

## **Ocena polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych DNA wykorzystywanych w kontroli rodowodów bydła w Polsce**

**Anna Radko**

*Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy,  
Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

**P**rawidłowo prowadzona dokumentacja zootechniczna, zawierająca dane rodowodowe zwierząt jest podstawowym czynnikiem, wywierającym istotny wpływ na realizację programów hodowlanych i proces doskonalenia zwierząt gospodarskich. Od lat 60. działa w Polsce system kontroli rodowodów i identyfikacji bydła na podstawie grup krwi. Dane rodowodowe bydła potwierdza się w oparciu o antygeny 12 układów grupowych, wykorzystując ponad 80 surowic testowych. Prawdopodobieństwo wykluczenia rodzicielstwa na podstawie polimorfizmu antygenów erytrocytarnych wynosi 98% (Holm i Bendixen, 1996). W stadach bydła o podwyższonym współczynniku inbredu dochodzi do zwiększenia homozygotyczności i ograniczenia puli genowej. W tej sytuacji ustalenie ojcostwa na podstawie badania serologicznego jest często utrudnione lub wręcz niemożliwe. W takich przypadkach, obok grup krwi, wykorzystywane są sekwencje mikrosatelitarne DNA (Holm i Bendixen, 1996; Heyen i in., 1997; Radko i in., 2002).

Sekwencje mikrosatelitarne DNA są to krótkie, od 1- do 5-nukleotydowe tandemowe powtórzenia, występujące w genomach eukariotów z dość dużą częstością i rozmieszczone równomiernie co 6–10 kbp (Beckmann i Weber, 1992; Tautz, 1989). U bydła sekwencje mikrosatelitarne opisali w 1990 roku Fries i in. (1990). Dotychczas w genomie bydła zidentyfikowano ponad dwa tysiące sekwencji mikrosatelitarnych (<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap/intro.pl>), które ze względu na wysoki stopień polimorfi-

zmu oraz stosunkowo łatwą i szybką identyfikację stały się ostatnio najliczniejszą klasą markerów genetycznych, stosowanych zarówno w badaniach teoretycznych, jak i bezpośrednio związanych z hodowlą zwierząt gospodarskich (Arranz i in., 1996; Peelman i in., 1998; Janik i in., 2001; Radko i Duniec, 2002). Wysoko polimorficzne sekwencje mikrosatelitarne DNA znalazły szczególne wykorzystanie w kontroli pochodzenia. W pracach nad określeniem przydatności poszczególnych sekwencji mikrosatelitarnych do kontroli pochodzenia ważne jest określenie prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa (PE). Według danych Holma i Bendixena (1996), prawdopodobieństwo prawidłowego wykluczenia ojcostwa za pomocą testu molekularnego 6 sekwencji mikrosatelitarnych jednocześnie wynosi 0,99, a za pomocą 11 układów grupowych krwi 0,98. Porównanie to wskazuje, że zastosowanie testu molekularnego jest znacznie efektywniejszą i dokładniejszą techniką od konwencjonalnego badania grup krwi.

Wykorzystanie zestawu wysokopolimorficznych mikrosatelitarnych loci i zastosowanie reakcji PCR-multiplex do ich amplifikacji oraz automatyczna analiza genotypów w sekwenatorach DNA dają blisko stuprocentowe prawdopodobieństwo wykluczenia rodzicielstwa oraz zapewniają powtarzalność otrzymywanych wyników.

W wielu ośrodkach naukowych na świecie prowadzono badania nad opracowaniem jednolitego testu molekularnego umożliwiającego kontrolę pochodzenia w oparciu o standar-

dowy zestaw mikrosatelitów. Na XXV Konferencji Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Zwierząt (ISAG) w 1996 roku zalecono, by kontrola pochodzenia u bydła, prowadzona dotychczas w oparciu o grupy krwi, została poszerzona o analizę polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA, a w 1998 roku na XXVI Konferencji ISAG zalecono by 6 mikrosatelitarnych loci: BM2113, BM1824, SPS115, TGLA227, TGLA126 i TGLA122 stanowiło minimalny zestaw markerów wykorzystywany do kontroli pochodzenia u bydła. W 2000 roku zestaw ten rozszerzono o trzy kolejne markery: ETH10, ETH225 i INRA23. Obecnie, minimalną ilość markerów zaleczanych przez ISAG stanowi zestaw 9 następujących mikrosatelitów: BM2113, BM1824, ETH10, ETH225, INRA23, SPS115, TGLA227, TGLA126, TGLA122.

W Instytucie Zootechniki-PIB do kontroli rodowodów bydła, przeprowadzanej na podstawie analizy DNA, wykorzystywanych jest obecnie 11 markerów mikrosatelitarnych DNA: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824. Analiza taka wydaje się niezbędna, ponieważ w najbliższej przyszłości kontrola rodowodów, badanie struktury genetycznej ras oraz ocena zachodzących zmian genetycznych u bydła prowadzone będą głównie w oparciu o analizę DNA. Określenie na podstawie mikrosatelitów DNA struktury genetycznej u buhajów przeznaczonych do rozrodu i ich matek da w przyszłości możliwość wykorzystywania wyników badań uzyskanych w ramach kontroli pochodzenia do monitorowania zmian zachodzących w populacji bydła w Polsce.

W IZ-PIB przebadano ogółem 1930 sztuk bydła, w tym 1438 osobników rasy holsztyńskofryzyskiej (HO), 144 – bydła polskiego czerwonego (PR), 128 – czerwono-białego (RW), 122 – Hereford (HER) i 98 – Limousine (LM).

### **Identyfikacja markerów mikrosatelitarnych DNA**

Do identyfikacji markerów mikrosatelitarnych u badanych sztuk bydła użyto standardowego zestawu odczynników „Bovine PCR Typing Kit”, produkcji firmy Applied Biosystems. Zestaw ten zawiera fluorescencyjnie znakowane sekwencje starterowe do amplifikacji

sekwencji mikrosatelitarnych (BM1824, BM2113, ETH3, ETH10, ETH225, INRA23, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227).

Analiza obejmowała następujące etapy:

- I. Izolację genomową DNA z próbek krwi obwodowej i cebulek włosowych oraz z tkanek, głównie nasienia i tkanki mięsnej.
- II. Amplifikację (zwielokrotnienie) wyizolowanych fragmentów DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej PCR-multiplex przy użyciu fluorescencyjnie znakowanych sekwencji starterowych i polimerazy TaqGold. Amplifikację przeprowadzono przy użyciu amplifikatora GeneAmp PCR System 9600 firmy Applied Biosystems.
- III. Analizę otrzymanych produktów PCR wykonano w sekwenatorze ABI Prism 377 oraz w sekwenatorze ABI 3130xl firmy Applied Biosystems przy użyciu komputerowego programu GeneScan. Zamplifikowane fragmenty DNA, o różnej długości, poddawano elektroforezie w denaturującym 4% żelu poliakrylamidowym w obecności standardu długości 350 Rox i próbki referencyjnej. Wynik rozdziału elektroforetycznego odczytano w programie GeneScan 2.1. Ponadto, przystosowano program komputerowy GeneMapper firmy Applied Biosystems do automatycznego określenia wielkości alleli dla poszczególnych markerów identyfikowanych w sekwenatorze kapilarnym ABI 3130xl.

Genotypy badanych osobników określono w programach Genotyper 2.0 i GenMapper.

Określenie polimorfizmu wytypowanych przez ISAG markerów mikrosatelitarnych DNA u badanych ras bydła objęło: obliczenie częstości występowania zidentyfikowanych alleli wybranych markerów mikrosatelitarnych u badanego bydła, stopnia heterozygotyczności-H, indeksu stopnia polimorfizmu-PIC oraz prawdopodobieństwa wykluczenia-PE dla każdego locus, gdy znane są genotypy obojga rodziców oraz prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa- $PE_C$  dla wszystkich 11 loci łącznie.

### Polimorfizm mikrosatelitarny u bydła w Polsce

Wszystkie wybrane do badań markery mikrosatelitarne w omawianych rasach charakteryzowały się wysokim polimorfizmem, na co wskazuje zarówno liczba alleli wykrytych w poszczególnych loci, jak i wartość PIC i H. W badanym materiale w 11 mikrosatelitarnych loci DNA wykryto 118 alleli, których liczba w zależności od locus wynosiła od 7 (locus BM1824) do 16 (locus TGLA122). Zidentyfikowane allele występowały u poszczególnych ras ze zróżnicowaną częstością w poszczególnych loci. U rasy PR w 5 loci: BM2113, ETH10, SPS115, INRA23 i ETH225 ustalono allele o długościach wynoszących odpowiednio 121 pz, 229 pz, 250 pz, 220 pz i 154 pz, których nie zaobserwowano u innych badanych ras bydła. U bydła rasy HER w loci: SPS115, TGLA126, ETH225, BM1824 zidentyfikowane odpowiednio allele 246 pz, 127 pz, 158 pz i 192 pz występowały tylko u tej rasy. Do najbardziej polimorficznych markerów można zaliczyć loci TGLA122, w którym odnotowano w sumie 16 alleli, TGLA277 i TGLA53 po 14 alleli i INRA23 o łącznej sumie alleli równej 12. Wszystkie analizowane loci charakteryzowały się wysokimi wartościami wskaźników PIC i H wynoszącymi ponad 0,5. Jedyne w loci ETH3 u bydła rasy HER otrzymano nieco niższą wartość PIC wynoszącą 0,464. Najwyższe wartości PIC, powyżej wartości 0,8, odnotowano w locus TGLA53 u wszystkich ras, za wyjątkiem rasy HER, gdzie otrzymano wartość PIC równą 0,697. Wysokim polimorfizmem (PIC i H wyższe od 0,7) charakteryzowały się również markery: TGLA227, BM2113 i INRA23. Najniższym polimorfizmem w przeprowadzonych badaniach odznaczało się locus ETH3 (PIC = 0,464 i H = 0,562) u rasy HER. W locus tym, spośród oznaczonych 3 alleli 2 występowały ze zdecydowanie większą częstością przekraczającą 93%, podobnie jak w badaniach przeprowadzonych przez Stockburgera i in. (1999) oraz Janika i in. (2001), gdzie spośród 4 zidentyfikowanych alleli 2 stanowiły ponad 90%. Na tym etapie badań nie można stwierdzić, co jest powodem obserwowanego ograniczenia zmienności w locus ETH3 u bydła rasy HER.

U rasy HO, która stanowi najliczniejszą grupę zwierząt w polskiej populacji bydła,

u 1438 przebadanych osobników największy polimorfizm (PIC i H >0,8) określono w loci TGLA227, TGLA53 i TGLA122 (tab.1). Niemal identyczny stopień polimorfizmu w tych loci u bydła rasy HO hodowanego w Polsce wykazano również w badaniach przeprowadzonych w latach 1999-2001 przez Radko i in. (2002). Nieco wyższy polimorfizm niż w przeprowadzonych wcześniej badaniach odnotowano w loci TGLA53 i SPS115, natomiast w pozostałych loci zaobserwowano nieco niższe wartości analizowanych wskaźników PIC i H. Niższy polimorfizm w analizowanych loci świadczy o konieczności kontrolowania zmian zachodzących w strukturze genetycznej bydła rasy HO i informowaniu o ograniczeniu zmienności genetycznej badanej rasy.

U bydła rasy HO wysoki polimorfizm w locus TGLA227, o wartości PIC i H wynoszącym ponad 0,8, wykazano także w Belgii, Finlandii, Hiszpanii i USA (Peelman i in., 1998; Heyen i in., 1997; Martín-Burriel i in., 1999).

Ważnym parametrem, określającym bezpośrednio przydatność sekwencji mikrosatelitarnych DNA do kontroli pochodzenia, jest prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzica (PE) na podstawie pojedynczego locus oraz łączne prawdopodobieństwo wykluczenia (PE<sub>C</sub>) na podstawie wszystkich analizowanych loci. Badania przeprowadzone przez Bates i in. (1996) u bydła holsztyńskiego wykazały, że prawdopodobieństwo wykluczenia rodzicielstwa (PE<sub>C</sub>), oszacowane na podstawie 22 markerów mikrosatelitarnych, wynosi ponad 0,99999 w sytuacji, gdy znane są genotypy obydwu rodziców i ponad 0,9986, gdy znany jest genotyp jednego z rodziców. Holm i Bendixen (1996) wykazali z kolei, że PE<sub>C</sub> wyliczone na podstawie tylko 6 sekwencji mikrosatelitarnych (CSM42, BM2113, ETH225, INRA23, BM1824 i ETH3) wynosi 0,99, natomiast za pomocą analizy 11 systemów grupowych krwi 0,98. Inne badania wykazały, że już na podstawie 5 markerów mikrosatelitarnych (DRB3, CYP21, ETH131, HEL6 i FSHB) PE<sub>C</sub> osiąga wartość 99% (Usha, 1995). W badaniach własnych prawdopodobieństwo wykluczenia oszacowano z uwzględnieniem możliwości przebadania obydwu osobników rodzicielskich.

Prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa-PE w badanych rasach, obliczone na pod-

stawie pojedynczych loci, mieściło się w przedziale od 0,264 w locus ETH3 u rasy HER, w którym zaobserwowano ograniczoną zmienność genetyczną, do 0,729 w locus TGLA53 u rasy RW. Wysokie wartości tego parametru ( $>0,5$ ) u wszystkich badanych ras wykazano dla loci: TGLA227, BM2113, TGLA53 i INRA023, natomiast najniższe zaobserwowano w loci SPS115 u bydła ras RW (PE = 0,355) i HO (PE = 0,386) oraz w locus TGLA126 u bydła rasy LM (PE = 0,388).

Łączne prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa- $PE_C$  na podstawie 11 loci oszacowane dla poszczególnych ras wyniosło powyżej 99,98%.

Wysokie wartości omawianych wskaźników PIC, H i PE wskazują na znaczny stopień zmienności genetycznej analizowanych ras bydła oraz świadczą o przydatności analizowanego zestawu 11 markerów mikrosatelitarnych DNA do badań weryfikacji rodowodów bydła.

Tabela 1. Polimorfizm 11 markerów mikrosatelitarnych DNA u badanego bydła  
Table 1. Polymorphism of 11 microsatellite DNA markers in analysed cattle

Locus		PIC	H	PE
<b>TGLA227</b>	HO	0,826	0,843	0,692
	PR	0,794	0,818	0,643
	RW	0,78	0,802	0,628
	HER	0,822	0,841	0,687
	LM	0,775	0,802	0,616
<b>BM2113</b>	HO	0,747	0,782	0,573
	PR	0,747	0,782	0,573
	RW	0,72	0,757	0,538
	HER	0,795	0,818	0,645
	LM	0,773	0,798	0,616
<b>TGLA53</b>	HO	0,845	0,86	0,721
	PR	0,814	0,831	0,679
	RW	0,849	0,863	0,729
	HER	0,697	0,734	0,522
	LM	0,822	0,84	0,701
<b>ETH10</b>	HO	0,597	0,621	0,424
	PR	0,689	0,729	0,51
	RW	0,581	0,612	0,402
	HER	0,679	0,726	0,484
	LM	0,701	0,742	0,513
<b>SPS115</b>	HO	0,578	0,626	0,386
	PR	0,735	0,759	0,573
	RW	0,546	0,597	0,355
	HER	0,739	0,772	0,565
	LM	0,686	0,729	0,498
<b>TGLA126</b>	HO	0,61	0,662	0,414
	PR	0,735	0,759	0,573
	RW	0,592	0,657	0,389
	HER	0,654	0,687	0,474

*Kontrola pochodzenia u bydła*

	LM	0,571	0,609	0,388
<b>TGLA122</b>	HO	0,79	0,812	0,642
	PR	0,637	0,689	0,449
	RW	0,781	0,804	0,629
	HER	0,634	0,685	0,439
	LM	0,731	0,765	0,556
	<b>INRA23</b>	HO	0,737	0,774
PR		0,834	0,85	0,704
RW		0,792	0,818	0,637
HER		0,717	0,748	0,544
LM		0,737	0,773	0,558
<b>ETH3</b>		HO	0,623	0,663
	PR	0,762	0,787	0,604
	RW	0,68	0,719	0,496
	HER	0,464	0,562	0,264
	LM	0,639	0,687	0,445
	<b>ETH225</b>	HO	0,681	0,726
PR		0,806	0,829	0,657
RW		0,731	0,768	0,55
HER		0,703	0,744	0,516
LM		0,621	0,68	0,42
<b>BM1824</b>		HO	0,71	0,752
	PR	0,654	0,707	0,452
	RW	0,654	0,699	0,462
	HER	0,606	0,641	0,424
	LM	0,669	0,719	0,469

PIC - indeks stopnia polimorfizmu, H - stopień heterozygotyczności, PE - prawdopodobieństwo wykluczenia.  
*PIC – polymorphic information content, H – degree of heterozygosity, PE – probability of exclusion.*

### Literatura

- Arranz J.J., Bayón Y., San Primitivo F. (1996). Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Anim. Genet.*, 27: 415–419.
- Bates S., Holm T., Haeringen H. van, Lange K., Ziegler J., Heyen D., Da Y., Lewin H. (1996). Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellites markers in fluorescent multiplexes for automated parentage verification. *Anim. Genet.*, 27: 17–42.
- Beckmann J.S., Weber J.L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genom.*, 12: 627–631.
- Fries R., Eggen A., Stranzinger G. (1990). The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genom.*, 8: 403–406.
- Grzybowski G., Lubieniecki K., Żurkowski M., Kurył J. (1995). Identyfikacja zmutowanych genów i ich oddziaływanie na użytkowość zwierząt. *Prz. Hod.*, 5: 10–14.
- Heyen D.W., Beever J.E., Da Y., Evert R.E., Green C., Bates S.R.E., Ziegler J.S., Lewin H.A. (1997). Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim. Genet.*, 28: 21–27.

Holm L-E., Bendixen C. (1996). Usefulness of microsatellites from the ISAG comparison test for parentage control in Danish Black-and-White cattle. *Anim. Genet.*, 27 (Suppl. 2): 17–42.

Janik A., Ząbek T., Radko A., Natonek M. (2001). Evaluation of polymorphism at 11 microsatellite loci in Simmental cattle raised in Poland. *Ann. Anim. Sci.*, 1, 2: 19–29.

Martín-Burriel I., García-Muro E., Zaragoza P. (1999). Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Anim. Genet.*, 30: 177–182.

Peelman L.J., Mortiaux F., Zeveren A. Van, Dansercoer A., Mommens G., Coopman F., Bouquet Y., Burny A., Renaville R., Portetelle D. (1998). Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim. Genet.*, 29: 161–167.

Radko A., Duniec M. (2002). Analysis of polymorphism at 11 DNA microsatellite loci in

Black-and-White and Red-and-White cattle in Poland. *Ann. Anim. Sci.*, 2, 1: 63–75.

Radko A., Duniec M., Ząbek T., Janik A., Natonek M. (2002). Polimorfizm 11 sekwencji mikrosatelitarnych DNA i ocena ich przydatności do kontroli pochodzenia bydła. *Med. Wet.*, 58: 708–710.

Stockburger E.M., Green R.D., Wood W.O., Holm T., Macneil M.D., Schafer D.W., Yemm R.S., Berg-Ramsey J. (1999). Determination of the stringency of DNA microsatellite marker genotypes for use in individual animal identification. 1999 Beef Program Report Colorado State University.

Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17: 6463–6471.

Usha A.P., Simpson S.P., Williams J.L. (1995). Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Anim. Genet.*, 26: 155–161.

## EVALUATION OF POLYMORPHISM OF DNA MICROSATELLITES USED FOR PARENTAGE VERIFICATION OF CATTLE IN POLAND

### Summary

The aim of the study was to analyse the polymorphism of microsatellite DNA markers selected for routine verification of cattle pedigrees at the National Research Institute of Animal Production (NRIAP). Microsatellite DNA polymorphism was examined using automated DNA sizing technology. From 2003 to 2006, the analyses were performed on an ABIPRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) and on an ABI3130xl capillary sequencer (Applied Biosystems). GeneMapper software (Applied Biosystems) for automatic sizing of alleles of particular markers was adapted to determine genotypes at 11 microsatellite loci using a capillary sequencer. In 2006, the NRIAP cattle pedigree database, which is based on blood groups, was extended with the results of DNA tests.

The present study makes it possible to evaluate genetic variation in cattle raised in Poland, to issue internationally recognized DNA certificates that verify animal pedigree data, and to make expert opinions commissioned by the Polish Federation of Cattle Breeders and Dairy Farmers, the prosecutor's office, police and private breeders.



fot. red.