

## MONITORING OF GENETIC DIVERSITY IN FARMED DEER POPULATIONS USING MICROSATELLITE MARKERS

Lenka Maršáľková, Ľubomír Belej, Pavol Bajzík, Jaroslav Pokorádi

### ABSTRACT

Deer (Cervidae) belong to the most important species used as farmed animals. We focused on assessing the genetic diversity among five deer populations. Analysis has been performed on a total of 183 animals originating from Czech Republic, Hungary, New Zealand, Poland and Slovak Republic. Genetic variability were investigated using 8 microsatellite markers used in deer. Statistical data of all populations we obtained on the basis of Nei statistics, using by POWERMARKER 3.23 programme. Graphical view of relationships among populations and individuals in the populations was obtained using the Dendroscope software. Molecular genetic data combined with evaluation in statistical programmes could lead to a complex view of populations and differences among them.

**Keywords:** genetic variability, microsatellite markers, Red deer

### ÚVOD

Jelenia zver (*Cervidae*) je v súčasnej dobe jedným zo zaujímavých živočíšnych druhov chovaných na farmách, ale využívaná aj ako divo- žijúca lovná zver. Strata genetickej diverzity bola pozorovaná u všetkých druhov, ktoré sa využívajú ako farmové zvieratá. Od 80-tych rokov sa využívajú genetické markery založené na variabilite DNA, čo umožňuje identifikáciu populácií ale taktiež jedincov medzi sebou (Poetsch et al., 2001). Použitie mikrosatelitných markerov na vyhodnocovanie genetickej diverzity a príbuznosti medzi jednotlivými populáciami je zdokumentované v mnohých štúdiách (Xu Yan-chun et al. 2001). Práca vychádzajúca z mikrosatelitných markerov hodnotiaca premiešanie populácie jeleňov a nerovnováhu v sledovanej skupine bola popísaná v práci Slate et al. (2007). Biodiverzitu Francúzskej populácie popísali Frantz et al. (2008). Nízka genetická diverzita môže vzniknúť ako následok rapidnej redukcie zvierat, ako aj introdukcie skupiny zvierat do novej lokality. Znížená diverzita sa prejavuje hlavne redukciami počtu alel a zníženou hodnotou heterozygotity (Webley et al., 2007). Súčasný vývoj molekulárnej biológie a štatistiky umožňuje identifikáciu a využitie genomickej variácie. Rôzne štatistické programy využívajúce genetické údaje boli vyvinuté na hodnotenie príbuznosti medzi populáciami. Cieľom tejto práce bolo vyhodnotiť genetickú variabilitu medzi piatimi, rôzne veľkými, populáciami farmových jeleňov.

### MATERIÁL A METÓDY

DNA bola izolovaná z chlpových cibuliek z celkového počtu 183 farmových jeleňov pochádzajúcich z Českej republiky (50), Maďarska (30), Nového Zélandu (45), Poľska (45) a Slovenskej republiky (13). Ako zdroj DNA sme používali bunkový lyzát. V modifikovanom PCR multiplexe podľa Ernsta (2008) bolo použitých 8 mikrosatelitných markerov. Mastermix obsahoval 1 µl lyzátu; 1,2x Go Taq® Hot Pufor (Promega, Medison USA); 0,34 mM dNTP (Applied Biosystems); 1,8 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Medison USA); 0,5 U GoTaq® Hot Start Polymeráza (Promega, Medison USA); 3% DMSO, rôzne koncentrácie primerov (80 - 400 nM) a

redestilovanú vodu doplnenú do objemu 10 µl. PCR reakcia prebiehala na prístroji PTC-150 Minicycler™ v krokoch: predinkubácia pri 95°C, 5 min.; 30 cyklov pozostávajúcich z denaturácie (95°C, 30 s.), aneling (59°C, 90 s.) a extenzie (72°C, 90 s.), záverečná extenzia pri 72°C, 1 min. a chladenie na 15°C (1s.). Fragmentyčná analýza PCR produktov prebiehala pomocou prístroja ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems) a genotypy jedincov boli vyhodnotené softvérom Genemapper. Genetická diverzita populácií bola vyhodnotená pomocou Nei (1983) štatistiky v programe POWERMARKER 3.23 (Liu and Muse, 2005) - počet alel (NA), počet genotypov, pozorovaná (Ho) a očakávaná heterozygotita (He) a Hardy-Weibergová rovnováha (HWE). Dendrogramy boli zostrojené pomocou softvéru Dendroscope (Huson et al., 2007).

**Tabuľka 1** Zoznam primerov, farbička používaná pri fragmentačnej analýze, sekvencia primerov

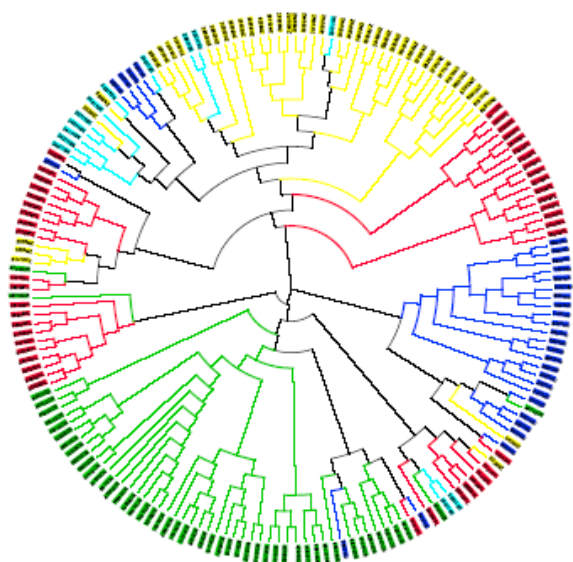
<b>BM888</b>	VIC – ACTAGGAGGCCATATAGGAGGC// AGCTCAAACGAGGGACAGGG (Talbot et al., 1996)
<b>OarFCB5</b>	6FAM - AAGTTAATTTCTGGCTGGAAA ACCCAG//ACCTGACCCTTACTCTCTC ACTC (Buchanan et al., 1994)
<b>RM188</b>	VIC – GCACTATTGGGCTGGTGATT// GGTTCACAAAGAGCTGGAC (Barendse et al., 1994)
<b>RT1</b>	VIC-CATATGGCTAACTACCTAGCTTG CC//GAGTCCCAAAGATTTTCAGCCCTAC (Wilson et al., 1997)
<b>RT13</b>	NED – GCCCAGTGTTAGGAAAGAAGA// CATCCAGAACAGGAGTGAG (Wilson, et al., 1997)
<b>T26</b>	6FAM – TGCCATAGTTTTTCTACCTTC// GAAGTTCCAATAGACACGCTC (Jones et al., 2002)
<b>T156</b>	6FAM – ATGAATACCCAGTCTTGTCTG// TCTTCCTGACCTGIGTCTTG (Jones et al., 2002)
<b>T501</b>	PET – CTCCTCATTATTACCCTGTGA ACATGCTTTGACCAAGACCC (Jones et al., 2002)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našej práci sme hodnotili genetickú variabilitu medzi populáciami farmových jeleňov pochádzajúcich z piatich krajín. Celkovo sme pozorovali 140 alel v 8 mikrosatelitných lokusoch. Počet alel na lokus sa nachádzal v rozmedzí od 12 (RM188, T501) do 27 (RT13) s priemerným počtom 17,5. Môžeme konštatovať že zvolené mikrosatelitné markery sú polymorfnejšie ako markery publikované v práci **Židek et al. (2011)** s priemerným počtom alel 11,5. He na lokus u všetkých populácií sa nachádzal v rozmedzí 0,714 (RT1) a 0,912 (RT13), v priemere 0,846 (Tab. 2.). Hodnota Ho na lokus sa nachádzala v rozmedzí 0,628 (RT13) a 0,857 (OarFCB5). Tieto hodnoty sú porovnateľné s najnižšou a najvyššou hodnotou Ho uvedenými v práci **Židek et al. (2007)**. Priemerná hodnota Ho je 0,743 a je porovnateľné s priemernou hodnotou Ho na lokus v práci **Perez-Espona et al. (2008)**. Keďže je hodnota Ho v lokuse RT13 malá v pomere k počtu genotypov, môžeme uvažovať, že tu dochádza k určitej fixácii alel.

Tabuľka 2 P<0,001 vo všetkých lokusoch

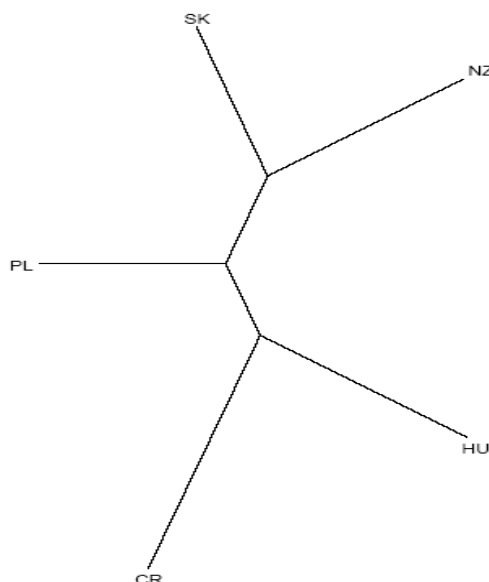
Marker	počet genotypov	počet alel	He	Ho
OarFCB5	51	13	0.881	0.857
T156	59	20	0.879	0.771
BM888	68	24	0.881	0.836
RT1	37	17	0.714	0.644
RT13	75	27	0.912	0.628
T501	42	12	0.822	0.732
T26	46	15	0.865	0.711
RM188	38	12	0.815	0.771
Mean	52	17.5	0.846	0.743



**Obrázok 1** Matica genetických vzdialeností je vyráтанá na základe pozorovanej alelovej frekvencie jedincov. SK (tyrkysová), HU (modrá), CR (zelená), NZ (žltá), PL (červená).

Obrázok 1 je detailnejším zobrazením populácií a predstavuje vzájomné premiešanie populácií. Každá vetva na grafe predstavuje jedinca. Dendrogram je rozdelený do štyroch hlavných vetiev. Česká populácia (zelená) sa nachádza na samostatnej vetve a je najmenej premiešaná. maďarská populácia (modrá) sa nachádza taktiež na samostatnej vetve blízko českej populácie.

Jedinci poľskej populácie sú rozdelený do viacerých vetiev a nachádzajú sa prevažne na jednej hlavnej vetve spolu so slovenskou (tyrkysová) a novozélandskou (žltá) populáciou. Štvrtú vetvu tvorí malá skupina poľských jedincov. Všetky populácie vytvárajú samostatné zhluky jedincov až na poľskú populáciu.



**Obrázok 2** Genetické vzdialenosti medzi populáciami boli vypočítané z priemernej frekvencie alel u všetkých jedincov v populácii.

Obrázok 2 je grafickým zobrazením genetických vzdialeností medzi všetkými piatimi populáciami. Slovenská a Novozélandská populácia majú navzájom menšiu genetickú vzdialenosť a vytvárajú prvú skupinu. K nim najvzdialenejšia je populácia Z Čiech, ku ktorej je priradená Maďarská populácia. Medzi týmito dvomi skupinami sa nachádza Poľská populácia, ktorá má približne rovnakú genetickú vzdialenosť od oboch skupín.

ZÁVER

Genetická variabilita bola vyhodnotená u piatich populácií farmových jeleňov pochádzajúcich zo Slovenska, Maďarska, Českej Republiky, Nového Zélandu a Poľska. Môžeme skonštatovať, že vybrané mikrosatelity sú dostatočne polymorfne a vhodné na analýzy tohto

druhu. Genetickú diverzitu a premiešanie jedincov sme vizualizovali pomocou dendrogramov na ktorých môžeme vidieť, že jedinci z daných populácií majú tendenciu vytvárať samostatné zhluky. Výsledky poukazujú na genetickú ustálenosť jednotlivých skupín zvierat. Na základe výsledkov môžeme taktiež konštatovať, že jednotlivé populácie majú dostatočné genetické vzdialenosti. Molekulárno-genetické údaje a ich vyhodnotenie pomocou štatistických programov nám umožňujú komplexný pohľad na populácie.

## LITERATÚRA

BARANDSE, W., ANMITAGE, S. M., KOSSAREK, L. M., SHALOM, A., KIRKPATRICK, B. W., RYAN, A. M., CLAYTON, D., LI, L., NEIBERGS, H. L., ZHANG, N., GROSSE, W. M., WEISS, J., CREIGHTON, P., MCCARTHY, F., RON, M., TEALE, A. J., FRIES, R., MCGRAW, R. A., MOORE, S. S., GEORGES, M., SOLLER, M., WOMACK, J. E., HETZEL, D. J. S. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. In *Nature Genetics*, vol. 6, 1994, no. 1, p 227-235.

BUCHANAN, F. C., ADAMS, L. J., LITTLEJOHN, R. P., MADDOX, J. F., CRAWFORD, A. M. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellite. In *Genomics*, vol. 22, 1994, p. 397-403.

HUSON, D. H., RICHTER, D. C., RAUSCH, CH., DEZULIAN, T., FRANZ, M., RUPP, R. 2007. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 8:460, 2007, software freely available from <<http://www.dendroscope.org>>.

ERNST, M., KLIMENT, J., LEVÝ, E., KOURKOVÁ, L., STEJSKAL, M. 2008. *Populace bílých jelenů – Využití mikrosatelitních analýz při šlechtění populace bílých jelenů u LČR*, s.p. Hradec Králové : Edice Grantové služby LČR, 2008. 28 s.03/07. ISBN 978-80-86945-01-9.

FRANTZ, A. C., HAMANN, J. L., KLEIN, F. 2008. Fine-scale genetic structure of red deer (*Cervus elaphus*) in a French temperate forest. In *Eur. J. Wildl. Res.*, vol. 54, 2008, p. 44-52.

JONES, K. C., LEVINE, K. F., BANKS, J. D. 2002. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). In *Mol. Ecol.*, vol. 2, 2002, no. 4, p. 425-427.

LIU, K., MUSE, S. V. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. In *Bioinformatics*, vol. 21, 2005, p. 2128-2129.

NEI, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. 1 vyd. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p. ISBN 0-231-06320-2.

PÉREZ-ESPONA, S., PÉREZ-BARBERÍA, F. J., McLEOD, J. E., JIGGINS, C. D., GODON, I. J., PEMBERTON, J. M. 2008. Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*). In *Mol. Ecol.*, vol. 17, 2008, no. 4, p. 981-996.

POETSCH, M., SEEFELDT, S., MASCHKE, M., LIGNITZ, E. 2001. Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer – possible employment in forensic applications. In *Forensic Science International*, vol. 116, 2001, no. 1, p. 1-8.

SLATE, J., PEMBERTON, J. M. 2007. Admixture and patterns of linkage disequilibrium in a free-living vertebrate population. In *J. of Evol. Biol.*, vol. 20, 2007, no. 4, p. 1415-1427.

TALBOT, J., HAIGH, J., PLANTE, Y. 1996. A parentage evaluation test in North American Elk (Wapiti) using microsatellites of ovine and bovine origin. In *Anim. Genet.*, vol. 27, 1996, p. 117-119.

WEBLY, L. S., ZENGER, K. R., HALL, G. P., COOPER, D. W. 2007. Genetic structure of introduced European fallow deer (*Dama dama dama*) in Tasmania, Australia. In *Eur. J. Wildl. Res.*, vol 53, 2007, s. 40-46.

WILSON, G. A., STROBECK, C., WU, L., COFFIN, J. W. 1997. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. In *Mol. Ecol.*, vol. 6, 1997, p 697-699.

XU, Y. CH., PAN, Z. CH., XU, Z. R., YANG, S. H., JIN, Y., BAI, S. Y. 2001. Status of microsatellite as genetic markers in cervids. In *J. of Forest. Res.*, vol. 12, 2001, no. 1, p. 55-58.

ŽIDEK, R., JAKABOVA, D., TRANDZIK, J., BULECA, J., TAKACOVÁ, D., ŽITŇAN, R. 2011. Genetic admixture in pig population observed by microsatellite markers. In *Archiv fur tierzucht-archives of animal breeding*, vol. 54, 2011, no. 1, p. 51-60.

ŽIDEK, R., JAKABOWI-SATKOVA, D., TRANDŽÍK, J., JAKAB, F., BULECA, J., MASSANYI, P., LASZLO, Z. 2007. Genetic variability data of the Slovak large white improved swine breed. In *Magyar allatorvosok lapja*, vol. 129, 2007, no. 11, p. 656-660, ISSN 0025-004X.

## Acknowledgments:

This work was supported by the grant VEGA 1/1074/11 and KEGA 3/7255/09 in cooperation with the Xcell Slovakia.

## Contact address:

Lenka Maršalková, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: marsalkova@gmail.com.

Lubomír Belej, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: lubomir.belej@uniag.sk.

Pavol Bajzík, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: pavol.bajzik@uniag.sk.

Jaroslav Pokorádi, Xcell Slovakia Breeding Services, s.r.o., Ventúrska 1, 811 01 Bratislava, Slovakia, Email: pokoradi@xcell.sk.