

Wykorzystanie markerów mikrosatelitarnych stosowanych u kur w badaniu zmienności genetycznej populacji doświadczalnej przepiórki japońskiej (*Coturnix japonica*)

Joanna Gruszczyńska¹, Elżbieta Michalska²

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,

Wydział Nauk o Zwierzętach, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt;

¹Zakład Genetyki Molekularnej; *gruszczy_n_j@hotmail.com*

²Zakład Metod Doskonalenia Zwierząt; *emichalska@alpha.sggw.waw.pl*
ul. Ciszewskiego 8. 02-786 Warszawa

Badaniami objęto 98 ptaków obu płci, pochodzących z outbredowej populacji przepiórki japońskiej (*Coturnix japonica*). Genomowy DNA był izolowany z próbek krwi metodą ekstrakcji fenolowo-chloroformowej. Do amplifikacji wybranych loci mikrosatelitarnych za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) zastosowano startery wykorzystywane w badaniach markerów mikrosatelitarnych (ADL0142, ADL0143, ADL0272, MCW0088) u kur. Po ustaleniu warunków amplifikacji i otrzymaniu jej produktów przeprowadzono analizę długości otrzymanych alleli przy pomocy automatycznego sekwenatora ALF Express II (Pharmacia LKB). Dla wybranych loci: ADL0142, ADL0143, ADL0272 i MCW0088 ustalono liczbę alleli równą, odpowiednio: 6, 7, 9 i 6. W odniesieniu do dwóch pierwszych loci rezultat ten w znacznym stopniu różnił się od wyników otrzymanych przez innych autorów, którzy wykazali w swoich badaniach u przepiórek zaledwie 3 i 1 allel, odpowiednio [16, 8]. Wykazano, że markery kurze ADL0272 i MCW0088 mogą być stosowane w badaniach molekularnych przepiórek japońskich. Stwierdzono istotne zróżnicowanie rozkładu frekwencji poszczególnych alleli w loci ADL0142 i ADL0272 między samcami i samicami. Uzyskane wartości współczynnika heterozygotyczności (H_c): 0,82 (ADL0142); 0,72 (ADL0143); 0,88 (ADL0272); 0,73 (MCW0088) i indeksu stopnia polimorfizmu (PIC), odpowiednio: 0,79; 0,7; 0,87; 0,7, wskazują na możliwość wykorzystania wybranych sekwencji mikrosatelitarnych jako markerów genetycznych.

SŁOWA KLUCZOWE: markery mikrosatelitarne / przepiórka japońska

Badania finansowane z grantu wewnętrznego SGGW nr 50407020014

Markery genetyczne to sekwencje DNA, kodujące lub nie kodujące, które charakteryzują się dużym polimorfizmem oraz łatwym do prześledzenia sposobem dziedziczenia. Sekwencje mikrosatelitarne zawierają krótki, najczęściej dwu-, trzy- lub czteronukleotydowy motyw. Występują jako proste powtórzenia motywu lub też motyw może być przedzielony inną sekwencją. Dzięki swojej dużej zmienności zarówno pomiędzy populacjami, jak i w ich obrębie, mikrosatelity stały się świetnymi markerami genetycznymi wykorzystywanymi w wielu badaniach dotyczących między innymi: kontroli pochodzenia u zwierząt [1, 5, 13, 19, 22], szacowania zmienności genetycznej wewnątrz i pomiędzy populacjami [10, 20, 25, 26], identyfikacji genów cech ilościowych [21, 23, 24] oraz tworzenia map genomowych [4, 12, 17, 18].

Genom przepiórki japońskiej jest stosunkowo mało poznany. Wykorzystanie podobieństwa mikrosatelitarnych sekwencji DNA z gatunkiem ptaków z tej samej podrodziny (kura) lub rodziny (indyk), których materiał genetyczny jest już częściowo znany, niesie nadzieje jego szybszego poznania. Jednak, pomimo podobieństw wynikających z bliskości taksonomicznej, pewnym utrudnieniem w analizie markerów mikrosatelitarnych tego gatunku jest konieczność poszukiwania markerów, gdyż wiele poznanych, np. w populacjach kur, nie odpowiada markerom przepiórczego genomu [8, 9, 11, 16].

Dlatego celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości zastosowania starterów do tej pory stosowanych w analizie DNA kur i wykorzystania ich w badaniach polimorfizmu mikrosatelitarnego u przepiórki japońskiej (*Coturnix japonica*), jak również określenie stopnia polimorfizmu wybranych sekwencji mikrosatelitarnych w badanej populacji oraz sprawdzenie przydatności wybranych sekwencji mikrosatelitarnych jako markerów genetycznych.

Materiał i metody

Materiałem doświadczalnym była populacja outbredowa przepiórki japońskiej utrzymywana w Katedrze Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW. Populacja bazowa została wytworzona przez obukierunkowe dwustopniowe krzyżowanie 3 linii przepiórek, tak aby uzyskać populację o znanym udziale genetycznym poszczególnych linii (1/2 linii J i po 1/4 linii W i K, utrzymywanych w izolacji od 25 pokoleń). Wytworzona w ten sposób populacja mieszańcowa przez kolejnych 6 pokoleń była prowadzona systemem losowego wyboru 1 samca i 1 samicy w obrębie każdej z 50 rodzin pełnego rodzeństwa i ich losowego kojarzenia z unikaniem inbrodu. Plan kojarzeń ustalano przy pomocy programu komputerowego [14], typującego połączenia rodziców na podstawie minimalizacji inbrodu hipotetycznego potomstwa. Ptaki wykorzystane do badań pochodziły z 6 pokolenia potomnego kojarzeń losowych i zostały wybrane na rodziców następnego pokolenia.

Do analizy molekularnej wykorzystywano krew pobraną po dekapitacji. Zgromadzono próbki od 49 samców i 49 samic z badanej populacji, po zakończeniu cyklu reprodukcyjnego. Genomowy DNA był izolowany metodą ekstrakcji fenolowo-chloroformowej (wg metodyki Hillel i wsp. [7] w modyfikacji opracowanej w Katedrze) i przechowywany do dalszych analiz w temperaturze 4°C. Do amplifikacji wybranych

loci mikrosatelitarnych za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) zostały wykorzystane startery, które dotychczas stosowano w analizie molekularnej DNA kur [2, 16]. Startery forward znakowane były znacznikiem Cy5. Ustalono następujące warunki reakcji PCR: (95°C/3 min; X°C/1 min; 72°C/3 min) x 1; (95°C/30 s; X°C/1 min; 72°C/1min) x 30; (95°C/30 s; X°C/1 min; 72°C/10 min) x 1. Ustalona temperatura przyłączania startera X w reakcji PCR wynosiła odpowiednio dla kolejnych markerów: 55°C – ADL0142; 50°C – ADL0143; 60°C – ADL0272; 56°C – MCW0088.

Po otrzymaniu produktów amplifikacji badanych loci przeprowadzono analizę długości otrzymanych alleli przy pomocy automatycznego sekwenatora ALF Express II (Pharmacia LKB).

W sumie przebadano 98 ptaków pod względem markerów ADL0143 i ADL0272. Pod względem kolejnych dwóch markerów możliwe było jedynie zbadanie 74 (dla markera MCW0088) i 67 ptaków (dla markera ADL0142).

Wyniki analizy molekularnej stanowiły podstawę do oszacowania frekwencji alleli badanych loci, frekwencji homo- i heterozygot, współczynnika heterozygotyczności oczekiwanej – H_e [15] oraz określenia współczynnika indeksu polimorfizmu – PIC [3].

Zróznicowanie frekwencji alleli badanych loci między samcami i samicami weryfikowano przy pomocy testu niezależności chi-kwadrat.

Wyniki i dyskusja

W badanej populacji przepiórki japońskiej zaobserwowano amplifikację wszystkich badanych sekwencji mikrosatelitarnych. Wyniki te wskazują na możliwość wykorzystania wybranych starterów specyficznych dla sekwencji kur do przeprowadzania łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) u przepiórki japońskiej. Powyższe wyniki potwierdzają wcześniejsze rezultaty badań Panga i wsp. [16], którzy określili stopień podobieństwa sekwencji mikrosatelitarnych między kurą a przepiórką japońską. Wymienieni autorzy uwzględnili procent podobieństwa regionów flankujących (5' oraz 3'), a także porównali liczbę powtórzeń motywów podstawowych u obu gatunków ptaków. Procent podobieństwa między kurą a przepiórką japońską pod względem sekwencji ADL0143 końca 5' wynosił 81%, a końca 3' – 96%, gdy tymczasem dla sekwencji ADL0142 był taki sam dla obu końców i kształtował się na poziomie 79%.

W tabeli 1 przedstawiono frekwencję alleli badanych loci mikrosatelitarnych. Wykazano wysoki polimorfizm badanych sekwencji mikrosatelitarnych w próbach DNA pochodzących od ptaków z badanej populacji. W wybranych loci: ADL0142, ADL0143, ADL0272 i MCW0088 stwierdzono następującą liczbę alleli, odpowiednio: 6; 7; 9 i 6. Rezultat ten w znacznym stopniu różnił się od wyników otrzymanych przez innych autorów, którzy wykazali w swoich badaniach u przepiórek zaledwie 3 i 1 allel w dwóch pierwszych loci, odpowiednio [16, 8]. Zważywszy na niewielką liczbę przebadanych ptaków oraz rodzaj motywu powtarzającego się badanych sekwencji, autorzy ci sugerowali konieczność dalszych badań, które mogłyby ewentualnie zmodyfikować lub potwierdzić uzyskany wynik.

W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że markery kurze ADL0272 i MCW0088 dają także produkt amplifikacji u przepiórek. We wcześniejszych pracach Inoue-Murayama i wsp. [9], wykorzystując startery specyficzne dla kur, dokonali amplifikacji sekwencji mikrosatelitarnych u przepiórki japońskiej tylko w 26,7% (32 sekwencje mikrosatelitarne z przebadanych 120) przypadków, a Pang i wsp. [16] tylko 22,9% sekwencji mikrosatelitarnych (11 z 48).

Długość wybranych sekwencji mikrosatelitarnych wahała się od 216 pz do 226 pz – ADL0142; od 152 pz do 164 pz – ADL0143; od 166 pz do 184 pz – ADL272; od 252 pz do 266 pz – MCW0088 (tab. 1). Pang i wsp. [16] oraz Inoue-Murayama i wsp. [8]

Tabela 1 – Table 1

Frekwencja alleli wybranych loci mikrosatelitarnych w badanej populacji przepiórki japońskiej
The allele frequency of microsatellite loci in Japanese quail population

Marker ADL0142 długość alleli (pz) alleles' length (bp)	Frekwencja Frequency	Marker ADL0143 długość alleli (pz) alleles' length (bp)	Frekwencja Frequency	Marker ADL0272 długość alleli (pz) alleles' length (bp)	Frekwencja Frequency	Marker MCW0088 długość alleli (pz) alleles' length (bp)	Frekwencja Frequency
Samce – Males							
	n*=54		n*=98		n*=98		n*=58
216	0,037	152	0,020	166	0,194	252	0,431
218	0,111	154	0,092	168	0,071	254	0,034
220	0,149	156	0,408	170	0,204	260	0,034
222	0,296	158	0,083	172	0,092	262	0,034
224	0,296	160	0,112	174	0,184	264	0,208
226	0,111	162	0,265	176	0	266	0,259
		164	0,020	178	0,112		
				180	0,143		
				184	0		
Samice – Females							
	n*=80		n*=98		n*=98		n*=90
216	0,350	152	0	166	0,061	252	0,378
218	0,288	154	0,133	168	0,010	254	0,122
220	0,162	156	0,469	170	0,102	260	0
222	0,138	158	0,010	172	0,092	262	0,033
224	0,025	160	0,174	174	0,153	264	0,300
226	0,037	162	0,214	176	0,204	266	0,167
		164	0	178	0,092		
				180	0,051		
				184	0,235		
Samce i samice łącznie – Males and females together							
	n*=134		n*=196		n*=196		n*=148
216	0,224	152	0,010	166	0,128	252	0,399
218	0,216	154	0,112	168	0,041	254	0,088
220	0,157	156	0,439	170	0,153	260	0,013
222	0,202	158	0,046	172	0,092	262	0,034
224	0,134	160	0,143	174	0,168	264	0,263
226	0,067	162	0,240	176	0,102	266	0,203
		164	0,010	178	0,102		
				180	0,097		
				184	0,117		

n* – liczba alleli – number of alleles

wykazali w badanych populacjach przepiórki japońskiej allele o długości 204 pz; 210 pz; 214 pz dla markera ADL0142 i 138 pz dla markera ADL0143. W badanej populacji przepiórek długość sekwencji markerów ADL0142 i ADL0143 oraz ADL0272 i MCW0088 była mniejsza niż długość sekwencji ww. markerów u kur [2, 17].

W poszczególnych loci mikrosatelitarnych wykazano występowanie następujących alleli o najwyższej frekwencji (tab. 1): locus ADL0142 – 216 pz (0,224); ADL0143 – 156 pz (0,439); ADL0272 – 174 pz (0,168) i MCW0088 – 252 pz (0,399). Inoue-Murayama i wsp. [9] wykazali w próbie 20 przepiórek występowanie dwóch alleli (210 pz i 214 pz) w locus ADL0142, o frekwencji odpowiednio: 0,51 i 0,49.

W niniejszej pracy zaobserwowano różne rozkłady częstości występowania poszczególnych alleli badanych loci u samców i samic (tab. 1). Wyniki testu niezależności chi-kwadrat wskazały na wysoko istotny wpływ płci na frekwencję alleli pod względem markera ADL0142 i ADL0272. Natomiast w odniesieniu do markera ADL0143 i MCW0088 różnice w częstości występowania poszczególnych alleli u samców i samic nie były statystycznie istotne. U samców odnotowano brak alleli: 176 pz i 184 pz locus ADL0272, a u samic alleli 152 pz i 164 pz locus ADL0143 oraz allelu 260 pz locus MCW0088. Należy zauważyć, że allel 184 pz (marker ADL0272), którego nie odnotowano u samców, u samic odznaczał się największą frekwencją.

Dla każdego z badanych loci wyznaczono heterozygotyczność obserwowaną (H_o), która okazała się najwyższa (0,97) dla locus MCW0088, a najniższa (0,70) dla locus ADL0142 (tab. 2). Inoue-Murayama i wsp. [8] odnotowali w swoich badaniach znacznie niższą wartość H_o (0,30) dla locus ADL0142.

Tabela 2 – Table 2

Wartości współczynników H_o , H_e i PIC wybranych markerów w populacji przepiórki japońskiej
 H_o , H_e and PIC coefficients for chosen markers in Japanese quail population

Marker	Liczba ptaków Number of birds	H_o	H_e	PIC
ADL0142	67	0,70	0,82	0,79
ADL0143	98	0,87	0,72	0,70
ADL0272	98	0,92	0,88	0,86
MCW0088	74	0,97	0,73	0,70

Uzyskane w niniejszej pracy wysokie wartości heterozygotyczności oczekiwanej (H_e) – od 0,72 do 0,88, jak i wartości PIC – od 0,7 do 0,86 (tab. 2), pozwalają na wykorzystanie wybranych czterech sekwencji mikrosatelitarnych jako markerów genetycznych.

Podsumowując, w niniejszych badaniach wykazano możliwość zastosowania wybranych starterów kurzych do amplifikacji sekwencji mikrosatelitarnych przepiórki japońskiej. Odnotowano wysoki polimorfizm badanych sekwencji mikrosatelitarnych.

Uzyskane wartości wskaźnika heterozygotyczności (H_e) oraz współczynnika indeksu polimorfizmu (PIC) świadczą o przydatności wybranych sekwencji mikrosatelitarnych jako markerów genetycznych i łącznie z markerami ADL 0206, ADL 0315, HUJ 0006, ADL 0037, dla których wcześniej ustalono warunki reakcji i stwierdzono występowanie polimorfizmu [6], mogą stanowić dogodne narzędzie w analizie genetycznej populacji przepiórki japońskiej.

PIŚMIENNICTWO

1. ALTET L., FRANCINO O., SANCHEZ A., 2001 – Microsatellite polymorphism in closely related dogs. *Journal of Heredity* 92, 276-279.
2. ATZMON G., BAXTER-JONES C., YONASH N., CHENG H., AVIDAN N., LAVI U., CAHANER A., HILLEL J., 1999 – Microsatellite markers associated with quantitative traits in broilers. *Journal of Heredity* 84, 191-194.
3. BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W., 1980 – Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic* 32, 314-331.
4. CHENG H.H., 1997 – Mapping the chicken genome. *Poultry Science* 76, 1101-1107.
5. GRALAK B., KURYŁ J., ŁUKASZEWICZ M., ŻURKOWSKI M., 1998 – Applicability of nine microsatellite DNA sequences vs eleven polymorphic blood protein and enzyme systems for the parentage control in Polish Arabian and Thoroughbred horses. *Animal Science Paper and Reports* 16, 209-218.
6. GRUSZCZYŃSKA J., MICHALSKA E., SOBIERAJSKA K., 2002 – Microsatellite polymorphism selecting loci in Japanese quail (*Coturnix japonica*) population. *Cellular & Molecular Biology Letter* 7 (1), 176.
7. HILLEL J., PLOTSKY Y., HABERFELD A., LAVI U., CAHANER A., JEFFREYS A.J., 1989 – DNA fingerprints of poultry. *Animal Genetics* 20, 25-35.
8. INOUE-MURAYAMA M., KAYANG B.B., KIMURA K., IDE H., NOMURA A., TAKASHI H., NAGAMINE Y., TAKEDA T., HANADA H., TATSUDA K., TSUDZUKI M., MATSUDA Y., MIZUTANI M., MURAYAMA Y., ITO S., 2001 – Chicken microsatellite primers are not efficient markers for Japanese quail. *Animal Genetics* 32, 7-11.
9. INOUE-MURAYAMA M., NOMURA A., IDE H., KIMURA K., TATSUDA K., TAKAHASHI H., NAGAMINE Y., HANADA H., TAKEDA T., TSUDZUKI M., ITO S., 1998 – Application of chicken microsatellite markers to Japanese quail and Chinese painted quail. *Animal Genetics* 29 (suppl. 1), 46.
10. KAISER M.G., YONASH N., CAHANER A., LAMONT S.J., 2000 – Microsatellite polymorphism between and within broiler population. *Poultry Science* 79, 626-628.
11. KAYANG B.B., INOUE-MURAYAMA M., TAKASHI H., MINEZAWA M., TSUDZUKI M., MIZUTANI M., ITO S., 2003 – Twenty-eight new microsatellite loci in chicken and their cross-species amplification in Japanese quail and helmeted guinea fowl. *Animal Science Journal* 74, 255-259.
12. KAYANG B.B., VIGNAL A., INOUE-MURAYAMA M., MIWA M., MONVOISIN J.L., ITO S., 2004 – A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail. *Animal Genetics* 35, 195-200.
13. LUIKART I., BIJU-DUVAL M.P., ERTUGRUL O., ZAGDSUREN Y., MAUDET C., TABERLT P., 1999 – Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplex for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics* 30, 431-438.

14. OLECH W., MICHALSKA E., 1990 – Porównanie współczynników inbrodu w dwóch metodach kojarzeń w populacji zamkniętej. *Zwierzęta Laboratoryjne* 27, 2, 3-8.
15. OTT J., 1992 – Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics* 51, 283-290.
16. PANG S.W.Y., RITLAND C., CARLSON J.E., CHENG K.M., 1999 – Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific primers. *Animal Genetics* 30, 195-199.
17. REED K.M., MENDOZA K.M., BEATTIE C.W., 1999 – Utility of chicken-specific microsatellite primers for mapping the turkey genome. *Animal Biotechnology* 10, 137-141.
18. REED K.M., MENDOZA K.M., BEATTIE C.W., 2000 – Comparative analysis of microsatellite loci in chicken and turkey. *Genome* 43, 796-802.
19. SCHNABEL R.D., WARD T.J., DERR J.N., 2000 – Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, Bison bison and domestic cattle. *Animal Genetics* 31, 360-366.
20. TAKAHASHI H., NIRASAWA K., NAGAMINE Y., TSUDZUKI M., YAMAMOTO Y., 1998 – Genetic relationships between 10 native Japanese breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *Journal of Heredity* 89, 543-546.
21. TATSUDA Y., FUJINAKA K., 2001 – Genetic mapping of the QTL affecting body weight in chicken using a F2 family. *British Poultry Science* 42, 333-337.
22. USHA A.P., SIMPSON S.P., WILLIAMS J.L., 1995 – Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics* 26, 155-161.
23. VAN KAAM J.B., GROENEN M.A., BOVENHHUIS H., VEENENDAAL A., VEREIJKEN A.L., VAN ARENDANK J.A., 1999 – Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting growth and feed efficiency. *Poultry Science* 78, 15-23.
24. VAN KAAM J.B., GROENEN M.A., BOVENHHUIS H., VEENENDAAL A., VEREIJKEN A.L., VAN ARENDANK J.A., 1999 – Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting carcass traits. *Poultry Science* 78, 1091-1099.
25. VANHALA T., TUISKULA HAAVISTO M., ELO K., VIKKI J., MAKI-TANIAL A., 1998 – Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science* 77, 783-790.
26. WIMMERS K., PONSUKSILI S., HARDGE T., VALLE-ZARATE A., MARTHUR P.K., Horst P., 1997 – Genetic distinctness of African, Asian and South American local chickens. *Animal Genetics* 31, 159-165.

Joanna Gruszczyńska, Elżbieta Michalska

The use of the chicken microsatellite markers in the study of genetic variability of Japanese quail (*Coturnix japonica*) experimental population

Summary

The study was conducted on 98 birds originated from the experimental population of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Genomic DNA was extracted from their blood by phenol-chloroform extraction. The molecular analysis was performed by using the polymerase chain reaction (PCR) for the microsatellite markers, isolated from the chicken microsatellite DNA-enriched library.

The PCR products were analysed using Sequencer ALF Express II (Pharmacia LKB). Microsatellite polymorphism was detected in all of the tested loci. We detected 6 alleles in locus ADL0142; 7 in ADL0143; 9 in ADL0272 and 6 alleles in locus MCW0088. The result was quite different from those obtained by Pang et al. [16] and Inoue-Murayama et al. [8] who found only 3 and 1 alleles in two first mentioned loci. For the first time it was proved that chicken markers ADL0272 and MCW0088 can be amplified also in quails and there are microsatellite sequences too. Significant differences in the allele frequency distribution depending on the sex for the ADL0142 and ADL0272 were stated. The high heterozygosity (H_e) 0.82 (ADL0142); 0.72 (ADL0143); 0.88 (ADL0272); 0.73 (MCW0088) and polymorphism information content (PIC) 0.79; 0.7; 0.87; 0.7, respectively, suggests that there is a possibility to use these microsatellites as genetic markers.