

## Polimorfizm sekwencyjny w locus cytochromu *b* (mtDNA) u wybranych gatunków z rzędu *Perissodactyla*

Zuzanna Nowak, Adam Dobrzyński, Krystyna M. Charon

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Zakład Genetyki Molekularnej, ul. Ciszewskiego 8. 02-786 Warszawa; [nowakz@alpha.sggw.waw.pl](mailto:nowakz@alpha.sggw.waw.pl)

Powstawanie gatunków zwierząt było ściśle związane z ewolucją ich genomów. Zmienność obserwowana na poziomie sekwencji DNA jest skutkiem mutacji prowadzących do powstania nowych jednostek taksonomicznych. Procesy te zachodzą zarówno w DNA jądrowym, jak i w mitochondriach zawierających odrębny materiał genetyczny – mitochondrialny DNA (mtDNA). W pracy dokonano analizy porównawczej 22 sekwencji fragmentu cytochromu *b*, mitochondrialnego DNA długości 590 pz, osobników należących do trzech rodzin nieparzystokopytnych. Dwanaście sekwencji pochodziło z internetowej bazy danych NCBI, dziesięć – uzyskano na potrzeby badań z materiału biologicznego. Oszacowanie zmienności genetycznej i stworzenie dendrogramu metodą UPGMA, możliwe było przy użyciu programu DIALIGN 2.1. Analiza zmienności otrzymanych sekwencji potwierdziła występowanie zjawiska heteroplazmii, opisanego wcześniej przez Ishidę [1]. Udowodniła również przydatność wybranej sekwencji jako markera pozwalającego na filogenetyczne różnicowanie osobników pod względem przynależności do różnych rodzin w obrębie tego samego rzędu.

**SŁOWA KLUCZOWE:** polimorfizm / Equidae / DNA mitochondrialny / filogeneza

Badania genetyczne populacji z wykorzystaniem mitochondrialnego i jądrowego DNA prowadzą do określenia zmienności pomiędzy osobnikami należącymi do tego samego, jak i różnych gatunków. Dzięki jednostronnemu, matczynemu przekazywaniu potomstwu materiału genetycznego, zawartego w mitochondriach i unikalnym sekwencjom przenoszonym na chromosomie Y, można śledzić wpływ poszczególnych linii na tworzenie ras i populacji w ramach gatunku oraz ich udziału w ogólnej puli genowej badanej grupy. Badania molekularne, wykorzystujące markery DNA pozwalają więc uzyskać pełny obraz filogenezy, który może uzupełnić lub udoskonalić system tradycyjny, oparty na różnicach biometrycznych.

Od momentu, kiedy odnotowano, że zmienność genetyczna mitochondrialnego DNA (mtDNA) pomiędzy osobnikami różnych gatunków jest utrwalana przez brak procesów naprawczych, polimorfizm w obrębie tych cyrkularnych struktur DNA jest szeroko analizowany pod kątem badań ewolucyjnych [1]. Dwie cechy mitochondrialnego DNA czynią go szczególnie przydatnym do badań filogenetycznych. Po pierwsze, ewolucja mitochondrialnego DNA zachodziła przeważnie na drodze substytucji pojedynczej pary nukleotydów, z nieznaczną częstotliwością wtórnych mutacji [3], po drugie, częstotliwość mutacji w mitochondrialnym DNA jest nawet dziesięciokrotnie wyższa niż w jądrowym [3, 4].

Pierwsi przedstawiciele rzędu nieparzystokopytnych pojawili się w dolnym eocenie, tj. około 70 mln lat temu. Wywodzili się prawdopodobnie z rodziny *Phenacodontidae* znanej z późnego paleocenu. Wczesna specjacja nieparzystokopytnych przebiegała gwałtownie. Wyodrębniły się cztery dominujące linie. Wiele powstałych wtedy rodzin przetrwało do eocenu, wymierając później w oligocenie.

W 1996 roku Ishida i wsp. [1] po raz pierwszy dokonali porównania sekwencji mtDNA we fragmencie genu cytochromu *b* mtDNA pomiędzy końmi Przewalskiego a końmi pełnej krwi angielskiej, zębą i osłem. Wykazali oni, że zmienność w obrębie badanego fragmentu pozwala na odróżnienie osobników należących do tego samego rzędu, ale różnych gatunków i podgatunków.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy na podstawie analizy sekwencji wybranego fragmentu mtDNA genu cytochromu *b* z regionu D-loop można dokonywać wewnątrz- i międzygatunkowych analiz filogenetycznych, przy założeniu, że obserwowana zmienność wybranego fragmentu – jako markera genetycznego powinna być większa pomiędzy gatunkami, niż w obrębie jednego gatunku oraz, że będzie ona adekwatna do stopnia obserwowanych różnic morfologicznych i anatomicznych między gatunkami.

## **Materiał i metody**

Analizie sekwencyjnej poddano fragment DNA długości 590 pz (par zasad), zlokalizowany w genie cytochromu *b* mtDNA. Badany fragment zsekwencjonowano u 10 koni należących do trzech ras. Badaniami objęto konie śląskie, konie trakeńskie i pochodzenia trakeńskiego oraz konie huculskie zaliczane do ras prymitywnych. Do analizy porównawczej wykorzystano także 11 analogicznych sekwencji, znajdujących się w zasobach genetycznej bazy danych NCBI, oraz sekwencję opublikowaną przez Ishidę i wsp. [1]. Ostatecznie wśród 22 porównywanych sekwencji znalazło się:

- 14 sekwencji koni *Equus caballus*
- 1 sekwencja osła *Equus asinus*
- 1 sekwencja zebry *Equus grevyi*
- 4 sekwencje nosorożców z rodzajów *Rhinocerotidae* i *Dinocerothidae*
- 2 sekwencje tapirów z rodzaju *Tapirus*

Od badanych zwierząt pobierano krew obwodową z żyły jarzmowej i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . DNA izolowano metodą fenolowo-chloroformową. Am-

plifikację (metodą PCR) wybranego fragmentu mtDNA przeprowadzono w termocyklerze typu *T3Thermocycler* (Biometra). Warunki reakcji zostały ustalone na podstawie danych z literatury [4]: 1 cykl – 96°C 2 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min; 34 cykle – 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min; 1 cykl – 72°C 10 min. Startery do reakcji PCR zostały wybrane na podstawie danych z pracy Ishidy i wsp. [1]:

L5' – TATTCCTAGCCATACACTACAC,

R 5' – TATTCCTAGCCATACACTACAC.

Produkt PCR przechowywano w temperaturze 4°C.

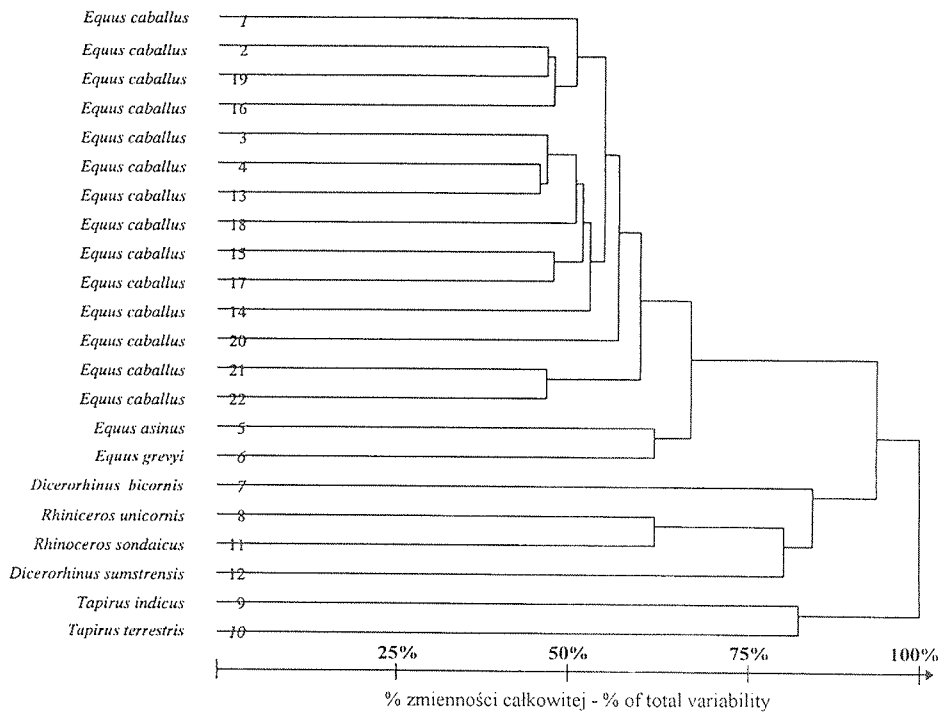
Produkt PCR sekwencjonowano metodą Sangera, po wcześniejszej ligacji z wektorem pGEM, odczyt sekwencji prowadzony był przy użyciu sekwenatora automatycznego Alf Express II. Porównania sekwencji i określenia zmienności w badanym fragmencie pomiędzy poszczególnymi osobnikami dokonano w programie DIALIGN 2.1, opracowanym przez Morgenstern i wsp. [5]. Program ten umożliwił wykreślenie dendrogramu metodą UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean). Metoda ta jest stosowana w przypadku, gdy tempo ewolucji pomiędzy poszczególnymi gatunkami jest w przybliżeniu równe (prawie liniowa zależność pomiędzy dystansem ewolucyjnym a czasem dywergencji) [6].

## Wyniki i dyskusja

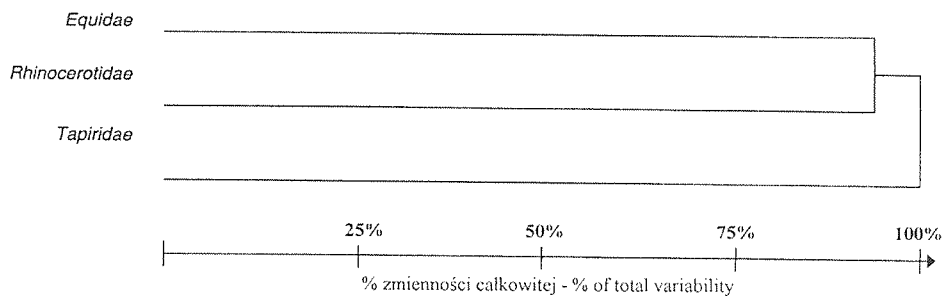
Porównanie składu nukleotydowego badanego odcinka mtDNA u zwierząt z gatunków należących do rzędu nieparzystokopytnych pozwoliło stwierdzić, że zmienność sekwencji osobników, w obrębie każdego z badanych gatunków, jest mniejsza niż pomiędzy gatunkami, a otrzymane różnice między gatunkami odzwierciedlają stopień podobieństwa filogenetycznego jednostek systematycznych z rzędu nieparzystokopytnych (rys. 1). Wyniki sugerują, że badana sekwencja mitochondrialnego DNA może być używana jako marker w badaniach filogenetycznych do oznaczania różnic międzygatunkowych. Należy stwierdzić jednak fakt, że wszystkie badane osobniki z gatunku *Equus caballus*, mimo iż tworzą wspólną gałąź filogenetyczną na dendrogramie, wykazują duże zróżnicowanie sekwencji między sobą (niezależnie od rasy). Od około 50 do 65% całkowitej zmienności badanych fragmentów mtDNA przypada na różnice między poszczególnymi osobnikami. Dowodzi to dużej zmienności badanego fragmentu w obrębie gatunku. Główną przyczyną tak dużej zmienności międzyosobniczej jest heteroplazmia komórkowa, czyli obecność w komórce mitochondriów zawierających różny materiał genetyczny [2].

Ishida [1] również zaobserwował heteroplazmię u sześciu, spośród siedmiu badanych ras koni, na tej podstawie można sądzić, że w rodzinie *Equidae* jest to zjawisko powszechne. Poddaje to w wątpliwość, czy zastosowany marker (fragment mtDNA) można w pełni uznać za właściwy do badań filogenetycznych prowadzonych w obrębie tego samego gatunku.

Dla bardziej czytelnego zobrazowania zmienności, prezentowanej w badanym fragmencie genu cytochromu *b* między rodzinami z rzędu nieparzystokopytnych, pogrupowano pojedyncze sekwencje na należące do zwierząt z trzech rodzin: *Equidae*, *Rhino-*



Rys. 1. Dendrogram dystansu genetycznego wybranych sekwencji mtDNA  
 Fig. 1. Phylogenetic distance between selected mtDNA sequences



Rys. 2. Zmienność między rodzinami rzędu *Perissodactyla*  
 Fig. 2. Distance between different families from order *Perissodactyla*

*cerotidae* i *Tapiridae*. Powstały w ten sposób dendrogram przedstawiono na rysunku 2. Dendrogram w pełni odpowiada filogenezie rzędu nieparzystokopytnych. Badana sekwencja mitochondrialnego DNA może być używana jako marker w badaniach filogenetycznych, mających na celu określenie przynależności osobnika do rodziny. Potwierdzenie tej tezy wymaga jednak przeprowadzenia analizy porównawczej obejmującej większą liczbę przedstawicieli poszczególnych gatunków.

#### PIŚMIENNICTWO

1. ISHIDA N., HASEGAWA T., OYUNSUREN T., MUKOYAMA H., 1996 – PCR-RFLP analysis of the cytochrome *b* gene in horse mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 27, 359-363.
2. KAVAR T., HABE F., BREM G., DOVČ P., 1999 – Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. *Animal Genetics* 30, 423-430.
3. KIM K-I., YANG Y-H., LEE S-S., PARK C., MA R., BOUZAT J.L., LEWIN H.A., 1999 – Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics* 30, 102-108.
4. MAEDA Y., HASHIGUCHI T., 1994 – The recent studies on DNA analysis in the horse. *Journal of Equine Science* 6, 2, 31-53.
5. MORGENSTERN B., 1999 – DIALGIN2: improvement of the segment-to-segment, Approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 15, 203-210.
6. WEIR B.S., 1996 – Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates Inc. Publishers, 341-375.

Zuzanna Nowak, Adam Dobrzyński, Krystyna Małgorzata Charon

### Sequencing polymorphism in cytochrome *b* locus (mtDNA), among the selected species from order *Perissodactyla*

#### S u m m a r y

Speciation process is strictly connected with genome evolution. The variability observed on the DNA level results from the mutations leading to creation the new taxonomic units. These processes take place both in nuclear DNA and in mitochondrial (mtDNA). In the paper presented we made the comparative analysis of 22 sequences from cytochrom *b* fragment of 590 bp taken from individuals belonging to three families of even-toed ungulates. Twelve sequences were taken from internet database NCBI; ten were obtained for the purposes studied directly from the biological material. The genetical variability was evaluated and UPGMA dendrogram was done using the program DIALIGN 2.1. The analysis of variation of obtained sequences confirmed the heteroplasmy phenomenon described previously by Ishida [1]. It has also proved the advisability of using the chosen sequence as a marker to assign the phylogenetic differentiation of individuals on the base of their family taxonomy within the same order.

