

Genetická analýza národních plemen hus

Vladimíra Czerneková¹
Martina Jochová²

¹ Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 00 Praha - Uhřetěves; czernekova.vladimira@vuzv.cz

² Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 00 Praha - Uhřetěves; svatonova.martina@vuzv.cz

Grant: MZERO0717

Název grantu: Institucionální podpora ministerstva zemědělství na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace

Oborové zaměření: EB - Genetika a molekulární biologie

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Česká husa je původní plemeno husy, které vzniklo na našem území domestikací divoké velké husy. Česká husa chocholatá vznikla z české husy selekcí chocholatých hus. Obě plemena jsou zařazena do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat významných pro výživu a zemědělství. Genetická variabilita plemen byla studována pomocí 22 mikrosatelitních markerů: *TTUCG1*, *ZAAS001*, *CKW19*, *CKW20*, *CKW46*, *ZAAS075*, *ZAAS175*, *ZAAS142*, *CKW14*, *ZAAS154*, *CKW15*, *CKW21*, *ZAAS054*, *CKW48*, *ZAAS039*, *ZAAS113*, *ZAAS137*, *ZAAS169*, *ZAAS144*, *TTUCG5*, *CKW18* a *CKW41*. Celkový počet alel nalezených na studovaných lokusech byl 55 u české husy a 35 u české husy chocholaté, průměrný počet alel na mikrosatelitní lokus byl 2,5 u české husy a 1,6 u české husy chocholaté. Průměrná hodnota pozorované heterozygotnosti byla 0,18 u české husy a 0,21 u české husy chocholaté. Průměrné hodnoty očekávaných heterozygotností byly 0,19 (česká husa) a 0,18 (česká husa chocholatá).

Klíčová slova Genetická variabilita, mikrosatelitní DNA, česká husa, česká husa chocholatá

1. ÚVOD

Česká husa je původní plemeno husy, které vzniklo na našem území domestikací divoké velké husy. Plemeno je zařazeno do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat významných pro výživu a zemědělství. Až do poloviny 19. století byla u nás nejrozšířenějším plemenem. Od roku 1870 byla částečně vytlačena a částečně křížena s emdenskými, tuluskými a pomoranskými husami. Očekávané zlepšení užitkovosti se však nedostavilo, naopak došlo ke zhoršení, především kvality peří. Populace původního domácího plemene českých hus byla obnovena ve 30. letech 20. století ze selských hus, tj. nekřížených jedinců z jižních Čech. K další krizi v chovu došlo v 60. a 70. letech minulého století z důvodu plošného křížení s husami rýnskými a italskými. K obnově plemene české husy byly tehdy použity starší husy z oblasti východních Čech. V současnosti se jedná o menší, nenáročné plemeno se schopností vysedět a odvodit housata. Z hlavních znaků je zdůrazněn menší rámec, široký, nepřilíh hluboký trup, jemnější hlava a zobák, nižší, široký postoj a velmi bohaté peří s vysokým podílem prachového peří. Průměrná hmotnost houserů je 5 až 5,5 kg a hus 4 až 4,5 kg (1).

Česká husa chocholatá vznikla z české husy selekcí chocholatých hus v průběhu 70. a 80. let 20. století. Jako samostatné plemeno byla uznána v roce 1988. Jedná se také o menší, nenáročné plemeno se silnou konstitucí. Plemenný typ je shodný s husou českou, ale husa česká chocholatá má hrbol vzniklý neuzavřenými lebečními švy na temeni hlavy. Rozlišovacím znakem je také hmotnost: husa chocholatá je v průměru o 1 kg těžší. Obě plemena se chovají pouze v čistě bílém zbarvení (1).

K hodnocení genetické variability ohrožených druhů hospodářských zvířat jsou dosud nejvíce využívány DNA markery mikrosatelity (2), (3). Mikrosatelity se nacházejí v celém genomu eukaryotických i prokaryotických organismů (4), (5), nejvíce pak v jeho nekódujících oblastech (6). Prvotní molekulární analýzy u hus založené na mikrosatelitní analýze uskutečnil Cathey et al. (7). Další genetické analýzy byly provedeny u asijských plemen hus (8–11). V současné době je mikrosatelitní analýza jedním z hlavních nástrojů studia genetické variability uvnitř a mezi populacemi ohrožených druhů zvířat (12–15). Cílem této práce bylo zjištění úrovně genetické variability české husy a české husy chocholaté.

2. MATERIÁL A METODIKA

Analyzováno bylo celkem 132 zvířat (106 českých hus a 26 českých hus chocholatých). Genomická DNA byla izolována z krve pomocí magnetických částic MagMAX™-96 DNA Multi-Sample Kit (Applied Biosystems, USA). Genotypování zahrnovalo 22 mikrosatelitních lokusů, které byly rozděleny do čtyř multiplexních reakcí (viz Tabulka 1). Reakční směs o objemu 10 µl obsahovala 2 µl DNA (10 až 100 ng), 10 pml obou primerů a 5 µl 2x koncentrovaného PPP Master Mixu (Top-Bio, ČR). Amplifikace probíhala v termocykleru TGradient 96 (Whatman Biometra, Germany) podle následujícího programu: úvodní denaturace při teplotě 95 °C po dobu 5 min; pak následovalo 35 opakování následujícího cyklu: denaturace při teplotě 95 °C po dobu 60 s, při teplotě 53 až 60 °C po dobu 30 s, při teplotě 72 °C po dobu 60 s; závěrečná extenze proběhla při 72 °C po dobu 10 minut. Produkty PCR byly zředěny vodou v poměru 1:1. Kapilární elektroforéza PCR produktů probíhala v sekvenátoru ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Výpočet délky alel byl proveden pomocí softwaru GeneMapper® 4.0 (Applied Biosystems, USA).

Frekvence alel, efektivní počet alel, pozorovaná heterozygotnost, očekávaná heterozygotnost, test Hardy-Weinbergovy rovnováhy a fixační koeficienty (F_{IS}) byly odhadnuty s využitím softwarového balíku GenePop 4.0.10 (16). Hodnoty polymorfního informačního obsahu byly vypočteny podle Botsteinovy metody (17).

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Celkový počet alel nalezených na 22 mikrosatelitních lokusech byl 55 u české husy (ČH) a 35 u české husy chocholaté (ČCH). Průměrný počet alel na mikrosatelitní lokus byl 2,5 (ČH) a 1,6 (ČCH) s rozsahem 1 – 7 (1 – 4 u ČCH). Nízký průměrný počet alel je způsobem přítomností mikrosatelitů pouze s jednou alelou (10 u ČH a 13 u ČCH). Hardy-Weinbergova rovnováha byla u českých hus porušena ($P > 0,05$) u 5 polymorfních lokusů a u českých hus chocholatých pouze u 2 lokusů. Průměrné pozorované heterozygotnosti (H_O) všech mikrosatelitních lokusů měly hodnotu 0,18 (ČH) a 0,21 (ČCH), hodnoty očekávaných heterozygotností (H_E) byly 0,19 (ČH) a 0,18 (ČCH). Nejvyšší hodnotu pozorované heterozygotnosti (0,62) měl u českých hus mikrosatelit *CKW21*. V případě českých hus chocholatých byla největší hodnota (0,88) zjištěna pro mikrosatelit *ZAAS169*. U očekávané heterozygotnosti byla nejvyšší hodnota zjištěna u mikrosatelitu *ZAAS113* (0,62), v případě českých hus chocholatých (0,66) u mikrosatelitu *ZAAS169*. Větší rozdíly mezi nalezenou a očekávanou heterozygotností má populace české husy, což odpovídá i většímu množství lokusů v nerovnováze (P_{HWE}). Nalezené hodnoty pozorované a očekávané heterozygotnosti byly výrazně nižší než v práci Parada et al. (13). Naopak Li et al. (12) uvádí hodnoty heterozygotnosti pro lokusy *ZASS075*, *ZAAS113*, *ZAAS154*, *ZAAS169* a *ZAAS175* nižší. V případě lokusů *CKW21* a *TTUCG5* jsou hodnoty heterozygotností srovnatelné s údaji u zátorských hus (14). Efektivní počet alel se v populaci českých hus pohyboval od 1,05 (lokus *ZAAS054*) po 2,58 (lokus *ZAAS113*). V populaci českých hus chocholatých od 1,26 (lokus *ZAAS075*) po 2,85 (lokus *ZAAS169*). Průměrná hodnota pro české husy byla 1,79 a pro české husy chocholaté 1,86 (viz Tabulka 2).

Pro lepší interpretaci nízkých hladin heterozygotností a k eliminaci Wahlundova efektu byly vypočteny hodnoty fixačních koeficientů (F_{IS}). U českých hus se nalezené hodnoty pohybovaly v rozmezí od -0,0496 (lokus *ZAAS175*) po 0,6823 (lokus *ZAAS039*). České husy chocholaté vykazovaly hodnoty od -0,6667 (lokus *ZAAS113*) po 0,2647 (lokus *ZAAS075*). Nízký inbríding byl nalezen u lokusů *ZAAS175*, *CKW14* a *CKW21* u českých hus. České husy chocholaté měly záporné hodnoty koeficientu inbrídingu u lokusů *ZAAS175*, *CKW21*, *ZAAS039*, *ZAAS113*, *ZAAS169*, *ZAAS144* a *TTUCG5*. Hodnoty polymorfního informačního obsahu (PIC) byly v rozmezí 0 (monomorfní lokusy) až 0,66 (lokus *ZAAS113* u české husy) nebo 0,72 (lokus *ZAAS169* u české husy chocholaté). Jelikož u české husy chocholaté bylo nalezeno více monomorfních lokusů, je průměrná hodnota PIC (0,20) menší než v případě českých hus (0,23). Hodnoty PIC nalezené u lokusů *CKW21* a *TTUCG5* jsou srovnatelné s údaji v práci Parada et al. (13). Celkové informace o souhrnných statistikách jsou uvedeny v tabulce 2.

4. ZÁVĚR

Cílem práce bylo provést analýzu genetické variability u dvou plemen hus, zařazených mezi genové zdroje České republiky. Celkem bylo analyzováno 132 zvířat. Celkový počet alel nalezených na sledovaných mikrosatelitních lokusech byl 55 u české husy a 35 u české husy chocholaté, průměrný počet alel na mikrosatelitní lokus byl 2,5 u české husy a 1,6 u české husy chocholaté. Průměrná hodnota pozorované heterozygotnosti byla 0,18 u české husy a 0,21

u české husy chocholaté. Průměrné hodnoty očekávaných heterozygotností byly 0,19 (česká husa) a 0,18 (česká husa chocholátá). Jelikož u české husy chocholaté bylo nalezeno více monomorfních lokusů, je průměrná hodnota polymorfního informačního obsahu (0,20) menší než v případě českých hus (0,23). Z uvedených výsledků vyplývá, že obě studovaná plemena hus jsou značně homogenní s nízkým stupněm genetické struktury. Získané výsledky budou použity ve šlechtitelském programu národních plemen hus.

Poděkování

Tato práce byla realizována za podpory projektu Ministerstva zemědělství ČR (MZERO0717).

Zdroje

1. Metodika uchování genetického zdroje zvířat, 2017. Dostupné z WWW: <<http://www.genetickezdroje.cz/wp-content/uploads/2017/02/Husy.pdf>>.
2. GROHME, M. A., SOLER, R. F., WINK, M., FROHME, M. 2013. Microsatellite marker discovery using single molecule real-time circular consensus sequencing on the Pacific Biosciences RS. *Biotechniques* 55(5): 255–258. ISSN 0736-6205.
3. GUASTELLA, A. M., ZUCCARO, A., CRISCIONE, A., MARLETTA, D., BORDONARO, S. 2011. Genetic Analysis of Sicilian Autochthonous Horse Breeds Using Nuclear and Mitochondrial DNA Markers. *Journal of Heredity* 102: 753–758. ISSN 0022-1503.
4. FIELD, D.; WILLS, C. 1996. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 263: 209–215. ISSN 0962-8452.
5. TÓTH, G., GÁSPARI, Z., JURKA, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10: 967–981. ISSN 1088-9051.
6. METZGAR, D.; BYTOF, J.; WILLS, C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10: 72–80. ISSN 1088-9051.
7. CATHEY, J. C., DEWOODY, J. A., SMITH, L. M. 1998. Microsatellite markers in Canada geese (*Branta canadensis*). *Journal of Heredity* 89(2): 173–175. ISSN 0022-1503.
8. DU, W. X., YU, D. B., LIU, H. L., LIAN, C. L., HOU, S. S., WANG, L. Y. 2005. Isolation of goose microsatellite markers using dual-suppression-PCR technique. *Journal of Nanjing Agricultural University* 28: 63–67. ISSN 1000-2030.
9. WANG, J. W., QIU, X. P., ZENG, F. T., SHI, X. W., ZHANG, Y. P. 2005. Genetics differentiation of domestic goose breeds in China. *Journal of Genetics and Genomics* 32: 1053–1059. ISSN 1673-8527.
10. TU, Y. J., CHEN, K. W., ZHANG, S. J., TANG, Q. P., GAO, Y. S., YANG, N. 2006. Genetic diversity of 14 indigenous grey goose breeds in China based on microsatellite markers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 19(1): 1–6. ISSN 1011-2367.
11. LI, H. F., CHEN, K. W., YANG, N., SONG, W. T., TANG, Q. P. 2007. Evaluation of genetic diversity of Chinese native geese revealed by microsatellite markers. *Worlds Poultry Science Journal* 63(3): 381–390. ISSN 0043-9339.
12. LI, J. J., YUAN, Q. Y., SHEN, J. D., TAO, Z. R., LI, G. Q., TIAN, Y., WANG, D. Q., CHEN, L., LUI, L. Z. 2012. Evaluation of the genetic diversity and population structure of five indigenous and one introduced Chinese goose breeds using microsatellite markers. *Canadian Journal of Animal Science* 92(4): 417–423. ISSN 0008-3984.

13. PARADA, R., KSIĄZKIEWICZ, J., KAWKA, M., JASZCZAK, K. 2012. Studies on resources of genetic diversity in conservative flocks of geese using microsatellite DNA polymorphic markers. *Molecular Biology Reports* 39(5): 5291–5297. ISSN 0301-4851.
14. ANDRES, K., KAPKOWSKA, E. 2011. Applicability of anamid and galliform microsatellite markers to the genetic diversity studies of domestic geese (*Anser anser domesticus*) through the genotyping of the endangered zatorska breed. *BMC Research Notes* 4(65): 1–10. ISSN 1756-0500.
15. CAO, Z. Z., SU, D., ZHAO, Y. Y., LIU, M., GAO, M., LUAN, X. H. 2014. Development of eight novel microsatellite markers for Huoyan geese. *Genetics and Molecular Research* 13(3): 5562–5565. ISSN 1676-5680.
16. ROUSET, F. 2008. Genepop 007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106. ISSN 1755-0998.
17. 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 Genetics* 32: 314–331. ISSN 0002-9297.

Příloha

Tabulka 1. Charakteristika použitých mikrosatelitních lokusů

Lokus	Očekávaná velikost (bp)	Značení	Anelační teplota (°C)
<i>TTUCG1</i>	113–115	NED	53
<i>ZAAS001</i>	180–192	VIC	53
<i>CKW19</i>	276	PET	53
<i>CKW20</i>	265	FAM	53
<i>CKW46</i>	286	FAM	53
<i>ZAAS075</i>	173–195	FAM	56
<i>ZAAS175</i>	195–210	PET	56
<i>ZAAS142</i>	204–214	VIC	56
<i>CKW14</i>	221–223	NED	56
<i>ZAAS154</i>	209–227	PET	56
<i>CKW15</i>	277	NED	56
<i>CKW21</i>	346–375	FAM	56
<i>ZAAS054</i>	146–206	FAM	60
<i>CKW48</i>	244	NED	60
<i>ZAAS039</i>	161–208	VIC	60
<i>ZAAS113</i>	189–221	PET	60
<i>ZAAS137</i>	197–210	FAM	60
<i>ZAAS169</i>	183–217	VIC	60
<i>ZAAS144</i>	186–211	FAM	53
<i>TTUCG5</i>	176–216	NED	53
<i>CKW18</i>	246–250	PET	53
<i>CKW41</i>	384	VIC	53

Tabulka 2. Genetická variabilita 22 mikrosatelitních lokusů

Plemeno	TNA	MNA	MNE	H_O	H_E	PIC	F_{IS}	P_{HWE}
ČH	55	2,5	1,79	0,18	0,19	0,23	0,21	0,298
ČHCH	35	1,6	1,86	0,21	0,18	0,20	-0,15	0,545

ČH česká husa, ČHCH česká husa chocholátá

TNA celkový počet alel, MNA průměrný počet alel na lokus, MNE průměrný efektivní počet alel, H_O pozorovaná heterozygotnost, H_E očekávaná heterozygotnost, PIC polymorfni informační obsah, F_{IS} koeficient inbrídingu, P_{HWE} test Hardy-Weinbergovy rovnováhy