

Sekwencje mikrosatelitarne w badaniach struktury genetycznej kóz

Jacek Sikora¹, Aldona Kawęcka¹, Katarzyna Walinowicz²

¹Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Ochrony Zasobów Genetycznych Zwierząt,

²Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Dział Genetyki i Hodowli Zwierząt,
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Celem prowadzonych badań była charakterystyka struktury genetycznej kóz saaneńskich na podstawie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA. Badania przeprowadzono na 54 kozach rasy saaneńskiej. Zidentyfikowano 34 warianty polimorficzne w 6 badanych *loci*. Średnia liczba alleli (N_a) wynosiła 5,7, a liczba alleli efektywnych (N_e) – 3,8. Dla większości *loci* nie stwierdzono odchyień od stanu równowagi genetycznej. Heterozygotyczność obserwowana (H_o) i oczekiwana (H_e) u kóz saaneńskich przyjmowała wartość 0,7. Markery mikrosatelitarne są przydatnym narzędziem w analizie struktury genetycznej i porównaniu zmienności między różnymi rasami kóz. Wskazane wydaje się rozszerzenie tego typu badań na inne rasy kóz w Polsce, przy użyciu większej liczby markerów.

SŁOWA KLUCZOWE: kozy / rasa saaneńska / sekwencje mikrosatelitarne / struktura genetyczna

Badania zmienności i struktury genetycznej kóz nie są tak rozpowszechnione jak w przypadku bydła czy owiec. Wraz z rozwojem technik molekularnych obserwuje się jednak coraz większe zainteresowanie tego typu badaniami również w odniesieniu do tego gatunku zwierząt. W europejskim projekcie Econogene [2], przy użyciu markerów mikrosatelitarnych, analizowano genetyczną różnorodność 45 ras kóz z 15 krajów Europy i Bliskiego Wschodu. Markery mikrosatelitarne znalazły zastosowanie w badaniach kontroli pochodzenia kóz [6], ocenie dystansu genetycznego między rasami, liniami i populacjami zwierząt [9], szacowaniu stopnia zimbredowania populacji, a także w badaniach filogenetycznych [4].

Rasa saaneńska wyhodowana została w Szwajcarii, w kantonie Berno, w dolinie rzeki Saanen, a obecnie rozpowszechniona jest na całym świecie. W wielu krajach użyto jej do wyhodowania nowych i uszlachetniania pierwotnych ras. W Polsce pod względem liczebności rasa ta zajmuje trzecie miejsce, po kozach białych i barwnych uszlachetnionych, co stanowi około 17% pogłowia kóz będącego pod oceną [10]. Od

kóz saaneńskich, kóz miejscowych i białych szlachetnych niemieckich wywodzi się najliczniejsza polska rasa kóz – biała uszlachetniona.

Celem prowadzonych badań była charakterystyka struktury genetycznej stada kóz saaneńskich na podstawie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 54 kozach rasy saaneńskiej. DNA zostało wyizolowane z próbek krwi z wykorzystaniem DNA Purification Kit. Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA została przeprowadzona na podstawie wybranych markerów, zalecanych przez FAO do oceny bioróżnorodności kóz [3]: CSR0247, ILSTS0087, INRA0023, McM0527, OarFCB0020, SRCRSP0023. Amplifikację wyizolowanego DNA, z wykorzystaniem wybranych sekwencji starterowych, przeprowadzono jednocześnie dla 6 *loci* (reakcja typu multipleks). Reakcję dla pojedynczej próbki przeprowadzono w objętości 10 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała: 3 mM MgCl₂, 0,4 mM DTP, 1 ml buforu (10x), 0,15 mM CSR0247, 0,08 mM ILSTS0087, 1,2 mM INRA0023, 0,1 mM McM0527, 0,25 mM OarFCB0020, 0,25 mM SRCRSP0023, 100 ng DNA i 2 U polimerazy AmplitaqGold. Amplifikację dla wybranych *loci* przeprowadzono w następujących warunkach: wstępna denat. 95°C – 10 min, 31 cykli: 94°C – 30 s, 55°C – 30 s, 72°C – 1 min, wydłużanie: 72°C – 5 min.

Produkty PCR poddano rozdzielowi w sekwenatorze kapilarnym. Wielkość analizowanych fragmentów DNA określono w parach zasad, a uzyskane dane stanowiły podstawę do przeprowadzenia analiz statystycznych. Analizy przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego POPGENE 3.2.

Wyniki i dyskusja

Zmienność genetyczna ma ogromne znaczenie dla wszystkich gatunków zwierząt. Duża pula genów w populacji gwarantuje lepsze zdolności adaptacyjne populacji do warunków środowiska. Niebezpieczeństwo ograniczenia tej różnorodności stwarzają zmiany zachodzące na skutek pracy hodowlanej, prowadzące do ograniczenia puli genetycznej. Coraz większego znaczenia nabierają zatem badania struktury i zmienności genetycznej zwierząt, służące monitorowaniu zmian zachodzących w populacjach. Początkowo do określenia struktury genetycznej wykorzystywane były markery I klasy, jednak w badaniach na szeroką skalę przydatniejsze okazały się markery II klasy, m.in. sekwencje mikrosatelitarne.

W badaniach przeprowadzonych na grupie kóz rasy saaneńskiej zidentyfikowano 34 warianty polimorficzne w 6 *loci*. W tabeli 1. przedstawiono frekwencje alleli w badanych *loci* mikrosatelitarnych. Wszystkie badane sekwencje mikrosatelitarne były polimorficzne. W *locus* SRCRSP023 zidentyfikowano 8 alleli o długości od 85 do 111 pz. Z najwyższą frekwencją (0,24) występował allel o długości 111 pz. W *locus* INRA23 zaobserwowano 7 alleli. W *loci* MCM0527, ILSTS0087 i OarFCB0020 zidentyfikowano po 5 alleli. Z najwyższą frekwencją występowały allele, odpowiednio: 156

Tabela 1 – Table 1Częstość występowania alleli w badanych *loci*
Frequency of alleles at *loci*

McM0527		CRSD0247		ILST0087		OarFCB0020		INRA0023		SRCRSP023	
156	0,5000	217	0,0648	145	0,1852	97	0,0370	197	0,1667	85	0,0833
158	0,0278	229	0,2037	147	0,0278	99	0,0833	199	0,0785	95	0,1481
166	0,1296	231	0,4537	149	0,1759	101	0,6574	201	0,1019	97	0,0278
170	0,0185	239	0,2778	151	0,2500	103	0,0278	207	0,1574	99	0,1852
172	0,3240			157	0,3611	107	0,1944	211	0,1296	101	0,2407
								213	0,3333	103	0,1389
								215	0,0926	107	0,1204
										111	0,0556

pz (0,5), 151 pz (0,25) i 101 pz (0,65). Najniższym polimorfizmem charakteryzowało się *locus* CSRD0247; zidentyfikowano w nim tylko 4 allele.

Na podstawie częstości alleli obliczono parametry zmienności genetycznej. W tabeli 2. przedstawiono wartości heterozygotyczności obserwowanej (H_o) i oczekiwanej (H_e), liczbę obserwowanych alleli (N_a) dla poszczególnych *loci*, wyliczoną liczbę alleli efektywnych (N_e) oraz wartości średnie dla badanej grupy. Efektywna liczba alleli wahała się w granicach od 2,08 do 6,29 i była znacznie niższa od obserwowanej, co świadczy o zaangażowaniu faktycznie niewielkiej liczby alleli w tworzeniu struktury genetycznej populacji kozy saaneńskiej. Średnia liczba alleli w badanej populacji wynosiła 5,7.

Tabela 2 – Table 2

Liczba alleli (N_a), efektywna liczba alleli (N_e), heterozygotyczność obserwowana (H_o) i oczekiwana (H_e) oraz odchylenie od stanu równowagi (P_{HW}) dla badanych *loci* i średnia dla rasy
Number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), probability value for Hardy-Weinberg equilibrium (P_{HW}) at the *loci* and mean for breed

Locus	N_a	N_e	H_o	H_e	P_{HW}
McM0527	5	2,68	0,685	0,627	0,7669
CSRD0247	4	3,04	0,778	0,671	0,2579
ILST0087	5	3,86	0,629	0,741	$p < 0,05$
OarFCB0020	5	2,08	0,426	0,521	$p < 0,05$
INRA0023	7	5,00	0,870	0,800	0,1298
SRCRSP023	8	6,29	0,889	0,841	$p < 0,05$
Średnia Mean	5,7	3,83	0,713	0,700	-

Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych dla ras włoskich – roccaverano i vallesana, z wykorzystaniem tych samych markerów mikrosatelitarnych. W projekcie Econogene średnia liczba alleli wahała się w granicach od 5,2 do 8,3

w zależności od rasy, a dla polskich kóz barwnych ujętych w tym projekcie wynosiła 6,9 [2]. W badaniach przeprowadzonych na terenie Brazylii [8] zaobserwowano wysoką liczbę alleli w populacjach użytkowanych mlecznie ras importowanych, tj. alpejskiej (12,8), toggenburskiej (9,5), saaneńskiej (9,3), a u kóz anglonubijskich – 7,4, podobnie jak u ras rodzimych – moxoto i caninde. Minimalna liczba alleli w *locus* w badaniach przeprowadzanych przez Oliveira i wsp. [8] wynosiła 9, a maksymalna 26. Inne wyniki uzyskał Menezes [7], badając natywne rasy brazylijskie z wykorzystaniem 27 markerów mikrosatelitarnych – minimalna liczba alleli w *locus* wynosiła 3, a maksymalna 23. Podobne badania, mające na celu scharakteryzowanie struktury populacji ras rodzimych kóz, przeprowadzono w Chinach [5] i w Indiach [4]. Średnia liczba alleli dla tych populacji wynosiła, odpowiednio – 6,9 i 5,4.

Wartość heterozygotyczności obserwowanej (H_o) i oczekiwanej (H_e) u kóz saaneńskich była wysoka i wynosiła 0,7 (tab. 2). Podobne obserwacje dotyczące tej rasy dokonali Araujo i wsp. [1]. Według Oliveiry i wsp. [8], H_o u kóz saaneńskich była znacznie niższa i wynosiła 0,45. Podobny poziom heterozygotyczności uzyskano dla rasy alpejskiej (0,46) i anglonubijskiej (0,4). W badaniach przeprowadzonych w Szwajcarii [9] zaobserwowano wyższą heterozygotyczność dla ras udomowionych (0,58) w porównaniu z rasami dzikimi bezoar i ibex (0,17 i 0,19). Brazylijskie rasy charakteryzowały się niskim poziomem heterozygotyczności [1, 8]. Badania przeprowadzone na szerszą skalę, obejmujące Europę Środkową i Północną oraz Bliski Wschód, wykazały wyższą heterozygotyczność dla populacji kóz z Bliskiego Wschodu (0,59) w porównaniu z kozami europejskimi (0,66).

Markery mikrosatelitarne są przydatnym narzędziem w analizie struktury genetycznej i porównaniu zmienności między różnymi rasami kóz. Wskazane wydaje się rozszerzenie tego typu badań na inne rasy kóz w Polsce, przy użyciu większej liczby markerów.

PIŚMIENNICTWO

1. ARAUJO A., GUIMARAES S., MACHADO T., LOPES P., PEREIRA C.F., RODRIGUES M., COLUMBIANO V., FONSECA C., 2006 – Genetic diversity between herds of Alpine and Saanen dairy goats and the naturalized Brazilian Moxotó breed. *Genetics and Molecular Biology* 29, 1, 67-74.
2. CANON J., GARCIA D., GARCIA-ATANCE M.A., OBEXER-RUFF G., LENSTRA J.A., AJMONE-MARSAN P., DUNNER S. and The ECONOGENE Consortium, 2006 – Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East. *Animal Genetics* 37, 327-334.
3. FAO, 2004 – Conservation Strategies for Animal Genetic Resources. FAO, Rome, Italy.
4. GANAI N.A., YADAV B.R., 2001 – Genetic variation within and among three Indian breeds of goat using heterologous microsatellite markers. *Animal Biotechnology* 12 (2), 121-136.
5. LI M-H., ZHAO S-H., BIAN C. et al., 2002 – Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis. *Genetics Selection Evolution* 34, 729-744.
6. 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*). *Animal Genetics* 30 (6), 431-438.

7. MENEZES M., MARTINEZ A., RIBEIRO M., FILHO E., BERMEJO J., 2006 – Genetic characterization of Brazilian native breeds of goats using 27 markers microsatellites. *R. Bras. Zootec.*, vol. 35, 4, 1336-1341.
8. OLIVEIRA J.D., IGARASHI M.L.S.P., MACHADO T.M., MARCOS MATEO MIRETTI M.M., FERRO J.A., CONTEL E.P.B., 2007 – Structure and genetic relationships between Brazilian naturalized and exotic purebred goat domestic goat (*Capra hircus*) breeds based on microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 30, 2, 356-363.
9. SAITBEKOVA N., GAILLARD C., OBEXER-RUFF G., DOLF G., 1999 – Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics* 30 (1), 36-41.
10. POLSKI ZWIĄZEK OWCZARSKI, 2007 – Hodowla owiec i kóz w Polsce w 2006 roku. Warszawa.
11. www.isag.org.uk/pdf/2005_PanelsMarkersSheepGoats

Jacek Sikora, Aldona Kawęcka, Katarzyna Walinowicz

Microsatellite sequences in studies of genetic structure in goats

S u m m a r y

Saanen goat population variability and structure was investigated genetically utilizing FAO recommended microsatellite markers. Genetic variation at 6 microsatellite *loci* and population structure were examined. Thirty four alleles, in total, were detected. Allel numbers (N_a), observed (H_o), expected heterozygosity (H_e) were calculated. All microsatellite *loci* were found to be polymorphic, with 4 to 8 alleles per *locus* in average. The average H_e values compared to the average H_o values did not show differences in the studied populations – their value was 0.7. No significant genotypic linkage disequilibrium was found for most of the *loci*. Estimates of genetic variability such as effective number of alleles and gene diversities revealed substantial genetic variation frequently displayed by microsatellite markers. Average effective number of alleles was less than the average observed number of alleles: 5.7 and 3.8, respectively. The populations showed high levels of genetic variation. Microsatellite markers were a useful tool for analysis of genetic structure in goats.

