

Charakterystyka wybranych populacji kaczek metodą RAPD-PCR

EWA WIŚNIEWSKA, BARTOSZ GRAJEWSKI*, MAREK BEDNARCZYK

Katedra Biotechnologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego ATR, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

*Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Wiśniewska E., Grajewski B., Bednarczyk M.

Use of RAPD-PCR for the genetic characterization of some duck populations

Summary

In Poland conservative flocks of waterfowl are kept *in situ*. The latest report in the field of avian biotechnology provided an opportunity to preserve waterfowl genetic resources according to the *ex situ* method with the use of blastodermal cells (BCs). In this method the donors' BCs are injected into recipient embryos. Then the obtained sex chimeras are crossed in order to reconstruct the donor's BCs genotype. For this purpose the molecular characterization of duck and goose groups under a conservation program are needed. The aim of the study was to assess the applicability of the RAPD-PCR method to evaluate polymorphism and make a genetic characterization. The experiment involved 4 groups of ducks under a conservation program: A1, A3, P8 and P9. A total of 85 bands were obtained from the four investigated groups after DNA amplification with 7 primers, within the mean of 3.04. The amplified DNA fragments ranged from 300 to 2000 bp. Five bands were specific for the certain groups. The overall genetic relatedness between the investigated groups ranged from 0.68 to 0.78. The high genetic relatedness between the examined groups is considered to be a reflection of the same phylogenetic origin as well as similar selection criteria applied in breeding before subjecting ducks to a conservation program.

Keywords: ducks, RAPD-PCR, DNA polymorphism

Od lat 70. utrzymywane są w naszym kraju stada zachowawcze kaczek i gęsi metodą *in situ*, zgodnie z opracowanym programem zachowania rezerwy genetycznej ptactwa wodnego (17). Populacje ich liczą 14 odrębnych grup genetycznych kaczek i 17 gęsi, stąd też koszt realizacji programu ochrony zasobów genetycznych drobiu wodnego jest znaczny. Stada zachowawcze lub zagrożone wyginięciem populacje zwierząt chroni się dwiema metodami: *in situ* – polegającą na utrzymaniu zwierząt w ich naturalnym środowisku oraz *ex situ* – polegającą na gromadzeniu i przechowywaniu zamrożonego materiału biologicznego w postaci nasienia, komórek jajowych, zarodków, tkanek lub DNA.

Metoda *ex situ* znalazła zastosowanie w ochronie wielu gatunków ssaków, a przede wszystkim bydła, w odniesieniu do którego opracowano skuteczne metody mrożenia i rozmrażania nasienia (9). Pierwsza z wymienionych metod jest obecnie stosowana w odniesieniu do ptaków, w tym drobiu wodnego, chociaż jej podstawową wadą są wysokie koszty utrzymania odpowiednio licznych populacji (8). Alternatywą drogą metody utrzymania rezerwy genetycznej *in situ* mogą być znacznie tańsze metody, oparte na najnowszych osiągnięciach biotechnologii. Dotyczą one możliwości manipulacji komórkami embrionalnymi ptaków (1), ich pobierania, przechowywania w formie zamrożonej (7), rozmrażania i iniekcji do zarodków biorców – w celu tworzenia chimer (19) oraz identyfikacji chimer płciowych i ich krzyżowania prowadzące do odtworzenia populacji dawców komórek (3).

Badania tego rodzaju prowadzone były dotychczas u kurach, toteż opracowanie efektywnej metody utrzymania

i rekonstrukcji bioróżnorodności kaczek ze stad zachowawczych, z wykorzystaniem właściwości komórek blastodermalnych wymaga rozwiązania kilku zagadnień. Najważniejsze z nich to: adaptacja metody tworzenia chimer płciowych kury do specyfiki rozwoju embrionalnego kaczek (2) oraz opracowanie dokładnej charakterystyki, w tym molekularnej, każdej z grup genetycznych, umożliwiającej jej identyfikację.

Analizę molekularną wybranych populacji kaczek przeprowadzono metodą losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD-PCR), która została po raz pierwszy opisana przez Williamsa i wsp. w 1990 roku (21). RAPD-PCR należy do technik powielania DNA wykorzystujących łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). W odróżnieniu jednak do klasycznej reakcji PCR w metodzie RAPD-PCR stosuje się jeden starter, przeważnie o długości 10 nukleotydów. Krótkie startery hybrydują w wielu miejscach badanego genomu i prowadzą do amplifikacji kilku do kilkunastu różnych fragmentów DNA. RAPD-PCR jest prostą, łatwą i szybką metodą analizy DNA. Największą jej zaletą jest jednak fakt, iż nie wymaga wcześniejszej znajomości sekwencji DNA badanego genomu. Ma to szczególne znaczenie w badaniach drobiu wodnego, a zwłaszcza kaczek. Dotychczas bowiem zgromadzono niewiele informacji dotyczących charakterystyki molekularnej tego gatunku.

We wcześniejszych badaniach populacje rezerwy genetycznej kaczek w Polsce były scharakteryzowane pod względem cech reprodukcyjnych i mięsnych (12, 13), jednak nie zostały jak dotąd opisane metodami genetyki molekularnej. Celem badań była charakterystyka genetycz-

na wybranych grup kaczek na podstawie analizy polimorfizmu DNA wykazanego metodą RAPD-PCR. Uzyskane informacje pozwolą w przyszłości na precyzyjną charakterystykę badanych populacji opartą nie tylko na ocenie efektów fenotypowych poszczególnych genów, ale również na analizie genetycznej polimorfizmu DNA.

Material i metody

Badania przeprowadzono na ptakach z 4 stad zachowawczych kaczek w typie Pekin, pochodzenia angielskiego (A1) i (A3) oraz duńskiego (P8) i francuskiego (P9), utrzymywanych w standardowych warunkach środowiskowo-żywnościowych, w Zakładzie Hodowli Drobiu Wodnego w Dworzyskach k. Poznania. Do badań wybrano losowo po 10 dorosłych kaczorów z każdego stada. Krew obwodową pobrano z żyły skrzydłowej do plastikowych probówek zawierających antykoagulant EDTA i schłodzono do temperatury 4°C. DNA izolowano metodą GTC i amplifikowano metodą RAPD-PCR, z wykorzystaniem 7 starterów, których sekwencje przedstawiono w tab. 1.

Amplifikacji dokonano na termocyklerze MJ Research PTC 100, według oryginalnego programu. Wstępną denaturację dwuniciowego DNA prowadzono w temperaturze 95°C przez 5 minut. Następnie zastosowano program powtarzalny w 45 cyklach: 95°C w czasie 1 minuty, 35°C w czasie 1 minuty, 72°C w czasie 2 minut. Na zakończenie syntezę komplementarnych nici prowadzono w temperaturze 72°C przez 5 minut. Uzyskany produkt amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (aparatury Apelex ST 606 T), przy napięciu prądu 100 V, przez około 80 minut. Po rozwinięciu DNA żel poddawano oględzinom w transiluminatorze (Spectroline TC-312A), w świetle ultrafioletowym. Fotografie archiwizowano za pomocą programu komputerowego Grab-it i analizowano za pomocą programu komputerowego GelScan, uzyskując graficzny obraz prążków DNA w próbce.

Podobieństwo genetyczne (PG) obliczono według wzoru (11):

$$PG = 2 \times NR_1 NR_2 / (NR_1 + NR_2),$$

gdzie: NR_1, NR_2 – liczba wspólnych prążków dla porównywanych grup R_1, R_2 ; NR_1 – liczba prążków identyfikowanych w grupie R_1 ; NR_2 – liczba prążków identyfikowanych w grupie R_2 .

Wyniki i omówienie

Analizę molekularną badanych populacji oparto na następujących parametrach: liczba zliczalnych amplifikowanych fragmentów DNA, liczba prążków wspólnych w profilach porównywanych parami i współczynnik PG. Po amplifikacji DNA z siedmioma starterami w czterech grupach genetycznych kaczek otrzymano łącznie 85 prążków (tab. 1) o długości mieszczącej się w zakresie od 300 do około 2000 pz, co daje średnio 3,04 prążka na reakcję. Liczba prążków różniła się znacznie, w zależności od użytego startera (od 3 do 22) oraz w odniesieniu do grupy genetycznej (od 16 – A3 do 26 – P9). Przykładowy rozdział produktów amplifikacji DNA ze starterem AB1-07, AB1-26 oraz AB1-28 przedstawiono na ryc. 1. Wyodrębniono 5 charakterystycznych dla poszczególnych grup genetycznych fragmentów DNA. Wspomniane prążki mogą być źródłem markerów DNA pozwalających na identyfikację osobników na poziomie molekularnym. Ponadto na ich podstawie można zaprojektować tzw. markery SCAR (sequence characterized amplified region) o wysokiej specyficzności do badanego allelu.

Tab. 1. Sekwencja starterów oraz liczba uzyskanych produktów amplifikacji

Starter	Sekwencja (5'-3')	Liczba produktów				Łącznie
		Grupa genetyczna				
		A1	A3	P8	P9	
AB1-02	TGATCCCTGG	1	0	1	1	3
AB1-03	CATCCCCTG	1	1	2	2	6
AB1-04	GGACTGGAGT	5	3	3	6	17
AB1-07	GGTGACGCAG	5	3	6	7	21
AB1-10	CTGCTGGGAC	0	4	5	4	13
AB1-26	TTTGCCCGGA	1	0	1	1	3
AB1-28	AGGGAACGAG	6	5	6	5	22
Łącznie		19	16	24	26	85

Tab. 2. Podobieństwo genetyczne (PG) badanych grup genetycznych kaczek

Grupa genetyczna	A1	A3	P8	P9
A1	-	0,65	0,74	0,71
A3		-	0,77	0,63
P8			-	0,84
Średnio	0,70	0,68	0,78	0,73

Spśród zastosowanych w badaniach starterów najbardziej informatywne okazały się AB1-07 i AB1-28. Starter AB1-07 był równie skuteczny w badaniach prowadzonych na kurach (4). Natomiast starter AB1-03 umożliwiający amplifikację wielu fragmentów DNA kur (4) w grupach genetycznych kaczek A1, A3, P8, P9 okazał się mało skuteczny (1 lub 2 fragmentów DNA). Sekwencja stosowanych starterów ma duże znaczenie, ponieważ warunkuje liczbę miejsc w łańcuchu DNA, w których następuje amplifikacja. Stwierdzono np., że startery posiadające na końcu 3' zasady C lub G dawały najlepsze wyniki (10). Ponadto liczba amplifikowanych fragmen-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Ryc. 1. Elektroforetyczny obraz amplifikacji genomowego DNA kaczek ze starterem AB1-07, AB1-26 i AB1-28

Objaśnienia: ścieżką 1-4 – starter AB1-07, ścieżka 6-9 – starter AB1-26, ścieżka 11-14 – starter AB1-28; ścieżka 5, 10 – marker wielkości DirectLoad™ Step Ladder (Sigma). Kaczki: A3 – ścieżka 1, 6, 11; A1 – ścieżka 2, 7, 12; P9 – ścieżka 3, 8, 13; P8 – ścieżka 4, 9, 14.

tów DNA zależy również od wielkości genomu danego organizmu, np. średnią ilość genomowego DNA ssaków ocenia się na około 3,5 pg, natomiast u ptaków wartość ta jest niższa i wynosi średnio 1,4 pg.

Średnie podobieństwo genetyczne, szacowane w oparciu o wyniki uzyskane ze wszystkimi starterami mieściło się w przedziale od 0,68 do 0,78 (tab. 2). Uzyskane wartości wskazują na wysoki poziom podobieństwa między badanymi grupami, z czego można wnioskować o ich wspólnym pochodzeniu filogenetycznym. Podobne wyniki otrzymano w analogicznych badaniach rodzimych ras gęsi, w których wartości podobieństwa genetycznego kształtowały się w granicach 0,71-0,80 (5) oraz 0,59-0,68 (16). Porównywalny lub nieco wyższy poziom współczynnika PG odnotowano w liniach zimbredowanych kur rasy leghorn (18).

Można przypuszczać, iż badane grupy genetyczne kaczek wykazują znaczne podobieństwo genetyczne nie tylko ze względu na wspólne pochodzenie filogenetyczne lecz również ze względu na taki sam kierunek użytkowania i podobny nacisk selekcyjny, jakiemu były poddane przed przeniesieniem ich do rezerwy genetycznej. Potwierdzeniem tej tezy są badania przeprowadzone na kurach, w których wykazano, iż selekcja prowadzona przez 10 pokoleń w tym samym kierunku i tą samą metodą, powoduje zbliżenie genetyczne danych rodów (8). Wyższym polimorfizmem charakteryzują się populacje ptaków dziko żyjących. Zróżnicowanie genetyczne w rosyjskich populacjach kaczek dziko żyjących, określone na podstawie dystansu genetycznego, mieściło się w granicach od 0,668 do 0,971 (15). Również wysokie zróżnicowanie genetyczne wykryto w populacji gęsi dzikiej (*Anser anser*), u której oszacowany na podstawie analizy DNA fingerprinting, indeks podobieństwa mieścił się w przedziale od 0,215 do 0,371, w zależności od użytej sondy (22). Badania prowadzone w populacjach kaczki piżmowej (*Cairina moschata*) potwierdzają tezę, iż gatunki żyjące w swoim naturalnym środowisku wykazują wyższy polimorfizm genetyczny (20).

Średnia wartość współczynnika PG dla wszystkich starterów między grupami genetycznymi porównywanymi parami wahała się od 0,63 między A3 i P9 do 0,84 między P9 i P8. Otrzymane wartości współczynnika PG między danymi grupami były adekwatne do występujących między nimi różnic i podobieństw w typie budowy, barwie dzioba, nóg oraz wartościach cech reprodukcyjnych i mięsnych. Najbardziej podobne do siebie ptaki z grup P9 i P8 różniły się masą ciała w 7. tygodniu życia średnio ok. 300 g. Natomiast wartości cech mięsnych, tj.: procentowy udział w tuszce mięśni piersiowych i mięśni nóg oraz skóry z tłuszczem podskórnym były w tych grupach bardzo zbliżone (14). Ponadto kaczki z grup P8 i P9 charakteryzują się taką samą barwą upierzenia, nóg, dzioba oraz skorupy jaj. Stwierdzono również, iż średnio ptaki z grupy A3 różniły się najbardziej pod względem genetycznym od pozostałych osobników. Zaobserwowano różnice w typie budowy, barwie dzioba, nóg i skorupy jaj w porównaniu z kawkami z innych grup. Przykładowo: barwa dzioba ptaków z grupy A3 jest odmienna od żółto-pomarańczowej, stwierdzonej u osobników z grup P8 i P9. Ponadto barwa skorupy jaj kaczek A3 jest biała lub zielonkawa, w pozostałych grupach tylko biała (14).

Przedstawione wyniki badań wykazały duże podobieństwo genetyczne ocenianych grup kaczek, w związku z czym należy się zastanowić nad dalszym utrzymywaniem tych ptaków w oddzielnych stadach zachowawczych. Tym bardziej, że jak stwierdzono (12) badając grupy genetyczne kaczek A1, A2 i A3, ich konsolidacja w jedną grupę syntetyczną nie spowodowała zmniejszenia zmienności cech użytkowych w porównaniu z grupami wyjściowymi. Metoda RAPD-PCR stwarza możliwość oceny populacji na poziomie molekularnym i utrzymania zasobów genetycznych metodą *ex situ* w postaci rozróżnialnych populacji komórek blastodermalnych, które mogą posłużyć do odtworzenia genotypu dawcy (3). Pozwoli to na zachowanie bioróżnorodności i obniży koszt utrzymania rezerwy genetycznej kaczek w Polsce. Udowodniono, że ochrona populacji ssaków metodą *ex situ* w postaci zamrożonych tkanek, gamet i oocytów jest mniej kosztowna niż utrzymywanie żywych zwierząt (6).

Piśmiennictwo

1. Bednarczyk M.: Manipulacje komórkami embrionalnymi ptaków. *Biotechnologia* 2003, 60, 36-47.
2. Bednarczyk M., Lakota P., Grajewski B.: Ocena przeżywalności zarodków kaczek i gęsi po iniekcji do jamy podzarodkowej komórek blastodermalnych dawców. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 521-524.
3. Bednarczyk M., Lakota P., Słomski R., Plawski A., Lipiński D., Siemieniako B., Lisowski M., Czekalski P., Grajewski B., Dłużniewska P.: Reconstitution of a chicken breed by inter se mating of germline chimeric birds. *Poultry Sci.* 2002, 81, 1347-1353.
4. Bednarczyk M., Siwek M.: Estimation of genetic relatedness among parental flocks of meat-type hens from the same breeding group. *Ann. Anim. Sci.* 1999, 26, 93-104.
5. Bednarczyk M., Siwek M., Mazanowski A., Czekalski P.: DNA polymorphism in various goose lines by RAPD-PCR. *Folia Biol. (Kraków)* 2002, 50, 45-48.
6. Brem G., Graf F., Kräusslich H.: Genetic and economic differences between alternative methods of gene conservation (small population, frozen semen and frozen embryos). *Proc. 33 Konf. EAAP, Sankt Petersburg 1982*, s. 1-6.
7. Chelmońska B., Pokorny P., Wojciechowski A.: Cryopreservation of chicken blastoderm cells. *Anim. Sci. Papers Rep.* 1997, 15, 73-83.
8. Cywa-Benko K.: Charakterystyka genetyczna i fenotypowa rodzimych rodów kur objętych programem ochrony bioróżnorodności. *Rocz. Nauk. Zoot.* 2002, rozpr. hab. nr 15.
9. Holt W. V., Pickard A. R.: Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev. Reprod.* 1999, 4, 143-150.
10. Horn P. L., Rafalski J. A., Whitehead P. J.: Molecular genetic (RAPD) analysis of breeding Magpie geese. *Auk* 1996, 113, 552-557.
11. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. J., Weatherall D. J., Ponder B. A. J.: DNA fingerprints and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am. J. Human Genet.* 1986, 39, 11-24.
12. Książkiewicz J.: Cechy reprodukcyjne i mięsne kaczek z trzech grup zachowawczych oraz utworzonej z nich grupy syntetycznej. *Zesz. Nauk. Drob.* 4, Prace hab., Poznań 1994.
13. Książkiewicz J.: Characteristics of meatness traits in six generations of ducks in conservative groups. *J. Anim. Feed Sci.* 1997, 6, 101-108.
14. Książkiewicz J.: Wykorzystanie bioróżnorodności kaczek do ekologicznego odchowu gospodarczego. *Wyd. IZ, Kraków* 2002, 3-9.
15. Kulikova I. V., Chelomina G. N., Zhuravlev Iu N.: Low genetic differentiation and close evolutionary connection between *Anas platyrhynchos* and *Anas poecilorhyncha*: data from RAPD-PCR analysis. *Genetica* 2003, 39, 1353-1362.
16. Maciuszonek A., Grajewski B., Bednarczyk M.: RAPD-PCR analysis of various goose populations. *Folia Biol. (Kraków)* 2005, 58, (w druku).
17. Mazanowski A.: Metody zachowania rezerwy genetycznej ptactwa wodnego. *Biul. Inf. IZ* 1984, 3, 14-23.
18. Plotsky Y., Kaiser M. G., Lamont S. J.: Genetic characterization of highly inbred chicken lines by two DNA methods: DNA fingerprinting and polymerase chain reaction using arbitrary primers. *Anim. Genet.* 1995, 26, 163-170.
19. Pokorny P.: Obtaining chicken chimeras after injecting cryopreserved blastoderm cells into the subgerminal cavity of recipient embryos. *Anim. Sci. Papers Rep.* 2002, 20, 55-66.
20. Stai S. M., Hughes C. R.: Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Anim. Genet.* 2003, 34, 387-389.
21. Williams J., Kubelik A. R., Livak K. J., Tingey S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 6531-6536.
22. Zawadzka M.: Analiza genetyczna populacji gęsi zatorskiej i odmian pokrewnych za pomocą metody fingerprinting. *Praca dokt., IGIHZ PAN, Jastrzębiec* 1999.

Adres autora: mgr inż. Ewa Wiśniewska, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz; e-mail: ewawisniewska@o2.pl