

UTILIZATION OF DNA MICROSATELLITES USED IN PARENTITY PANEL IN EVALUATION OF DIVERZITY AND DISTANCES BETWEEN THE BREEDS OF PIGS IN CZECH REPUBLIC

VYUŽITÍ DNA MIKROSATELITŮ POUŽÍVANÝCH V PANELU NA URČOVÁNÍ RODIČOVSTVÍ PRO ZHODNOCENÍ DIVERZITY A DISTANCÍ MEZI PLEMENY PRASAT V ČR

Komosný M., Urban T.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: houmrs.k@seznam.cz, urban@mendelu.cz

ABSTRACT

This study was concerned with the evaluation of diverzity between breeds of pig in Czech Republic according to microsatellites (MS) used in parentage panel. The panel contains these microsatellites: S0068, S0107, SW24, SW353, SW936, S0070, SW72, TNFB, S0355 and S0386. Animals of Czech Large White (ČBU; n = 202), Czech Landrace (ČLA; n = 81) and Přestice Black-Pied breeds (PC; n = 142) were studied. Measure of diversity like heterozygosity, polymorphism information content (PIC) and Nei's genetic distance were determined. ČLA breed had the lowest values of heterozygosity and PIC. On the other hand, the PC breed had this parameter the highest. Between ČBU a ČLA breeds higher value of Nei's genetic distance was discovered, than between both white breeds and the genetics source PC. On the base of dendrogram, the gene resource PC had the highest phylogenetic distance from both improved white breeds.

Keywords: diverzity, distance, PIC, MS, parentity, pig

ABSTRAKT

Předmětem této studie bylo zhodnocení diverzity mezi plemeny prasat v ČR podle mikrosatelitů (MS) používaných v panelu pro určování rodičovství a původu. V panelu byly použity tyto mikrosatelity: S0068, S0107, SW24, SW353, SW936, S0070, SW72, TNFB, S0355 a S0386. Byly sledováni jedinci plemen české bílé ušlechtilé (ČBU; n = 202), česká landrase (ČLA; n = 81) a přeštické černostrakaté (PC; n = 142). Byly stanoveny míry diverzity: heterozygotnost, polymorfní informační obsah (PIC) a Neiova genetická distance. Plemeno ČLA měla nejnižší hodnoty heterozygotnosti a PIC. Na rozdíl od plemene PC, které mělo tyto ukazatele nejvyšší. Mezi plemeny ČBU a ČLA byla zjištěna větší genetická distance než mezi těmito plemeny a genovým zdrojem PC. Genový zdroj PC byl však fylogeneticky vzdálenější od obou prošlechtěnějších plemen na základě dendrogramu.

Klíčová slova: diverzita, distance, PIC, MS, parentita, prase

ÚVOD

V ČR se u prasat provádí identifikace jedinců a ověřování původu (parentity) pomocí DNA mikrosatelitů (MS). V roce 2002 byl zkonstruován nový panel MS, který je od roku 2003 využíván pro plemennou knihu SCHPČM. Panel obsahuje tyto mikrosatelity: S0068, S0107, SW24, SW353, SW936, S0070, SW72, TNFB, S0355 a S0386. Cílem bylo zhodnotit genetickou diverzitu mezi plemeny české bílé ušlechtilé, česká landrase a přeštické černostrakaté pomocí mikrosatelitů používaných v testech parentity.

MATERIÁL A METODIKA

Pro analýzy jsme využily jedince plemen české bílé ušlechtilé (ČBU) v počtu 202, česká landrase (ČLA) v počtu 81 jedinců a přeštické černostrakaté (PC) v počtu 142 jedinců.

Biologické vzorky

Materiál byl získán z krve, spermatu, vrubu z ucha a chlupové cibulky zvířat. Z krve byla genomová DNA izolována pomocí kitu JETQUICK® Blood&Cell culture DNA Spin Kit.. Při izolaci ze spermatu předcházela suspendace s PBS pufrem a β -mercaptoethanolem. Izolace DNA z tkáně a z chlupových cibulek byla prováděna pomocí kitu Invisorb®Spin Tissue Mini a kitu JETQUICK®Tissue DNA Spin Kit.

Multiplex PCR

Multiplexová PCR pomocí, které byla uskutečněna amplifikací všech MS sekvencí najednou, probíhala za použití termálního cykléru GeneAmp™ PCR.. Reakční mix o celkovém objemu 12,5 μ l obsahoval. 1,2 x PCR pufr (15 mM $MgCl_2$; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 0,01% želatina), 336 μ M každý DTP, 100-600 nM každého primeru, 1,8 U *Taq* polymerázy a 10-100 ng templátové DNA.

Podmínky cyklování: iniciační denaturace 95°C/10min; 30 cyklů (denaturace 95°C/30s, hybridizace 54°C/30s, elongace 72°C/60s); závěrečná elongace 72°C/60min. Podrobnější informace uvádí Putnová *et al.*(2003) a Nechtelberger *et al.*(2001).

Fragmentační analýza

Testování polymorfismu bylo prováděno prostřednictvím fragmentární analýzy DNA v automatickém sekvenátoru ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. 1 μ l PCR produktu, 0,5 μ l velikostního standardu bylo smícháno s 11,5 μ l formamidu. Vzorky byly denaturovány při 95°C po dobu 5 min.a vloženy na led. Postupně docházelo k separaci PCR fragmentů kapilární elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a laserovému skenování fluorescenčně značených DNA fragmentů. Určení genotypů v konkrétních MS proběhlo vyhodnocením velikostí DNA fragmentů softwarovými programy GeneScan® 3.7 NT a Genotyper® 3.7 NT. Mikrosatelity byly stanoveny pracovištěm Laboratoř aplikované molekulární genetiky.

Metody a software

Z databáze byly vypočítány následující parametry diverzity: pozorovaná homozygotnost (P_Hom); pozorovaná heterozygotnost (P_Het); očekávaná homozygotnost

(O_Hom) a očekávaná heterozygotnost (O_Het) podle Levene (1949); a očekávaná heterozygotnost (Nei) podle Nei (1973).

Pro výpočet polymorfního informačního obsahu (PIC) jsme využili vzorec podle (Botstein *et al.* 1980): $PIC = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^k x_i^4$. Hodnota *PIC* je definována jako pravděpodobnost, že genotyp markeru daného potomka umožní vyvodit, kterou ze dvou alel markeru získal od konkrétního heterozygotního rodiče (při nepřítomnosti crossing-overu). Pro výpočet genetických distancí a dendrogramu byl použit software POPGENE® verze 1.3.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Hodnoty heterozygotnosti a homozygotnosti byly spočítány pro všechny MS používané v panelu na určování rodičovství u jednotlivých plemen prasat. V tabulce č. 1 jsou popsány hodnoty ukazatelů diverzity u plemene ČBU. V ukazateli P_Hom byly v rozmezí od 0,1584 do 0,4851. Nejnížší hodnoty pozorované homozygotnosti a zároveň nejvyšší heterozygotnosti se vyskytovaly v lokusu S0107 a S0070 (0,1584 resp. 0,1931). Průměrná homozygotnost a heterozygotnost za všechny MS u ČBU byla 0,3173 a 0,6827. Očekávané hodnoty sledovaných ukazatelů diverzity měly obdobnou výši. Pouze lokusy S0355 a S0386 vykazovaly v očekávaných parametrech heterozygotnosti hodnoty vyšší (O_Het S0355 = 0,7303; O_Het S0386 = 0,6677).

Tab. 1. Míry genetické diverzity u plemene české bílé ušlechtilé

Lokus	n	P_Hom	P_Het	O_Hom*	O_Het*	Nei**
S0068	404	0,4851	0,5149	0,4878	0,5122	0,5109
S0107	404	0,1584	0,8416	0,1636	0,8364	0,8344
SW24	404	0,3069	0,6931	0,3100	0,6900	0,6883
S0355	404	0,3366	0,6634	0,2697	0,7303	0,7285
S0386	404	0,4010	0,5990	0,3323	0,6677	0,6661
SW353	404	0,4653	0,5347	0,4656	0,5344	0,5330
SW936	404	0,3168	0,6832	0,3160	0,6840	0,6823
S0070	404	0,1931	0,8069	0,1796	0,8204	0,8184
SW72	404	0,2921	0,7079	0,2656	0,7344	0,7325
TNFB	404	0,2178	0,7822	0,1761	0,8239	0,8219
Průměr	404	0,3173	0,6827	0,2966	0,7034	0,7016
Směr. odch.		0,1099	0,1099	0,1128	0,1128	0,1125

Pozn.: n: počet alel; P_Hom: Pozorovaná homozygotnost; P_Het: Pozorovaná heterozygotnost; O_Hom: Očekávaná homozygotnost; O_Het: Očekávaná heterozygotnost; * Očekávaná homozygotnost a heterozygotnost byla vypočtena pomocí Levene(1949); ** Neiova (1973) očekávaná heterozygotnost

U plemene ČLA (viz Tab. 2) byly hodnoty pozorované homozygotnosti nejnížší u MS TNFB (0,1975) a nejvyšší u S0355 (0,7901) a S0386 (0,6173). V ostatních MS byly hodnoty obou ukazatelů obdobné a pohybovaly se u P_Hom od 0,2469 do 0,4938. Průměrné hodnoty

pozorované homozygotnosti a heterozygotnosti ve všech lokusech byly u ČLA 0,3938 resp. 0,6062. Očekávané hodnoty sledovaných ukazatelů diverzity měly obdobnou výši, kromě MS SW353. V něm se výše očekávané homozygotnosti i heterozygotnosti významně lišily od pozorovaných hodnot (O_Hom = 0,2121; O_Het = 0,7879) a to v obou případech o 0,1212.

Tab. 2. Míry genetické diverzity u plemene česká landrase

Lokus	n	P_Hom	P_Het	O_Hom*	O_Het*	Nei**
S0068	162	0,3580	0,6420	0,3599	0,6401	0,6362
S0107	162	0,2716	0,7284	0,2744	0,7256	0,7211
SW24	162	0,2469	0,7531	0,2724	0,7276	0,7231
S0355	162	0,7901	0,2099	0,7328	0,2672	0,2656
S0386	162	0,6173	0,3827	0,6003	0,3997	0,3973
SW353	162	0,3333	0,6667	0,2121	0,7879	0,7830
SW936	162	0,4938	0,5062	0,4865	0,5135	0,5104
S0070	162	0,3457	0,6543	0,3903	0,6097	0,6059
SW72	162	0,2840	0,7160	0,3270	0,6730	0,6688
TNFB	162	0,1975	0,8025	0,1754	0,8246	0,8195
Průměr	162	0,3938	0,6062	0,3831	0,6169	0,6131
Směr. odch.		0,1860	0,1860	0,1765	0,1765	0,1754

Pozn.: n: počet alel; P_Hom: Pozorovaná homozygotnost; P_Het: Pozorovaná heterozygotnost; O_Hom: Očekávaná homozygotnost; O_Het: Očekávaná heterozygotnost; * Očekávaná homozygotnost a heterozygotnost byla vypočtena pomocí Levene(1949); ** Neiova (1973) očekávaná heterozygotnost

Nejnižší hodnoty homozygotnosti mělo plemeno PC (Tab. 3). Pouze v mikrosatelitu S0355 bylo procento homozygotů nad padesát procent a to P_Hom = 0,5563. V ostatních lokusech se míra homozygotnosti pohybovala v rozmezí 0,1127 až 0,3803. Průměrné hodnoty celého panelu MS v pozorované homozygotnosti byly u PC 0,2486 a heterozygotnosti 0,7514.

Tab. 3. Míry genetické diverzity u plemene přeštické černostrakaté

Lokus	n	P_Hom	P_Het	O_Hom*	O_Het*	Nei**
S0068	284	0,2746	0,7254	0,2589	0,7411	0,7384
S0107	284	0,1268	0,8732	0,1656	0,8344	0,8315
SW24	284	0,2254	0,7746	0,2040	0,7960	0,7932
S0355	284	0,5563	0,4437	0,4484	0,5516	0,5497
S0386	284	0,2465	0,7535	0,3146	0,6854	0,6829
SW353	284	0,3803	0,6197	0,3485	0,6515	0,6493
SW936	284	0,2254	0,7746	0,2244	0,7756	0,7728
S0070	284	0,1127	0,8873	0,1364	0,8636	0,8606
SW72	284	0,2113	0,7887	0,2379	0,7621	0,7594
TNFB	284	0,1268	0,8732	0,2046	0,7954	0,7926
Průměr	284	0,2486	0,7514	0,2543	0,7457	0,7430
Směr. odch.		0,1347	0,1347	0,0932	0,0932	0,0928

Pozn.: n: počet alel; P_Hom: Pozorovaná homozygotnost; P_Het: Pozorovaná heterozygotnost; O_Hom: Očekávaná homozygotnost; O_Het: Očekávaná heterozygotnost; * Očekávaná homozygotnost a heterozygotnost byla vypočtena pomocí Levene(1949); ** Neiova (1973) očekávaná heterozygotnost

V tabulce č. 4 je zobrazena průměrná heterozygotnost všech plemen pro jednotlivé mikrosatelity. Nejvyšší hodnoty vykazoval MS TNFB (0,8113) a nejnižší S0355 (0,5146), přičemž celkově průměrná hodnota heterozygotnosti sledovaných mikrosatelitů byla 0,6859.

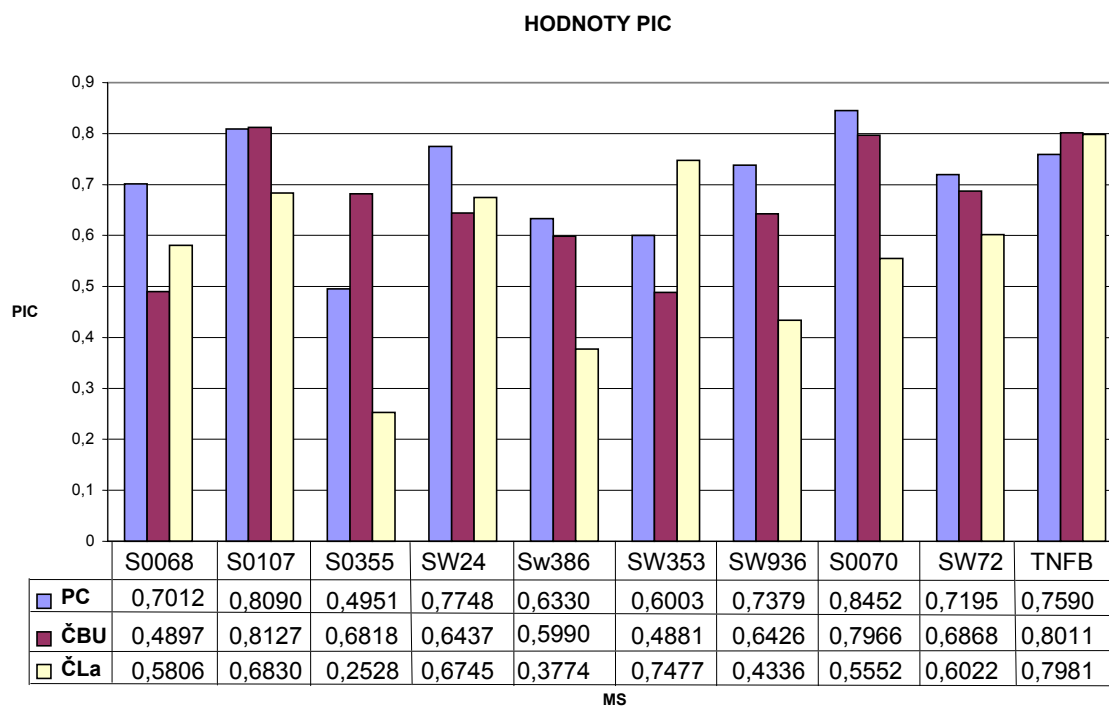
Tab. 4. Průměrná heterozygotnost jednotlivých MS u všech plemen prasat

Lokus	n	Prům_Het
S0068	850	0,6285
S0107	850	0,7956
SW24	850	0,7348
S0355	850	0,5146
S0386	850	0,5821
SW353	850	0,6551
SW936	850	0,6552
S0070	850	0,7616
SW72	850	0,7202
TNFB		0,8113
Průměr	850	0,6859
Směr. odch.		0,0957

Pozn.: n: počet alel; Prům_Het: Průměrná heterozygotnost;

Důležitým parametrem pro zhodnocení genetické diverzity mezi plemeny je také polymorfní informační obsah (PIC). Jeho hodnoty jsou zobrazeny v grafu č. 1. Je zde patrné, že hodnoty PIC jsou nejnižší v MS S0355. U plemene ČLA dosahuje pouze 25,28%. Ze sledovaných plemen mělo nejvyšší hodnoty PIC plemeno PC a to v šesti MS lokusech z deseti.

Graf 1. Hodnoty PIC pro jednotlivá plemena



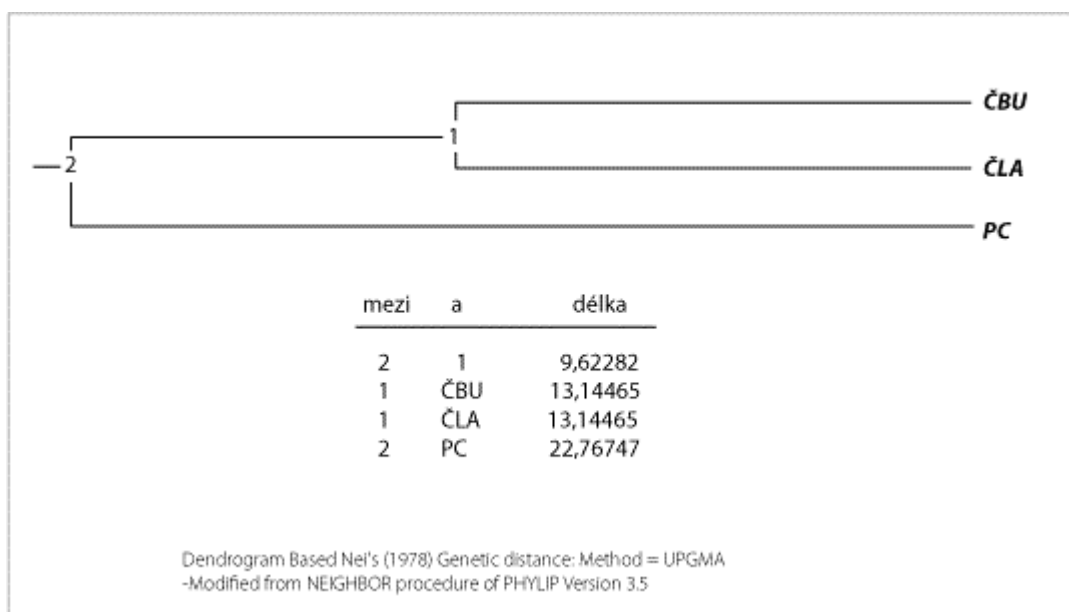
V tabulce č. 5. je popsána Neiova nevychýlená míra genetické identity a distance [Nei (1978) Genetics 89:583-590] mezi populacemi. Mezi plemeny české bílé ušlechtilé a přeštické černostrakaté byla Neiova genetická distance nejnižší a mezi plemeny české bílé ušlechtilé a česká landrase nejvyšší. Přičemž z dendrogramu z obrázku č. 1 vyplývá, že fylogeneticky se bílá plemena oddělila od černostrakatého dříve, než se plemena ČBU a ČLA oddělila od sebe.

Tab. 5. Genetická distance mezi plemeny

Plemeno	ČBU	ČLA	PC
ČBU	****	0,5925	0,7688
ČLA	0,5234	****	0,6789
PC	0,2629	0,3873	****

Neiova (1978) genetická identita (nad diagonálou) a genetická distance (pod diagonálou).

Obr.1 Dendrogram plemen prasat v ČR



ZÁVĚR

Bylo zjištěno, že nejmenší míru heterozygotnosti, a tím i variability, mělo plemeno česká landrase. Toto plemeno mělo také nejmenší hodnoty polymorfního informačního obsahu a to zejména v MS S0355. Může to být částečně zkresleno menším počtem testovaných zvířat než u ostatních studovaných plemen. Naopak plemeno přeštické černostrakaté má v šesti lokusech z deseti nejvyšší PIC a také největší průměrnou heterozygotnost.

Plemena PC a ČLA měla nejvyšší homozygotnost v mikrosatelitu S0355. Zejména u plemene PC je procento homozygotů v tomto lokusu výrazně vyšší. To znamená, že se pravděpodobně v blízkosti tohoto MS lokusu nachází jiný, významnější lokus, který má vztah k užitkové vlastnosti, na který je vyvíjen silnější selekční tlak.

Přeštické černostrakaté prase, jakožto genový zdroj prasat v ČR, fylogeneticky oddělilo dříve od plemen bílých (ČLA a ČBU). Přesto byla zjištěna větší genetická vzdálenost mezi bílými plemeny navzájem než mezi nimi a plemenem PC. Vyplývá to pravděpodobně z působení intenzivnějších šlechtitelských postupů u bílých plemen a extenzivnějšímu přístupu k genové rezervě.

LITERATURA

Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. American Journal of Human Genetics, 1980, 32:314–331.

Dvořák J., Putnová L., Vrtková I., Komosný M. *Analýza výsledků využívání nového panelu MS k identifikaci a ověřování parentity prasat*. In Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví

a produkce prasat. České Budějovice 2005: Scientific Pedagogical Publishing, 2005, s. 33-36. ISBN: 80-85645-50-5.

Dvořák V., Putnová L., Dvořák J.: *The validity of microsatellite panel for paternity verification in breeds of pigs in Czech Republic*. Acta universitalis agriculturae et silviculturae Mendelianeae Brunensis, 2003, 3: 315-24.

Knoll A., Putnová L. *Evaluation of the microsatellite markers used for parentage kontrol in pigs in the Czech Republic*. In: Conf. Abstr. Book 29th International Conf. On Animal Genetics, Tokyo, Japan, September 11-16, 2004: 109.

Levene H. *On a matching problem in genetics*. Ann. Math. Stat., 1949, 20: 91-94.

Nechtelberger D., Kaltwasser C., Stur I., Meyer J.N., Brem G., Mueller M., Mueller S. *DNA microsatellite analysis for parentage control in Australian pigs*. Animal Biotechnology 12, 2001: 141-144.

Nei M. *Analysis of gene diversity in subdivided populations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70: 3321-3323.

Putnová L., Knoll A., Dvořák V., Dvořák J. *A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic*. Czech Journal of Animal Science, 2003, 48: 307-314.