

Katedra Hodowli Amatorskich i Zwierząt Dzikich Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
20-950 Lublin, ul. Akademicka 13  
e-mail: mirosław.karpinski@up.lublin.pl

\*Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
20-612 Lublin, ul. Głęboka 30

MIROŚLAW KARPIŃSKI, ŁUKASZ ADASZEK\*, LESZEK DROZD,  
STANISŁAW WINIARCZYK\*, PIOTR CZYŻOWSKI

**Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych  
mitochondrialnego DNA u sarny (*Capreolus capreolus*)**

Restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial DNA  
in roe deer (*Capreolus capreolus*)

**Streszczenie.** Celem badań było oszacowanie parametrów genetycznych dwóch subpopulacji saren (*Capreolus capreolus*), na podstawie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych mitochondrialnego genu oksydoreduktazy cytochromowej b. Materiałem do badań było DNA z wycinków mięśni pobieranych z dwóch populacji sarny (*Capreolus capreolus*) pochodzących z Nadleśnictwa Białobrzegi i Zwierzyniec. W celu określenia różnic genetycznych pomiędzy dwoma populacjami wykonano reakcję PCR z użyciem starterów L14735, H15149 i porównano sekwencje nukleotydów uzyskanych amplikonów o długości 464 par zasad. Jednocześnie przeprowadzono analizę statystyczną fragmentów restrykcyjnych (RFLP) dla trzech loci, wykorzystując endonukleazy *HaeIII*, *HincII*, *SspI* w obu badanych populacjach dzikich przeżuwaczy. Na podstawie frekwencji alleli wyliczono heterozygotyczność H (0,533–0,764), indeks stopnia polimorfizmu PIC (0,375–0,661) oraz standardowy dystans genetyczny Ds (0,0094). Wykorzystując sekwencje nukleotydów, stworzono drzewo filogenetyczne ilustrujące zróżnicowanie genetyczne w badanych populacjach sarny. Badanie frekwencji alleli uzyskanych w metodą RFLP wykazało, że najbardziej polimorficznym spośród trzech loci wytypowanych do oceny zmienności genetycznej sarny jest locus *Ssp I*.

**Słowa kluczowe:** sarna, polimorfizm, mt-DNA, RFLP

WSTĘP

Każdą populację zwierząt wolno żyjących tworzy system subpopulacji związanych z określonymi warunkami ekologicznymi lub geograficznymi. Obszar i sposób rozprzestrzeniania się zwierząt mają często charakter wyspowy, a między poszczególnymi

subpopulacjami istnieją przestrzenie niezasiedlone przez osobniki danego gatunku. Analiza genetycznego zróżnicowania i wyjaśnienie mechanizmów rozprzestrzeniania się zwierząt są możliwe poprzez zastosowanie odpowiednich parametrów charakteryzujących rozpatrywane populacje. W tym celu do niedawna wykorzystywano cechy morfologiczne osobników wchodzących w ich skład, jednak modyfikujący wpływ środowiska powodował, że wyniki tych badań, mimo że uzyskane na bardzo dużym liczebnie materiale, nie były wiarygodne. Zróżnicowanie genetyczne między subpopulacjami w obrębie określonego gatunku można określić na podstawie polimorfizmu wybranych białek (markery klasy I). Jednak u zwierząt wolno żyjących (dzikich) jest to praktycznie niemożliwe ze względu na trudności z uzyskaniem materiału do badań, czyli krwi. W badaniach ewolucyjnych czy filogenetycznych analizie poddaje się całkowitą sekwencję mitochondrialnego DNA (mtDNA) lub wybrane geny wchodzące w jego skład. Dość często do określania różnic i podobieństw pomiędzy indywidualnymi osobnikami, jak i populacjami wykorzystuje się sekwencje nukleotydów cytochromu b [Matsunaga i in. 1998, Kuwayama i Ozawa 2000]. Zaletą badań opierających się na analizie kwasów nukleinowych jest to, że cząsteczki DNA mogą być otrzymane niemal z każdej tkanki, np. mięśnia, kawałków skóry, cebulek włosa itp.

Celem badań było oszacowanie parametrów genetycznych subpopulacji saren (*Capreolus capreolus*) pochodzących z terenów Nadleśnictwa Zwierzyniec i Białobrzegi na podstawie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych mitochondrialnego genu oksydoreduktazy cytochromowej b.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na próbkach tkanki mięśniowej pobranych od 16 saren pozyskanych w dwu łowiskach: 8 (I–8) w Nadleśnictwie Zwierzyniec i 8 (I–VIII) w Nadleśnictwie Białobrzegi. Próbki pobierano z przepony za pomocą jałowego, jednorazowego skalpela, umieszczano w plastikowych woreczkach ze strunowym zamknięciem, transportowano w chłodni i poddawano głębokiemu mrożeniu w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Izolacja DNA.** Genomowy DNA przeznaczony do analizy ekstrahowano z 10-20 mg rozmrożonej tkanki mięśniowej. Izolację DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega).

**Reakcja PCR.** Amplifikacji poddano odcinek mitochondrialnego DNA (gen tRNA Glu/ podjednostka oksydoreduktazy cytochromowej). Zastosowane startery L14735 (5'-aaa aac cac cgt tgt tat tca act-3') i H15149 (5'-gcc cct cag aat gat att tgt cct ca-3') umożliwiały amplifikację fragmentu podjednostki cytochromu b o długości 464 pz [Charon i Świtoński 2000]. Mieszanina reakcyjna zawierała: 23,5  $\mu\text{l}$  wody, 5  $\mu\text{l}$  10x PCR bufor (Qiagen), 5  $\mu\text{l}$  dNTP's (10 mM, Qiagen), 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM, Qiagen), starter L14735 1,5  $\mu\text{l}$  (10 pmol/ $\mu\text{l}$ , DNA Gdańsk), starter H15149 1,5  $\mu\text{l}$  (10 pmol/ $\mu\text{l}$ , DNA Gdańsk) oraz Taq polimerazę w ilości 0,5  $\mu\text{l}$  (1 jednostka, Qiagen). Mieszaninę reakcyjną zwirowywano i dodawano 5  $\mu\text{l}$  DNA uzyskanego po ekstrakcji z tkanki mięśniowej. Reakcja PCR wykonana w termocyklerze (Biometra) składała się z wstępnej denaturacji w  $96^{\circ}\text{C}$  przez 3 min, po której następowało 40 cykli, w których faza denaturacji przebiegała w temperaturze  $96^{\circ}\text{C}$ , przez 30 s, faza wiązania i wydłużania starterów w  $65^{\circ}\text{C}$  przez 60 s, oraz jednego cyklu końcowego wydłużania starterów w temperaturze  $72^{\circ}\text{C}$ .

przez 3 godz. Wielkość uzyskanego amplikonu oceniano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny, porównując z markerem masowym 100 bp ladder (Gibco).

**Sekwencjonowaniu** poddano wszystkie uzyskane produkty PCR. Po zakończeniu amplifikacji zostały one oczyszczone na złożach w kolumnkach wirówkowych z zestawu Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen). Sekwencjonowanie wykonano z użyciem tych samych starterów jak w reakcji PCR, w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN (ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit) w Warszawie. Analizę uzyskanych sekwencji i interpretację nieodczytanych automatycznie nukleotydów przeprowadzono w programie Chromas. Homologię uzyskanych w ten sposób sekwencji z sekwencjami zawartymi w bazie danych Genbank określono za pomocą programu BLAST, NCBI (National Centre for Biotechnology Information) [Brodmann i in. 2001].

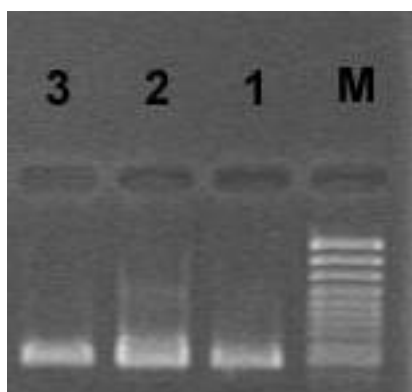
**Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP).** Uzyskany produkt PCR trawiono, wykorzystując następujące enzymy restrykcyjne: *HincII*, *HaeIII* i *SspI*. W tym celu, po zakończeniu amplifikacji, dodawano do 17 µl mieszaniny reakcyjnej PCR, 1 µl enzymu (10 jednostek), 2 µl odpowiedniego buforu i inkubowano w 37°C przez 2 godziny. Liczbę uzyskanych fragmentów restrykcyjnych określano podczas ich rozdziału elektroforetycznego w 2,5% żelu agarozowym. Ich wielkość określano wstępnie porównując z markerem masowym 100 bp ladder (Gibco), natomiast dokładne obliczenia wykonano na podstawie analizy amplifikowanych sekwencji w programie komputerowym Chromas.

**Parametry zmienności genetycznej wewnątrz i między populacjami.** W celu oszacowania podstawowych parametrów genetycznych badanej populacji wyliczono wskaźnik heterozygotyczności (H) i stopień polimorficzności (PIC), stosując ogólnie przyjęte metody obliczeń [Charon i Świtoński 2000]. Dystans genetyczny określono za Neiem [1972].

## WYNIKI I OMÓWIENIE

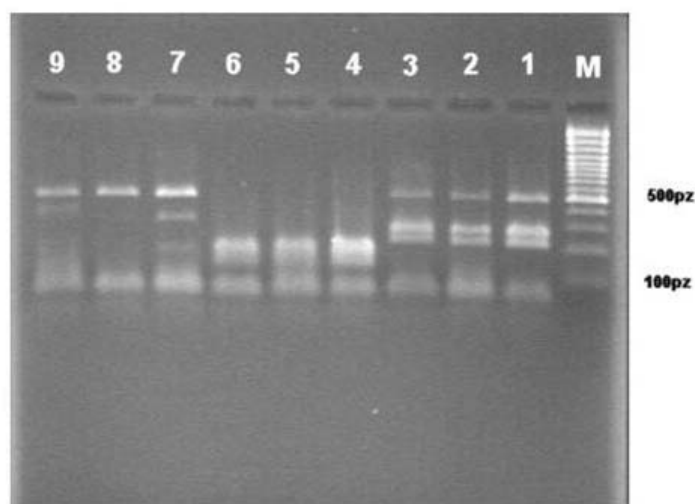
Amplifikacja materiału genetycznego wyekstrahowanego z mięśni 16 badanych saren przy użyciu starterów L14735 i H15149 pozwoliła na uzyskanie 16 produktów PCR, o długości 464 par zasad (rys. 1).

W celu określenia polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych otrzymanych produktów amplifikacji trawiono je endonukleazami *HincII*, *HaeIII* i *SspI* i rozdzielano elektroforetycznie (rys. 2) oraz analizowano ich sekwencje w programie Chromas. Trawienie produktów PCR endonukleazą *HincII* powodowało pojawienie się jednolitego w obu populacjach wzoru elektroforetycznego złożonego z dwu fragmentów, których wielkość odczytana w programie Chromas wynosiła 209 i 255 par zasad. Przy endonukleazie *HaeIII* produkty PCR pochodzące z obu populacji saren były cięte na trzy także jednokowe fragmenty o wielkości: 114, 159 i 179 pz. Natomiast wzór elektroforetyczny produktów PCR pochodzących od zwierząt z Nadleśnictwa Zwierzyniec i Białobrzegi trawionych *SspI* składał się w obu przypadkach z 5 fragmentów o długości 114, 161, 162, 188 i 302 pz dla pierwszej z rozpatrywanych populacji saren oraz 114, 161, 162, 189 i 302 pz dla drugiej z nich. Różnice w wielkości alleli między obiema badanymi populacjami po



Rys. 1. Elektroforeza w 1,5% żelu agarozowym produktów PCR cytochromu b mtDNA saren, o długości 464 par zasad. Ścieżki: M – marker masowy; 1, 2, 3 – produkty PCR uzyskane w reakcji amplifikacji DNA izolowanego z tkanki mięśniowej badanych osobników

Fig. 1. Roe deer cytochrome b mtDNA gene (product size 464 bp) electrophoresis in 1.5% agarose gel. Lanes: M – molecular weight marker, 1, 2, 3 – PCR products after amplification of DNA from muscle tissue samples taken from examined animals



Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny (żel 2,5%) ampliconów uzyskanych w badaniach własnych, trawionych endonukleazami *Hinc II*, *Hae III* i *Ssp I*. Ścieżki: M – marker masowy, 1, 2, 3 – próbki trawione enzymem *Hae III*; 4, 5, 6 – próbki trawione enzymem *Hinc II*, ścieżki 7, 8, 9 – próbki trawione enzymem *Ssp I*

Fig. 2. Electrophoresis (2.5% gel) of amplicons obtained in the study, digested with *Hinc II*, *Hae III* and *Ssp I* endonucleases. Lanes: M – molecular weight marker, 1, 2, 3 – amplicons digested with *Hae III*, 4, 5, 6 – amplicons digested with *Hinc II*, 7, 8, 9 – amplicons digested with *Ssp I*

trawieniu produktów PCR endonukleazą *SspI* spowodowane były przesunięciem miejsca cięcia dla tego enzymu w populacji z Białobrzegów o jeden nukleotyd, w następstwie czego w badaniach uzyskiwano fragmenty DNA o długości 189 i 161 pz, a nie jak w przypadku populacji ze Zwierzyńca o długości 188 i 162 pz:

#### Populacja ze Zwierzyńca

```
AAAAACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAACTCTAATGACCAATATCC
GAAAAACTCACCCACTAATAAAAAATTGTAAATAACGCATTCATTGATCTCCC
AGCCCCATCAAATattTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATCTG
TCTAATCTTACAAATCCTTACAGGCCTATTCCTAGCAATACACTACACATCCG
ACACAATAACAGCATTCTCCTCTGTCACTCACATCTGCCGAGACGTAACTA
TGGCTGAATTATCCGATATACATGCAAACGGAGCATCaatattTTTCATCTGC
TTATTCCTACATGTAGGACGAGGCCTATATTATGGATCTTACACTTTTCTAGA
GACATGAAACATTGGAGTAATTCTCCTATTCACAGTAATAGCCACGGCATTG
GTAGGATACGTTTTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGC
```

114 pz

188 pz

162 pz

#### Populacja z Białobrzegów

```
AAAAACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAACTTTAATGACCAATATCCG
AAAAACTCACCCACTAATAAAAAATTGTAAATAACGCATTCATTGATCTCCCA
GCCCCATCAaatATTTTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATCTGT
CTAATCTTACAAATCCTTACAGGCCTATTTCTAGCAATACACTACACATCCGA
CACAATAACAGCATTCTCCTCTGTTACTCACATCTGCCGAGACGTAACTATG
GCTGAATTATCCGATACATACATGCAAACGGAGGCATCAATattTTTCATCTGC
TTATTCCTCATGTAGGACGAGGCCTATATTATGGATCTTACACTTTTCTAGAG
ACATGAAACATTGGAGTAATTCTCCTATTCACAGTAATAGCCACGGCATTG
TAGGGTACGTTTTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGC
```

114 pz

189 pz

161 pz

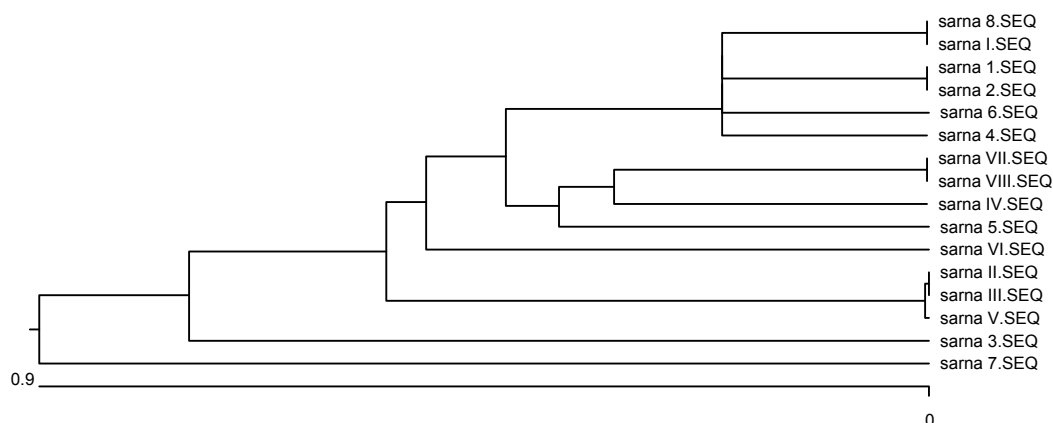
W sumie u badanych saren zidentyfikowano 2 allele dla *HincII*, 3 allele dla *HaeIII* i 6 alleli dla *SspI*.

Obliczone współczynniki heterozygotyczności (H) i indeksu stopnia polimorfizmu (PIC) (tab. 1) w obrębie populacji ze Zwierzyńca wynosiły dla *HaeIII*, *HincII* i *SspI* odpowiednio 0,718, 0,533, 0,763 i 0,602, 0,375, 0,661. Natomiast w populacji z Białobrzegów wynosiły odpowiednio 0,718, 0,533, 0,764 oraz 0,602, 0,375, 0,064. Dysponując wartościami frekwencji oraz współczynników heterozygotyczności i indeksu stopnia polimorfizmu, obliczono dystans genetyczny pomiędzy badanymi populacjami sarny, który wynosił 0,0094.

Tabela 1. Współczynnik heterozygotyczności (H), indeks stopnia polimorfizmu (PIC) dla badanych fragmentów restrykcyjnych u saren pochodzących z Nadleśnictw Zwierzyniec i Białobrzegi  
 Table 1. Heterozygosity (H) and polymorphic information content (PIC) of examined restriction fragments from roe dears from the Forest Inspectorate Białobrzegi and Zwierzyniec

Pochodzenie saren (Nadleśnictwo)	Endonukleaza restrykcyjna	Wielkość identyfikowanych alleli (pz)	Współczynnik heterozygotyczności (H)	Indeks stopnia polimorfizmu (PIC)
Zwierzyniec 407	<i>Hae III</i>	114–159–179	0,718	0,602
	<i>Hinc II</i>	209–255	0,533	0,375
	<i>Ssp I</i>	114–161–162–188–302	0,763	0,661
Białobrzegi 50	<i>Hae III</i>	114–159–179	0,718	0,602
	<i>Hinc II</i>	209–255	0,533	0,375
	<i>Ssp I</i>	114–161–162–189–302	0,764	0,064

W celu określenia wewnątrzgatunkowych związków filogenetycznych pomiędzy badanymi sarnami, sekwencje amplifikowanego genu oksydoreduktazy cytochromowej mtDNA zostały zestawione w programie DNASTAR metodą Clustal. Stopień homologii pomiędzy poszczególnymi sekwencjami fragmentów mitochondrialnego DNA, którego graficznym przedstawieniem jest drzewo filogenetyczne (rys. 3) był stosunkowo wysoki i wahał się w przedziale 96,3–100%.



Rys. 3. Drzewo filogenetyczne badanych saren  
 Fig. 3. Phylogenetic tree of examined roe dears

Naturalnie występująca zmienność nukleotydów w DNA, tak zwany polimorfizm, który nie zawsze ma swoje odzwierciedlenie w cechach fenotypowych, jest wykorzystywana jako marker dla danego DNA. Niejednokrotnie osobniki o tych samych cechach fenotypowych różnią się znacznie na poziomie genotypowym. Polimorfizm DNA może być wykorzystany nie tylko do charakteryzowania danej populacji, ale również do śledzenia sposobu dziedziczenia się określonych genów w danej populacji.

W badaniach własnych liczba i rozmieszczenie swoistych sekwencji rozpoznawanych przez endonukleazy *HincII* i *HaeIII* w amplifikowanym fragmencie cytochromu b była taka sama u wszystkich badanych saren, niezależnie od miejsca ich pochodzenia. Sugeruje to możliwość zastosowania uzyskanego profilu restrykcyjnego do identyfikacji tego gatunku zwierząt np. w dochodzeniu sądowym przy określaniu przynależności gatunkowej próbek krwi, kości i innych tkanek lub wykrywaniu zafałszowań produktów wędliniarskich [Murray i in. 1995, Roed i Midthjell 1998, Roed 1998]. Natomiast restryktaza *SspI* bardziej nadaje się do określania zróżnicowania genetycznego w obrębie populacji saren. O ile w przypadku dwóch pierwszych endonukleaz produkty trawienia ampliconów uzyskanych w badaniach własnych pochodzących od saren ze Zwierzyńca i Białobrzegów charakteryzowała identyczna wielkość, to w przypadku endonuleazy *SspI* wielkość produktów trawienia DNA można było skorelować z miejscem pochodzenia zwierząt.

W podobnie przeprowadzonych badaniach szwajcarskich nad *Capreolus capreolus* [Wolf i in. 1999] z wykorzystaniem metody PCR-RFLP przy zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *HaeIII* uzyskano 3 allele o wielkości od 126 do 179 pz z powtarzającym się fragmentem 159 pz. W badaniach własnych przy enzymie *HaeIII* allel o wielkości 159 pz występował u każdego badanego osobnika, natomiast wielkość pozostałych identyfikowanych alleli wahała się od 114 do 179 pz. Przy enzymie restrykcyjnym *HincII* uzyskiwano 2 allele, których wielkość w badaniach szwajcarskich była identyczna jak w badaniach własnych, wynosiła 209 i 255. Zarówno w badaniach szwajcarskich, jak i własnych największe zróżnicowanie w wielkości alleli wystąpiło po zastosowaniu enzymu *SspI*. O ile w badaniach szwajcarskich uzyskiwano 3 allele, to w badaniach własnych było 5 alleli o wielkości: 114, 161, 162, 188, 302 w populacji ze Zwierzyńca i 114, 161, 162, 189, 302 w populacji z Białobrzegów, co świadczy o większym zróżnicowaniu genetycznym populacji z badanego obszaru.

Fickel i Reinsch [2000] zajmowali się polimorfizmem DNA sarny europejskiej (*Capreolus capreolus*). W grupie 20 badanych osobników indeks stopnia polimorfizmu PIC dla 7 loci wahał się od 0,354 do 0,753. W uzyskanych wynikach badań własnych dla 3 loci u 16 osobników wahał się w granicach 0,788–0,914. Współczynnik heterozygotyczności H w badaniach Fickela wynosił od 1,000 do 0,500. W badaniach własnych był on nieco niższy od 0,533 do 0,764.

Badania nad polimorfizmem DNA u jeleniowatych prowadzone przez Polziehna i in. [2001] na populacjach kanadyjskich jeleni wapiti (*Cervus elaphus*) wykazały standardowy dystans genetyczny (Ds) pomiędzy badanymi populacjami w zakresie od 0,6947 do 0,0434. W badaniach własnych Ds pomiędzy populacjami sarny z Nadleśnictwa Zwierzyniec i Białobrzegi miał wartość 0,0094. Współczynnik heterozygotyczności u skandynawskich jeleniowatych wahał się od 0,09 do 0,78 u łosia, od 0,13 do 0,70 u jelenia, od 0,12 do 0,65 u sarny [Roed i Midthjell 1998, Roed 1998, Poetsch i in. 2001].

Reasumując, istnieje możliwość wykorzystania analizy sekwencji nukleotydowych mitochondrialnego cytochromu b oraz jego fragmentów restrykcyjnych w badaniu polimorfizmu DNA populacji sarny. Porównanie zmienności mitochondrialnego DNA jest ponadto bardzo czułą metodą stosowaną obecnie w badaniach nad filogeografią, dziedziną zajmującą się mechanizmami rządzącymi geograficznym rozmieszczeniem subpopulacji w obrębie jednego gatunku [Polziehn i Strobeck 2001]. Dotychczasowe próby odróżnienia subpopulacji saren na podstawie oceny cech morfologicznych opartych

na pomiarach biometrycznych czaszek tych zwierząt nie pozwoliły na uzyskanie zadowalających wyników [Karpiński i Drozd 2000], co dodatkowo skłania do wykorzystywania dla potrzeb filogeografii technik biologii molekularnej.

Analiza filogenetyczna sekwencji cytochromu b wskazuje także na istnienie korytarza ekologicznego pomiędzy kompleksami leśnymi makroregionu północno-wschodniej i południowo-wschodniej Polski. Badanie frekwencji alleli uzyskanych w metodzie RFLP wykazało, że najbardziej polimorficznym spośród trzech loci wytypowanych do oceny zmienności genetycznej sarny jest locus *SspI*. Wyliczony standardowy dystans genetyczny (0,0094) między sarnami pochodzącymi z Nadleśnictwa Zwierzyniec i Nadleśnictwa Białobrzegi świadczy o niewielkim zróżnicowaniu genetycznym.

#### PIŚMIENNICTWO

- Brodmann P. D., Nicholas G., Schaltenbrand P., Ilg E. C. 2001. Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 491–496.
- Charon K., M., Świtoński M. 2000. *Genetyka zwierząt*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Fickel J., Reinsch A. 2000. Microsatellite markers for the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Molec. Ecol.* 9, 993–1011.
- Karpiński M., Drozd L. 2000. Charakterystyka zmian kości żuchwy dzikich przeżuwaczy w obrazie rentgenowskim. *Medycyna Wet.* 56, 185–189.
- Kuwayama R., Ozawa T. 2000. Phylogenetic relationships among european red deer, wapiti and sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molec. Phylogen. Evol.* 1, 115–123.
- Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Nakai H., Shibata K., Yamada J., Shinmura Y. 1998. Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. *Meat Sci.* 49, 379–385.
- Murray, B. W., McClymont R. A., Strobeck C. 1995. Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *J. Forensic Sci.* 40, 943–951
- Nei M. 1972. Genetic distances between populations. *Am. Naturalist.*, 106, 283–292.
- 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. *Forensic Sci. Int.* 116, 1–8.
- Polziehn R. O., Strobeck C. 2001. A phylogenetic comparison of red deer and wapiti using mitochondrial DNA. *Molec. Phylogen. Evol.* 2, 1065–1080.
- Roed K. H., Midthjell L. 1998. Microsatellites in reindeer, Rangifer tarandus, and their use other cervids. *Molec. Ecology* 7, 1771–1788.
- Roed K. H. 1998. Microsatellite variation in Scandinavian Cervidae using primers, derived from Bovidae. *Hereditas* 129, 19–25.
- Wolf Ch., Rentsch J., Hiibner F. 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chero.* 47, 1350–1355.

**Summary.** The aim of this study was to estimate the basic genetic parameters of the studied sub-population of roe deer (*Capreolus capreolus*) based on restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial DNA. The material for the investigation was collected from two populations of roe deer (*Capreolus capreolus*) coming from The Forest Inspectorate Białobrzegi and Zwierzyniec. To determine the genetic differences between these two populations of roe deer the PCR analysis with the primer pair L14735, H15149 was applied and the comparison of nucleotide



sequences of the obtained amplicons of 464 pair in length was made. At the same time, the restriction fragments (RFLP) were analysed statistically for three loci using endonucleases *HaeIII*, *HinII*, *SspI* in both studied wild ruminant populations. From the allele frequencies the following were estimated: heterozygosity-H (0.533–0.764), polymorphic information content-PIC (0.375–0.661) and standard distance Ds (0.0094). Using the nucleotide sequences there was developed a phylogenetic tree illustrating genetic diversity within the roe deer populations under investigation. The researches on allele frequencies obtained after the RFLP method proved locus *SspI* to be the most polymorphic among the three loci selected for genetic variation estimation in roe deer.

**Key words:** roe deer, mt-DNA, RFLP