

Genetyczna charakterystyka owcy rasy wrzosówka na podstawie 14 markerów mikrosatelitarnych DNA

ANNA RADKO, TADEUSZ RYCHLIK, EWA SŁOTA

Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-085 Balice

Radko A., Rychlik T., Słota E.

Genetic characterization of the wrzosówka sheep breed on the basis of 14 microsatellite DNA markers

Summary

The genetic characterization of the wrzosówka sheep breed was performed on the basis of microsatellite DNA markers. 73 sheep were typed with a set of 14 microsatellites (BM757, BM827, BM6526, BM8125, OarAE129, OarCP20, OarCP34, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB128, OarFCB304, OarHH35, OarHH47, OarHH64) recommended by the FAO for biodiversity studies. The analyzed microsatellite markers were characterized by a high polymorphism in the studied material. Except for locus OarAE129, which shows the lowest variation ($H=0.485$ and $PIC=0.368$), the calculated H and PIC values exceeded 0.5. The highest polymorphism was characteristic of locus OarAE128 and OarHH47 ($H=0.837$, $PIC=0.817$ and $H=0.827$, $PIC=0.807$). The high polymorphism of selected DNA microsatellite sequences (with H and PIC values averaging 0.711 and 0.670 respectively) and the probability of excluding the wrong parent based on all analyzed markers (99.96%) are clear evidence that they are useful for parentage control of wrzosówka sheep.

Keywords: sheep, biodiversity, microsatellite DNA markers

Jednym z podstawowych elementów Światowego Programu Zachowania Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich FAO jest zinventaryzowanie światowych zasobów genetycznych, które umożliwi monitorowanie i identyfikowanie ras zagrożonych wyginięciem oraz opracowanie programów ich zachowania. Zasoby genetyczne zwierząt gospodarskich utrzymywanych w Polsce są znaczne, każdy z gatunków reprezentowany jest przez kilka-kilkanaście ras, odmian i linii, wśród których występuje szereg cennych ras rodzimych (lokalnych), odznaczających się specyficznymi cechami użytkowymi i unikatowym genotypem. W maju 2000 r. Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi zaakceptował do realizacji 32 programy hodowlane obejmujące 75 ras, odmian i rodów gospodarskich. W populacji owiec programem ochrony zasobów genetycznych objęto 13 ras i odmian: wrzosówkę, świniarkę, owcę olkuską, wielkopolską, pomorską, kamieniecką, corriedale, leine oraz polską owcę górską odmiany barwnej, polską owcę nizinną odmiany żelazneńskiej, polską owcę nizinną odmiany uhruskiej, merynosa odmiany barwnej i merynosa booroola.

Kryzys, jaki dotknął w latach dziewięćdziesiątych polskie owczarstwo, doprowadził do znacznego spadku поголовья owiec, następstwem czego mogło być ograniczenie zmienności genetycznej niektórych ras owiec hodowanych w kraju. Uważa się zatem za celowe podjęcie działań na rzecz odbudowy i doskonalenia wartości hodowlanej krajowego поголовья owiec, a szczególnie tej grupy zwierząt, które mogą stanowić rezer-

wę genetyczną dla takich cech, jak: zdrowotność, płodność i plenność. Działania te powinny objąć również kompleksową analizę ich struktury genetycznej przy wykorzystaniu możliwie największej liczby markerów genetycznych, co pozwoli na zachowanie bioróżnorodności badanych owiec w stadach zachowawczych. Dotychczas analiza struktury genetycznej owcy rasy wrzosówka przeprowadzona była na podstawie grup krwi i polimorficznych białek, nie wykonano natomiast takiej analizy na podstawie markerów mikrosatelitarnych DNA (6). Celem badań było podjęcie próby scharakteryzowania owcy rasy wrzosówka na podstawie analizy polimorfizmu 14 sekwencji mikrosatelitarnych DNA zalecanych przez FAO do oceny bioróżnorodności owiec.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 73 owcach rasy wrzosówka pochodzących z terenów południowej Polski. Próbkę krwi od tych zwierząt przekazywane były w latach 2001-2002 do Działu Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt w celu wykonania badań kontroli rodowodów.

Do analizy polimorfizmu DNA wybrano 14 *loci* (BM757, BM827, BM6526, BM8125, OarAE129, OarCP20, OarCP34, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB128, OarFCB304, OarHH35, OarHH47, OarHH64) wchodzących w skład zestawu zalecanego przez FAO do oceny bioróżnorodności owiec.

Na bazie wyizolowanego genomowego DNA amplifikację sekwencji z wybranych *loci* wykonano metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) przy użyciu fluorescencyjnie znakowanych starterów. Sekwencje starterowe do powielenia fragmentów DNA z analizowanych *loci* pozyskano z in-

ternetowej bazy danych <http://www.projects.roslin.ac.uk/sheepmap>. Uzyskane produkty PCR poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 4% żelu poliakrylamidowym w laserowym sekwenatorze ABI PRISM 377. Wyniki rozdzielania elektroforetycznego analizowano przy pomocy programu komputerowego GeneScan 2.1., natomiast wielkości zidentyfikowanych alleli określono w programie Genotyper 2.0.

Na podstawie częstości występowania poszczególnych alleli sekwencji mikrosatelitarnych wyliczono stopień heterozygotyczności – H (7), indeks stopnia polimorfizmu – PIC (3) oraz prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa z uwzględnieniem możliwości przebadania obydwu osobników rodzicielskich – PE (5) dla każdego *locus*. Obliczono również łączne prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa PE_c na podstawie wszystkich 14 badanych *loci*.

Wyniki i omówienie

Owca rasy wrzosówka jest jedną z najstarszych ras rodzimych, którą charakteryzuje łatwa adaptacja do zróżnicowanych warunków klimatyczno-środowiskowych, małe wymagania w zakresie żywienia i warunków chowu, duża żywotność i odporność na choroby, wczesne dojrzewanie płciowe, aseasonowość oraz wyrównany poziom owulacji i plenności. Ponadto, rasę tę cechuje doskonała jakość skór oraz wyjątkowo specyficzny smak mięsa. Wrzosówka zaliczana była niegdyś do grupy owiec o znacznym udziale w pogłowie krajowym, jednak w okresie powojennym zaniechano hodowli tej rasy, co spowodowało, że trafiła ona do hodowli zachowawczej.

W przedstawionych badaniach dokonano próby oceny struktury genetycznej owcy rasy wrzosówka na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnych DNA. Markery te ze względu na dużą częstość występowania w genomie (dotychczas u owiec zidentyfikowano ponad 1800 sekwencji mikrosatelitarnych, wysoki stopień polimorfizmu oraz stosunkowo łatwą i szybką identyfikację, przy użyciu reakcji PCR i analizy produktu amplifikacji w sekwenatorach DNA) stały się najliczniejszą klasą markerów genetycznych, które znalazły szerokie zastosowanie do analizy zmienności genetycznej między różnymi rasami owiec (1, 2, 4, 8-10). W koordynowanym przez FAO Programie MoDAD – Analiza Różnorodności Biologicznej Zwierząt Gospodarskich wybrano 27 sekwencji mikrosatelitarnych, które zaleca się do badania zmienności genetycznej owiec. Na podstawie częstości występowania alleli warunkujących poszczególne markery mikrosatelitarne można obliczyć, między innymi, takie wskaźniki, jak stopień polimorfizmu i stopień heterozygotyczności. Wskaźniki te umożliwiają z kolei oszacowanie zmienności genetycznej różnych ras owiec. Ocena zmienności genetycznej i stopnia heterozygotyczności może być pomocna przy wyborze zwierząt do hodowli dla zachowania ich biologicznej różnorodności oraz przy ustalaniu optymalnego wariantu krzyżowania w celu uzyskania maksymalnego efektu heterozji. Badania polimorfizmu, jak największej liczby markerów genetycznych pozwalają także na śledzenie i monitorowanie zmian, jakie zachodzą

Tab. 1. Częstość występowania zidentyfikowanych alleli w badanych 14 mikrosatelitarnych *loci* DNA

<i>Loci</i>	Allel	Częstość	<i>Loci</i>	Allel	Częstość
BM757	176	0,123	OarFCB48	148	0,110
	178	0,39		150	0,555
	180	0,192		152	0,062
	182	0,253		154	0,041
	184	0,041		156	0,096
BM827	216	0,164	OarFCB128	158	0,137
	218	0,596		99	0,075
	222	0,185		109	0,075
	224	0,055		111	0,247
BM6526	162	0,411	OarFCB304	113	0,212
	164	0,116		121	0,041
	166	0,082		123	0,075
	168	0,233		125	0,158
	170	0,158		127	0,116
BM8125	112	0,075	OarHH35	162	0,021
	116	0,445		164	0,267
	118	0,055		166	0,240
	120	0,342		172	0,212
	122	0,082		180	0,110
OarAE129	144	0,418	OarHH47	188	0,151
	146	0,582		119	0,212
OarCP20	71	0,253	OarHH64	121	0,089
	73	0,178		123	0,466
	75	0,082		125	0,041
	77	0,253		127	0,110
	83	0,103		131	0,021
	87	0,041		133	0,062
	89	0,089		129	0,048
OarCP34	114	0,192	OarHH47	131	0,137
	116	0,363		139	0,247
	118	0,137		141	0,178
	122	0,103		143	0,178
	124	0,205		145	0,144
OarFCB20	89	0,055	OarHH64	153	0,068
	93	0,096		124	0,055
	95	0,171		128	0,253
	97	0,322		132	0,096
	99	0,041		134	0,596
	101	0,151			
	105	0,164			

dają w strukturze genetycznej określonych populacji owiec pod wpływem prowadzonej pracy hodowlanej.

W badanej populacji owiec w obrębie badanych 14 markerów mikrosatelitarnych, wchodzących w skład

Tab. 2. Zakres długości w parach zasad (pz), liczba alleli, heterozygotyczność (H), indeks stopnia polimorfizmu (PIC) oraz prawdopodobieństwo wykluczenia (PE) dla badanych *loci*

<i>Loci</i>	Zakres długości (pz)	Liczba alleli	H	PIC	PE
BM757	176-184	5	0,730	0,686	0,494
BM827	216-224	4	0,581	0,533	0,342
BM6526	162-170	5	0,732	0,692	0,505
BM8125	112-122	5	0,669	0,613	0,417
OarAE129	144-146	2	0,485	0,368	0,184
OarCP20	71-89	7	0,813	0,788	0,632
OarCP34	114-124	5	0,760	0,724	0,541
OarFCB20	89-105	7	0,803	0,777	0,619
OarFCB48	148-158	6	0,647	0,617	0,439
OarFCB128	99-127	8	0,837	0,817	0,677
OarFCB304	162-188	6	0,791	0,759	0,586
OarHH35	119-133	7	0,712	0,679	0,500
OarHH47	129-153	7	0,827	0,807	0,658
OarHH64	124-134	4	0,568	0,513	0,329

zestawu zalecanego przez FAO do oceny bioróżnorodności owiec, ustalono 78 alleli, które wykazywały zróżnicowane rozmieszczenie w poszczególnych *loci*, od 2 do 8 alleli (tab. 2). W oparciu o wyliczone częstości występowania zidentyfikowanych alleli, podanych w tab. 1, obliczono wartości wskaźników H i PIC (tab. 2). Otrzymane wyniki wykazały, że badane markery charakteryzują się wysokim stopniem polimorfizmu. Średnie wartości współczynnika heterozygotyczności i indeksu polimorfizmu dla wszystkich badanych *loci* osiągnęły wysokie wartości równe odpowiednio 0,711 i 0,670. Wyjątek stanowił *locus* OarAE129, dla którego ustalono jedynie 2 allele i otrzymano najmniejsze wartości badanych wskaźników równe 0,485 i 0,368 odpowiednio dla H i PIC. W pozostałych *loci* omawiane wskaźniki przyjęły wartości wyższe niż 0,5. Najwyższym polimorfizmem odznaczały się *loci* OarFCB128 oraz OarHH47, dla których wskaźniki H i PIC osiągnęły wartości równe odpowiednio 0,837 i 0,817 oraz 0,827 i 0,807. Inne badania przeprowadzone przez Tomasco i wsp. (9) oraz Cerita i wsp. (4) na różnych populacjach owiec również wykazały wysoki polimorfizm *loci* OarFCB128 i OarHH47 o wskaźnikach H i PIC wyższych od wartości 0,7.

Na podstawie częstości zidentyfikowanych alleli przeprowadzono także analizę przydatności badanych markerów do kontroli pochodzenia. Miarą przydatności poszczególnych markerów genetycznych do weryfikacji pochodzenia jest prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzicielstwa – PE. Prawdopodobieństwo wykluczenia oszacowane dla każdego z 14 badanych *loci*, z uwzględnieniem możliwości przebadania obydwu osobników rodzicielskich podano w tab. 2. Najwyższe wartości równe 0,677 i 0,658 otrzy-

mano, odpowiednio, dla OarFCB128 i OarHH47 odznaczających się najwyższym polimorfizmem, natomiast najniższą wartość wynoszącą 0,184 dla OarAE129 o najniższym polimorfizmie. PE wyliczone na podstawie wszystkich 14 *loci* łącznie osiągnęło wartość 0,9996, co oznacza, że zastosowanie w kontroli pochodzenia łącznie wszystkich badanych markerów genetycznych daje możliwość wykluczenia niewłaściwego rodzica z 99,96% prawdopodobieństwem. Podobne badania przeprowadzone na podstawie 10 *loci* mikrosatelitarnych, w tym 7 wykorzystanych w badaniach własnych, wykazały również wysokie prawdopodobieństwo wykluczenia na poziomie 99,9% (9).

W przeprowadzonej analizie polimorfizmu DNA owcy rasy wrzosówka, spośród 14 wybranych markerów mikrosatelitarnych przeznaczonych do określania bioróżnorodności owiec, stwierdzono wysoki polimorfizm 13 sekwencji mikrosatelitarnych DNA, dla których oszacowane wartości stopnia heterozygotyczności i polimorfizmu były wyższe od wartości 0,5, co świadczy o dużej przydatności tych markerów do analizy bioróżnorodności owiec rasy wrzosówka. Ograniczoną przydatność do tych badań stwierdzono jedynie dla *locus* OarAE129, dla którego w badanej rasie owiec zidentyfikowano tylko 2 allele.

Wyliczone wysokie prawdopodobieństwo, z jakim można wykluczyć niewłaściwego rodzica na podstawie analizowanych markerów wskazuje, że mogą one być wykorzystane w kontroli rodowodów owiec rasy wrzosówka. Ewentualne wprowadzenie w przyszłości w Polsce polimorfizmu mikrosatelitarnego do kontroli pochodzenia owiec należałoby jednak poprzedzić szerszymi badaniami, obejmującymi wszystkie markery zalecane przez FAO do analizy polimorfizmu DNA, na różnych rasach owiec. Badania takie miałyby na celu wyznaczenie odpowiedniego zestawu – wysokopolimorficznych *loci*, gwarantujących wysokie prawdopodobieństwo wskazania błędów w rodowodach.

Piśmiennictwo

- Achmann R., Brem G.: Parentage control in austrian domestic mountain sheep (*Ovis aries*) using DNA microsatellite analysis. *Anim. Genet.* 1998, 29, 12-13.
- Arranz J., Bayon Y., San Primitivo F.: Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim. Gen.* 1998, 29, 435-440.
- Botstein D., White R. L., Skolnicki M., Davis R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980, 32, 314-331.
- Cerit H., Altinel A., Elmaz O., Avanus K.: Polymorphism evaluation of various genomic loci in the kivrıcik sheep breed of Turkey. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 2004, 28, 415-425.
- Jamieson A.: The genetics of transferrin in cattle. *Heredity* 1965, 20, 419-441.
- Janik A., Rychlik T., Duniec M.: Struktura genetyczna krajowych ras owiec pod względem grup krwi i polimorficznych wariantów białek. *Rocz. Nauk. Zoot.* 1996, 23, 43-57.
- Nei M., Roychoudhury A. K.: Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genet.* 1974, 76, 379-390.
- Radko A., Rychlik T.: Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych DNA u owiec rasy Berrichone du Cher. *Rocz. Nauk. Zoot.* 2003, 17, 105-108.
- Tomasco I., Wlasiuk G., Lessa E. P.: Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep. *Genetics Mol. Biol.* 2002, 25, 37-41.
- Zamorano M. J., Ruiter J., Townsend S., Cruickshank R., Bruford M., Byrne K., Rodero A., Vega-Pla y J. L.: Polimorfismos de DNA en Las Razas Ovinas Merino Y Churra Lebrijana. *Arch. Zootec.* 1998, 47, 267-272.

Adres autora: dr inż. Anna Radko, ul. Bitschana 2/5, 31-416 Kraków; e-mail: arys@izoo.krakow.pl