

Zmienność mikrosatelitarna w obrębie chromosomów płci u żubrów

Zuza Nowak, Wanda Olech

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW w Warszawie

The microsatellite variability within European bison sex chromosomes

Abstract: The contemporary metapopulation of the European bison is extremely valuable for maintaining the biodiversity within the European fauna, but it is also unusual experimental field for biologists, ecologists and geneticists. The present Polish population counting over 1000 individuals can be used for the assessment of genetic population parameters, and for following their dynamics. The modern genetics, using the techniques of molecular biology is a very effective tool allowing the naturalists to monitor changes in genetic structure over the course of years, and to describe the changes in incidence of selected genes during the development of the population. Our target was to pursue changes in the range of four sequences being characteristic for not only the paternal but also maternal lines. This analysis was done for 84 European bison born in 1950–70 (ancestors) and 175 European bison born after year 2000 (contemporary). For every male and female four fragments of nuclear DNA were amplified (INRA30; INRA126; INRA189, and TGLA325), and microsatellite sequences located on the sex chromosome. As a result observed was a loss of alleles belonging to the Caucasus line, and the increase of the genetic distance between female lines amongst contemporary individuals. In females such effect could be caused by the accumulation of genetic differences during their 60 years of isolation in various small populations. An attempt should be made, to find males from the Lowland-Caucasian line with alleles characteristic for Caucasus, in order to save genes of the only representative of the Caucasian subspecies in the population.

Key words: European bison, genetics, DNA, microsatellites, variability

Wstęp

Restytucja żubra w Europie, która miała swój początek w roku 1924, była ukierunkowana na jak najszybsze powiększenie populacji tego gatunku, zarówno w niewoli, jak i na wolności. Niewątpliwym sukcesem była reintrodukcja żubra, pierwsza zrealizowana w Puszczy Białowieskiej już w 1952 roku. Po wykonaniu dokładnej analizy rodowodów osobników żyjących na początku lat 60., Slatis (1961) stwierdził, że wywodzą się one od dwunastu zwierząt – założycieli współczesnej populacji gatunku. Grupa dwunastu założycieli składała się z pięciu samców i siedmiu samic. Jeden z samców należał do podgatunku kaukaskiego, a pozostałych 11 założycieli wywodziło się z Puszczy Białowieskiej i należało do podgatunku nizinnego żubra. W efekcie kojarzenia założycieli w czystości lub między podgatunkami, współczesne żubry podzielone są na dwie linie. Wśród dwunastu założycieli tylko siedem (cztery samce i trzy

samice) dało początek populacji linii nizinnej (białowieckiej). Wszystkie siedem zwierząt należało do podgatunku nizinnego *Bison bonasus bonasus*. Linia ta od początku restytucji jest linią zamkniętą, co oznacza, że potomek należy do tej linii tylko pod warunkiem, iż pochodzi od obojga rodziców tej linii. Ta sama grupa siedmiu założycieli i cztery inne samice z podgatunku nizinnego oraz jeden samiec z podgatunku kaukaskiego *Bison bonasus caucasicus* dały początek drugiej wyodrębnionej linii hodowlanej: białowiecko-kaukaskiej. Linia białowiecko-kaukaska jest linią otwartą, co w tym wypadku oznacza, że do linii tej należy osobnik, którego jeden z rodziców należy do linii białowiecko-kaukaskiej, niezależnie od przynależności drugiego rodzica. Na podstawie analizy rodowodów stwierdzono, że łączenie dwóch linii powoduje utratę zmienności genetycznej w obrębie linii białowiecko-kaukaskiej, więc zaleca się separację obydwu linii w hodowli (Olech 2003; Pucek i in. 2004).

Współczesna metapopulacja żubra jest niezwykle cenna ze względu na zachowanie bioróżnorodności europejskiej fauny, ale również jest niezwykle swoistym polem doświadczalnym dla biologów, ekologów i genetyków. Polska populacja, licząca dziś ponad 1000 osobników, może posłużyć do oceny genetycznych parametrów populacyjnych i śledzenia ich zmian w czasie. Księga Rodowodowa Żubrów prowadzona od początku restytucji pozwoliła przede wszystkim na śledzenie wzrostu inbredu i prowadzenie działań mających na celu jego zmniejszenie. Informacje rodowodowe zawarte w Księdze pozwoliły również na śledzenie przepływu genów założycieli gatunku w obrębie poszczególnych linii hodowlanych i między nimi oraz wybranie strategii postępowania w dalszej hodowli żubra w niewoli (Olech 2003).

Współczesna genetyka, wykorzystująca osiągnięcia biologii molekularnej, dostarcza przyrodnikom bardzo efektywnych narzędzi pozwalających niezwykle wnikliwie śledzić zmiany frekwencji wybranych genów na przestrzeni lat i w bezpośredni sposób opisywać zmiany podczas rozwoju populacji. Naszym założeniem było śledzenie zmian w obrębie wybranych sekwencji charakteryzujących nie tylko linie mateczne, lecz również ojcowskie. Przekazywanie materiału genetycznego przez ojców dotyczy genów leżących na chromosomie Y i z tego względu skupiono się na *loci* na tym chromosomie leżącym. Aby móc prześledzić zmiany, jakie mogły nastąpić przez lata, prawie od początku restytucji, badaniami objęto DNA osobników urodzonych w latach 1950–1970 oraz DNA osobników nam współczesnych.

Materiał i metody

Badania objęły 84 żubry urodzone w latach 1950–1970 (antenaci) i 175 żubrów żyjących obecnie (współczesne). Wszystkie zwierzęta zostały podzielone na linie ojcowskie i matczyne (tab. 1) na podstawie analizy rodowodów. Wśród badanych zwierząt znaleźli się potomkowie tylko dwóch linii ojcowskich: PLEBEJERA (nr 45) i KAUKASUSA (100). Wśród założycielek badanej populacji znalazły się trzy krowy: PLANTA (42), PLAVIA (16) i BILMA (89).

Tabela 1. Liczba zbadanych zwierząt (antenatów i współczesnych) z podziałem na płęć i przynależność do linii ojcowskiej (samce) i matczynej (samice)

Płęć/Linia	Status antenat	Populacja współczesna
Samce	42	100
Plebejer	30	50
Kaukasus	12	50
Samice	42	75
Planta	22	30
Plavia	12	20
Bilma	8	25
RAZEM	84	175

Źródłem materiału genetycznego była substancja gąbczasta główek kości długich lub fragmenty mózgdzeni w przypadku antenatów. Od żubrów żyjących współcześnie były pobierane tkanki miękkie, krew obwodowa (*post mortem*), lub cebulki włosów albo krew obwodowa przyżyciowo. Materiał chrzęstny lub kostny udostępniło Muzeum Żubra przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW i Zakład Badania Ssaków PAN w Białowieży, gdzie kolekcjonuje się czaszki żubrów eliminowanych w Puszczy Białowieskiej. Osobniki linii nizinnej pochodzące z lat 1950–1970 były urodzone jedynie w Polsce, ale ze względu na znaczenie polskiej populacji mogą stanowić dobrą reprezentację dla linii nizinnej. Materiał od osobników współczesnych pochodził przekrojowo z różnych stad żubrów (zarówno żyjących na wolności, jak i w niewoli) bytujących nie tylko w Polsce, ale również w innych krajach Europy.

DNA z kości był izolowany zmodyfikowaną metodą Kalmara i wsp. (2000), wykorzystującą precypitację z błękitem bromofenolowym. Metoda izolacji DNA z pozostałych tkanek była zależna od ich typu. DNA z krwi obwodowej był izolowany standardową metodą fenolowo-chloroformową (Gerstein 2001), z tkanek miękkich – metodą wysalania (Brown 2001), z cebulek włosowych metodą wykorzystującą substancje chelatujące (Walsh 2001). Otrzymany DNA po zmierzeniu stężenia był przechowywany w temperaturze -20°C .

Dla każdego osobnika męskiego były amplifikowane cztery fragmenty jądrowego DNA, będące sekwencjami mikrosatelitarnymi zlokalizowanymi na chromosomie Y. Wybrane sekwencje mikrosatelitarne: INRA30; INRA126; INRA189 i TGLA325 zostały opisane na gatunku *Bos taurus*. Na podstawie danych Australijskiej Organizacji Badań nad Dobrostanem CSIRO (Commonwealth Scientific and Research Organization), informujących, że wymienione sekwencje mikrosatelitarne mogą również amplifikować się na chromosomie X (w regionie pseudoautosomalnym), wykonano reakcję amplifikacji wszystkich czterech fragmentów również u badanych osobników żeńskich.

Długość amplifikowanych sekwencji mikrosatelitarnych została oznaczona w sekwenatorze automatycznym AlfExpress II z wykorzystaniem odpowiednio dobranych standardów masy. Analizie statystycznej poddano oddzielnie dane dla samców i samic. W obu przypadkach została obliczona liczba zidentyfikowanych alleli i ich frekwencja w obrębie linii i statusu (antenat/współczesny). Dla samic został oszacowany dystans genetyczny i utworzony dendrogram. Wszystkie obliczenia zostały wykonane w programie Popgen32 (Yeh i wsp. 2001).

Wyniki

Tabela 2. Częstość zidentyfikowanych alleli u badanych samców podzielonych na linie męskie z uwzględnieniem statusu (antenat i współczesny).

Locus	Allel	linia Plebejera		linia Kaukasusa	
		antenat n = 30	współczesny n = 50	antenat n = 12	współczesny n = 50
INRA 30	158		0,22		
	163		0,11		
	172	1,00	0,67	1,00	1,00
INRA 126	181	0,20			
	197			0,33	
	199	0,20		0,33	
	201	0,60	1,00	0,34	1,00
INRA 189	110	0,30			
	120	0,30	0,33		
	124	0,10			
	132	0,30	0,67	1,00	1,00
TAGLA 325	115	0,50		0,67	
	117	0,30		0,33	
	125	0,10	0,12		
	127	0,10	0,88		1,00

Analiza linii ojcowskich

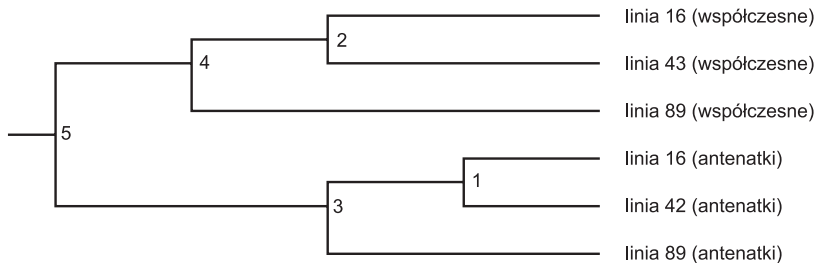
W obrębie poszczególnych sekwencji mikrosatelitarnych zidentyfikowano 3 allele dla mikrosatelity INRA30 i po 4 allele dla pozostałych sekwencji (tab. 2). W większości analizowanych przypadków można zaobserwować zmniejszenie się liczby identyfikowanych alleli u osobników współczesnych w porównaniu z antenatami. U współczesnych samców z linii Plebejera nie stwierdzono 6 z 12 alleli zidentyfikowanych u antenatów, choć w obrębie locus INRA30 stwierdzono trzy allele u współczesnych, a jeden u antenatów. Szczególnie drastyczna wydaje się utrata i tak już niewielkiej zmienności w linii Kaukasusa, wśród polskich reprezentantów jego linii. Z siedmiu alleli zidentyfikowanych u antenatów, u ich potomków stwierdzono już tylko 4 – wszystkie utrwalone

w swoim *locus*, czyli mające stuprocentową frekwencję. Z tabeli 2 wynika również, że jeśli u antenatów istniały jeszcze allele odrębne dla obu porównywanych linii (allel 197pz/INRA126), to w populacji współczesnej zanikły całkowicie. Należy jednak wziąć pod uwagę niewielką liczbę reprezentantów linii Kaukasusa o statusie antenata oraz ich pochodzenie jedynie z naszego kraju.

Analiza linii matczynych

Tabela 3. Częstość zidentyfikowanych alleli u badanych samic podzielonych na linie żeńskie z uwzględnieniem statusu (antenatka i współczesna).

Locus	Allel	linia Planty		linia Plavii		linia Bilmy	
		antenatka n = 22	współczesna n = 30	antenatka n = 12	współczesna n = 20	antenatka n = 8	współczesna n = 25
INRA 30	158		0,12				
	163	0,06	0,13	0,07			
	172	0,69	0,50	0,86	0,50	0,62	0,56
	182	0,25	0,25	0,07	0,50		0,44
	186					0,38	
INRA 126	191	0,06					
	197	0,06					
	199	0,13		0,08		0,25	
	201	0,62	0,75	0,71	0,75	0,50	0,75
	205	0,13	0,25	0,21	0,25	0,25	0,25
INRA 189	120	0,13	0,25	0,14	0,50		0,19
	124	0,06	0,13	0,07		0,13	0,06
	132	0,81	0,62	0,79	0,50	0,87	0,75
TAGLA 325	115	0,31		0,29		0,25	0,19
	117	0,06	0,37	0,21	0,50	0,12	0,19
	125		0,25				0,44
	127	0,63	0,38	0,50	0,50	0,63	0,06
	129						0,12



Rycina 1. Dendrogram dystansu genetycznego ocenionego na podstawie frekwencji alleli w trzech *loci* zidentyfikowanych u samic z 3 linii żeńskich i podzielonych na antenatki i współczesne. Linia 16 – Plavii, 42 – Planty, 89 – Bilmy

Pozytywny wynik amplifikacji poszczególnych fragmentów mikrosatelitarnych u osobników płci żeńskiej pozwolił na przeprowadzenie analizy podobieństwa tych osobników z uwzględnieniem ich statusu (współczesny/antenat) i podziału na linie. Dla samic zidentyfikowano 3 allele w *locus* INRA189 i po 5 alleli w pozostałych *loci* (tab. 3). Widoczne jest również (podobnie jak u samców), zmniejszenie się liczby zidentyfikowanych alleli u osobników mających status współczesnych. O cztery allele mniej zidentyfikowano w linii Planty i Plavii, dwa allele mniej w linii Bilmy. Frekwencje poszczególnych alleli zostały wykorzystane do utworzenia dendrogramu (ryc. 1) obrazującego bardzo wyraźny podział między osobnikami o różnym statusie pochodzenia i między liniami matczynymi. Na dendrogramie widoczne jest wyraźne podobieństwo linii dwóch założycielek hodowli pszczyńskiej (Planty i Plavii) – większe u antenatek, mniejsze u krów współczesnych, oraz odrębność linii matczynej założycieli ze Sztokholmu (Bilmy).

Dyskusja

Przeprowadzone badania były pierwszą bezpośrednią próbą opisaną zmienności genetycznej w dynamicznie rozwijającej się populacji, która przeszła drastyczne ograniczenie liczebności, tzw. „wąskie gardło”.

Zaobserwowany większy dystans genetyczny pomiędzy osobnikami współczesnymi niż pomiędzy osobnikami z początku restytucji może być spowodowany dwoma czynnikami: utrzymywaniem poszczególnych stad w izolacji i niewielką ich liczebnością. W zamkniętych ośrodkach hodowli żubrów zwierzęta były i są wymieniane co kilka lat, co wynika ze specyfiki ich hodowli. Wymiana polega głównie na przenoszeniu samców między ośrodkami oraz na kultywowaniu linii żeńskich. Taki sposób wymiany zwierząt mógł spowodować izolację poszczególnych grup samic pochodzących z danej linii przy jednoczesnej wymianie samców. Może jest to przyczyną zaobserwowania większych różnic między liniami żeńskimi niż męskimi. Pamiętać też należy, że żubry w Polsce stanowiły zamkniętą populację przez ponad 60 lat, gdyż dopiero w 2000 roku zapoczątkowano import żubrów będących potomkami osobników wywiezionych z Polski w latach siedemdziesiątych. Wszelkie zmiany, które pojawiały się w czasie przemieszczenia się żubrów w różne miejsca w pierwszych latach restytucji gatunku mogły zostać utrwalone przez system utrzymywania oddzielonych grup samic w hodowli.

Na podstawie badań jądrowego DNA można jednoznacznie określić tendencje wskazujące na spadek różnorodności genetycznej w badanych grupach zwierząt. Badania wykazały jednoznaczną utratę zmienności u zwierząt współczesnych i dodatkowo tendencję do „spłaszczenia genetycznego” populacji współczesnych, czyli wyrównywania frekwencji alleli i zaniku alleli charakterystycznych dla linii. Zanik alleli charakterystycznych dla linii Kaukasusa i wzrost frekwencji alleli z linii Plebejera jest bardzo wyraźny. Mimo iż allele

mikrosatelitarne są markerami neutralnymi, można przypuszczać, że podobną tendencję wykazują pozostałe *loci*. Bardzo ważne jest zatem, aby wśród żyjących potomków Kakasusa wyszukiwać osobniki o jak najbardziej urozmaiconym genotypie i używać ich do rozrodu.

W populacji z tak małą liczbą założycieli optymizmem powinien napawać fakt stwierdzenia nowych alleli w grupie żubrów współczesnych. *Loci* mikrosatelitarne należą do tzw. markerów neutralnych, pokazujących ogólną zmienność puli genowej niezwiązaną choćby z doбором, ale podlegającą na przykład dryfowi genetycznemu. Zachowanie wielu alleli we współczesnej populacji może świadczyć o naturalnemu przeciwdziałaniu gatunku wzrastającemu inbredowi.

Literatura

- Brown T.A. 2001. Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volume 1, 2nd ed; Robinson D.H., Laflèche G.J., Nucleic acid electrophoresis in agarose gel Oxford University Press.
- Kalmar T., Bachrati C.Z., Marcsik A., Rasko I. 2000. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones; Nucleic Acids Research 28(12).
- Gerstein A. 2001. Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 1, 2nd ed; Booz M.L., Electrophoresis, Willey-Liss A John Willey&Sons, INC, Publication.
- Olech W. 2003. Wpływ inbrodu osobniczego i inbrodu matki na przeżywalność cieląt żubra (*Bison bonasus*). Rozprawa naukowa, SGGW, Warszawa.
- Pucek Z. (ed), Belousova I.P., Krasieńska M., Krasieński Z.A., Olech W. 2004. European bison. Status Survey and Conservation Action Plan, IUCN Gland, Switzerland and Cambridge, UK
- Slatis H.M., Hoene R.E. 1961. The effect of consanguinity on the distribution of continuously variable characteristics. Amer J Hum Genet, 13: 28–31.
- Walsh S., Metzger D. A., Higuchi R. 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR – based typing from forensic material. Biotechniques., 10, 506–513.
- Yeh F.C., Boyle T., Yang R-C., Ye Z., Mao J.X., Yeh D. 2001. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>