania miały związek z cechami użytkowymi (wydajnością laktacyjną i zawartością białka w mleku), a także z długością użytkowania i wydajnością życiową mleka.

**SŁOWA KLUCZOWE:** krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, przyczyny brakowania, długość użytkowania

## **WSTĘP**

Każdego roku ze stada krów mlecznych hodowca eliminuje z różnych powodów ich pewną część. Brakowane krowy są w różnym wieku, co wiąże się ze zróżnicowaniem ich okresu użytkowania, życiowej wydajności mleka i liczby urodzonych cieląt. Przyczyny brakowania są różne. Można je podzielić na zamierzone i niezamierzone przez hodowcę. Krowy wybrakowane z przyczyn niezależnych od hodowcy oddziałują negatywnie na długość użytkowania krów i na postęp hodowlany (Krencik i Łukaszewicz 1991). Według Dorynka i wsp. (2005) 25% brakowań planuje hodowca, zaś aż 64% stanowią brako-

wania nieprzewidziane. Morek-Kopec i Żarnecki (2009) stwierdzili, że odsetek tych drugich brakowań wzrósł z 68% (w latach 1995–2002) do 86% w 2007 roku. Z porównania odsetek krów brakowanych z poszczególnych powodów w okresie kilkudziesięciu lat wynika, że ulegały one znacznym zmianom, ale główną przyczyną brakowania krów były zaburzenia w rozrodzie. W latach 70. i 80. XX wieku odsetek brakowań z powodu zaburzeń rozrodu mieścił się w przedziale 15–32% (Pawlina 1975, Lipiński 1982). W latach 90. XX wieku zaobserwowano wzrost brakowań z tej przyczyny do 19–42% (Krencik i Łukaszewicz 1991, Pawlina i wsp. 1997). Podobny poziom brakowań na skutek zaburzeń rozrodu obserwowano także po 2000 roku. Wynosił on 24–48% (Krencik i Łukaszewicz 1991, Dorynek i wsp. 2005, Sawa i Bogucki 2009, Pokorska i wsp. 2012, Sawa i wsp. 2012).

Również długość użytkowania krów mlecznych w Polsce w tym okresie ulegała zmianom. W latach 70. XX wieku obserwowano krótki okres użytkowania krów w stadach państwowych, wahający się w granicach 2,28–3,03 lat (Pawlina 1975). Według późniejszych badań Pawliny i wsp. (1988) w latach 80. długość tego okresu wahała się w granicach 2,53–4,35 lat. Natomiast w latach 2001–2002 według Dorynka i wsp. (2005) wynosiła ona zaledwie 2,75 lat.

Badania przeprowadzone przez Pawlinę i wsp. (1997), Borkowską i Januś (2006) oraz Pokorską i wsp. (2012) wykazały, że długość użytkowania krów różni się w zależności od przyczyny brakowania. Borkowska i Januś (2006) stwierdziły, że najdłużej były użytkowane zwierzęta brakowane z powodu starości (6,1 lat), zaś najkrócej (2,8 lat) wybrakowane z powodu białaczki oraz sprzedaży do dalszego chowu.

Problem długości użytkowania krów i przyczyn ich brakowania jest ciągle ważny i aktualny (Pawlina i wsp. 2015). Powinien on być w naszym kraju monitorowany, zwłaszcza że nastąpiła duża zmiana hodowanych ras o użytkowości mięsno-mlecznej (czarno-biała i czerwono-biała) w mleczną (polska holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej i czerwono-białej) o znacznie większej wydajności mleka. Dlatego podjęto niniejsze badania, których celem była analiza długości użytkowania krów, przyczyn ich brakowania oraz związków między przyczynami brakowania a długością użytkowania i cechami użytkowymi.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 207 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej wybrakowanych w latach 2011–2013 z jednego wysoko wydajnego stada z Dolnego Śląska. Stado to miało wysoką średnią wydajność mleka, wynoszącą w 2013 r. 11 224 kg od krowy za laktację. Zwierzęta utrzymywane były w oborze wolnostanowiskowej, bezściółkowej i karmione TMR (total mixed ration). Krowy zostały wybrakowane z następujących grup przyczyn brakowania: choroby, przyczyny produkcyjne, przyczyny reprodukcyjne, wady ciała i inne przyczyny (tab. 1). Dane do analizy pobrano z dokumentacji fermy oraz z systemu SYMLEK. Posłużyły one badaniom zależności pomiędzy przyczyną brakowania a długością użytkowania krów w stadzie, średnią wydajnością laktacyjną mleka, wydajnością życiową mleka oraz zawartością tłuszczu i białka w mleku. Istotność różnic między średnimi wartościami badanych cech krów w grupach przyczyn brakowania przetestowano za pomocą testu Duncana.

Tabela 1  
Table 1Analizowane przyczyny brakowania  
Analyzed causes of culling

| Grupa przyczyn<br>Group causes | Przyczyny brakowania<br>Causes of culling       |   |  |
|--------------------------------|---|---|--|
| I                              | Choroby<br>Diseases                             | 1. Choroby metaboliczne<br>2. Choroby infekcyjne<br>3. Zapalenie płuc<br>4. Porażenie poporodowe<br>5. Kliniczne <i>mastitis</i><br>6. Inne choroby | 1. Metabolic diseases<br>2. Infectious diseases<br>3. Pneumonia<br>4. Postpartum paralysis<br>5. Clinical <i>mastitis</i><br>6. Other diseases |
| II                             | Przyczyny produkcyjne<br>Production reasons     | 7. Nagły spadek produkcji   | 7. A sudden decline in production  |
| III                            | Przyczyny reprodukcyjne<br>Reproductive reasons | 8. Poronienia<br>9. Jałowość<br>10. Trudny poród  | 8. Miscarriage<br>9. Sterility<br>10. Difficult birth  |
| IV                             | Wady ciała<br>Body defects                      | 11. Wady dróg rodnych<br>12. Wady budowy<br>13. Wady kończyn<br>14. Wady wymienia   | 11. Defects of genital tracts<br>12. Defects in body structure<br>13. Defects of limbs<br>14. Defects of udder                                 |
| V                              | Inne przyczyny<br>Other reasons                 | 15. Wypadki<br>16. Padnięcia<br>17. Inne  | 15. Accidents<br>16. Deaths<br>17. Other   |

## WYNIKI I DYSKUSJA

Badania wykazały, że największą grupą przyczyn brakowania krów w badanym stadzie były choroby (48,79%), a spośród nich choroby metaboliczne (20,29%) i infekcyjne (11,59%), a najmniejszą – spadek produkcji mleka (5,31%). Natomiast z powodów reprodukcyjnych (poronienia, jałowość, trudne porody) usunięto 17,39% krów (tab. 2). Jest to w porównaniu z wynikami innych autorów (Czaplicka i wsp. 2004, 2013, Kuczaj i wsp. 2008, Oler i wsp. 2012, Ziętara i wsp. 2013, Stefańska 2014) niski odsetek krów wybrakowanych z tych przyczyn. Według Ziętary i wsp. (2013) najczęstszymi przyczynami brakowania krów w 2011 r. w województwie mazowieckim były choroby układu rozrodczego oraz jałowość, które stanowiły 44,4% usunięć krów. Również Kuczaj i wsp. (2008) i Oler i wsp. (2012) stwierdzili, że przyczyny reprodukcyjne (odpowiednio: 34,1 i 35,9% wybrakowanych krów) oraz choroby (odpowiednio: 20,2 i 41,1%) były głównymi powodami ich brakowania. Według Stefańskiej (2014) to przede wszystkim problemy z rozrodem (48%) oraz choroby metaboliczne (18%) są najczęstszymi przyczynami brakowania krów. Wyniki badań własnych wykazały znacznie niższy odsetek krów wybrakowanych z powodów reprodukcyjnych (17,39%), a zbliżony odsetek krów usuniętych z powodu chorób metabolicznych (20,29%). Zdaniem Dorynka i wsp. (2005) i Stefańskiej (2014) znaczny wzrost wydajności mleka krów i poprawa jego składu chemicznego doprowadził pośrednio do pogłębienia ujemnego bilansu energii w okresie okołoporodowym,

co jest jedną z podstawowych przyczyn nasilenia się występowania chorób metabolicznych (ketoza, kwasica, hipokalcemia) i pogorszenia wskaźników płodności. Błędy w żywieniu obniżają zdrowotność i wydajność krów oraz powodują zaburzenia rozrodu, objawiające się: poronieniami, ciężkimi porodami, rodzeniem się cieląt martwych.

Tabela 2  
Table 2

Szczegółowe przyczyny brakowania krów w badanym stadzie  
Detailed reasons for cows culling in the investigated herd

| Grupa przyczyn<br>Group causes | Przyczyna brakowania<br>Cause of culling                 | Liczba krów<br>Number of cows | Grupa przyczyn<br>Group causes | Przyczyna brakowania<br>Cause of culling       | Liczba krów<br>Number of cows |
|--------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|
| I<br>101<br>(48,79%)           | Choroby metaboliczne<br>Metabolic diseases               | 42<br>(20,29%)                | III<br>36<br>(17,39%)          | Poronienie<br>Miscarriage                      | 8<br>(3,87%)                  |
|                                | Choroby infekcyjne<br>Infectious diseases                | 24<br>(11,59%)                |                                | Jałowość<br>Sterility                          | 14<br>(6,76%)                 |
|                                | Zapalenie płuc<br>Pneumonia                              | 7<br>(3,38%)                  |                                | Trudny poród<br>Difficult birth                | 1<br>(0,48%)                  |
|                                | Porażenie poporodowe<br>Postpartum paralysis             | 5<br>(2,42%)                  |                                | Wady dróg rodnych<br>Defects of genital tracts | 13<br>(6,28%)                 |
|                                | Kliniczne <i>mastitis</i><br>Clinical <i>mastitis</i>    | 4<br>(1,93%)                  | IV<br>31<br>(14,98%)           | Wady budowy<br>Defects in body structure       | 7<br>(3,38%)                  |
|                                | Inne choroby<br>Other diseases                           | 19<br>(9,18%)                 |                                | Wady kończyn<br>Defects of limbs               | 16<br>(7,73%)                 |
| II<br>11<br>(5,31%)            | Nagły spadek produkcji<br>A sudden decline in production | 11<br>(5,31%)                 |                                | Wady wymienia<br>Defects of udder              | 8<br>(3,86%)                  |
|                                |  |                               | V<br>28<br>(13,53%)            | Wypadki<br>Accidents                           | 19<br>(9,18%)                 |
|                                |  |                               |                                | Padnięcia<br>Deaths                            | 2<br>(0,97%)                  |
|                                |  |                               |                                | Inne<br>Other                                  | 7<br>(3,38%)                  |

Wymienione w tabeli 2 przyczyny brakowania krów spowodowały, że krowy usuwano ze stada po 2,87 lat użytkowania mlecznego (tab. 3). Okres użytkowania wybrakowanych krów był krótki i zbliżony do podanego przez Dorynka i wsp. (2005). Z tej tabeli wynika, że najdłużej były użytkowane i miały największą wydajność życiową krowy wybrakowane z przyczyn produkcyjnych (odpowiednio: 3,95 lat i 41 886 kg), a najkrócej i z najmniejszą wydajnością życiową krowy usunięte z powodu chorób (odpowiednio: 2,45 roku i 28 304 kg). Stwierdzono również związek przyczyn brakowania z wydajnością laktacyjną i zawartością białka w mleku. Największą wydajność w pierwszej laktacji miały krowy usunięte z przyczyn selekcyjnych (11 542 kg), czym różniły się statystycznie (przy  $P \leq 0,01$  i  $P \leq 0,05$ ) od krów wybrakowanych z powodu chorób (8342 kg) i przyczyn reprodukcyjnych (9322 kg). Najwyższą średnią zawartość tłuszczu w mleku miały krowy wybrakowane z powodu chorób (5,14%), a najniższą wybrakowane z przyczyn



losowych (4,02%). Mleko krów wybrakowanych z powodu chorób zawierało najmniej białka (3,19%). Natomiast najwięcej białka miało mleko pochodzące od krów usuniętych z przyczyn reprodukcyjnych (3,38%).

Zestawione wyniki badań długości okresu użytkowania krów i wartości ich cech użytkowych (tab. 4) wykazały zróżnicowanie wartości tych badanych cech w zależności od konkretnej przyczyny brakowania. Najdłużej były użytkowane (5,06 lat) oraz miały największą wydajność życiową (58 852 kg) i laktacyjną (11 412 kg) krowy wybrakowane z powodu wad wymienia. Natomiast najkrócej były użytkowane (1,43 roku), dały najmniej mleka w życiu (18 926 kg) i w laktacji (5904 kg) oraz miały najniższy procent tłuszczu w mleku (3,73%) krowy wybrakowane z powodu trudnego porodu. Również krótko były użytkowane (1,49 roku) krowy wybrakowane z powodu zapalenia płuc. Miały one też niską wydajność życiową mleka (22 634 kg) oraz niską zawartość tłuszczu (3,74%) i białka (3,10%) w mleku.

Tabela 3

Table 3

Średnie wartości ocenianych cech produkcyjnych w zależności od grupy przyczyn brakowania  
Average values of production traits evaluated according to the group of the causes of culling

| Przyczyny brakowania<br>Causes of culling       | Długość użytkowania (lata)<br>Length of performance (years) | Wydajność życiowa mleka<br>Life-time milk yield | Wydajność laktacyjna mleka<br>Lactation milk yield | Zawartość tłuszczu w mleku<br>Fat content of the milk | Zawartość białka w mleku<br>Protein content of the milk |
|---|---|---|--|---|---|
| Choroby<br>Diseases                             | 2,45 A  | 28 304 a  | 8342 Aa  | 5,14  | 3,19 a  |
| Przyczyny produkcyjne<br>Production reasons     | 3,95 B  | 41 886 b  | 11 542 Bc  | 4,30  | 3,34  |
| Przyczyny reprodukcyjne<br>Reproductive reasons | 3,25  | 28 893  | 9322 ab  | 4,21  | 3,38 b  |
| Wady ciała<br>Body defects                      | 3,19  | 34 711  | 9972 abc   | 4,10  | 3,21 a  |
| Inne przyczyny<br>Other reasons                 | 3,14  | 39 306  | 10 504 bc  | 4,02  | 3,22 a  |
| Ogółem<br>Altogether                            | 2,87  | 32 080  | 9294   | 4,14  | 3,23  |

Litery a, b, c w kolumnach oznaczają istotne różnice między średnimi na poziomie istotności  $P \leq 0,05$ , litery A i B różnice wysoko istotne między średnimi na poziomie istotności  $P \leq 0,01$

The letters a, b, c in the columns denote significant differences between the mean values at  $P \leq 0.05$  significance level, the letters A and B, a highly significant difference between the mean level of significance  $P \leq 0.01$

Tabela 4

Table 4

Średnie wartości cech produkcyjnych w zależności od przyczyny brakowania

Average values of production traits depending on the cause of culling

| Przyczyna brakowania<br>Cause of culling                 | Długość użytkowania (lata)<br>Length of the performance (years) | Wydajność życiowa mleka<br>Life-time milk yield | Wydajność laktacyjna mleka<br>Lactation milk yield | Zawartość tłuszczu w mleku<br>Fat content of the milk | Zawartość białka w mleku<br>Protein content of the milk |
|--|---|---|--|---|---|
| Choroby metaboliczne<br>Metabolic diseases               | 2,06  | 24 777  | 8783   | 3,81  | 3,16  |
| Choroby infekcyjne<br>Infectious diseases                | 3,30  | 34 641  | 10 207   | 4,47  | 3,45  |
| Zapalenie płuc<br>Pneumonia                              | 1,49  | 22 634  | 8896   | 3,74  | 3,10  |
| Porażenie poporodowe<br>Postpartum paralysis             | 2,66  | 28 199  | 6827   | 4,69  | 3,20  |
| Kliniczne mastitis<br>Clinical <i>mastitis</i>           | 3,75  | 37 544  | 7603   | 3,98  | 3,23  |
| Inne choroby<br>Other diseases                           | 2,32  | 27 676  | 8079   | 4,13  | 3,21  |
| Nagły spadek produkcji<br>A sudden decline in production | 3,95  | 41 886  | 11 342   | 4,30  | 3,34  |
| Poronienia – Miscarriage                                 | 3,13  | 24 827  | 7809   | 4,30  | 3,35  |
| Jałowość – Sterility                                     | 3,43  | 31 054  | 11 032   | 4,26  | 3,43  |
| Trudny poród<br>Difficult birth                          | 1,43  | 18 926  | 5904   | 3,73  | 3,32  |
| Wady dróg rodnych<br>Defects of genital tracts           | 3,52  | 33 385  | 10 360   | 3,94  | 3,20  |
| Wady budowy<br>Defects in body structure                 | 2,36  | 22 828  | 9560   | 4,04  | 3,31  |
| Wady kończyn<br>Defects of limbs                         | 2,37  | 30 044  | 8681   | 4,07  | 3,09  |
| Wady wymienia<br>Defects of udder                        | 5,06  | 58 852  | 11 412   | 4,34  | 3,32  |
| Wypadki – Accidents                                      | 2,76  | 34 969  | 10 721   | 4,09  | 3,16  |
| Padnięcia – Deaths                                       | 2,75  | 27 805  | 10 480   | 3,74  | 3,19  |
| Inne – Other   | 4,29  | 53 745  | 9953   | 4,19  | 3,38  |
| Ogółem – Altogether                                      | 2,87  | 32 080  | 9294   | 4,14  | 3,23  |

## PODSUMOWANIE

Wykazano, że główną grupą przyczyn brakowania krów w badanym stadzie były choroby oraz wady budowy ciała. Okres użytkowania wybrakowanych krów był krótki i wyniósł 2,87 lat. Stwierdzono, że niektóre przyczyny brakowania miały związek z cechami użytkowymi (wydajnością laktacyjną i zawartością białka w mleku), a także z długością użytkowania i wydajnością życiową mleka.

## PIŚMIENNICTWO

- Borkowska D., Januś E., 2006. Przyczyny brakowania krów czarno-białych a ich płodność, długość użytkowania i produktywność. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin*, XXIV, 13: 89–94.
- Czaplicka M., Puchajda Z., Szalunas T., 2004. Długość użytkowania i przyczyny brakowania krów wysoko wydajnych. *Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego*, 72 (1): 129–136.
- Czaplicka M., Szalunas T., Puchajda Z., 2013. Porównanie użytkowości mlecznej krów holendersko-fryzyjskich importowanych z Francji i ich krajowych rówieśnic. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 1 (9): 9–15.
- Dorynek Z., Pytlewski J., Antkowiak I., 2005. Przyczyny brakowania oraz życiowa użytkowość krów holendersko-fryzyjskich. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 1 (1): 17–26.
- Krencik D., Łukaszewicz M., 1991. Przyczyny brakowania krów w okręgu olsztyńskim. *Przegląd Hodowlany*, 1: 3–4.
- Kuczaj M., Zielak M., Blicharski P., 2008. Reasons for the culling of polish Holstein-Friesian cows in a high yield herd. *Medycyna Weterynaryjna*, 64 (10): 1205–1208.
- Lipiński J., 1982. Przyczyny brakowania krów w Polsce. *Przegląd Hodowlany*, 8: 20–22.
- Morek-Kopeć M., Żarnecki A., 2009. Przyczyny brakowania krów rasy polskiej holendersko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 5 (3): 9–17.
- Oler A., Sawa A., Urbańska P., Wojtkowiak M., 2012. Analysis of longevity and reasons for culling high-yielding cows. *Acta Scientiarum Polonorum, Zootechnica*, 11 (3): 57–64.
- Pawlina E., 1975. Długość użytkowania i przyczyny brakowania krów w państwowych gospodarstwach rolnych w powiecie Góra Śląska w latach 1969–1972. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu*, 22 (112): 128–135.
- Pawlina E., Kaliciak M., Wyrostek A., 2015. Długość użytkowania i przyczyny brakowania krów mlecznych w Polsce. *Przegląd Hodowlany*, 1: 5–7.
- Pawlina E., Nowicki B., Hibner A., Kruszyński W., 1997. Długość użytkowania i wartość cech użytkowych wybrakowanych krów rasy czerwono-białej. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Zootechnika XLII*, 307: 105–113.
- Pokorska J., Kulaj D., Ormian M., 2012. Przyczyny brakowania krów rasy polskiej holendersko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej użytkowanych w fermie wielkotowarowej. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 8 (2): 17–24.
- Sawa A., Bogucki M., 2009. Długowieczność krów i przyczyny ich brakowania. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 5 (2): 55–62.
- Sawa A., Neja W., Bogucki M., Jankowska M., 2012. Wpływ przedłużenia laktacji na poziom i przyczyny brakowania krów. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 8 (4): 27–32.

- Stefańska B., 2014. Metody oceny statusu metabolicznego wysoko wydajnych krów mlecznych. *Wiadomości Zootechniczne*, LII (2): 50–56.
- Ziętara W., Adamski M., Mirkowska Z., 2013. Rzeczywisty a optymalny okres użytkowania krów mlecznych. *Roczniki Naukowe Ekonomii Rolnictwa i Rozwoju Obszarów Wiejskich*, 100 (3): 90–100.

## **RELATIONSHIP OF REASONS OF CULLING COWS OF POLISH HOLSTEIN-FRIESIAN WITH THEIR PRODUCTIONS TRAITS**

### **S u m m a r y**

Tests were carried out on scrap in 2011–2013 cows Polish Holstein-Friesian in high yielding herd located in Lower Silesia. The aim of the study was to analyze the relationship between the causes of culling cows and their characteristics and uses. The main group of causes of culling cows in the herd were examined metabolic diseases and infectious and structural defects of the body. It was found that some of the reasons for culling are connected with the use features (lactation yield and protein content of milk), and the length of use, and performance life milk.

**KEY WORDS:** cows of Polish Holstein-Friesian breed, reasons of culling, length of use