

WYKORZYSTANIE POLIMORFIZMU MTDNA DO ROZRÓŻNIENIA PUCHU KACZEK I GĘSI*

Małgorzata Natonek-Wiśniewska, Piotr Krzyścin,
Monika Bugno-Poniewierska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa

Dotychczas nie wyprodukowano syntetycznego materiału, który dorównywałby izolacyjnością i sprężystością naturalnemu puchowi. Wyprodukowane z niego wypełnienia zapewniają optymalne utrzymanie ciepłoty ciała ludzkiego, jak również bardzo skuteczne odprowadzenie wilgoci. W zależności od przeznaczenia producenci stosują puch gęsi lub jego mieszaninę z puchem kaczym w różnych proporcjach. Z przyczyn ekonomicznych istnieje ryzyko fałszowania wsadu przez niedeklerowany dodatek np. puchu kaczego. Zagadnienie to ma zatem duże znaczenie dla kontroli wypełnień puchowych stosowanych jako naturalna ocieplina. W prezentowanej pracy przedstawiono sposób identyfikacji gatunkowej puchu kaczki i gęsi oparty na selektywnej amplifikacji PCR specyficznych gatunkowo fragmentów 12S rRNA i d-loop mtDNA. Proponowana metoda jest specyficzna gatunkowo i pozwala na otrzymanie wyniku powtarzalnego w całym jej zakresie działania. Zakres działania metody jest bardzo szeroki: od 0,1% zafalszowania puchu do 100%. Jest ona na tyle czuła, że umożliwia detekcję z 15 µg puchu. Na uwagę zasługuje fakt zróżnicowanej czułości w zależności od fragmentu pióra poddanego analizie – większą czułość uzyskano dla dutki niż dla puchu. Czułość metody identyfikacji puchu gęsi była taka sama niezależnie od rasy osobnika, od którego pozyskano materiał, natomiast dla kaczki czułość była zróżnicowana w zależności od rasy – dla rouen była niższa od czułości dla kaczki pekin. Opracowana metoda może stać się skutecznym narzędziem do sprawdzenia wiarygodności producentów puchu i pierza.

Słowa kluczowe: identyfikacja gatunkowa puchu, mtDNA, puch kaczy, puch gęsi

Wytwarzanie odzieży wierzchniej czy nakryć pościelowych z naturalnym wypełnieniem puchowym wymusza na ich producentach konieczność podawania składu gatunkowego stosowanego puchu. Powszechnie wiadomo, że lepsze właściwości

*Praca finansowana z tematów 04-011.1 i 07-4.14.7.

termiczne ma pierze pochodzące od gęsi; jest ono również lżejsze od kaczego. Natomiast pierze otrzymane od tego ostatniego jest bardziej sprężyste i znacznie tańsze od gęsiego. Zatem w zależności od potrzeby producenci stosują puch określonego gatunku ptaków lub mieszaninę puchu obu gatunków w różnych proporcjach. Wtedy też zachodzi ryzyko fałszowania wsadu przez dodatek niezgodny z deklaracją producenta.

Wciąż nie ma dostępnej komercyjnej metody pozwalającej na specyficznym gatunkową identyfikację piór czy puchu. Pomocne w jej opracowaniu są doniesienia mówiące o wykorzystaniu do tego celu specyficznych gatunkowo starterów, sekwencjonowania czy enzymów restrykcyjnych. Wszystkie wspomniane techniki oparte są na reakcji PCR wykorzystującej DNA, głównie mitochondrialne (Ali i in., 2014; Doosti i in., 2014). Fragmentami najczęściej stosowanymi do analizy różnicującej interesujące gatunki były: gen kodujący cytochrom B, d-loop oraz 12S rRNA (Lanzilao i in., 2005; Martín i in., 2007; Hou i in., 2015).

Innym aspektem podjętych badań było wyznaczenie skutecznej metody ekstrakcji DNA. Z wcześniejszych badań wynika, że najskuteczniejszym sposobem są metody wykorzystujące krzemionkę (White i in., 2012) lub kolumnienki (Bartkovich i in., 2014; Boonseub i in., 2012). Obie metody pozwoliły na wyekstrahowanie DNA z piór sowy czy sroki, nie tylko świeżych, ale również z okazów muzealnych czy zwierząt wypchanych (Speller i in., 2011).

Należy zaznaczyć, że zarówno izolacja DNA, jak i późniejsze etapy analizy muszą pozwolić na otrzymanie wyniku powtarzalnego, a całościowa metoda musi cechować się wysoką czułością i specyficznością gatunkową. Dysponowanie metodą spełniającą powyższe założenia jest niezwykle pożądanym z przyczyn ekonomicznych i stanowi ważne narzędzie w procesie identyfikacji gatunkowej piór i puchu.

Celem przedstawionej pracy było zatem wyznaczenie metody umożliwiającej różnicowanie gatunkowe puchu kaczek i gęsi.

Material i metody

Próbki do badań w postaci piór i puchu pozyskano od kaczek rasy pekin (20 osobników) i rouen (4 osobniki) oraz gęsi białej kołudzkiej (5 osobników) i china sage 2 (20 osobników). Z miksów pierza / puchu utworzono próbkę reprezentatywną, a następnie próbki analityczne do badań. Liczbę powtórzeń dla próbek poddanych analizie przedstawiono w tabeli 1. Do kontroli krzyżowych użyto DNA wyizolowanego z mięsa indyka i kury. Jako kontrole pozytywne PCR (PTC) użyto DNA pozyskanego również z mięsa kaczki i gęsi.

Izolacja DNA

Badaniom poddano osobno dutki piór, a osobno puch w ilości około 0,015 g. Izolację DNA wykonano zestawem Sherlock (A&A Biotechnology) przeznaczonym dla mikrośladów zgodnie z metodyką podaną przez producenta. Otrzymane ekstrakty DNA sprawdzono spektrofotometrycznie.

Tabela 1. Parametry ekstraktów DNA uzyskanych z analizowanych próbek
 Table 1. Parameters of DNA extracts obtained from analysed samples

Gatunek Species	Rasa Breed	Miejsce pozyskiwania DNA (liczba powtórzeń) DNA acquisition site (number of repeats)	Parametry otrzymanego DNA Parameters of DNA obtained	
			c (ng/μl)	A260/280
Kaczka Duck	rouen	dutka (1) / quill (1)	32,6	1,74
		puch (2) / down (2)	13,4–37,6	1,5–1,88
	pekin	dutka (1) / quill (1)	37,6	1,77
		puch (2) / down (2)	17,4–37,6	1,59–1,88
Gęś Goose	china sage	dutka (1) / quill (1)	10,1	1,44
		puch (1) / down (1)	6,1	1,4
	biała kołudzka White Kołuda	dutka (1) / quill (1)	41,9	1,8
		puch (4) / down (4)	12,2–15,4	1,38–1,65

Reakcja PCR

Do reakcji PCR zastosowano startery specyficzne gatunkowo dla fragmentu 12SrRNA kaczki (Martín i in., 2007) oraz d-loop gęsi (Hou i in., 2015). Regiony DNA ograniczone stosowanymi w analizie starterami wykazują brak homologii międzygatunkowej u drobiu sprawdzony przy zastosowaniu aplikacji BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Dla każdego analizowanego gatunku zastosowano analogiczny skład mieszaniny reakcyjnej. W jej skład wchodziła HotStarTaq DNA Polymerase, 1x PCR Buffer, 1x Q-Solution (Qiagen), 1,33mM MgCl₂, 0,67 pM każdego startera. Temperatura anilingu wynosiła 52°C ora 56°C, odpowiednio dla PCRu dla kaczki i gęsi.

Wszystkie reakcje PCR prowadzono z negatywną kontrolą PCR (NTC) mającą na celu detekcję potencjalnych zanieczyszczeń mieszaniny reakcyjnej ora pozytywną kontrolą PCR (PTC).

W celu sprawdzenia specyficzności przeprowadzono reakcje krzyżowe między obiema gatunkami oraz DNA kurzym i indyczym.

Zakres działania metody wyznaczono na podstawie analizy rozcieńczeń DNA puchu w ilości 0,09% do 100%.

Wyniki

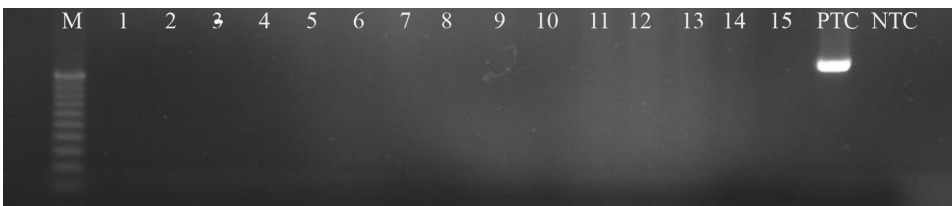
Wynik izolacji zestawem Sherlock

Otrzymana ilość DNA nie była duża – we wszystkich próbkach wahała się między 6,1 a 41,9 ng/μl i była uzależniona od części pióra, z której izolowano DNA (tab. 1).

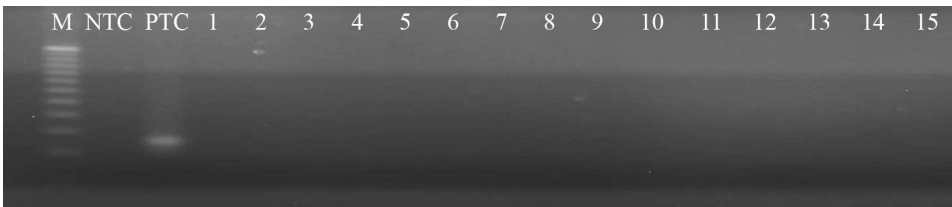
Stężenie DNA uzyskanego z dutek miało wyższą wartość. Czystość izolatów wyrażona proporcją A260/280 we wszystkich przypadkach była w zakresie 1,38–1,88 i analogicznie do stężenia miała wyższe wartości dla dutek. Niemniej jednak należy zaznaczyć, że wszystkie izolaty DNA pozwoliły na uzyskanie produktu PCR.

Wynik reakcji PCR

Amplifikacja starterami gęsimi DNA wyizolowanego z piór i puchu umożliwiła otrzymanie produktu o długości 387 pz specyficznego wyłącznie dla próbek DNA pochodzących od gęsi. Dla DNA pozostałych gatunków (kaczki, kury i indyka) nie otrzymano produktu reakcji (fot. 1). Analogiczne badania wykonane starterami kaczymi wykazało otrzymanie produktu charakterystycznego (64 pz) jedynie dla kaczek (fot. 2). W obu przypadkach dla kontroli pozytywnej (PTC) reakcji otrzymano produkt, natomiast kontrola negatywna (NTC) potwierdziła czystość reakcji.

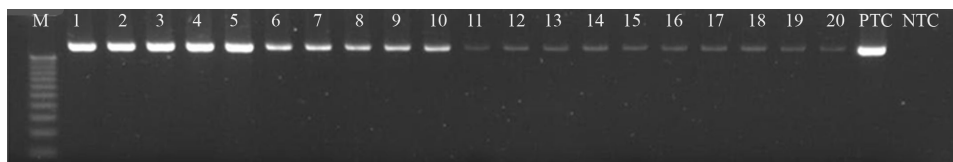


Fot. 1. Reakcje krzyżowe dla starterów gęsich. Studzienka M: marker wielkości 25 pz, studzienki 1–5 – DNA z puchu kaczki, 6–10 – DNA z mięsa kury, 11–15 – DNA z mięsa indyka, PTC, NTC
 Fig. 1. Cross-reactions for goose primers. Lane M: 25 bp marker, lanes 1–5 – DNA from duck down, 6–10 – DNA from chicken meat, 11–15 – DNA from turkey meat, PTC, NTC



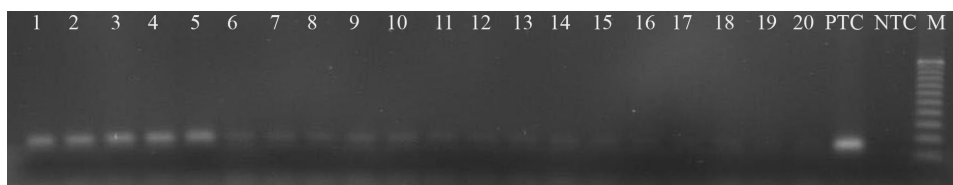
Fot. 2. Reakcje krzyżowe dla starterów kaczych. Studzienka M: marker wielkości 25 pz. NTC, PTC, studzienki 1–5 – DNA z puchu gęsi, 6–10 – DNA z mięsa kury, 11–15 – DNA z mięsa indyka
 Fig. 2. Cross-reactions for duck primers. Lane M: 25 bp marker. NTC, PTC, lanes 1–5 – DNA from goose down, 6–10 – DNA from chicken meat, 11–15 – DNA from turkey meat

Reakcję pozytywną dla obu gatunków uzyskano dla próbek puchu o zawartości między 0,09% do 100%, przy czym intensywność produktu PCR jest uzależniona od ilości materiału wyjściowego (fot. 3 i 4).



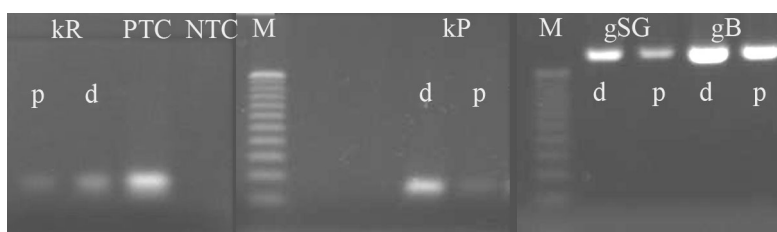
Fot. 3. Identyfikacja puchu gęszego. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR w badanym zakresie działania metody. W kolejnych studzienkach znajduje się produkt PCR dla DNA wyizolowanego z puchu gęszego w ilości 100% (1–5), 10% (6–10), 1% (11–15), 0,09% (16–20), PTC, NTC, M – marker wielkości 25 pz

Fig. 3. Identification of goose down. Electrophoretic separation of PCR products across the method range. Successive lanes contain PCR product for DNA isolated from goose down in amounts of 100% (1–5), 10% (6–10), 1% (11–15), 0.09% (16–20), PTC, NTC, M – 25 bp marker



Fot. 4. Identyfikacja puchu kaczki. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR w całym zakresie działania metody. W kolejnych studzienkach znajduje się produkt PCR dla DNA wyizolowanego z puchu kaczego w ilości 100% (1–5), 10% (6–10), 1% (11–15), 0,09% (16–20), PTC, NTC, M – marker wielkości 25 pz

Fig. 4. Identification of duck down. Electrophoretic separation of PCR products across the method range. Successive lanes contain PCR product for DNA isolated from duck down in amounts of 100% (1–5), 10% (6–10), 1% (11–15), 0.09% (16–20), PTC, NTC, M – 25 bp marker



Fot. 5. Zależność czułości metody od miejsca pozyskiwania DNA i rasy. W kolejnych studzienkach znajduje się produkt PCR dla DNA wyizolowanego z piór kaczki rouen (kR), kaczki pekin (kP), gęsi china sage (gSG) i gęsi białej kołudzkiej (gB), (d) – DNA pozyskane z dutków, (p) – DNA pozyskane z puchu, M – marker wielkości 25 pz

Fig. 5. Relationship of method sensitivity with DNA acquisition site and breed. Successive lanes contain PCR product for DNA isolated from the feathers of Rouen duck (kR), Pekin duck (kP), China Sage goose (gSG) and White Kołuda goose (gB), (d) – DNA obtained from quills, (p) – DNA obtained from down, M – 25 bp marker

Czułość prezentowanych metod była uzależniona od rodzaju materiału, z którego pozyskiwano DNA. Wyższą czułość zaobserwowano dla reakcji wykonywanej na DNA otrzymanego z dutki niż z puchu (fot. 5). Ponadto czułość metody identyfikacji puchu gęsi była taka sama niezależnie od rasy osobnika, od którego pozyskano ma-

teriał, natomiast dla kaczki czułość była zróżnicowana w zależności od gatunku. Dla kaczki rouen jest niższa od wcześniej ustalonej (dla rasy pekin) czułości na poziomie 0,1%.

Omówienie wyników

Tematyka identyfikacji gatunkowej drobiu jest zagadnieniem bardzo często poruszonym w ostatnich latach. Opisane w literaturze metody, wykorzystujące różnice w sekwencjach mitochondrialnego DNA, wskazują możliwość wykrycia przynależności gatunkowej mięsa i pierza ptaków (Martin i in., 2007; Bottero i Dalmasso, 2011; Okuma i Hellberg, 2015).

Powody podejmowania tego typu badań są wielorakie, ale na czoło wysuwają się trzy: kontrola autentyczności produktów spożywczych – najczęściej mięsa i jaj (Ardura i in., 2010), zapobieganie nielegalnemu przywozowi chronionych gatunków oraz identyfikacja okazów muzealnych (Speller i in., 2011; White i in., 2012).

Nieco nowszym zagadnieniem jest fałszowanie puchu używanego do wypełnień odzieży czy kołder. Z tego względu podjęto badania mające na celu opracowanie metody rozróżnienia gatunkowego puchu kaczki od puchu gęsi. Oznaczenie zrealizowano przy zastosowaniu reakcji PCR, wykorzystując różnice w sekwencji fragmentu genomu (12srRNA i d-loop) identyfikowanych gatunków.

Zastosowana metoda ekstrakcji, wykorzystująca zjawisko osadzania DNA na kolumienkach, jest rutynowym sposobem pozyskiwania DNA z piór (Boonseub i in., 2012). Przy izolacji DNA innymi metodami otrzymywano produkt o zbyt dużej degradacji, co w znacznej mierze uniemożliwia dalszą analizę (Rudnicki i in., 2007).

Opracowane metody identyfikacji puchu kaczki i gęsi są specyficzne gatunkowo – wykorzystywane w każdej z nich startery przyłączają się jedynie do sekwencji docelowych gatunków, dla których zostały zaprojektowane, natomiast nie wchodzą w reakcje krzyżowe z DNA innych gatunków ptactwa domowego.

Zakres działania metody był bardzo szeroki i obejmował przedział od granicy oznaczalności LOD do 100% puchu czy piór. Granica oznaczalności wynosi 0,1%, co przekłada się na $1,5 \times 10^{-5}$ g materiału wyjściowego.

Ilość materiału wyjściowego, niezbędnego do otrzymania wystarczającej ilości DNA o odpowiedniej jakości, jest ważnym wskaźnikiem czułości opracowywanej metody. W tym przypadku, podobnie jak w innych metodach opartych na PCR, wystarczy tylko jeden promień pióra (Boonseub i in., 2012). Konkludując, pióro ptaków może być dobrym źródłem DNA dla potrzeb technik PCR.

Na uwagę zasługuje fakt różnej intensywności produktów reakcji PCR związany z czułością testu. Metoda identyfikacji DNA gęsiego cechowała się większymi możliwościami ze względu na zastosowanie starterów o 100% homologii do kilku ras tego gatunku. W przypadku kaczek zaobserwowano różnice w sekwencji nukleotydowej poszczególnych ras, co znacznie skomplikowało wybór starterów. Spowodowało to konieczność wyboru starterów, które będą wykazywały jak największe podobieństwo do sekwencji kilku ras, jednak do żadnej rasy w 100%. Takie podejście z jednej strony zwiększa skuteczność analizy, niwelując wpływ rasy kaczki, ale z drugiej strony obni-

za jej czułość, ponieważ jest ona uzależniona od różnic w sekwencji DNA. Niemniej jednak czułość identyfikacji tkanek kaczki rouen jest na tyle wysoka aby umożliwić oznaczenie 15µg pierza / puchu tej rasy.

Podsumowując, opracowane metody pozwalają na określenie przynależności gatunkowej piór kaczek i gęsi i mogą stanowić skuteczne narzędzie w walce z nadżyciami związanymi z produkcją i wykorzystaniem pierza.

Podziękowania

Autorzy pracy dziękują Panu Kotaro Tatsuma za propozycję ciekawego tematu badań oraz dostarczenie materiału do jego realizacji.

Piśmiennictwo

- Ali M.E., Razzak M.A., Hamid S.B.A. (2014). Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects – a review. *Food Anal. Method.*, 7 (10): 1933–1949.
- Ardura A., Linde A.R., Moreira J.C., Garcia-Vazquez E. (2010). DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biol. Conserv.*, 143 (6): 1438–1443.
- Bartkovich M.M., Wang Y., Zhengwang Z., Pengcheng W. (2014). Examination and comparison of molecular sexing protocols for two songbird species in China – evaluation of DNA extraction kits, primers, and feather age. *Research & Trip Reports May-July 2014*, 156
- Boonseub S., Johnston G., Linacre A. (2012). Identification of protected avian species using a single feather barb. *J. Forensic Sci.*, 57 (6): 1574–1577.
- Bottero M.T., Dalmasso A. (2011). Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet. J.*, 190 (1): 34–38.
- Doosti A., Dehkordi P.G., Rahimi E. (2014). Molecular assay to fraud identification of meat products. *J. Food Sci. Tech.*, 51 (1): 148–152.
- Hou B., Meng X., Zhang L., Guo J., Li S., Jin H. (2015). Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. *Meat Sci.*, 101: 90–94.
- Lanzilao I., Burgalassi F., Fancelli S., Settimelli M., Fani R. (2005). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial *cytb* gene from species of dairy interest. *J. AOAC Int.*, 88 (1): 128–135.
- Martín I., García T., Fajardo V., López-Calleja I., Rojas M., Pavón M.A., Martín R. (2007). Technical note: detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.*, 85 (2): 452–458.
- Okuma T.A., Hellberg R.S. (2015). Identification of meat species in pet foods using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. *Food Control*, 50: 9–17.
- Rudnick J.A., Katzner T.E., Bragin E.A., DeWoody J.A. (2007). Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers. *Mol. Ecol. Notes*, 7: 757–762.
- Speller C.F., Nicholas G.P., Yang D.Y. (2011). Feather barbs as a good source of mtDNA for bird species identification in forensic wildlife investigations. *Invest. Gen.*, 2: 1–16.
- White N.E., Dawson R., Coghlan M.L., Tridico S.R., Mawson P.R., Haile J., Bunce M. (2012). Application of STR markers in wildlife forensic casework involving Australian black-cockatoos (*Calyptorhynchus* spp.). *Forensic Sci. Int., Genetics*, 6 (5): 664–670.

MAŁGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA, PIOTR KRZYŚCIN,
MONIKA BUGNO-PONIEWIERSKA

The use of mtDNA polymorphism to differentiate duck and goose down

SUMMARY

To date, no synthetic material has been produced to match natural down for insulating power and resilience. Down filling allows humans to maintain optimum body temperature and effective moisture absorption. Depending on the application, manufacturers use goose down alone or mixed with duck down in different proportions. For economic reasons, there is a risk that the down filling is adulterated with undeclared addition of, for example, duck down. Therefore, this issue is of great importance for the control of down fillings used as a natural heat insulation.

This paper presents a method for species identification of duck and goose down, based on selective PCR amplification of species-specific fragments of 12S rRNA and d-loop mtDNA. The proposed method is species specific and allows for repeatable results across the range. The scope of the method is very wide, from 0.1% down adulteration to 100%. It is sensitive enough to detect 15 µg of down.

It is worth noting that the sensitivity varied depending on the fragment of feathers subjected to analysis, with better sensitivity obtained for the quills than for down. In addition, the sensitivity of the goose down identification method was the same for all breeds, but duck sensitivity varied according to the breed, being lower for Rouen than for Pekin ducks.

The developed methods are an effective tool to check the reliability of the producers of down and feathers.

Key words: species identification of down, mtDNA, duck down, goose down