



HODNOTENIE MEDZILÍNIOVEJ DIVERZITY PREPELICE JAPONSKEJ RAPD PRIMÉROM V7

Interline diversity analysis in japanese quail population using V7 RAPD markers

R. ŽIDEK, M. RYBANSKÁ

Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra, Slovak Agricultural University, Nitra, Slovak Republic

ABSTRACT

Japanese quail (*Coturnix Japonica*) has been used as an animal for laboratory research because of its small body size, short generation interval and high egg production. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) is a powerful tool for studying the genetic similarity between lines or populations. NCH line selected for low cholesterol content, VCH line selected for high cholesterol content and non-selected KCH line (control), were used for this experiment. V7 decamer primer successfully amplified the genomic DNA from samples of Japanese quail lines. A total of 9 fragments were observed by individual analysis, 8 bands were polymorphic. Increase in the frequency of polymorphic bands was detected in all the selected lines. Computed genetic similarity ranged from 0.836 to 0.983. Lowest value of genetic similarity was observed between the line with high cholesterol content and the line with low cholesterol content. Random markers are able to detect genetic similarities between analyzed lines of animals, and predict genetic marker searching tool in Japanese quail population.

Key words: japanese quail, line diversity, V7 RAPD markers

ÚVOD

Rozmanitosť fauny a flóry vo vzťahu k rozvoju generácie ľudstva významne ovplyvňuje biodiverzita rastlín a živočíchov, nevynímajúc populáciu niektorých druhov hydiny, ktorá je ohrozená viac ako iné druhy hospodárskych zvierat.

Špeciálne postupy v šľachtení hydiny môžu zvyšovať homogenizáciu genotypov vo vzniknutých hybridoch s extrémnou úžitkovosťou zameranou na produkciu mäsa alebo znášku vajec, môžu vplývať na diverzitu v disruptívne selektovaných skupinách zvierat (Baumgartner et al., 1999; Končeková – Baumgartner, 2004; Baumgartner, 2005), čo je možné uskutočniť metódami založenými na genetických markéroch.

Biodiverzitu hydiny charakterizujú mnohé plemená a populácie, ktoré prezentujú veľké množstvo genetických charakteristík a variant ako dôsledok domestikácie. Ekonomika následným zvyšujúcim sa trendom šľachtenia niektorých druhov hydiny na produkčné vlastnosti vyžaduje konzervovanie a obnovovanie pôvodného genetického založenia populácie takmer všetkých druhov hospodárskych zvierat, a preto je potrebné rešpektovať kritériá, ktoré doplnil Ruane (2000), aby bola zachovaná identifikácia genetických zdrojov, ich monitorovanie a ochrana. Metódy, založené na genetických markéroch sú významné na zmapovanie genómu prepelice japonskej a pri hodnotení medzilíniovej biodiverzity v jej populácii, čo vyplýva i z prác viacerých autorov, ktorí potvrdili, že len mizivé percento mikrosatelitných primérov

Correspondence: E-mail: Radoslav.zidek@seznam.cz

použitých na kurách je schopné produkovať špecifický produkt po aplikácii DNA. Línie prepelice japonskej, ktoré boli selektované počas dlhších časových intervalov, na odlišné úžitkové vlastnosti, analyzovali Sharma et al.(2000) pomocou RAPD markérov. Vizualizovali šesť vybraných primérov v 60-tich frakciách, pričom zistili medzi nimi 19 polymorfných. Z dosiahnutých výsledkov zaznamenali efektívnosť RAPD markérov pri stanovení medzilíniových odlišností prepelice japonskej. Metódu RAPD použili Calvo et al.(2001) na generovanie fingerprintov ošípaných, kačíc a moriek Testovali vzorky DNA na potvrdenie efektivity a špecifity. Výsledky ich prác demonštrovali použiteľnosť RAPD fingerprintov na zistenie rozdielov medzi druhmi a skupinami v rámci druhu. Diferencie medzi piatimi rozdielne selektovanými líniami leghornky bielej hodnotili Sharma et al.(2001), Singh a Sharma (2002) pomocou 50-tich dekamérových primérov. Zistili, že iba 12 primérov objavilo polymorfné frakcie, ktorých počet bol 21. Zaznamenané rozdiely medzi líniami stanovili na základe Neiovho koeficienta podobnosti, vychádzajúceho z frekvencie frakcií. Zhang et al. (2002a, 2002b) použili náhodne amplifikovanú polymorfnú DNA na kontrolu a porovnávanie piatich prirodzených populácií kúr, dvoch brojlerových línií a jednej nosivej línie. Pomocou navrhnutých primérov zaznamenali úzky vzťah medzi pozorovanými líniami.

Semenova et al. (2002) využili variabilitu polymorfnej DNA (RAPD a mikrosatelity) a bielkovinové markéry na porovnanie ruských plemien kúr, troch európskych znáškových plemien a troch brojlerových plemien, ktoré pochádzali z Ázie. Genetickú diverzitu štatisticky vyjadrili dendrogramom podobnosti, čím potvrdili najvyššiu genetickú podobnosť medzi ruskými a ázijskými plemenami kúr. Podobne aj Ali et al. (2003) a Geng s Zangom (2003) použili RAPD metódu na analyzovanie diverzity medzi lokálnymi plemenami hydiny. Diverzita japonskej prepelice bola čiastočne sledovaná v prácach Židek et al. (2003, 2005).

Cieľom práce je zhodnotiť diverzitu vybraných analyzovaných línií prepelice japonskej metódu RAPD, využijúc štatistické spracovanie a grafické znázornenie dosiahnutých výsledkov.

MATERIÁL A METÓDA

Za účelom sledovania genetickej podobnosti prepelice japonskej sme využili populáciu zvierat génovej rezervy pochádzajúcej z VÚŽV – SCHŠH v Ivanke pri Dunaji. Použili sme cholesterolové línie 11 (NCH), 12 (VCH) a 13 (KCH) v počte 30 zvierat (Baumgartner a kol., 1999). Populácie prepelice japonskej boli disruptívne selektované. Jedinca v každej sledovanej línii sme pre lepšiu elimináciu genetických rozdielov medzi samčiami a samičiami jedincami rozdelili na skupinu

samcov (1) a skupinu samíc (0). Technológia odchovu a chovu prepelice bola aplikovaná podľa základných technologických postupov uvedených Baumgartnerom a Hetényi (2001).

Odber vzoriek bol realizovaný z podkrídlovej žily v objeme maximálne 0,5 ml krvi. Odobratá krv bola z injekčnej striekačky prenesená do 1,5 ml skúmavky s obsahom antikoagulačného roztoku ACD. Z odobratej a skladovanej krvi sme izolovali DNA pomocou fenol-chloroformovej extrakcie podľa Wettona (1994). Vzorky sme zmiešavali a koncentráciu DNA merali postupom, ktorý popísal Sharm a kol. (2002). Na polymerázovú reťazovú reakciu sme použili reakčný roztok s obsahom 10x tlmivý roztok, 1,5 U Taq DNA polymerázy, 0,3 mmol. l⁻¹ dNTP mixu, 1,5 μmol. l⁻¹ RAPD priméru, 1,5 mmol. l⁻¹ MgCl₂ a 50 ng templátovej DNA. Reakcia prebiehala v termocykléri s celkovým objemom 25 ul. PCR, program obsahoval iniciačný denaturačný krok pri 94 °C počas 2 minút. Každý zo 45 cyklov pozostával z denaturácie počas 60 sekúnd pri 94 °C, nasadenia primérov počas 1 minúty pri 38 °C, polymerizácie počas 2 minúty pri 72 °C. Fáza predĺžovania trvala 10 minút pri 72 °C. Po ukončení sme vzorky schladili na 4 °C a na 1,4 % agarózovom géle s pridaním etídium bromidu frakcie separovali. Jednotlivé frakcie sme vizualizovali pomocou UV transiluminátora, fotografovali a analyzovali pomocou programu GelWorks 4.00 intermediate. DNA. Pre sledovanie diverzity bol použitý RAPD primér V7 (5'- 3' GAA GCC AGC C) V pokuse sme použili zmiešanú a jednotlivo analyzovanú vzorky troch spomínaných línií.

Index genetickej podobnosti pre jednotlivé vzorky sme počítali podľa vzorca pre zdieľanie frakcií (Lynch, 1990): $Bab = 2Nab / (Na + Nb)$, kde Nab je počet všetkých spoločných frakcií medzi vzorkou a a vzorkou b . Na a Nb vyjadrujú počet všetkých frakcií pozorovaných jednotlivo na vzorke a a vzorke b . V rámci línie sme samčie a samičie jedince analyzovali osobitne. Medzilíniovú podobnosť (BS_{ij}) sme vypočítali ako priemernú hodnotu zdieľania frakcií medzi jedincami skupiny i a skupiny j . Dendrogram genetickej vzdialenosti sme získali využitím metriky neváženej párovo skupinovej metódy používajúcej aritmetické priemery (UPGMA) v programe PHYLIP 3,57 c (Felsenstein, 1993).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Technikou zmiešavania vzoriek sme primérom V7 získali deväť frakcií, z ktorých bolo šesť monomorfných a tri polymorfné. Dĺžka fragmentov sa pohybovala od 487 bp do 2435 bp. Rozvrstvenie frakcií na agarózovom géle a zobrazenie priemernej intenzity a dĺžky fragmentov je na obrázku 1. Pomocou popísaného priméru V7 sme získali PCR produkt všetkých sledovaných jedincov. Jednotlivou analýzou bolo pozorovaných rovnako deväť frakcií, z

Tabuľka 1: Frekvencia frakcií v každej sledovanej línii
Table 1: Band frequencies for each observed line

^l line/bp	2435	2120	1701	1299	1133	941	742	584	487
nch1	1,000	0,800	1,000	0,200	1,000	1,000	0,600	0,400	1,000
nch0	1,000	0,500	1,000	0,250	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000
vch1	1,000	0,500	0,750	0,000	1,000	0,750	0,250	0,000	1,000
vch0	1,000	0,400	0,800	0,400	1,000	0,400	0,400	0,200	1,000
kch1	0,750	0,250	1,000	0,500	0,750	1,000	0,500	0,000	1,000
kch0	1,000	0,500	0,750	0,000	1,000	0,750	0,000	0,250	1,000

nch1: male individuals of low cholesterol content line; nch0: female individuals of low cholesterol content line; vch1: male individuals of high cholesterol content line; vch0: female individuals of high cholesterol content line; kch1: male individuals of control line; kch0: female individuals of control line

ktorých bolo osem polymorfných a jedna monomorfná. Veľkosť pozorovaných frakcií sa pohybovala v rozmedzí od 487 bp do 2435 bp. Pre primér a každú sledovanú líniu boli vyrátané frekvencie frakcií, ktoré sú uvedené v tabuľke 1. V populácii je možné pozorovať globálne zvyšovanie frekvencie takmer všetkých polymorfných frakcií, ktoré vzniká v selektovaných líniiach.

Genetickú podobnosť medzi líniami vychádzajúcu zo zmiešavania vzoriek, pozorovanú pomocou priméru V7, sme zaznamenali v tabuľke 2. Namerané hodnoty genetickej podobnosti sa pohybovali v rozmedzí od

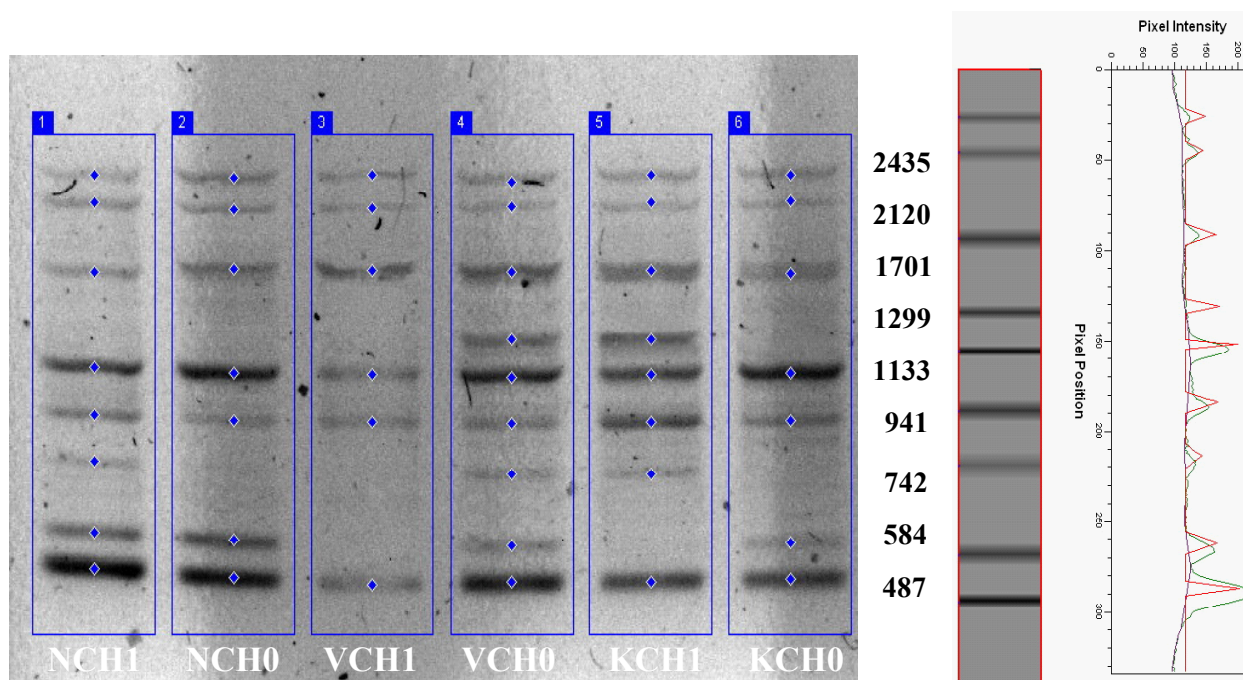
0,8000 do 1,0000. Najnižšia hodnota podobnosti bola registrovaná medzi líniou kch1 a vch0 a ako najpodobnejšie línie boli stanovené línie nch0 a kch0. Rovnako aj pre jednotlivito analyzované vzorky sme z vypočítaných frekvencií frakcií zostavili tabuľku medzilíniovej genetickej podobnosti a genetickej vzdialenosti. Genetická medzilíniová podobnosť je zachytená v tabuľke 3 pričom jej hodnoty sa pohybovali v rozmedzí od 0,8364 medzi líniami vch0 a nch0 až po najvyššiu zistenú geneticкую podobnosť 0,9831 medzi líniami kch0.

Tabuľka 2: Genetická podobnosť pozorovaná zmiešavaním vzoriek
Table 2: Genetic similarity observed by sample pooling

lína	nch1	nch0	vch1	vch0	Kch1	kch0
nch1	–					
nch0	0,9333	–				
vch1	0,8571	0,9231	–			
vch0	0,9412	0,8750	0,8000	–		
kch1	0,8750	0,8000	0,8571	0,9412	–	
kch0	0,9333	1,0000	0,9231	0,8750	0,8000	–

Tabuľka 3: Genetická podobnosť pozorovaná jednotlivou analýzou vzoriek
Table 3: Genetic similarity observed for each sample separately

lína	nch1	nch0	Vch1	vch0	kch1	kch0
nch1						
nch0	0,8964					
vch1	0,9273	0,8397				
vch0	0,9039	0,8364	0,9505			
kch1	0,9043	0,8028	0,9129	0,9093		
kch0	0,9137	0,9043	0,9831	0,9359	0,8777	



Obr. 1: RAPD profil zmiešaných vzoriek použitím priméru V7

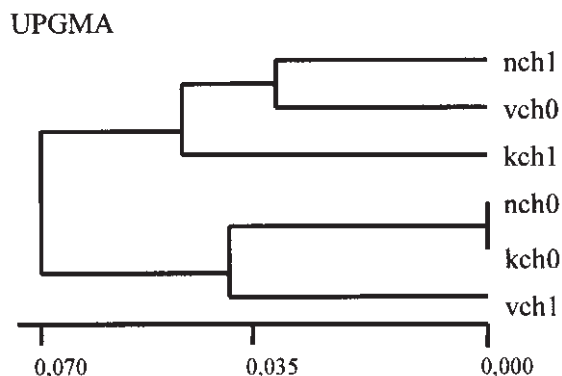
Fig. 1: RAPD profile of primer V7 by sample pooling

Dendrogramom zostrojeným pomocou UPGMA metriky sme rozdelili pozorovanú skupinu do dvoch vetiev, pričom do zhluky s najväčšou podobnosťou boli zaradené línie nch0 a kch0 (obr. 2). Ako teda vyplýva zo zostrojeného dendrogramu samičia nízkocholesterolová línia sa napriek selekcii geneticky neodlišuje od kontrolnej línie.

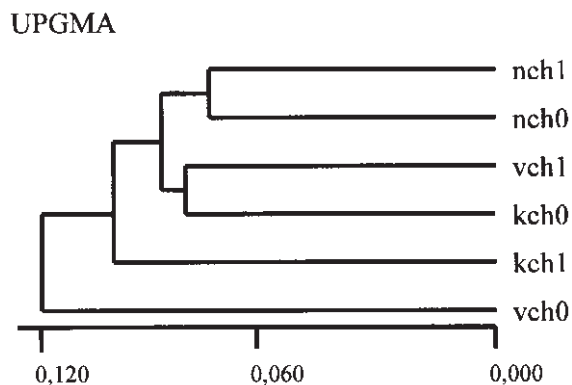
Komplexné medzilíniové vzťahy vyjadruje dendrogram zostrojený z podkladov získaných jednotlivým analyzovaním vzoriek (obr. 3). Nepodarilo sa nám potvrdiť výraznú podobnosť medzi líniou kch0 a nch0. Celá populácia vykazuje variabilitu medzi pozorovanými líniami. V zhluky s najväčšou podobnosťou sa nachádzajú zvieratá nízkocholesterolových línií oboch pohlaví. Najodlišnejšou je línia vch0

LITERATÚRA

- ALI, B. A. – AHMED, M. M. M. – ALY, O. M. 2003. Relationship between genetic similarity and some productive traits in local chicken strains. In: *African Journal of Biotechnology*, vol. 2, 2003, no. 2, p. 46-47.
- BAUMGARTNER, J. - KONČEKOVÁ, Z. - BENKOVÁ, J. - POLÁČIKOVÁ, M. - CSUKA, J. 1999a. Korelácie medzi obsahom minerálnych prvkov v žltku a niektorými ukazovateľmi kvality vajec prepelice japonskej [Correlations



Obr. 2: Dendrogram vychádzajúci zo zdieľania frakcií
Fig. 2: Dendrogram based on band sharing



Obr. 3: Komplexné medzilíniové vzťahy
Fig. 3: Complex interline relations

- among mineral elements content in yolk and some parameters of egg quality in Japanese quail]. In: *Journal of Farm Animal Science* (Vedecké práce VÚŽV Nitra), roč. 32, 1999a, s. 227-236
- BAUMGARTNER, J. – KONČEKOVÁ, Z. – CSUKA, J. – BENKOVÁ, J. – ŠÁRNIKOVÁ, K.B. – SIMEONOVÁ, J. 1999b. Šľachtenie prepelice japonskej na obsah žltkového cholesterolu. In: Zborník referátov z vedeckej konferencie s medzin. účasťou „Genetika a morfogenetika v chove hospodárskych zvierat“ Nitra: VÚŽV, 1999b, 158 s.
- BAUMGARTNER, J. – HETÉNYI, L. 2001. Prepelica japonská [Japanese quail]. Nitra : VÚŽV, 2001, 72 s. ISBN 80-88872-16-2.
- BAUMGARTNER, J. – KOPECKÝ, J. – KONČEKOVÁ, Z. – BENKOVÁ, J. 2005. Technologická kvalita vajec línií prepelice japonskej šľachtených na obsah žltkového cholesterolu [Technological quality of eggs of Japanese quail lines selected on yolk cholesterol content]. In: *Journal of Farm Animal Science* (Vedecké práce VÚŽV Nitra), roč. 38, 2005, s. 83-90.
- CALVO, J.H. – ZARAGOZA, P. – OSTA R.. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints for Identification of Species in Poultry Pate. In: *Poultry Science*, vol. 80, 2001, s. 522-524.
- FELSENSTEIN, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.57c. Department of genetics, University of Washington, Box 357360, Seattle, WA 98105, U.S.A, 1993.
- GENG, Z. – ZHANG, Y. 2003. Germplasm characteristics and genetic diversity of Wenchang fowl. In: *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, vol. 14, 2003, č. 4, s. 562-564.
- KONČEKOVÁ, Z. - BAUMGARTNER, J. 2004. Vaječná úžitkovosť prepelice japonskej mäsového typu [Egg performance of the meat type Japanese quail]. In: *Journal of Farm Animal Science* (Vedecké práce VÚŽV Nitra), roč. 37, 2004, s. 165-158.
- LYNCH, M. 1990. The Similarity Index and DNA Fingerprinting. In: *Molecular biology and evolution*, vol. 7, 1990, č. 5, s. 478-484.
- RUANE, J. 2000. A Framework for Prioritizing Domestic Animal Breeds for Conservation Purposes at the National Level: a Norwegian Case Study. In: *Conservation Biology*, vol.14, no. 5, 2000, p. 1385-1393.
- SHARMA, D. – APPA RAO, K.B.C. – TOTEY, S.M. 2000. Measurement of within and between population genetic variability in quails. In: *British Poultry Science*, vol. 41, 2000, p. 29-32.
- SEMENOVA, S.K. – MOISEEVA, I.G. – VASIL'EV, V.A. – FILENKO, A.L. – NIKIFOROV, A.A. – SEVAST'IANOVA, A.A. – RYSKOV, A.P. 2002. Genetic polymorphism of Russian, European, and Asian chicken breeds as revealed with DNA and protein markers. In: *Genetika*, vol. 38, 2002, no. 9, p. 1304-1308.
- SHARMA, D. – APPA RAO, K. B. C – SINGH, R.V. – TOTEY, S.M. 2001. Genetic diversity among Chicken breeds estimated through randomly amplified polymorphic DNA. In: *Animal Biotechnology*, vol. 12, 2001, no. 2, p. 111-120.
- SINGH, R.V. – SHARMA, D. 2002. Within- and between-strain genetic variability in White Leghorn population detected through RAPD markers. In: *British Poultry Science*, vol. 43, 2002, p. 33-37.
- SHAM, P. – BADER, J.S. – CRAIG, I. – O'DONOVAN, M. – MICHAEL OWEN, M. 2002. DNA pooling : A Tool for large-scale association studies. In: *Genetics*, vol. 3, 2002, p. 871.
- ZHANG, X. – LEUNG, F.C. – CHAN, D.K. – CHEN, Y. – WU, C. 2002. Comparative analysis of allozyme, random amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism on Chinese native chickens. In: *Poultry Science*, vol. 81, 2002a, no. 8, p. 1093-1098.
- ZHANG, X. – LEUNG, F.C. – CHAN, D.K. – YANG, G. – WU, C. 2002b. Genetic diversity of Chinese native chicken breeds based on protein polymorphism, randomly amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism. In: *Poultry Science*, vol. 81, 2002b, no. 10, p. 1463-1472.
- ŽIDEK, R. – RYBANSKÁ, M. – BAUMGARTNER, J. 2003. Analýza genetických markerov DNA vybraných línií prepelice japonskej. [Analysis of genetic similarity in population of Japanese quail.] In: *Journal of Farm Animal Science*, vol. 36, 2003, p. 69-73.
- ŽIDEK, R. – RYBANSKÁ, M. – BAUMGARTNER, J. – KONČEKOVÁ, Z. Genetická podobnosť v populácii prepelice japonskej. [Genetic similarity in population of Japanese quail.] In: *Journal of Farm Animal Science*, vol. 38, 2005, p. 65-71.
- WETTON, J.H. – PARKIN, D.T. 1994. Genetic variation in Birds of Prey, Phase IV (Final Report). In: *Department of Genetics*. Nottingham: Queens Medical Centre, 1994.

Adresa autorov: Ing. Radoslav Židek, PhD.; Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Slovenská poľnohospodárska univerzita; doc. Ing. Margita Rybanská, PhD.; Katedra genetiky a plemenárskej biológie, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 1, 949 92 Nitra, Slovenské republiky