

Polimorfizm restrykcyjny genu *DRBI* (MHC klasa II) a oporność owiec rasy wrzosówka na naturalne zarażenie nicieniami żołądkowo-jelitowymi*

Krystyna M. Charon, Agnieszka Kijewska,
Zuzanna Nowak, Mateusz Wieczorek

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Ziwerząt,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; charon@alpha.sggw.waw.pl

Identyfikowano polimorfizm restrykcyjny eksonu 2 genu *DRBI* u 374 owiec (135 matek i 239 jagniąt) rasy wrzosówka z Doświadczalnej Fermy Owiec Zakładu Hodowli Owiec i Kóz SGGW. DNA zwierząt izolowano z pełnej krwi, ekson 2 genu *DRBI* amplifikowano metodą PCR, a następnie trawiono trzema restryktazami: *RsaI*, *BsuRI* i *BstYI*. Po rozdziale elektroforetycznym w 12% żelu poliakryloamidowym żele barwiono azotanem srebra. Długość otrzymanych fragmentów restrykcyjnych analizowano za pomocą programu ScanPack 3.0 (Biometra). Ekstensywność zarażenia badanych owiec nicieniami żołądkowo-jelitowymi określano na podstawie liczby jaj nicieni w kale tych zwierząt (EPG – eggs per gram), oznaczonej w latach 1995-1998. Analiza DNA badanych owiec wykazała obecność 2 wzorów restrykcyjnych uzyskanych po trawieniu eksonu 2 genu *DRBI* enzymem *BstYI*, 10 wzorów po trawieniu *BsuRI* oraz 8 wzorów – *RsaI*. Frekwencja tych wzorów w grupach matek i jagniąt była na zbliżonym poziomie. Obserwowana w locus *DRBI* heterozygotyczność miała nieco wyższą wartość (0,45 do 0,88) od heterozygotyczności oczekiwanej (0,41 do 0,78), z wyjątkiem wzorów restrykcyjnych uzyskanych po trawieniu eksonu 2 enzymem *BsuRI* w przypadku jagniąt. Przeprowadzona za pomocą pakietu SAS 8.01 analiza statystyczna wykazała istotny wpływ określonych wzorów restrykcyjnych eksonu 2 genu *DRBI* na stopień zarażenia matek nicieniami żołądkowo-jelitowymi. Wysoko istotnie ($P \leq 0,01$) na EPG wpływała obecność w genotypie matek wzorów restrykcyjnych: *BSTY_2*, *BSU_1*, *BSU_6*, *RSA_5* i *RSA_8*. Natomiast statystycznie istotny ($P \leq 0,05$) okazał się wpływ wzorów *BSU_4*, *BSU_8*, *BSU_10*. W przypadku jagniąt nie stwierdzono istotnego wpływu genotypu w locus *DRBI* na stopień zarażenia pasożytami.

SŁOWA KLUCZOWE: owce / *DRBI* / polimorfizm / nicienie żołądkowo-jelitowe

*Badania zrealizowane w ramach projektu P06 D 013 21 finansowanego przez KBN

Nicienie żołądkowo-jelitowe oddziałują niekorzystnie na metabolizm białek i gospodarkę hormonalną żywiciela, i są istotną przyczyną strat w hodowli przeżuwaczy na całym świecie. Jednym z efektywnych sposobów ograniczenia inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych jest wykorzystanie naturalnej odporności zwierząt na pasożyty, w której istotną rolę odgrywa główny układ zgodności tkankowej (MHC) [2, 14, 17].

W ostatnich latach uwaga badaczy skupia się na polimorfizmie genu *DRB1*, należącego do klasy II MHC [17, 18]. Szczególnie interesujący jest ekson 2 tego genu, gdyż koduje on domenę $\beta 1$ cząsteczki DR (MHC II), która wraz z domeną $\alpha 1$ tworzy miejsce wiązania peptydu. Polimorfizm w obrębie tego eksonu wpływa na intensywność odpowiedzi immunologicznej.

Celem badań była analiza wpływu polimorfizmu restrykcyjnego eksonu 2 genu *DRB1*, należącego do genów klasy II głównego układu zgodności tkankowej, na podatność/odporność owiec rasy wrzosówka na naturalne zarażenie nicieniami żołądkowo-jelitowymi.

Material i metody

Doświadczeniem objęto 374 owce, w tym 135 matek i 239 jagniąt, rasy wrzosówka z Doświadczalnej Fermi Owiec Zakładu Hodowli Owiec i Kóz SGGW w Żelaznej.

Genomowy DNA izolowano metodą fenolowo-chloroformową z pełnej krwi badanych owiec. Amplifikację eksonu 2 genu *DRB1* przeprowadzano z zastosowaniem starterów podanych przez Ammer i wsp. [1], w warunkach opisanych przez Gruszczyńska i wsp. [7]. Produkt amplifikacji trawiono enzymami restrykcyjnymi *RsaI* (Fermentas), *BsuRI* (Fermentas), *BstYI* (BioLabs). Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych eksonu 2 genu *DRB1* określano po ich rozdzieleniu w 12% żelu poliakrylamidowym w temperaturze 15°C przy napięciu 300V, przez 3 godziny, barwionym po elektroforezie azotanem srebra. Wyniki dokumentowano za pomocą programu GenScan (Biometra), a do analizy długości otrzymanych fragmentów restrykcyjnych wykorzystano program ScanPack 3.0 (Biometra).

Sekwencja badanego eksonu 2 genu *DRB1*, z zaznaczonymi miejscami restrykcyjnymi dla enzymów *RsaI*, *BsuRI* i *BstYI*, jest następująca:

```

5' – tctctgcagcacattcctggagataactaagaaagagtgtcgttttccaacgggacggagcgggtgcgggtcctggaca
RsaI↓                               BsuRI↓ RsaI↓                               BsuRI↓
agt acttcataatggagaagagaccctgcgcttcgacagcgactgggg ccagt accgagcggtagg ccgagctggg
BsuRI↓                               RsaI↓                               BstYI↓                               BsuRI↓                               RsaI↓
gcgg cgggacccaaagt actggaacagccagaag gatctcctggagcgggcgcggg ccgccgtggacacgt ac
tgcagacacaactacggggtcggtgaga – 3'

```

Informacje dotyczące liczby jaj nicieni żołądkowo-jelitowych (EPG) w kale badanych owiec rasy wrzosówka pochodziły z bazy danych, utworzonej w latach 1995-1999 w Zakładzie Genetyki Molekularnej Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW, zawierającej wyniki badań realizowanych we współpracy z Instytutem Parazy-

tologii PAN [3, 4, 11, 12]. Badania te przeprowadzono u matek w wieku 2-5 lat, pięciokrotnie w ciągu sezonu pastwiskowego w roku 1995 oraz sześciokrotnie w latach 1996-1998 (łącznie 1551 pomiarów) oraz u jagniąt w wieku 3-6 miesięcy, czterokrotnie, od sierpnia do listopada, w latach 1996-1998 (łącznie 814 pomiarów). W celu normalizacji rozkładu liczby jaj nicieni żołądkowo-jelitowych w kale badanych owiec (EPG) wartości poszczególnych pomiarów przekształcono za pomocą transformacji logarytmicznej: $EPG_T = \log_{10}(EPG+1)$ [2, 15].

Analizę zależności między polimorfizmem restrykcyjnym eksonu 2 genu *DRB1* a liczbą jaj nicieni żołądkowo-jelitowych w kale badanych owiec przeprowadzono metodą wieloczynnikowej analizy wariancji, za pomocą pakietu SAS 8.01 [16]. W przypadku matek analizę przeprowadzono według modelu (*_M*), uwzględniającego, oprócz odpowiedniego efektu wzoru restrykcyjnego, stałe czynniki roku i miesiąca, natomiast dla jagniąt (model *_J*) uwzględniono dodatkowo stałe czynniki płci i typu urodzenia:

$$y_{ijopr} = \mu + \sum REST_{i,j} + r_o + m_{op} + s_q + t_r + e_{ijopr} \text{ (ijopqrw)}$$

gdzie:

y_{ijopr} – wartość cechy;

μ – średnia generalna;

$REST_{i,j} = bsty_{i,j}$ – wystąpienie ($j = 0, 1$) efektu i -tego allelu z grupy BSTY ($i = 1..2$); modele 1M i 4J;

$REST_{i,j} = bsu_{i,j}$ – wystąpienie ($j = 0, 1$) efektu i -tego allelu z grupy BSU ($i = 1..10$); modele 2M i 5J;

$REST_{i,j} = rsa_{i,j}$ – wystąpienie ($j = 0, 1$) efektu i -tego allelu z grupy RSA ($i = 1..8$); modele 3M i 6J;

r_o – efekt o -tego roku badania parazytologicznego ($o = 1..4$);

m_{op} – efekt p -tego miesiąca badania parazytologicznego w obrębie o -tego roku;

s_q – efekt q -tej płci ($q = 0..1$); tylko w modelach dla jagniąt;

t_r – efekt r -tego typu urodzenia ($r = 1..3$); tylko w modelach dla jagniąt;

e_{ijopr} – błąd losowy w modelach dla matek;

$e_{ijopqrw}$ – błąd losowy w modelach dla jagniąt.

W analizie za pomocą każdego z sześciu modeli uwzględniano jedynie wzory restrykcyjne, dla których dysponowano co najmniej 10 pomiarami cechy, pochodzącymi od co najmniej trzech różnych osobników.

Heterozygotyczność w locus *DRB1* w badanej populacji owiec obliczono według Nei [13].

Wyniki i dyskusja

Do oceny stanu zdrowotnego matek i jagniąt wykorzystano średnią liczbę jaj nicieni (EPG) w ich kale w poszczególnych badaniach – miesiącach i latach. Ocenę stanu zarażenia pasożytami przeprowadzono oddzielnie dla matek i dla jagniąt, co głównie wynikało z faktu różnego stopnia dojrzałości układu immunologicznego zwierząt mło-

dych i dorosłych. Dane dotyczące średniej wartości EPG i błędu standardowego średniej, w obu grupach badanych owiec (matek i jagniąt), przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 – Table 1

Wartości średniej i błąd standardowy średniej (SE) dla EPG po transformacji logarytmicznej w grupie matek i jagniąt w poszczególnych miesiącach w kolejnych latach
 Values of mean and SE for EPG in logarithmic scale in ewes and lambs in consecutive months of parasitological examination

Rok Year	Miesiąc Month	EPG			
		matki – ewes		jagnięta – lambs	
		średnia mean	SE	średnia mean	SE
1995	VI	2,544	0,168	–	–
	VII	3,044	0,173	–	–
	VIII	1,733	0,161	–	–
	IX	1,248	0,156	–	–
	X	1,322	0,158	–	–
Ogółem 1995 rok Total 1995		1,978	0,097	–	–
1996	V	2,675	0,144	–	–
	VI	0,336	0,131	–	–
	VII	1,031	0,134	–	–
	VIII	1,813	0,137	1,522	0,260
	IX	0,555	0,136	1,799	0,258
	X	0,868	0,138	2,010	0,258
Ogółem 1996 rok Total 1996	XI	–	–	3,042	0,264
		1,213	0,086	1,824	0,114
1997	V	0,294	0,189	–	–
	VI	2,051	0,151	–	–
	VII	1,884	0,152	–	–
	VIII	2,186	0,150	1,074	0,248
	IX	1,612	0,154	2,263	0,249
	X	1,643	0,155	2,173	0,248
Ogółem 1997 rok Total 1997	XI	–	–	1,810	0,249
		1,612	0,096	1,547	0,106
1998	V	1,138	0,141	–	–
	VI	2,480	0,140	–	–
	VII	1,627	0,140	–	–
	VIII	0,721	0,145	1,896	0,251
	IX	1,084	0,142	2,003	0,262
	X	1,194	0,140	1,947	0,255
Ogółem 1998 rok Total 1998	XI	–	–	1,691	0,253
		1,374	0,091	1,613	0,119
Wszystkie badania Total examinations		1,525	0,079	1,661	0,101

Średnia zlogarytmowana wartość EPG dla wszystkich badań, zarówno w grupie matek, jak i jagniąt, jest na podobnym poziomie, odpowiednio: 1,525 i 1,661, natomiast wartość błędu standardowego średniej EPG dla grupy matek jest niższa niż dla jagniąt.

Może to wynikać ze znacznie mniejszej liczby pomiarów EPG przeprowadzonych u jagniąt niż u owiec dorosłych, jak również świadczy o zróżnicowanej zmienności EPG w obu grupach zwierząt. Szczegółowe wyniki badań parazytologicznych, m.in. intensywność i ekstensywność zarażenia badanych owiec nicieniami żołądkowo-jelitowymi, przedstawiono w pracach Charon i wsp. [3, 4] oraz Moskwy i wsp. [11, 12].

Zdolności obronne organizmu przeciwko patogenom w głównej mierze zależą od odpowiedzi układu immunologicznego, której podstawowym warunkiem jest właściwe rozpoznanie przez cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej obcych antygenów oraz prezentacja ich limfocytom T. Polimorfizm cząsteczek MHC klasy II, do której należy badany gen *DRBI*, jest zlokalizowany przede wszystkim w tej części cząsteczki, w której znajduje się miejsce wiązania obcego białka (antygeny). Miejsce to tworzą domeny zewnętrzne łańcuchów α i β , kodowane przez ekson 2 odpowiedniego genu klasy II MHC. Polimorfizm w obrębie tego eksonu wpływa na intensywność odpowiedzi immunologicznej [8]. Najbardziej polimorficznym spośród genów MHC klasy II jest gen *DRB*, kodujący domenę β 1 cząsteczki DR, oznaczony u owiec symbolem *DRBI*, a u bydła – *DRB3*. Dlatego badacze zajmujący się genetycznym tłem odporności przeżuwaczy na nicienie żołądkowo-jelitowe, skupiają się przede wszystkim na polimorfizmie eksonu 2 genu *DRB*.

Badania polimorfizmu restrykcyjnego eksonu 2 genu *DRBI* u owiec prowadzone są od niedawna. Wcześniej badania identyfikowały polimorfizm długości fragmentu genu *DRBI*, obejmującego ekson 2 wraz z sąsiadującą sekwencją mikrosatelitarną, która jest zlokalizowana w intronie 2, w odległości 30 par zasad od końca 3' eksonu 2 genu *DRBI* [14, 17]. Badania prowadzone na owcach rasy soay, na szkockiej wyspie St. Kilda [14], wykazały istotne asocjacje niektórych alleli, identyfikowanych u tych owiec na podstawie polimorfizmu mikrosatelitarnego, z odpornością lub podatnością na nicienie żołądkowo-jelitowe. Również nasze badania [5], prowadzone wcześniej na tych samych owcach rasy wrzosówka, wykazały obecność 20 alleli, określonych na podstawie długości sekwencji mikrosatelitarnej łącznie z eksonem 2 genu *DRBI*. Ponadto stwierdzono [5], że obecność niektórych alleli w genotypie badanych owiec miała istotny ($P \leq 0,01$) wpływ na odporność na nicienie przewodu pokarmowego.

Wobec stwierdzonej wysokiej korelacji między polimorfizmem mikrosatelitarnym w locus *DRBI* a polimorfizmem sąsiadujących sekwencji kodujących – eksonu 2 [14], w ostatnich latach uwaga badaczy skupia się na polimorfizmie restrykcyjnym w eksonie 2 genu *DRBI*, który jest wynikiem mutacji punktowych, najczęściej substytucji zasad. Badania prowadzone przez Konnai i wsp. [9] na owcach cheviot, corriedale i suffolk, z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych *RsaI*, *SacI*, *SacII* i *HaeIII*, wykazały 25 wzorów restrykcyjnych, których frekwencja była w granicach od 0,7% do 17,5%. Późniejsze badania na owcach suffolk, z wykorzystaniem 9 enzymów restrykcyjnych [10], wykazały obecność 8 wzorów restrykcyjnych po trawieniu zamplikowanego eksonu 2 genu *DRBI* enzymem *RsaI*, 6 – *HaeIII*, 2 – *SacI*, 2 – *SacII*, 3 – *DdeI*, 2 – *NciI*, 2 – *HinII*, 2 – *EcoRI* i 2 – *BstNI*. Z kolei Gutierrez-Espleta i wsp. [8], badając owce długorogie (*Ovis canadensis*), wykazali obecność 21 alleli genu *DRBI*, różniących się pojedynczymi podstawieniami nukleotydów w eksonie 2. Spośród tych alleli, aż 16

powodowało zamianę aminokwasów w miejscu wiązania obcego białka łańcucha beta cząsteczki DR.

W badanej przez nas populacji owiec rasy wrzosówka występowały 2 wzory restrykcyjne po trawieniu zamplifikowanego eksonu 2 genu *DRBI* enzymem *BstYI*, 10 wzorów po trawieniu enzymem *BsuRI* oraz 8 po trawieniu enzymem *RsaI*. U matek nie stwierdzono wzoru BSU_5, a u jagniąt wzorów BSU_9 i BSU_10 (trawienie enzymem *BsuRI*). Wszystkie zidentyfikowane wzory restrykcyjne zostały zobrazowane w pracy Gruszczynskiej i wsp. [7], dwa z nich zostały zarejestrowane w GeneBank. Frekwencja zidentyfikowanych wzorów restrykcyjnych u matek i jagniąt była na zbliżonym poziomie (tab. 2).

Tabela 2 – Table 2

Frekwencja wzorów restrykcyjnych *BstYI*, *RsaI* i *BsuRI* eksonu 2 genu *DRBI* w grupie matek i jagniąt
Frequency of restriction patterns *BstYI*, *RsaI* and *BsuRI* in exon 2 of *DRBI* gene in ewes and lambs

Wzór restrykcyjny Restriction pattern	Frekwencja wzoru Pattern frequency		Wzór restrykcyjny Restriction pattern	Frekwencja wzoru Pattern frequency	
	matki ewes	jagnięta lambs		matki ewes	jagnięta lambs
BSU_1	0,446	0,549	RSA_1	0,347	0,424
BSU_2	0,250	0,207	RSA_2	0,225	0,286
BSU_3	0,057	0,057	RSA_3	0,073	0,030
BSU_4	0,119	0,139	RSA_4	0,115	0,067
BSU_5	0	0,009	RSA_5	0,034	0,022
BSU_6	0,046	0,031	RSA_6	0,038	0,024
BSU_7	0,039	0,004	RSA_7	0,008	0,006
BSU_8	0,012	0,004	RSA_8	0,160	0,141
BSU_9	0,019	0	BSTY_1	0,711	0,730
BSU_10	0,012	0	BSTY_2	0,289	0,270

Zaobserwowane większe zróżnicowanie występowania w badanej populacji zwierząt wzorów restrykcyjnych, zidentyfikowanych po trawieniu badanego fragmentu genu enzymami *RsaI* i *BsuRI*, jest konsekwencją większej liczby miejsc restrykcyjnych dla tych enzymów. W obu przypadkach sekwencja rozpoznawana przez te enzymy w badanym fragmencie DNA występuje 4-krotnie, co zwiększa liczbę kombinacji wzorów restrykcyjnych. Natomiast enzym *BstYI* ma tylko jedno miejsce restrykcyjne w eksonie 2 genu *DRBI*.

W celu określenia zróżnicowania genetycznego w badanej populacji owiec rasy wrzosówka, jak również sprawdzenia przydatności genu *DRBI* jako markera odporności na nicienie żołądkowo-jelitowe, obliczono współczynnik heterozygotyczności w badanym locus (stosując wzór według Nei [13]), wykorzystując frekwencję zidentyfikowanych wzorów restrykcyjnych. Wartości tego współczynnika zamieszczono w tabeli 3. Heterozygotyczność obserwowana ma nieco wyższe wartości od oczekiwanej, z wyjątkiem wzorów restrykcyjnych uzyskanych po trawieniu eksonu 2 enzymem *BsuRI* u jagniąt. Heterozygotyczność obserwowana po trawieniu eksonu 2 enzymami *BsuRI* i *RsaI*

ma wysoką wartość, przy czym w grupie matek jest ona nieco wyższa niż w grupie jagniąt. Podobną wartość heterozygotyczności w locus *DRB1*, wynoszącą 0,742, uzyskali Gutierrez-Espeleta i wsp. [8] dla owiec długorogich (*Ovis canadensis*). Autorzy ci uważają, że heterozygotyczność w loci MHC zwiększa liczbę gatunków pasożytów rozpoznawanych przez cząsteczki MHC. Niska wartość heterozygotyczności w locus *DRB1* po trawieniu eksonu 2 enzymem *Bst*YI wynika z liczby zidentyfikowanych wzorów restrykcyjnych (tylko 2 wzory).

Tabela 3 – Table 3

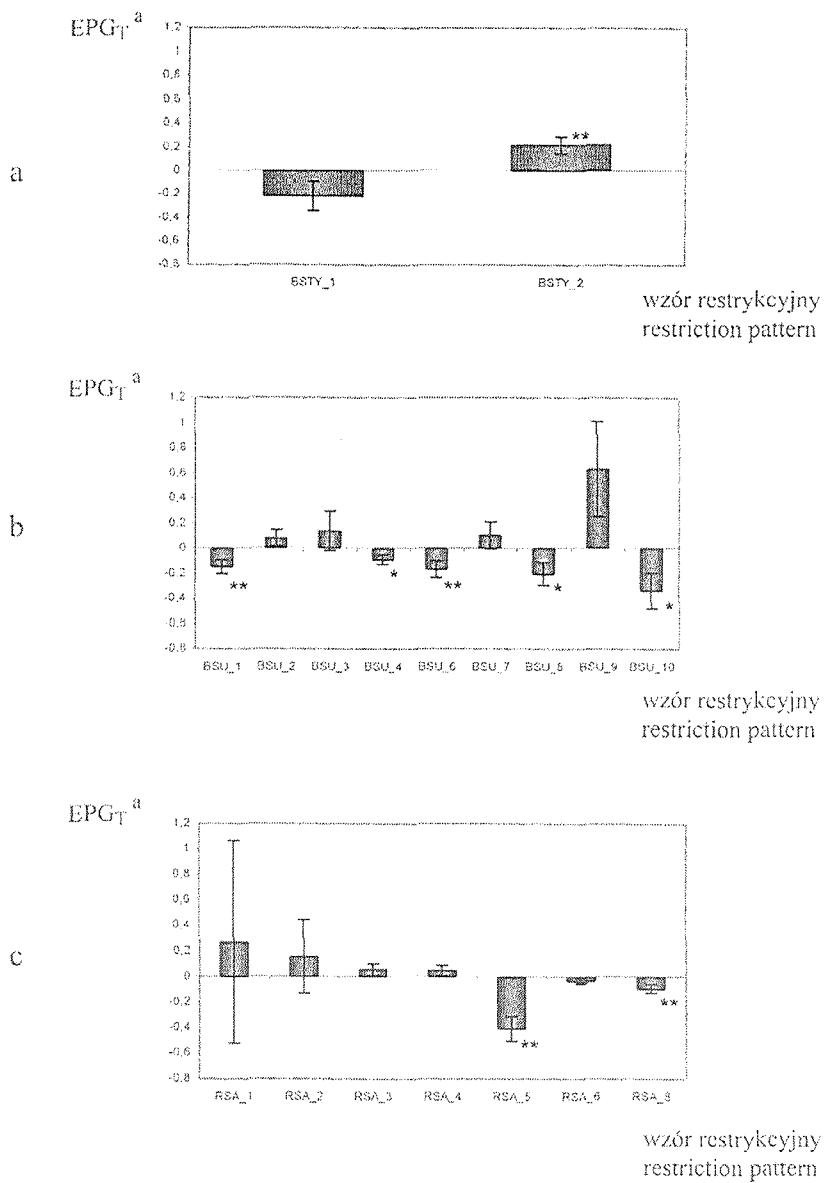
Oczekiwana i obserwowana heterozygotyczność w locus *DRB1* (po trawieniu eksonu 2 trzema enzymami restrykcyjnymi)

Expected and observed heterosigosity in locus *DRB1* (after digestion of exon 2 with three restriction enzymes)

Wzór restrykcyjny eksonu 2 genu <i>DRB1</i> Restriction pattern of <i>DRB1</i> gene	Matki – Ewes		Jagnięta – Lambs	
	HET	HET	HET	HET
	oczekiwana HET expected	obserwowana HET observed	oczekiwana HET expected	obserwowana HET observed
BSTY	0,4140	0,4519	0,3951	0,4580
BSU	0,7167	0,7769	0,6445	0,6170
RSA	0,7811	0,8779	0,7229	0,8067

W celu ustalenia ewentualnego związku między obecnością w genotypie owcy danego wzoru restrykcyjnego eksonu 2 genu *DRB1* a liczbą jaj nicieni żołądkowo-jelitowych w kale, przeprowadzono analizę statystyczną oddzielnie dla matek i jagniąt. W analizie tej jako cechę zależną przyjęto liczbę jaj nicieni żołądkowo-jelitowych w 1 gramie kału (EPG) badanych owiec. Uzyskane wyniki wskazują na istotny wpływ określonych wzorów restrykcyjnych eksonu 2 genu *DRB1* na stopień zarażenia owiec tymi pasożytami jedynie w grupie matek. Wysoko istotny ($P \leq 0,01$) okazał się wpływ wzorów restrykcyjnych: BSTY_2 (rys. 1a), BSU_1 i BSU_6 (rys. 1b), RSA_5 i RSA_8 (rys. 1c), a statystycznie istotny ($P \leq 0,05$) wpływ wzorów BSU_4, BSU_8, BSU_10 na liczbę jaj nicieni żołądkowo-jelitowych w kale matek (rys. 1b). W analizie nie uwzględniono wpływu wzoru restrykcyjnego RSA_7, ponieważ zidentyfikowano go tylko u jednej matki.

Porównując uzyskane wyniki z częstością występowania określonych wzorów restrykcyjnych badanego eksonu 2 u matek (tab. 2), można zauważyć, że niektóre z tych wzorów, jak: BSU_1 (ok. 45%), RSA_8 (ok. 16%) i BSU_4 (ok. 12%), występowały w genotypach matek stosunkowo często. Analiza zmienności liczby jaj nicieni żołądkowo-jelitowych w kale jagniąt nie wykazała istotnego wpływu obecności w genotypach jagniąt żadnego ze zidentyfikowanych wzorów restrykcyjnych na stopień zarażenia pasożytami. Przyczyną tego może być mniejsza liczba pomiarów EPG u jagniąt (814 pomiarów) w porównaniu z matkami (1551 pomiarów łącznie). Nie bez znaczenia może być także brak u jagniąt pełnej dojrzałości komórek układu immunologicznego, biorą-



a – odchylenie liczby jaj nicieni w kale owiec w skali zlogarytmowanej (EPG_T) od średniej EPG_T dla całej grupy matek przyjętej jako „0” – deviation in nematode faecal egg count in logarithmic scale (EPG_T) from the mean EPG_T in ewes' group accepted as 0

**Istotne przy P≤0,01 – Significant at P≤0.01

*Istotne przy P≤0,05 – Significant at P≤0.05

Rys. 1. Polimorfizm restrykcyjny (a) *BstYI*, (b) *BsuRI*, (c) *RsaI* a EPG u matek
Fig. 1. Restriction polymorphism (a) *BstYI*, (b) *BsuRI*, (c) *RsaI* and EPG in ewes

cych udział w odpowiedzi na inwazje pasożytnicze, stwierdzany także przez innych badaczy [19, 20]. W analizie pominięto wzór restrykcyjny BSU_8, gdyż wystąpił on w genotypach tylko dwóch jagniąt oraz wzór RSA_7, ze względu na jego bardzo niską frekwencję w tej grupie jagniąt.

Rok i miesiąc badania parazytologicznego miały wysoko istotny lub istotny wpływ na poziom zarażenia matek i jagniąt pasożytami przewodu pokarmowego. Także płęć jagnięcia istotnie wpływała na podatność na inwazję nicieni; jarki okazały się bardziej odporne na nicienie, tryczki zaś bardziej podatne. Średnia zlogarytmowana liczba jaj nicieni w kale (EPG_T) jarek wynosiła 1,58 ($\pm 0,11$), natomiast w kale tryczków – 1,74 ($\pm 0,11$). Podobnie Coltman i wsp. [6], badając owce soay, które podlegają jedynie selekcji naturalnej, stwierdzili istotne różnice w liczbie jaj nicieni w kale owiec zależnie od płci.

Przeprowadzone w stadzie owiec rasy wrzosówka badania polimorfizmu restrykcyjnego eksonu 2 *DRBI* i analiza jego ewentualnego związku z liczbą jaj nicieni w kale zwierząt wykazały, że:

– frekwencja alleli *DRBI* (wzorów restrykcyjnych) w grupach matek i jagniąt była na zbliżonym poziomie; ogółem zidentyfikowano 2 wzory restrykcyjne po trawieniu eksonu 2 genu *DRBI* enzymem *Bst*YI oraz 10 i 8 wzorów, odpowiednio po trawieniu enzymami *Bsu*RI i *Rsa*I;

– spośród zidentyfikowanych wzorów restrykcyjnych, jedynie obecność wzoru BSTY_2 była wysoko istotnie ($P \leq 0,01$) związana z podatnością owiec na inwazję nicieni żołądkowo-jelitowych, natomiast w przypadku wzorów RSA_5, RSA_8, BSU_1 i BSU_6 oraz BSU_4, BSU_8 i BSU_10 zanotowano ich korzystny wpływ na odporność owiec na parazytemię, stwierdzono bowiem statystycznie wysoko istotnie ($P \leq 0,01$) lub istotnie ($P \leq 0,05$) niższą liczbę jaj nicieni w kale owiec, w DNA których stwierdzono występowanie tych wzorów;

– w grupie jagniąt nie stwierdzono istotnych zależności między ich genotypem w locus *DRBI* a liczbą jaj nicieni w kale (EPG); potwierdza to znany już ścisły związek między dojrzałością układu immunologicznego a odpowiedzią tego układu na inwazje pasożytów przewodu pokarmowego.

PIŚMIENNICTWO

1. AMMER H., SCHWAIGER F.W., KAMMERBAUER C., GOMOLKA M., ARRIENS A., LAZARY S., EPPLER J.T., 1992 – Exonic polymorphism vs intronic simple repeat hypervariability in MHC-DRB genes. *Immunogenetics* 35, 332-340.
2. BISHOP S.C., STEAR M.J., 1999 – Genetic and epidemiological relationships between productivity and disease resistance: gastro-intestinal parasite infection in growing lambs. *Animal Science* 69, 515-524.
3. CHARON K.M., MOSKWA B., CABAJ W., RUTKOWSKI R., 1999 – Wpływ naturalnej inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych na wyniki produkcyjne owiec rasy wrzosówka. *Medycyna Weterynaryjna* 55 (8), 531-534.
4. CHARON K.M., MOSKWA B., NOWAK Z., SZYDŁOWSKI M., 2000 – Genetic parameters for faecal egg count following natural nematode infections and correlation with productive traits in Polish Heath Sheep. *Journal of Animal and Feed Sciences* 9, 461-470.

5. CHARON K.M., MOSKWA B., RUTKOWSKI R., GRUSZCZYŃSKA J., ŚWIDEREK W.P., 2002 – Microsatellite polymorphism in *DRB1* gene (MHC class II) and its relation to nematode faecal egg count in Polidh Heath Sheep. *Journal of Animal and Feed Sciences* 11, 47-58.
6. COLTMAN D.W., PILKINGTON J., KRUK L.E.B., WILSON K., PEMBERTON J.M., 2001 – Positive genetic correlation between parasite resistance and body size in free-living ungulate population. *Evolution* 55 (10), 2116-2125.
7. GRUSZCZYŃSKA J., BROKOWSKA K., CHARON K.M., ŚWIDEREK W.P., 2005 – Restriction fragment length polymorphism of exon 2 *Ovar-DRB1* gene in Polish Heath Sheep and Polish Lowland Sheep. *Journal of Applied Genetics* 46 (3), 311-314.
8. GUTIERREZ-ESPELETA G., HEDRICK P.W., KALINOWSKI S.T., GARRIGAN D., BOYCE W.M., 2001 – Is the decline of desert bighorn sheep from infectious disease the result of low MHC variation? *Heredity* 86, 439-450.
9. KONNAI S., NAGAOKA Y., ONUMA M., AIDA Y., 2000 – Analysis and frequency of *OLA-DRB1* alleles in Suffolk, Cheviot, Corriedale sheep. 27 International Conference on Animal Genetics Minnesota. Conference Abstract Book, 83.
10. KONNAI S., NAGAOKA Y., TAKESIMA S., ONUMA M., AIDA Y., 2003 – Technical Note: DNA typing for Ovine MHC *DRB1* Using Polymerase Chain Reaction-Rstriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). *Journal of Dairy Science* 86, 3362-3365.
11. MOSKWA B., CHARON K.M., CABAJ W., RUTKOWSKI R., 1998 – The mean distribution and repeatability of faecal egg counts in Polish Wrzosówka sheep following natural gastrointestinal nematode infection during two pasture seasons. *Acta Parasitologica* 43, 94-99.
12. MOSKWA B., CHARON K.M., CABAJ W., 1999 – Relationship between faecal egg output and the expression of haematological parameters in Polish Wrzosówka sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Helminthologia* 36, 91-96.
13. NEI M., 1973 – Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 70, 3321-3323.
14. PATERSON S., WILSON K., PEMBERTON J.M., 1998 – Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 95 (7), 3714-3719.
15. ROMJALI E., PANDEY V.S., GATENBY R.M., DOLOKSARIBU M., SAKUL H., WILSON A., VERCHULST A., 1997 – Genetic resistance of different genotypes of sheep to natural infections with gastro-intestinal nematodes. *Animal Science* 64, 97-104.
16. SAS: SAS[®] Procedures Guide. Version 8.01 TS Level OIMO 1999.2000, Edition, SAS Institute Inc. Cary, NC.
17. SCHWAIGER F.W., GOSTOMSKI D., STEAR M.J., DUNCAN J.L., McKELLAR Q.A., EPPLEN J.T., BUITCAMP J., 1995 – An ovine major histocompatibility complex *DRB1* allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *International Journal for Parasitology* 25, 815-822.
18. SCOTT P.C., MADDOX J.F., GOGOLIN-EWENS K.J., BRANDON M.R., 1991 – The nucleotide sequence and evolution of ovine MHC class II B genes: *DQB* and *DRB*. *Immunogenetics* 34, 80-87.
19. SMITH W.D., JACKSON F., WILIAMS J., 1985 – Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the local immune responses of 4.5 – 10-month-old lambs. *Journal of Comparative Pathology* 95, 235-245.
20. STEAR M.J., BAIRDEN K., DUNCAN J.L., GETTINBY G., McKELLAR Q.A., MURRAY M., WALLACE D.S., 1995 – The distribution of faecal egg counts in Scottish Blackface lambs following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Parasitology* 110, 573-581.

Restriction polymorphism in *DRBI* gene (MHC class II)
and resistance to natural infection with gastrointestinal
nematodes in Polish Heath Sheep

S u m m a r y

Restriction polymorphism in exon 2 of *DRBI* gene was identified in the population of 374 Polish Heath Sheep (135 ewes and 239 lambs) from the Experimental Flock, Żelazna, belonging to the Sheep and Goat Production Unit of the Warsaw Agricultural University. Genomic DNA was isolated using the phenol-chloroform extraction from the whole blood. Exon 2 of *DRBI* gene was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) followed by digestion with the chosen restriction enzymes: *RsaI*, *BsuRI* i *BstYI*. After electrophoresis of the PCR product in 12% polyacrylamide gel the silver staining was applied to visualize DNA fragments. The length of the restriction fragments was determined with the help of ScanPack 3.0 program (Biometra). The level of sheep infestation was determined on the basis of the number of gastrointestinal nematode eggs in the faeces (EPG – eggs per gram) estimated in the years 1995-1998. The analysis of restriction polymorphism showed the presence of 2 restriction patterns after digestion of amplified exon 2 of *DRBI* gene with the *BstYI* enzyme, 10 patterns after digestion with *BsuRI* and 8 *RsaI* enzymes. Frequency of identified patterns in both group -ewes and lambs was on the similar level. Observed heterosigosity in locus *DRBI* was slightly higher (0.45-0.88) then expected heterosigosity (0.41-0.78), with the exception of restriction patterns obtained after digestion of exon 2 with *BsuRI* enzyme in lambs. The conducted analysis with the use of SAS 8.01 program showed statistically significant effect of the genotype in locus *DRBI* on the gastrointestinal nematode infection level of ewes. The presence of BSTY_2, BSU_1, BSU_6, RSA_5 and RSA_8 restriction patterns showed statistically highly significant ($P \leq 0.01$) effect, while the presence of BSU_4, BSU_8 and BSU_10 patterns - significant ($P \leq 0.05$) effect. In case of lambs there was no association between genotype in locus *DRBI* and parasite infection.

