Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego, t. 2 (2006), nr 2

Wstępne badania struktury genetycznej jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*) z regionu środkowo-wschodniej Polski na podstawie polimorfizmu mitochondrialnego DNA

Leszek Drozd, Mirosław Karpiński, Piotr Czyżowski, Małgorzata Goleman

Akademia Rolnicza w Lublinie, Katedra Hodowli Amatorskich i Zwierząt Dzikich, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

W pracy przedstawiono wstępną ocenę parametrów genetycznych populacji jelenia szlachetnego w makroregionie środkowo-wschodniej Polski, z zastosowaniem metody PCR-RFLP. Materiał do badań stanowiły próbki tkanki mięśniowej pobrane od 32 jeleni pozyskanych w makroregionie środkowo-wschodniej Polski. Wyliczono heterozygotyczność (H) oraz indeks stopnia polimorfizmu (PIC) przy pomocy programu CERVUS 2,0. W badanej grupie jeleni zidentyfikowano ogółem 21 alleli. Liczba alleli w locus była zróżnicowana i wynosiła od 2 (locus BspHI) do 5 (locus Tsp509I). Otrzymane wyniki wykazują, że badane loci cechują się wysokim stopniem polimorfizmu. Średnia wartość współczynnika heterozygotyczności wynosiła 0,655, natomiast średnia wartość PIC – 0,531. W badanej populacji najbardziej polimorficznym loci był Tsp509I, natomiast najmniejszy polimorfizm stwierdzono dla loci BspHI, MboI oraz RsaI.

SŁOWA KLUCZOWE: *Cervus elaphus* / polimorfizm mtDNA

W czasie II wojny światowej nastąpiło całkowite wyniszczenie populacji jeleni na Lubelszczyźnie. Obecna populacja jelenia szlachetnego w tym makroregionie jest wynikiem akcji reintrodukcji tego gatunku, przeprowadzonej w latach 1950-1960. W ramach tej akcji na terenie Lubelszczyzny wypuszczono 261 jeleni o różnym pochodzeniu. Dominowały osobniki z Wielkopolski i Polski południowo-zachodniej, stanowiące 70,5% ogółu sprowadzonych jeleni, natomiast reszta, około 30%, to jelenie mazurskie. Miejsca introdukcji obejmowały prawie wszystkie duże kompleksy leśne na Lubelszczyźnie. Należy podkreślić, że introdukcja jeleni na tym terenie zakończyła się pełnym

sukcesem. Wypuszczonych 261 jeleni wytworzyło w ciągu 34 lat prężną populację, o liczebności 3118 osobników [3].

Celem pracy była ocena parametrów genetycznych populacji jelenia szlachetnego w makroregionie środkowo-wschodniej Polski przy użyciu metody PCR-RFLP.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły tusze 32 jeleni pozyskanych w makroregionie środkowo-wschodniej Polski (Nadleśnictwa: Parczew, Mircze, Zwierzyniec, Tomaszów). Próbki tkanki mięśniowej do dalszych analiz pobierano z prawego filara przepony.

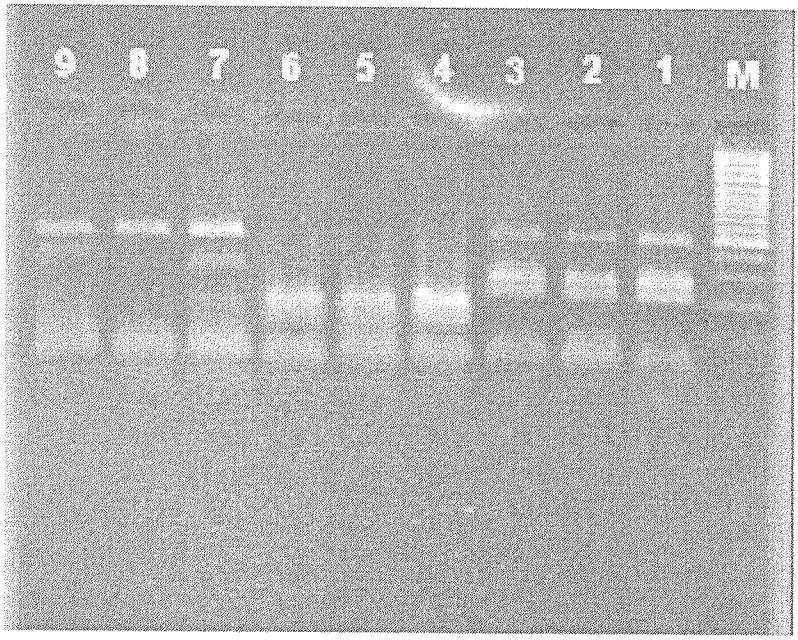
Izolację genomowego DNA przeprowadzono z tkanki mięśniowej przy użyciu zestawu Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promesa). Amplifikacji poddano odcinek mitochondrialnego DNA (gen $tRNA^{Glu}$/podjednostka oksydoreduktazy cytochromowej) [2]. Łańcuchową reakcję polimerazy przeprowadzono wykorzystując startery L14735: aaa aac cac cgt tgt tat tca act a/H15149: gcc cct cag aat gat att tgt cct ca (DNA Gdańsk) oraz Taq Polymerase i dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas). Warunki reakcji PCR: 96°C – 3 min. denaturacja, 96°C – 30 sek., 65°C – 60 sek. amplifikacja, 72°C – 180 min. rozciąganie [9]. Użyte startery pozwoliły na amplifikację fragmentu podjednostki cytochromu b o długości 464 nukleotydów. Amplikon wraz z enzymami restrykcyjnymi i specyficznym buforem w odpowiednim stężeniu inkubowano przez 2 godz. w temperaturze 37°C. Fragmenty restrykcyjne były rozdzielane na 2,5% żelu agarozowym z wykorzystaniem 100 bp ladder (Fermentas).

Wykorzystano następujące enzymy restrykcyjne: HaeIII, SspI, TaqI, RsaI, MboI, Tsp509I i BspHI. Dodatkowo amplikon od wybranych 9 osobników poddano sekwencjonowaniu. Na podstawie ilości i wielkości uzyskanych alleli przeprowadzono analizę statystyczną fragmentów restrykcyjnych (RFLP – Restriction Fragment Lenth Polimorphism) dla siedmiu loci w badanej populacji jeleni. Wyliczono heterozygotyczność (H) oraz indeks stopnia polimorfizmu (PIC). Parametry genetyczne wyliczono przy pomocy programu CERVUS 2,0 [6].

Wyniki i dyskusja

W badanej grupie jeleni zidentyfikowano ogółem 21 alleli. Wielkość alleli wahała się od 11 do 349 pz dla wszystkich 7 badanych loci. Liczba alleli w locus była zróżnicowana i wynosiła od 2 (locus BspHI) do 5 (locus Tsp509I) – tab. 1. Przykładowy żel z trzema enzymami restrykcyjnymi u trzech osobników przedstawiono na rycinie.

Wartości H i PIC dla poszczególnych loci przedstawiono w tabeli 2. Otrzymane wyniki wykazują, że badane loci cechują się dużym zróżnicowaniem stopnia polimorfizmu. Średnia wartość współczynnika heterozygotyczności wynosiła 0,655, natomiast średnia wartość PIC – 0,531. W badanej populacji najbardziej polimorficznym loci był Tsp509I, natomiast najmniejszy polimorfizm stwierdzono dla loci BspHI, MboI oraz RsaI. Należy stwierdzić, że z 7 analizowanych loci do dalszej charakterystyki struktury genetycznej jelenia szlachetnego najbardziej informatywne są loci Tsp509I i TaqI.



Ryc. Ścieżki 1, 2, 3 – endonukleaza HaeIII; ścieżki 4, 5, 6 – endonukleaza RsaI; ścieżki 7, 8, 9 – endonukleaza TaqI

Fig. Paths 1, 2, 3 – endonuclease HaeIII; paths 4, 5, 6 – endonuclease RsaI; paths 7, 8, 9 – endonuclease TaqI

Występowanie z tą samą częstością alleli w przypadku 6 loci można interpretować jako niedoskonałość metody RFLP dla badanej grupy zwierząt i konieczność zastosowania dodatkowo innych metod, np. sekwencjonowania.

W badaniach nad populacjami skandynawskich jeleniowatych współczynnik heterozygotyczności wahał się od 0,09 do 0,78 u łosia, od 0,13 do 0,70 u jelenia i od 0,12 do 0,65 u sarny [8]. W badaniach Fickela i Reinscha nad polimorfizmem sarny europejskiej [5], PIC dla 7 loci wahał się od 0,354 do 0,753.

We wcześniejszych badaniach autorów nad subpopulacją jelenia szlachetnego na Lubelszczyźnie średnie wartości H i PIC dla dwóch loci wynosiły odpowiednio 0,829 i 0,737, natomiast Ds pomiędzy poszczególnymi osobnikami wynosił od 0,329 do 0,403 [4]. W badaniach Boneta i wsp. [1] średnia wartość heterozygotyczności u jeleni z Mauritiusa wynosiła 0,529, natomiast PIC – 0,400, a dla populacji jelenia z Nowej Kaledonii – odpowiednio 0,595 i 0,461. W badaniach własnych uzyskane wartości dla współczynnika polimorfizmu były zbliżone (PIC=0,531), natomiast dla współczynnika heterozygotyczności były znacznie wyższe (H=0,655).

Biorąc pod uwagę różnorodność materiału genetycznego wykorzystanego przy introdukcji jelenia na Lubelszczyźnie, należy przypuszczać, że różnorodność puli genowej w obecnej populacji jest większa niż osobników pochodzących z innych rejonów.

Tabela 1 – Table 1
Charakterystyka fragmentów restrykcyjnych dla 7 loci
Characteristic of restriction fragments of 7 loci

Locus	Allele	q	bp
HaeIII	3	0,33	126
		0,33	159
		0,33	179
SspI	3	0,33	114
		0,33	162
		0,33	188
TaqI	4	0,31	27
		0,31	191
		0,04	218
		0,35	246
RsaI	2	0,50	121
		0,50	343
MboI	2	0,50	115
		0,50	349
Tsp509I	5	0,20	11
		0,20	58
		0,20	71
		0,20	126
		0,20	198
BspHI	2	0,50	28
		0,50	436

Tabela 2 – Table 2
Współczynnik heterozygotyczności (H) i indeks stopnia polimorfizmu (PIC) dla badanych fragmentów restrykcyjnych dla poszczególnych loci
Heterozygosity factor (H) and polymorphic information content (PIC) in evaluated loci

Locus	Allel size (bp)	H	PIC
RsaI	121 – 343	0,529	0,375
MboI	91 – 373	0,529	0,375
BspHI	28 – 436	0,529	0,375
HaeIII	126 – 179	0,713	0,602
SspI	114 – 188	0,713	0,602
TaqI	27 – 246	0,724	0,617
Tsp509I	11 – 198	0,847	0,768

Wartości H i PIC oszacowane przez Niemczewskiego i wsp. na populacji jelenia mazurskiego wynoszą odpowiednio: H – 0,540, PIC – 0,495 [7].

PIŚMIENNICTWO

1. BONNET A., THEVENON S., DUADET F., MALLARD J.C., 2002 – Efficiency of semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 11 microsatellite markers for genetic studies of deer populations. ***Animal Genetics*** 33, 342-350.
2. BRODMANN P.D., NICHOLAS G., SCHALTENBRAND P., ILG E.C., 2001 – Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. ***European Food Research and Technology*** 212, 491-496.
3. DROZD L., PIĘTA M., KARPIŃSKI M., PIWNIUK J., 2000 – Jakość byków jeleni w makroregionie środkowo-wschodniej Polski. ***Sylwan*** 3 (CXLIV), 87-92.
4. DROZD L., KARPIŃSKI M., GOLEMAN M., CZYŻOWSKI P., 2003 – Wykorzystanie metody PCR-RLFP w badaniach polimorfizmu i dystansów genetycznych u sarny (*Capreolus capreolus*) i jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*). ***Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska***, sectio EE, vol. XXI, 2, 56, 23-30.
5. FICKEL J., REINSCH A., 2000 – Microsatellite markers for the European roe deer (*Capreolus capreolus*). ***Molecular Ecology*** 9, 993-1011.
6. MARSHALL T.C., SLATE J., KRUUK L., PEMBERTON J.M., 1998 – Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. ***Molecular Ecology*** 7, 639-655.
7. NIEMCZEWSKI C., RUTKOWSKI J., ŻURKOWSKI M., 2002 – Preliminary investigations on the polymorphism of microsatellite markers in Mazurian red deer (*Cervus elaphus*). ***Animal Science Papers and Reports*** 20, 3, 169-174.
8. ROED K.H., 1998 – Microsatellite variation in Scandinavian Cervidae using primes derived from Bovidae. ***Hereditas*** 129, 19-25.
9. WOLF CH., RENTSCH J., HÜBNER F., 1999 – PCR-RFLP analysis if mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. ***Journal Agricultural Food Chemistry***, vol. 47, 4, 1350-1355.

Leszek Drozd, Mirosław Karpiński, Piotr Czyżowski,
Małgorzata Goleman

Preliminary investigations on the genetic structure with mitochondrial DNA in red deer (*Cervus elaphus*) from middle-eastern region of Poland

S u m m a r y

The aim of this paper was to evaluate genetic parameters of red deer populations in the middle-eastern region of Poland by PCR-RFLP mtDNA method. Tissue samples for preparation of DNA were obtained from 32 red deer from middle-eastern region of Poland. Heterozygosity (H) and polymorphic information content (PIC) with CERVUS 2.0 was calculated. Eighteen alleles from 11 to 349 bp were selected. The number of alleles in loci was diversified and the values were from 2 (locus BspHI) to 5 (locus Tsp509I). The results indicated that evaluated loci showed the highest degree of polymorphism. The average values of heterozygosity factor were 0.655 and PIC 0.531. The most polymorphic locus in the evaluated population of red deer was Tsp509I. There is

no polymorphism obtained in loci BspHI, MboI and RsaI. In the conducted investigations, value of PIC was very similar to that one of other authors but H was distinctly higher. On the other hand, the diversity of genetic material used in red deer introduction in the middle-eastern region of Poland allows concluding that polymorphism of red deer population is the highest one as compared to other regions of Poland.