Zmienność genetyczna zwierząt futerkowych z rodziny Canidae na podstawie analiz jądrowego i mitochondrialnego DNA

SYLWIA NISZTUK-PACEK

Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin, Polska

Otrzymano 14.06.2016

Zaakceptowano 10.07.2016

Nisztuk-Pacek S.

Genetic variability of farmed fur animals of the Canidae family assessed by nuclear and mitochondrial DNA analysis

Summary

The aim of the study was to assess the biodiversity of farmed fur animals from the Canidae family (common fox, polar fox, and raccoon dog) using nuclear and mitochondrial markers. The study involved 434 animals. The biological material included whole peripheral blood or skin tissue. The isolated genetic material was subjected to qualitative and quantitative analyses. Mitochondrial DNA (mtDNA) gene fragments (COX1, COX2, CYTB) and nuclear DNA (nDNA) gene fragments (MSTN1, MSTN2, MSTN3, IGF1, GHR) were amplified with the PCR (polymerase chain reaction) technique. The amplicons obtained were sequenced or subjected to PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) reaction, and bioinformatics analyses were performed. The interspecific analysis of the nDNA sequences revealed a total of 25 polymorphisms. On the other hand, the interspecific analysis of the mtDNA gene fragments identified 277 polymorphisms. The COX1 gene fragment exhibited the greatest variability. It was shown that the frequency of polymorphisms within the mitochondrial genome was almost 20-fold higher than that in the nuclear genome of the raccoon dog. It was found that the genetic distances revealed by the analysis of the mitochondrial gene fragments were similar to the results obtained by the nDNA analysis. The genetic distance between the raccoon and common fox was the greatest. The smallest phylogenetic distance was revealed between the two fox species. The study results indicate mitochondrial and nuclear genes may be alternatively used for determining the phylogenetic relationships between fur animals from the Canidae family.

Keywords: biodiversity, phylogenesis, mtDNA, nDNA

Psowate (*Canidae*) to rodzina zwierząt mięsożer-nych, która obejmuje 16 rodzajów i 41 gatunków (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>). Gatunkiem najbardziej zróżnicowanym fenotypowo i najlepiej poznanym pod względem genetycznym jest przedstawiciel rodziny *Canidae* – pies domowy (*Canis lupus familiaris*). Dzięki szybkiemu postępowi w zakresie genomiki strukturalnej i poznaniu sekwencji genomu psa możliwe było podjęcie badań molekularnych genomów także innych gatunków należących do rodziny psowatych, w tym hodowlanych zwierząt futerkowych – lisa pospolitego, lisa polarnego i jenota. Dotychczas badania obejmowały m.in. ocenę bioróżnorodności hodowlanych i dziko żyjących zwierząt futerkowych (1, 3, 4, 10, 14) oraz analizy porównawcze sekwencji DNA i określanie wzajemnych relacji filogenetycznych (9, 15, 18, 19).

Prowadzone analizy przyczyniły się do osiągnięcia dużego postępu w badaniach ewolucyjnych prowadzonych w rodzinie *Canidae*. Dotyczyły one zmienności wewnątrz- i międzygatunkowej. Na podstawie analiz filogenetycznych gatunków objętych hodowlą fermową w Polsce wykazano, że najmniejszy dystans genetyczny dzieli lisa polarnego i pospolitego. Z kolei analizy uwzględniające sekwencje nukleotydowe psa wskazują, że dystans genetyczny pomiędzy psem i jenotem jest mniejszy niż pomiędzy psem i lisami. W zależności od wykorzystywanych do badań fragmentów genów i zastosowanych metod występują jednak pewne rozbieżności w wielkościach dystansów genetycznych i zajmowanej pozycji filogenetycznej pomiędzy psem i poszczególnymi gatunkami hodowlanych zwierząt futerkowych z rodziny *Canidae* (15, 16, 18).

Od wielu lat markerami wykorzystywanymi m.in. w filogenezie zwierząt były przede wszystkim sekwencje mtDNA. Jest to związane z wysoką częstością mutacji mtDNA, brakiem rekombinacji oraz dziedziczeniem niemal wyłącznie w linii matczynej (2, 10, 12). Wyniki uzyskane na podstawie analizy sekwencji genów mitochondrialnych mogą być porównane z wynikami analiz genów jądrowych. Pewnym utrudnieniem w przypadku nDNA jest proces rekombinacji, który sprawia, że historia ewolucyjna różnych fragmentów tego samego genu może wykazywać znaczne odstępstwa (2).

Celem badań była analiza sekwencji wybranych genów jądrowych i mitochondrialnych lisów pospolitych, lisów polarnych i jenotów oraz ocena bioróżnorodności zwierząt hodowlanych objętych analizami z wykorzystaniem markerów jądrowych i mitochondrialnych.

Materiał i metody

Analizy molekularne. Badaniami objęto 434 osobniki trzech gatunków hodowlanych zwierząt futerkowych z rodziny *Canidae*: 40 lisów pospolitych (*Vulpes vulpes*), 40 lisów polarnych (*Vulpes lagopus*) oraz 354 jenoty (*Nyctereutes procyonoides*). Zwierzęta utrzymywane były w fermach zwierząt futerkowych zlokalizowanych we wschodniej i południowo-wschodniej Polsce.

Materiał do badań genetycznych jenotów stanowiła pełna krew obwodowa pobrana przyżyciowo do sterylnych, podciśnieniowych probówek z antykoagulantem K_2 EDTA. W przypadku lisów polarnych i pospolitych materiałem do badań była tkanka skórna, pobrana *post mortem*. Izolację całkowitego DNA przeprowadzono za pomocą komercyjnego zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Wyizolowane DNA poddane zostało ocenie jakościowo-ilościowej. Materiał genetyczny posłużył do amplifikacji wybranych fragmentów genów techniką PCR, którą przeprowadzono z użyciem termocyklera Labcycler (SensoQuest).

Sekwencje starterowe dla fragmentu mitochondrialnego genu COX1 zaprojektowane zostały przy pomocy programu Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Dla pozostałych fragmentów genów startery zaczerpnięto z piśmiennictwa (1, 10, 13) (tab. 1).

Eksperymentalnie ustalono skład mieszaniny reakcyjnej oraz optymalne temperatury przyłączania starterów dla wszystkich analizowanych fragmentów genów. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR składał się z: denaturacji wstępnej (95°C, 10 min), 35 cykli denaturacji (95°C, 1 min), przyłączania starterów (tab. 1) i wydłużania starterów (72°C, 1 min) oraz końcowego wydłużania starterów (72°C, 20 min) i chłodzenia do temperatury 4°C.

W celu ustalenia genotypów produkty PCR wszystkich fragmentów genów (z wyjątkiem fragmentu genu MSTN1) zostały zsekwencjonowane przy pomo-

cy zestawu do sekwencjonowania BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Próbkę oczyszczono na kolumnach CentriSep zgodnie z protokołem producenta. Oczyszczone produkty zostały zsekwencjonowane w automatycznym sekwenatorze ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Otrzymane sekwencje nukleotydowe badanych fragmentów genów poddano analizie za pomocą programów bioinformatycznych (BLAST, DNA BaserSequence Assembler v4, 2013). Do ustalenia pozycji zidentyfikowanych różnic wewnątrz- i międzygatunkowych wykorzystano sekwencję referencyjną psa domowego, co umożliwiło zestawienie analogicznych fragmentów genów u wszystkich badanych gatunków.

Badany w pracy gen MSTN, zgodnie z przeprowadzoną reakcją PCR, podzielony został na trzy odcinki: MSTN1, MSTN2 i MSTN3. Fragment genu MSTN1, w obrębie którego stwierdzono obecność polimorfizmu we wstępnych badaniach, poddano analizie restrykcyjnej. Wykorzystano enzym rozpoznający miejsce bez mutacji – FastDigest BsrDI (BseMI) (Thermo Scientific). Mieszanina reakcyjna składała się z: wody (17 µl), buforu 10 × FastDigest Green Buffer (2 µl), DNA (10 µl) oraz enzymu restrykcyjnego (1 µl). Przygotowaną mieszaninę worteksowano, wirowano i inkubowano w 55°C przez 15 min, a następnie inaktywowano enzym w temp. 80°C przez 5 min.

W wyniku trawienia enzymem BsrDI, heterozygoty charakteryzowały się obecnością trzech prążków o długości 764 pz, 557 pz oraz 207 pz, homozygoty pod względem genu zmutowanego – jednym prążkiem o długości 764 pz, natomiast homozygoty pod względem genu bez mutacji można było rozpoznać dzięki obecności dwóch prążków o długości 557 pz i 207 pz.

Metody statystyczne. Na podstawie częstości alleli w poszczególnych *loci* nDNA dla jenotów obliczono wskaźniki dla markerów kodominujących: liczbę alleli – N_a (number of alleles), efektywną liczbę alleli – N_e (effective number of alleles), heterozygotyczność obserwowaną – H_o (observed heterozygosity, Nei, 1987) i oczekiwaną – H_e (expected heterozygosity). Natomiast w przypadku haplo-

Tab. 1. Sekwencje starterowe analizowanych *loci*

Nazwa genu	Sekwencja starterów 5'-3'	Pozycje genów w mtDNA i nDNA (pz, pary zasad)	T (°C)
MSTN1 (myostatin gene)	F: TCACTGGGGTGGCAAGTTGTCTCT R: CACGCAGCGCTTTTATCCTCATCT	-128-585	60
MSTN2 (myostatin gene)	F: GGACAAAAGGCTCACAATTA R: GGAGATGGGTAGTGATTTCCTCA	2091-2655	60
MSTN3 (myostatin gene)	F: TATGAGCCACAAGGGAAGAATCAA R: TAGCCCTTACTAGGCTTGTC	4526 do +139	62,4
IGF1 (insulin-like growth factor 1)	F: AGCCACAGGGTACGGCTC R: CTCTGAGCCTTGGGCATGTC	56 480-56 658	58,5
GHR (growth hormone receptor)	F: AGATCTCCTCAAGGAAGGAAATTA R: AAGGATGTTAAGTGATTCTCATGG	221 127-221 326	54,3
CYTB (cytochrome b)	F: GCACGCAATAGGCGCTTCCA R: GCATTGGCTAAGGGGCCGGA	15 013-15 312	57
COX1 (cytochrome oxydase subunit I)	F: CCGGACATGGCATTCCCCCG R: GGCGGACGTAAGTACGCTCGTG	5616-6272	52
COX2 (cytochrome oxydase subunit II)	F: TACCCCTTCCAACCTCGGATT R: GGCAGATCAGGTTTCGAAAT	7048-7713	57

idalnych markerów mtDNA uwzględniono: liczbę alleli – N_a (number of alleles), efektywną liczbę alleli – N_e (effective number of alleles), indeks zmienności – h (diversity; $h = 1 - \sum p_i^2$ gdzie p_i – frekwencja i -tego allelu), oraz procent polimorficznych *loci* – %P (percentage of polymorphic *loci*). Analizy przeprowadzono przy wykorzystaniu programu GenAlEx 6.5 (7).

Częstość alleli w poszczególnych *loci* jądrowych i mitochondrialnych w obrębie badanych grup zwierząt futerkowych z rodziny *Canidae* była podstawą do obliczenia standardowych dystansów genetycznych D_s (5) pomiędzy analizowanymi gatunkami. Odległości genetyczne oszacowano na podstawie frekwencji alleli w polimorficznych *loci* przy wykorzystaniu programu GenAlEx 6.5 (7). Uzyskane wyniki dystansów genetycznych wykorzystano do utworzenia dendrogramów metodą przyłączania sąsiada (NJ, neighbour-joining) (8), używając programu Mega v. 4.0 (17).

Wyniki i omówienie

Analiza sekwencji nukleotydowych fragmentów genów jądrowych. Analiza wewnątrzgatunkowa sekwencji nukleotydowych genów jądrowych (MSTN1, MSTN2, MSTN3, IGF1, GHR) pozwoliła na identyfikację jednego polimorfizmu typu SNP (*single nucleotide polymorphism*) – C354T w obrębie fragmentu genu MSTN1, w grupie jenotów hodowlanych. U lisów pospolitych i lisów polarnych nie stwierdzono polimorfizmów wewnątrzgatunkowych w analizowanych fragmentach nDNA (tab. 2).

Analiza zmienności międzygatunkowej wykazała łącznie 25 polimorfizmów w obrębie 5 fragmentów genów nDNA. Najbardziej zmienny okazał się MSTN3, w obrębie którego obserwowano 11 różnic międzygatunkowych. Analiza bioinformatyczna fragmentu genu MSTN2 wykazała natomiast cztery polimorfizmy pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt, z czego jeden miał charakter insercji. Z kolei ekson 2. genu MSTN charakteryzował się brakiem zmienności zarówno wewnątrz-, jak i międzygatunkowej. Najmniejszą zmienność sekwencji genów jądrowych obserwowano w przypadku fragmentów genów GHR i IGF1, w obrębie których zidentyfikowano po jednym polimorfizmie pomiędzy badanymi gatunkami (tab. 2).

Analiza sekwencji nukleotydowych fragmentów genów mitochondrialnych. Analiza międzygatunkowa wykazała liczne polimorfizmy w sekwencjach wszystkich badanych genów mitochondrialnych u zwierząt futerkowych. Najbardziej zmienny był

fragment genu COX1, w obrębie którego zidentyfikowano 133 różnice międzygatunkowe typu SNP. Analiza wewnątrzgatunkowa sekwencji genu COX1 wykazała obecność siedmiu polimorfizmów (m.5715, m.5772, m.5931, m.6063, m.6090, m.6096, m.6159) u jenotów. Analiza COX1 u lisów pospolitych i lisów polarnych nie wykazała polimorfizmów wewnątrzgatunkowych.

Analiza sekwencji genu COX2 pomiędzy analizowanymi gatunkami zwierząt futerkowych wykazała łącznie 97 polimorfizmów typu SNP. Z kolei analiza wewnątrzgatunkowa wykazała obecność sześciu polimorfizmów u jenotów (m.7125, m.7194, m.7221, m.7287, m.7578, m.7665). U lisów pospolitych i lisów polarnych nie stwierdzono zmienności wewnątrzgatunkowej w sekwencji genu COX2.

Najbardziej konserwatywnym z analizowanych genów mitochondrialnych był gen CYTB. Wykazano obecność 47 polimorfizmów międzygatunkowych. Większość zidentyfikowanych zmian miała charakter jednonukleotydowych podstawień. Dodatkowo stwierdzono cztery delecje i jedną insercję (w pozycji

Tab. 2. Polimorfizmy w obrębie genów jądrowych u zwierząt z rodziny *Canidae*

Fragment genu	Lokalizacja w genie	Pozycja nukleotydu	Pies NC_006619	Lis pospolity	Lis polarny	Jenot	
MSTN1	ekson 1	102	T	T	C	T	
		114	C	G	G	C	
		268	G	G	G	A	
		306	G	A	A	G	
		336	G	A	A	G	
		354	G	G	G	G/A	
	intron 1	444	G	G	A	G	
		447	G	C	C	A	
		MSTN2	2130-2131	–	insAAA	insAAA	–
			2161	T	T	T	A
2179	C		C	T	C		
ekson 2	brak zmienności wewnątrz- i międzygatunkowej						
MSTN3	intron 2	2596	G	G	G	A	
		4579	A	G	A	A	
		4612	T	T	T	G	
		4666	A	G	G	A	
		4684	A	A	G	A	
		4687	A	A	G	A	
	ekson 3	4760	G	A	A	G	
		4814	T	A	T	T	
		5048	A	T	A	A	
	region flankujący 3'	5090	T	C	T	T	
		5096	C	T	C	C	
		5117	A	G	A	A	
				NC_006586			
GHR	ekson 9	221 185	G	G	G	C	
			NC_006597				
IGF1	ekson 3	56 607	A	A	A	G	

m.1014_1015) w grupie lisów pospolitych i lisów polarnych, w porównaniu z sekwencją tego genu w populacji jenotów.

Analiza wewnątrzgatunkowa sekwencji genu CYTB w populacji lisów pospolitych wykazała tylko jeden polimorfizm (m.C890T). Jednocześnie w grupie lisów polarnych wykazano obecność dwóch polimorfizmów wewnątrzgatunkowych. Pierwszy – w pozycji m.C901T, drugi miał charakter heteroplazmii i stwierdzony został w pozycji m.926. Nie odnotowano polimorfizmów genu CYTB w populacji jenotów.

Filogeneza na podstawie sekwencji nDNA. Na podstawie uzyskanych wyników analiz molekularnych określono wartości wskaźników opisujących zmienność genetyczną w zidentyfikowanych *loci* nDNA. W obrębie sekwencji genów jądrowych zidentyfikowano łącznie 25 polimorfizmów międzygatunkowych, z których 24 były monomorficzne, natomiast jedno *locus* (G354A w grupie jenotów) było polimorficzne, z frekwencją alleli: 0,546 (G) i 0,454 (A). W przypadku jądrowego *locus* G354A liczba alleli (N_a) wynosiła 2, efektywna liczba alleli (N_e) – 1,983, heterozygotyczność obserwowana (H_o) – 0,604, natomiast heterozygotyczność oczekiwana (H_e) – 0,496.

W przypadku nDNA określono wskaźniki statystyczne, uwzględniając polimorficzne *locus* w populacji jenotów, dla poszczególnych populacji zwierząt futerkowych z rodziny *Canidae* (jenotów, lisów pospolitych i lisów polarnych). W tym przypadku średnia efektywna liczba alleli w populacji jenotów wynosiła 1,039, średnia heterozygotyczność obserwowana – 0,024, a średnia heterozygotyczność oczekiwana – 0,020. W grupie lisów pospolitych i lisów polarnych nie stwierdzono zmian polimorficznych wewnątrz populacji, dlatego średnia liczba alleli i średnia liczba efektywnych alleli wynosiła 1, natomiast średnia heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana 0,000 (tab. 3).

Średnia wartość współczynnika heterozygotyczności obserwowanej (H_o) nieznacznie różniła się od średniej wartości współczynnika heterozygotyczności oczekiwanej (H_e) (tab. 3), co może świadczyć o niewielkim odchyleniu od równowagi genetycznej Hardy'ego-Weinberga. Jego przyczyną, poza dryfem genetycznym i kojarzeniami nielosowymi, mogła być selekcja prowadzona w populacji jenotów hodowlanych, która doprowadziła do zawężenia zmienności genetycznej w jej obrębie, wpływając w ten sposób na wartość współczynnika heterozygotyczności.

Wszystkie analizowane fragmenty genów nDNA (MSTN1, MSTN2, MSTN3, IGF1, GHR) zostały wykorzystane do określenia stopnia podobieństwa i standardowych dystansów genetycznych pomiędzy jenotem, lisem pospolitym i lisem polarnym.

Wyniki otrzymane na podstawie sekwencji jądrowego DNA wskazują, że dystans genetyczny pomiędzy jenotem a dwoma gatunkami lisów przyjmował stosunkowo wysokie wartości. Dystans genetyczny

Tab. 3. Wskaźniki statystyczne nDNA w badanych populacjach zwierząt futerkowych

Populacja		N_a	N_e	H_o	H_e
Jenoty	Średnia	1,040	1,039	0,024	0,020
	SE	0,040	0,039	0,024	0,020
Lisy pospolite	Średnia	1,000	1,000	0,000*	0,000*
	SE	0,000	0,000	0,000	0,000
Lisy polarne	Średnia	1,000	1,000	0,000*	0,000*
	SE	0,000	0,000	0,000	0,000

Objaśnienie: **locus* monomorficzne w obrębie gatunku

Tab. 4. Podobieństwa (nad przekątną) i dystanse genetyczne (pod przekątną) pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt futerkowych, obliczone na podstawie sekwencji nDNA

	Jenot	Lis pospolity	Lis polarny
Jenot	–	0,184	0,264
Lis pospolity	1,695	–	0,560
Lis polarny	1,330	0,580	–

Ryc. 1. Dendrogram przedstawiający relacje filogenetyczne jenota, lisa pospolitego i lisa polarnego, otrzymany na podstawie sekwencji nDNA

pomiędzy jenotem i lisem pospolitym był największy (1,695), natomiast pomiędzy lisem polarnym i lisem pospolitym najmniejszy (0,580) (tab. 4). Na podstawie dystansów genetycznych (tab. 4) skonstruowano dendrogram obrazujący relacje filogenetyczne pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt futerkowych (ryc. 1).

Filogeneza na podstawie sekwencji mtDNA. W obrębie analizowanych fragmentów genów mitochondrialnych stwierdzono łącznie 277 polimorfizmów międzygatunkowych, z których 16 było polimorficznych w obrębie poszczególnych gatunków. Na podstawie uzyskanych wyników analiz molekularnych określono wartości wskaźników opisujących zmienność genetyczną w poszczególnych *loci* mtDNA. Dla zidentyfikowanych *loci* mitochondrialnych określono liczbę alleli (N_a), frekwencję alleli (p i q), efektywną liczbę alleli (N_e) i indeks zmienności (h). Wartość N_e w populacji jenotów wahała się od 1,037 dla *locus* m.T426C do 1,908 dla *loci* m.T369C, m.T585C, m.T717C, m.T744C, m.T750C, m.T813C. Najwyższą efektywną liczbę alleli obserwowano dla *locus* m.T890C (1,956) zidentyfikowanego w grupie lisów pospolitych. Najniższą wartość zmienności (0,036) odnotowano w grupie jenotów dla *locus* m.T426C, natomiast najwyższą – 0,489 dla *locus* m.C890T (lisy pospolite) (tab. 5).

Uwzględniając wszystkie polimorficzne *loci* genu mitochondrialnego łącznie, określono wskaźniki zmienności oddzielnie dla poszczególnych badanych populacji (tab. 6). Najwyższe wartości ww. wskaź-

ników odnotowano w populacji jenotów. Jest to związane z największą liczbą zidentyfikowanych polimorficznych *loci* w tej grupie zwierząt. Z kolei podobne wartości wskaźników obserwowano w grupie lisów pospolitych i lisów polarnych, w obrębie których stwierdzono, odpowiednio, jeden i dwa polimorfizmy. Określony procent polimorficznych *loci* (%P) dla poszczególnych grup zwierząt był najwyższy w populacji jenotów (4,69), natomiast najniższy (0,36) w grupie lisów pospolitych (tab. 6).

Wszystkie analizowane fragmenty genów mtDNA (COX1, COX2, CYTB) zostały wykorzystane do określenia stopnia podobieństwa i standardowych dystansów genetycznych pomiędzy jenotem, lisem pospolitym i lisem polarnym.

Wyniki otrzymane na podstawie analizy fragmentów genów mitochondrialnych są zbliżone do wyników otrzymanych na podstawie analizy nDNA. W tym przypadku dystans genetyczny pomiędzy lisem pospolitym i lisem polarnym również przyjmował stosunkowo niskie wartości, natomiast dystans pomiędzy jenotem a dwoma pozostałymi gatunkami był niemal dwukrotnie wyższy. Największą odległość genetyczną odnotowano pomiędzy jenotem i lisem pospolitym, natomiast najmniejszy dystans genetyczny dzieli lisa pospolitego i lisa polarnego (tab. 7). Na podstawie dystansów genetycznych (tab. 7) skonstruowano dendrogram obrazujący relacje filogenetyczne pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt futerkowych (ryc. 2).

Wykorzystanie sekwencji zarówno genomu mitochondrialnego, jak i jądrowego pozwala na określenie genetycznej zmienności wewnątrz- i międzygatunkowej badanych gatunków zwierząt. Wyniki badań własnych, otrzymane po analizie sekwencji genów nDNA i mtDNA u jenotów, lisów pospolitych i lisów polarnych wskazują, że badane gatunki charakteryzowały się wysoką zmiennością międzygatunkową, szczególnie pod względem sekwencji mtDNA. Może to wynikać m.in. z dużo wyższego tempa mutacji genomu mitochondrialnego, w porównaniu z genomem jądrowym. Jest to jeden z powodów, dla których sekwencje mtDNA znajdują zastosowanie w różnokierunkowych badaniach, w tym w analizach mających na celu określenie relacji filogenetycznych w obrębie rodziny psowatych (9, 11, 12, 16, 18, 19).

Sposobem na zweryfikowanie, czy uzyskana na podstawie markerów mtDNA historia ewolucyjna jest zgodna z rzeczywistością, jest porównanie jej z historią wnioskowaną na podstawie DNA jądrowego. Analiza danych z nDNA jest trudniejsza ze względu na proces rekombinacji, który powoduje, że historia ewolucyjna różnych fragmentów danego *locus* może się różnić. Do analiz filogenetycznych powinno się zatem wybierać regiony nDNA o niskim tempie rekombinacji (2).

Tab. 5. Wskaźniki statystyczne w badanych *loci* mitochondrialnego DNA

Gatunek	Locus	Frekwencja alleli		N _a	N _e	H
Jenot	T369C	T – 0,610	C – 0,390	2	1,908	0,476
	T426C	T – 0,982	C – 0,018	2	1,037	0,036
	T585C	T – 0,390	C – 0,610	2	1,908	0,476
	T717C	T – 0,390	C – 0,610	2	1,908	0,476
	T744C	T – 0,610	C – 0,390	2	1,908	0,476
	T750C	T – 0,610	C – 0,390	2	1,908	0,476
	T813C	T – 0,390	C – 0,610	2	1,908	0,476
	G84A	G – 0,628	A – 0,372	2	1,877	0,467
	C153A	C – 0,628	A – 0,372	2	1,877	0,467
	A180G	A – 0,628	G – 0,372	2	1,877	0,467
	G246A	G – 0,628	A – 0,372	2	1,877	0,467
	G537A	G – 0,628	A – 0,372	2	1,877	0,467
	T624C	T – 0,628	C – 0,372	2	1,877	0,467
Lis pospolity	C890T	C – 0,575	T – 0,425	2	1,956	0,489
Lis polarny	C901T	C – 0,725	T – 0,275	2	1,663	0,399
	C926T	C – 0,925	T – 0,075	2	1,161	0,139

Tab. 6. Wskaźniki statystyczne mtDNA w badanych populacjach zwierząt futerkowych

Populacja		N _a	N _e	H	%P
Jenoty	Średnia	1,047	1,039	0,021	4,69
	SE	0,013	0,011	0,006	
Lisy pospolite	Średnia	1,004	1,003	0,002	0,36
	SE	0,004	0,003	0,002	
Lisy polarne	Średnia	1,007	1,003	0,002	0,72
	SE	0,005	0,002	0,002	

Tab. 7. Podobieństwa (nad przekątną) i dystanse genetyczne (pod przekątną) pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt futerkowych, obliczone na podstawie sekwencji mtDNA

	Jenot	Lis pospolity	Lis polarny
Jenot	–	0,300	0,337
Lis pospolity	1,202	–	0,551
Lis polarny	1,087	0,597	–

Ryc. 2. Dendrogram przedstawiający relacje filogenetyczne jenota, lisa pospolitego i lisa polarnego, otrzymany na podstawie sekwencji mtDNA

Zhong i wsp. (19) prowadzili analizy w celu określenia relacji filogenetycznych pomiędzy pięcioma gatunkami z rodziny *Canidae*, na podstawie sekwencji mtDNA. Potwierdzono, że lis pospolity i lis polarny należą do jednego kladu. Wyniki badań własnych, otrzymane na podstawie analizy sekwencji mtDNA, również wskazują na bliskie pokrewieństwo obu gatunków lisów (tab. 7). Zhang i Chen (18) określili

relacje filogenetyczne pomiędzy ośmioma gatunkami psowatych, z wykorzystaniem sekwencji genów mitochondrialnych. Autorzy stwierdzili, że rodzaje *Vulpes* i *Nyctereutes* mają bliskie powiązania filogenetyczne.

Skorczyk i wsp. (9), analizując dystanse genetyczne pomiędzy czterema gatunkami z rodziny psowatych stwierdzili, że najmniejszy dystans genetyczny dzieli lisa pospolitego i lisa polarnego oraz jenota i psa. Podobnie Świtoński i wsp. (16) określili relacje filogenetyczne, z wykorzystaniem siedmiu fragmentów genów jądrowych, pomiędzy zwierzętami futerkowymi z rodziny psowatych. Stwierdzili oni, że najmniejsze odległości genetyczne dzielą lisa pospolitego i lisa polarnego, a największe spośród analizowanych hodowlanych zwierząt futerkowych – jenota i oba gatunki lisów. Wyniki badań własnych nie odbiegają od wspomnianych rezultatów i wskazują, że jenot jest gatunkiem, który dzieli największą odległość genetyczną w stosunku do pozostałych gatunków objętych analizami. Podobne wartości dystansów genetycznych uzyskano na podstawie fragmentów genów nDNA i mtDNA (tab. 4 i 7).

Podsumowując, na podstawie analiz molekularnych sekwencji genów nDNA i mtDNA wykazano, że częstość występowania polimorfizmów w obrębie genomu mitochondrialnego była niemal dwudziestokrotnie wyższa w porównaniu z genomem jądrowym u jenota. Rezultaty analiz filogenetycznych świadczą o możliwości wykorzystania zarówno fragmentów genów mitochondrialnych, jak i jądrowych w celu określenia relacji filogenetycznych pomiędzy analizowanymi gatunkami zwierząt futerkowych. Wyniki uzyskane na podstawie analiz genomu jądrowego jedynie nieznacznie odbiegają od wyników analiz DNA mitochondrialnego. Mogą one zatem stanowić dodatkowe źródło informacji do określania relacji filogenetycznych pomiędzy zwierzętami futerkowymi z rodziny *Canidae*.

Piśmiennictwo

1. Grzes M., Nowacka-Woszek J., Szczerbal I., Czerwinska J., Gracz J., Switonski M.: A Comparison of Coding Sequence and Cytogenetic Localization of the Myostatin Gene in the Dog, Red Fox, Arctic Fox and Chinese Raccoon Dog. *Cytogenet. Genome Res.* 2009, 126, 173-179.
2. Hare M. P.: Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends Ecol. Evol.* 2001, 16, 700-706.
3. Jeżewska-Witkowska G., Horecka B., Jakubczak A., Kasperek K., Ślaska B., Bugno-Poniewierska M., Piórkowska M.: Genetic variability of farmed and free-living populations of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Ann. Anim. Sci.* 2012, 12, 501-512.
4. Kasperek K., Horecka B., Jakubczak A., Ślaska B., Gryzińska M., Bugno-Poniewierska M., Piórkowska M., Jeżewska-Witkowska G.: Analysis of genetic variability in farmed and wild populations of raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) using microsatellite sequences. *Ann. Anim. Sci.* 2015, 15, 889-901.
5. Nei M.: Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 1972, 106, 283-292.
6. Nei M.: *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press 1987.
7. Peakall R., Smouse P.: GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 2012, 28, 2537-2539.
8. Saitou N., Nei M.: The Neighbor-Joining Method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4, 406-425.
9. Skorczyk A., Flisikowski K., Świtoński M.: A Comparative Analysis of MC4R Gene Sequence, Polymorphism, and Chromosomal Localization in Chinese Raccoon Dog and Arctic Fox. *DNA and Cell Biol.* 2012, 31, 732-738.
10. Ślaska B., Grzybowska-Szatkowska L.: Analysis of the mitochondrial haplogroups of farm and wild-living raccoon dogs in Poland. *Mitochondrial DNA* 2011, 22, 105-110.
11. Ślaska B., Grzybowska-Szatkowska L., Bugno-Poniewierska M., Surdyka M., Śmiech A.: Nuclear and mitochondrial DNA mutation in human and canine tumors. *Med. Weter.* 2013, 4, 195-202.
12. Ślaska B., Grzybowska-Szatkowska L., Surdyka M., Nisztuk S., Rozanska D., Rozanski P., Śmiech A., Orzelski M.: Mitochondrial D-loop mutations and polymorphisms are connected with canine malignant cancers. *Mitochondrial DNA* 2014, 25, 238-243.
13. Ślaska B., Jeżewska G.: Optimization of PCR-RFLP technique for analysis of some genes in the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides* Gray 1834). *Ann. Anim. Sci.* 2008, 8, 29-36.
14. Ślaska B., Jeżewska G., Zięba G., Pierzchała M.: Genetic variability and linkage of selected microsatellite markers in the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*). *Arch. Tierzucht* 2008, 51, 187-198.
15. Ślaska B., Zięba G., Rozempolska-Rucinska I., Jeżewska-Witkowska G., Jakubczak A.: Evaluation of genetic biodiversity in farm-bred and wild raccoon dogs in Poland. *Folia Biol.-Krakow* 2010, 58, 195-199.
16. Świtoński M., Szczerbal I., Nowacka-Woszek J.: Comparative Genomics of 3 Farm Canids in Relation to the Dog. *Cytogenet. Genome Res.* 2009, 126, 86-96.
17. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007, 24, 1596-1599.
18. Zhang H., Chen L.: The complete mitochondrial genome of dhole *Cuon alpinus*: phylogenetic analysis and dating evolutionary divergence within Canidae. *Mol. Biol. Rep.* 2011, 38, 1651-1660.
19. Zhong H.-M., Zhang H.-H., Sha W.-L., Zhang C.-D., Chen Y.-C.: Complete Mitochondrial Genome of the Red Fox (*Vulpes vulpes*) and Phylogenetic Analysis with Other Canid Species. *Zool. Res.* 2010, 31, 122-130.

Adres autora: dr Sylwia Nisztuk-Pacek, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin;
e-mail: sylwia.nisztuk@up.lublin.pl