

Analiza bioróżnorodności owiec na podstawie markerów mikrosatelitarnych DNA

Anno Radko

*Instytut Zootechniki- Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Zinwentaryzowanie światowych zasobów genetycznych, które umożliwi monitorowanie i identyfikowanie ras zagrożonych wyginięciem oraz opracowanie programów ich zachowania, jest jednym z podstawowych elementów Światowego Programu Zachowania Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich FAO. 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 populacji zwierząt gospodarskich, pszczoł i ryb. W populacji była programy te objęły rasę polską czerwoną, w populacji koni - konika polskiego i rasę huculską, w populacji trzody chlewnej - rasę puławską, złotnicką pstrą i złotnicką białą. Programem ochrony objętych jest 13 ras i odmian owiec, w tym: polska owca górską, wrzosówka, świniarka, długowłnista owca odmiany pomorskiej, merynos barwny oraz owca olkuska.

Kryzys, jaki dotknął w latach dziewięćdziesiątych polskie owczarstwo, doprowadził do znacznego spadku pogłowia owiec, którego następstwem 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 pogłowia owiec, a szczególnie tej grupy zwierząt, która może

stanowić rezerwę 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 w badaniach struktury genetycznej różnych ras i linii owiec oraz ocenie różnic w obrębie ras i między nimi szerokie zastosowanie znalazły markery genetyczne klasy I - antygeny erytrocytarne, białka polimorficzne osocza krwi i erytrocytów. W Polsce badania polimorfizmu antygenów erytrocytarnych, białek polimorficznych osocza krwi i erytrocytów u niektórych ras i linii syntetycznych owiec hodowlanych prowadzili między innymi Trela i Trela (1983), Bojczuk i in. (1991) i Rychlik i in. (1996, 1997).

Od kilku lat w wielu ośrodkach naukowych na świecie, a ostatnio również w Polsce, wykonuje się analizy struktury genetycznej różnych ras owiec w oparciu o markery mikrosatelitarne DNA (Arranz i in., 1998; Diez-Tascon i in., 2000; Muigai i in., 2000; Radko i Rychlik, 2003). Coraz częściej markery te wykorzystywane są także do kontroli pochodzenia u owiec (Achmann i Brem, 1998; Rychlik i in., 2003).

Sekwencje mikrosatelitarne DNA

Sekwencje mikrosatelitarne, krótkie 1-, 6-nukleotydowe, tandemowe powtórzenia DNA, których długość wynosi średnio od 60 do 200 par zasad (Ma i in., 1996), występują w genomach eukariotów z dość dużą częstością i są rozmieszczone równomiernie co 6-10 kbp (Tautz, 1989;

Beckmann i Weber, 1992).

Do amplifikacji sekwencji mikrosatelitarnych wykorzystywana jest łańcuchowa reakcja polimerazy (Litt i Luty, 1989; Tautz, 1989). Analiza zamplifikowanych fragmentów DNA, wykonywana początkowo technikami hybrydyzacji, gdzie produkty PCR po elektroforezie przenoszono na filtry nylonowe i hybrydowano ze znaczącymi radioaktywnymi sondami, została zastąpiona analizą w automatycznych sekwenatorach DNA (Levitt i in., 1994; Tanaka i in., 1996; Heyen i in., 1997). Szczególne zastosowanie znalazła reakcja PCR typu multiplex, gdzie w mieszaninie reakcyjnej znajduje się nawet kilkanaście par starterów, dzięki czemu jednocześnie zachodzi powielenie kilkunastu loci. Startery stosowane do amplifikacji są znakowane fluorescencyjnie, czterema barwnikami, co umożliwia wykrycie jednocześnie kilkunastu markerów mikrosatelitarnych w jednej ścieżce żelu poliakrylamidowego (Heyen i in., 1997; Luikart i in., 1999). Do odczytu takiego rozdziału elektroforetycznego używane są czytniki laserowe, co eliminuje etap hybrydyzacji i pozwala na bezpośredni odczyt wyników oraz zachowanie danych w pamięci komputera.

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, mikrosatelity DNA stały się najliczniejszą klasą markerów genetycznych. Znalazły one szerokie zastosowanie zarówno w badaniach teoretycznych, jak i bezpośrednio związanych z hodowlą zwierząt gospodarskich (Lubieniecka i in., 1999; Diez-Tascon i in., 2000; Radko i Duniec, 2002; Radko i Rychlik, 2003). Markery mikrosatelitarne wykorzystywane są do analizy zmienności genetycznej w obrębie ras i między rasami, w szacowaniu stopnia zimbredowania poszczególnych populacji (linii), jak również do badania podobieństw i różnic między populacjami/rasami oraz ustalania dystansu genetycznego między nimi. W koordynowanym przez FAO programie MoDAD (Analiza Różnorodności Biologicznej Zwierząt Gospodarskich), obejmującym badanie zmienności genetycznej bydła, trzody chlewnej, kur oraz owiec wybrano 27 sekwencji mikrosatelitarnych, które zalecono do badania

zmienności genetycznej owiec.

Na podstawie częstości występowania alleli warunkujących poszczególne markery mikrosatelitarne DNA można obliczyć, między innymi, takie wskaźniki, jak stopień polimorfizmu, stopień heterozygotyczności, efektywną liczbę alleli w locus oraz dystans genetyczny. Wskaźniki te umożliwiają z kolei oszacowanie zmienności genetycznej wewnątrz i między populacjami, a także przeprowadzenie analizy różnic występujących między nimi (Arranz i in., 1998; Diez-Tascon i in., 2000). Ocena zmienności genetycznej, stopnia heterozygotyczności i dystansu genetycznego, 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 (Diez-Tascon i in., 2000; Muigai i in., 2000). Badania polimorfizmu markerów genetycznych pozwalają także na śledzenie i monitorowanie zmian, jakie zachodzą w strukturze genetycznej określonych populacji owiec pod wpływem prowadzonej pracy hodowlanej.

W Instytucie Zootechniki podjęto próbę oceny struktury genetycznej owcy rasy wrzosówka na podstawie analizy markerów mikrosatelitarnych DNA, wytypowanych przez FAO do analizy bioróżnorodności u owiec.

Owca rasy wrzosówka jest jedną z najstarszych ras rodzimych, którą charakteryzuje bardzo łatwa adaptacja do zróżnicowanych warunków klimatyczno-środowiskowych, małe wymagania w zakresie żywienia i warunków chowu, duża żywotność i odporność na choroby, wczesne dojrzewanie płciowe, asezonalność 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.

U wybranych losowo 73 sztuk owiec rasy wrzosówka określono polimorfizm 14 loci wchodzących w skład zestawu zalecanego przez FAO do oceny bioróżnorodności owiec: BM757, BM827, BM6526, BM8125, OarAE129, OarCP20, OarCP34, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB128, OarFCB304, OarHH35, OarHH47, OarHH64.

Na bazie wyizolowanego z leukocytów

krwi genomowego DNA, wykonano amplifikację sekwencji z wybranych *loci* metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR), przy użyciu fluorescencyjnie znakowanych starterów. Sekwencje starterowe do powielenia fragmentów DNA z analizowanych loci pozyskano z internetowej bazy danych (<http://www.projects.roslin.ac.uk/sheepmap>). Uzyskane produkty PCR poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w 4% żelu poliakrylamidowym w laserowym sekwenatorze ABI PRISM 377. Wyniki rozdziału elektroforetycznego analizowano przy pomocy programu komputerowego GeneScan 2.1., natomiast wielkości zidentyfikowanych alleli określono w programie Genotyper 2.0.

W badanej populacji owiec, w obrębie wybranych do badania 14 markerów mikrosatelitarnych, zalecanych do oceny bioróżnorodności owiec, ustalono 88 alleli, które wykazywały dość zróżnicowane rozmieszczenie w poszczególnych loci: od 2 alleli w locus OarAE129 do 8 alleli w locus OarFCB304 (tab. 1).

W analizie polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA, przeprowadzonej na podstawie 14 markerów u owcy rasy wrzosówka, można stwierdzić, że za wyjątkiem locus OarAE129, dla którego w badanej rasie owiec zidentyfikowano tylko 2 allele, co ogranicza przydatność tego

markera do dalszych badań, pozostałe markery mogą być wykorzystane do analizy bioróżnorodności owcy rasy wrzosówka.

Tabela 1. Zakres długości w parach zasad (pz), liczba alleli badanych markerów
Table 1. Length range in base pairs (bp), number of alleles and markers studied

Marker	Zakres długości (pz) <i>Length range (bp)</i>	Liczba alleli <i>No. of alleles</i>
BM757	176-184	5
BM827	216-224	4
BM6526	162-170	5
BM8125	112-122	5
OarAE129	144-146	2
OarCP20	71-89	7
OarCP34	114-124	5
OarFCB20	89-105	7
OarFCB48	148-158	6
OarFCB128	99-127	8
OarFCB304	162-188	6
OarHH35	119-133	7
OarHH47	129-153	7
OarHH64	124-134	4

Literatura

- Achmann R., Brem G. (1998). Parentage control in Austrian domestic mountain sheep (*Ovis aries*) using DNA microsatellite analysis. *Anim. Genet.*, 29: 12-13.
- Arranz J., Bayon Y., San Primitivo F. (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using micro-satellites. *Anim. Genet.*, 29: 435-440.
- Beckmann J.S., Weber J.L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genom.*, 12: 627-31.
- Bojczuk H., Michałowska B., Żurkowski M. (1980). Genetic differentiation of transferrins in long-wooled, Merino and Wrzosówka sheep. *Genet. Polon.*, 21, 3: 325-331.
- Bojczuk H., Bojczuk B., Żurkowski M. (1991). Dywastans genetyczny między rasami i liniami syntetycznymi owiec. *Zesz. Nauk. PTZ, Prz. Hod.*, 4: 8-13.
- Diez-Tascon C., Littlejohn P.R., Almeida R.A.P., Crawford M.A. (2000). The genetic variability of six Merino populations determined by microsatellites. 27th International Conference on Animal Genetics. University of Minnesota (USA), July 22-26, 2000, p. 9.
- Heyen D.W., Beever J.E., Da Y., Evert R.E., Green C., Bates S.R.E., Ziegler J.S., Lewin H.A. (1997). Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim. Genet.*, 28: 21-27.
- Levitt R.C., Kiser M.B., Dragwa C., Jedlicka A.E., Xu J., Meyers D.A., Hudson J.R. (1994). Fluorescence-based resource for semiautomated genomic analyses using microsatellite markers. *Genom.*, 24: 361-365.
- Litt M., Luty J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44: 397-401.
- Lubieniecka J., Grzybowski G., Grzybowski T., Mi-

- ścicka-Śliwka D., Lubieniecki K., Czarny J. (1999). Polymorphism at microsatellite loci in Piedmontese cattle by automated DNA sizing technology. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 17, 2: 25-34.
- Luikart G., Biju-Duval M.P., Ertugrul O., Zagdsuren Y., Maudet C., Taberlet P. (1999). Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Anim. Genet.*, 30: 431-438.
- Ma R.Z., Russ I., Park C., Heyen D.W., Beever J.E., Green C.A., Lewin H.A. (1996). Isolation and characterisation of 45 polymorphic microsatellites from the bovine genome. *Anim. Genet.*, 27: 43-47.
- Muigai W.A., Watts C.P., Hirbo J., Kemp S., Orege E.J., Hanotte O. (2000). Assessment of the genetic diversity of sub-Saharan African sheep populations using microsatellite markers. 27th International Conference on Animal Genetics. University of Minnesota (USA). July 22-26, 2000, p. 94.
- Radko A., Duniec M. (2002). Analysis of polymorphism at 11 DNA microsatellite loci in Black-and-White cattle in Poland. *Ann. Anim. Sci.*, 2, 1: 63-75.
- Radko A., Rychlik T. (2003). Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych DNA u owiec rasy Berrichone du Cher. *Rocz. Nauk. Zoot., Supl.*, 17: 105-108.
- Rychlik T., Janik A., Samborska M., Parys A. (1996). Polimorfizm grup krwi, transferyny i hemoglobiny w mięsnych rasach owiec hodowanych w Polsce. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 23, 3: 27-41.
- Rychlik T., Kaczor U., Wierzchoś E., Marchwica E. (1997). Characteristics of populations of prolific Olkuska sheep and selected sheep breeds with regard to blood groups and polymorphism of haemoglobin and transferrin. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 24, 2: 23-34.
- Rychlik T., Janik A., Duniec M. (1998). Dystans genetyczny między rasami i liniami owiec hodowanych w Polsce. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 25, 3: 45-56.
- Rychlik T., Radko A., Duniec M. (2003). Ocena przydatności polimorfizmu niektórych markerów genetycznych w kontroli rodowodów owiec. *Med. Wet.*, 59, 11: 1016-1018.
- Tanaka H., Saito M., Tsuji S. (1996). Analysis system of microsatellite polymorphism using automated laser fluorescent DNA sequencer. *Nippon Rinsho*, 54: 322-328.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17: 6463-6471.
- Trela E., Trela J. (1983). Częstość występowania typów transferyn u polskich owiec długowłnistych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 265: 219-224.

ANALYSIS OF A MICROSATELLITE SET FOR BIODIVERSITY STUDIES IN SHEEP

Summary

The genetic structure and characteristics of various breeds of sheep, especially those threatened with extinction, is attracting increasing international attention, taking into account the largest number of genetic markers possible. Genetic variability studies based on class I genetic markers (erythrocyte antigens, blood serum proteins, MHC antigens) have recently been extended with analysis of class II markers (polymorphic restrictive fragments, minisatellite and microsatellite sequences) associated with polymorphic DNA sequences. Of the DNA markers microsatellite sequences have found the broadest application. At present, they form the most numerous group of genetic markers that are used to study the genetic structure and genetic variability of different sheep breeds. This paper is a genetic characterization of Wrzosówka sheep based on 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 analysed microsatellite markers were characterized by a high polymorphism in the studied material.