

Kontrola wiarygodności rodowodów owiec w oparciu o markery genetyczne klasy I i II

Anna Radko, Tadeusz Rychlik, Dominika Rubiś, Agnieszka Szumiec

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

Zgodność zootechnicznej dokumentacji hodowlanej ze stanem faktycznym jest podstawowym warunkiem prawidłowo prowadzonej selekcji i wyboru zwierząt na rodziców następnych pokoleń. W celu jej weryfikacji prowadzi się kontrolę rodowodów i identyfikację zwierząt w oparciu o badania wybranych markerów genetycznych krwi potomka i jego rodziców. Metoda ta jest obecnie powszechnie stosowana na świecie. Wykorzystanie do tego celu dużej liczby cech antygenowych, polimorficznych form białek krwi oraz zestawu rekomendowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG (International Society for Animal Genetics) markerów mikrosatelitarnych DNA gwarantuje wiarygodny wynik. Ilość i jakość używanych przez laboratorium reagentów testowych do oznaczania antygenów erytrocytarnych oraz czułość stosowanych metod molekularnych w istotny sposób wpływają na rzetelność uzyskiwanych rezultatów. Stosowane metody weryfikowane są w organizowanych przez ISAG Międzynarodowych Testach Porównawczych.

Można przyjąć, że w efekcie prowadzonej kontroli gwarantowana jest wiarygodność danych, zawartych w dokumentacji hodowlanej dotyczącej pochodzenia. Przyjęte metody nie odbiegają od stosowanych w innych krajach sposobów sprawdzania poprawności prowadzonej dokumentacji hodowlanej i są zgodne z regulacjami prawnymi obowiązującymi w hodowli zwierząt w Polsce (ustawa z dnia 20 sierpnia 1977 r.: O organizacji ho-

dowli i rozrodzie zwierząt gospodarskich – tekst jednolity z 2002 r., Dz. U. Nr 207, poz. 1762 oraz z 2004 r., Nr 91, poz. 866).

MARKERY GENETYCZNE KLASY I

U owiec najbardziej przydatne do badań zgodności rodowodów okazały się grupy krwi, transferyny, albuminy i hemoglobina.

Wieloletnie badania, zapoczątkowane już w 1924 r. przez Białosuknię i Kączkowskiego, doprowadziły do poznania około 20 czynników antygenowych, zaklasyfikowanych do siedmiu układów grupowych krwi: A, B, C, D, M, R i X. Wprowadzenie przez ISAG międzynarodowych testów porównawczych surowic testowych pozwoliło na dokonanie standaryzacji reagentów uzyskanych w różnych laboratoriach oraz ujednoczenie oznaczeń identyfikowanych przez nie antygenów. Po teście porównawczym w 1990 r. międzynarodowe oznaczenia przyjęto dla 22 antygenów erytrocytów: Aa, Ab, Ba, Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bh, Bi, Ca, Cb, Cc, Da, Ma, Mb, Mc, R, 0, X i Z.

Pierwsze badania, dotyczące określenia typów transferyny w surowicy krwi owiec, zostały przeprowadzone przez Ashtona (1958), który początkowo opisał osiem fenotypów. W toku dalszych badań, prowadzonych przez wielu badaczy, określono ilość alleli występujących w różnych rasach. W 1966 r. przeprowadzono pierwszy międzynarodowy test porównawczy reagentów testowych dla owiec

i ustalono nazewnictwo transferyn. W 1990 r. laboratoria, biorące udział w międzynarodowym teście porównawczym, organizowanym w ramach ISAG, wykazały istnienie u owiec siedemnastu alleli transferyn: Tf^A, Tf^B, Tf^C, Tf^D, Tf^E, Tf^F, Tf^G, Tf^H, Tf^I, Tf^J, Tf^K, Tf^L, Tf^M, Tf^N, Tf^O, Tf^P, Tf^Q, Tf^R, Tf^S i Tf^T.

Zastosowanie badań grup krwi oraz polimorficznych wariantów białek krwi do potwierdzenia pochodzenia u owiec dało obiektywną metodę sprawdzenia wiarygodności rodowodów (Żur i Trela, 1983; Trela i Filipczuk, 1985; Rychlik i in., 1996, 2003). Wykorzystanie grup krwi oraz białek występujących w surowicy krwi i erytrocytach do określania niezgodności pochodzenia wiąże się z ich genetycznie uwarunkowanym polimorfizmem, łatwą identyfikacją fenotypów oraz stałością fenoty-

pów w ciągu całego życia osobnika.

Wykorzystanie do tego celu dużej liczby cech antygenowych oraz polimorficznych form białek krwi gwarantuje wiarygodny wynik. Szczególnie ilość i jakość używanych przez laboratorium reagentów testowych do oznaczania antygenów erytrocytarnych w istotny sposób wpływa na rzetelność uzyskiwanych rezultatów.

Prace nad uzyskaniem surowic testowych rozpoczęto w Instytucie Zootechniki w 1970 r., natomiast wstępne badania nad potwierdzeniem pochodzenia owiec na podstawie grup krwi rozpoczęto w 1973.

Oznaczanie składu antygenowego krwi u owiec przeprowadzano przy użyciu 16 reagentów testowych, wykrywających cechy antygenowe z 6 układów grupowych krwi (tab. 1).

Tabela 1. Reagenty testowe stosowane do oznaczania składu antygenowego krwi u owiec
Table 1. Test reagents used for determining the antigenic components of blood in sheep

Układy grupowe <i>Group systems</i>	Reagenty testowe <i>Test reagents</i>
A	Aa, Ab
B	Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bi, PLB-17
C	Ca, Cb
D	Da
M	Ma
R	R, 0

Jakość reagentów testowych pochodzących z różnych laboratoriów świata weryfikowana jest w organizowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (International Society for Animal Genetics – ISAG) międzynarodowych testach porównawczych. Zarówno weryfikacja jakości, jak i ujednolicenie nomenklatury reagentów stanowią o uniwersalności grup krwi przy ustalaniu testów genetycznych dla zwierząt hodowlanych. Testy te mogą być wykorzystywane w każdym państwie, co ma szczególnie istotne znaczenie przy imporcie i eksporcie zwierząt, nasienia oraz transplantowanych zarodków.

Wyniki Międzynarodowych Testów Porównawczych wykazały, że Laboratorium Działu Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt

Instytutu Zootechniki PIB posiada szeroki zestaw reagentów testowych, a ich wysoką specyficzność potwierdziły wyniki kilku ostatnich testów porównawczych organizowanych przez ISAG.

Obecnie kontrola wiarygodności rodowodów owiec w Polsce prowadzona jest w oparciu o badanie grup krwi oraz polimorficzne warianty transferyny i hemoglobiny.

Miarą skuteczności poszczególnych markerów genetycznych do weryfikacji pochodzenia jest prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzicielstwa. W przeprowadzonych badaniach polimorfizmu antygenów erytrocytarnych w 6 układach grupowych krwi oraz transferyny (TF) i hemoglobiny (HBB) owiec rasy Berrichone du Cher (Rychlik i in., 2003)

wykazano, że prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwie podanego rodzica (PE), obliczone przy użyciu loci grup krwi, wyniosło 0,84, a przy wykorzystaniu dodatkowo polimorfizmu

TF i HBB wartość ta wzrosła do 0,92. Zastosowanie markerów DNA daje natomiast możliwość potwierdzenia danych rodowodowych bliskie jedności.

Tabela 2. Wyniki badań kontroli rodowodów owiec w latach 2005–2011
Table 2. Results of parentage verification in sheep in 2005–2011

Rok	Ilość badanych stad <i>No. of flocks tested</i>	Ilość wydanych ekspertyz <i>No. of expert opinions issued</i>	Ilość wykluczeń <i>No. of incorrect pedigrees</i>	% wykluczeń <i>% of incorrect pedigrees</i>
2005	29	958	39	4,1
2006	30	732	46	6,3
2007	16	391	11	2,8
2008	15	399	46	11,5
2009	25	627	56	8,9
2010	20	573	45	7,8
2011	27	638	13	2,0
Razem – <i>Total</i>	162	4318	256	5,9

MARKERY GENETYCZNE KLASY II

Identyfikacja osobnicza oraz analiza rodowodów zwierząt gospodarskich na podstawie antygenów erytrocytarnych oraz białek surowicy krwi, szczególnie u bydła i koni, została poszerzona o analizę markerów DNA. Od 2011 r. kontrola pochodzenia u bydła, dotychczas prowadzona w oparciu o markery genetyczne klasy I, została zastąpiona analizą polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA. Można spodziewać się, że w najbliższych latach wymóg stosowania obok grup krwi markerów DNA u innych gatunków, w tym również u owiec, będzie obligatoryjny w kontroli pochodzenia osobników przeznaczonych do rozrodu oraz do stad zachowawczych.

Spośród markerów DNA, ze względu na duże, często przekraczające 99,99% prawdopodobieństwo wykluczeń oraz stosunkowo prostą identyfikację, największe zastosowanie w kontroli rodowodów znalazły sekwencje mikrosatelitarne (Tautz, 1989; Holm i Bendixen, 1996). Obecnie stanowią one najliczniejszą grupę mar-

kerów genetycznych, stosowanych nie tylko w kontroli pochodzenia (Rychlik i in., 2003; Souza i in., 2012), ale również w badaniu struktury i zmienności genetycznej populacji i ras owiec (Diez-Tascon i in., 2000; Baumung i in., 2006; Carneiro i in., 2010).

Do analizy sekwencji mikrosatelitarnych wykorzystywane są łańcuchowa reakcja polimerazowa (PCR) oraz techniki elektroforetyczne. W kontroli pochodzenia szczególne zastosowanie znalazła reakcja PCR typu multiplex, gdzie w mieszaninie reakcyjnej znajduje się nawet kilkanaście par starterów, dzięki czemu jednocześnie zachodzi powielenie kilkunastu loci. Startery stosowane do amplifikacji są znakowane fluorescencyjnie, czterema barwnikami, co umożliwia wykrycie jednocześnie kilkunastu markerów mikrosatelitarnych w jednej ścieżce żelu poliakrylamidowego.

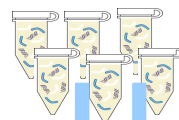
Do odczytu rozdziału elektroforetycznego używane są czytniki laserowe, co pozwala na bezpośredni odczyt wyników oraz zachowanie danych w pamięci komputera.

Etapy oznaczania markerów mikrosatelitarnych:

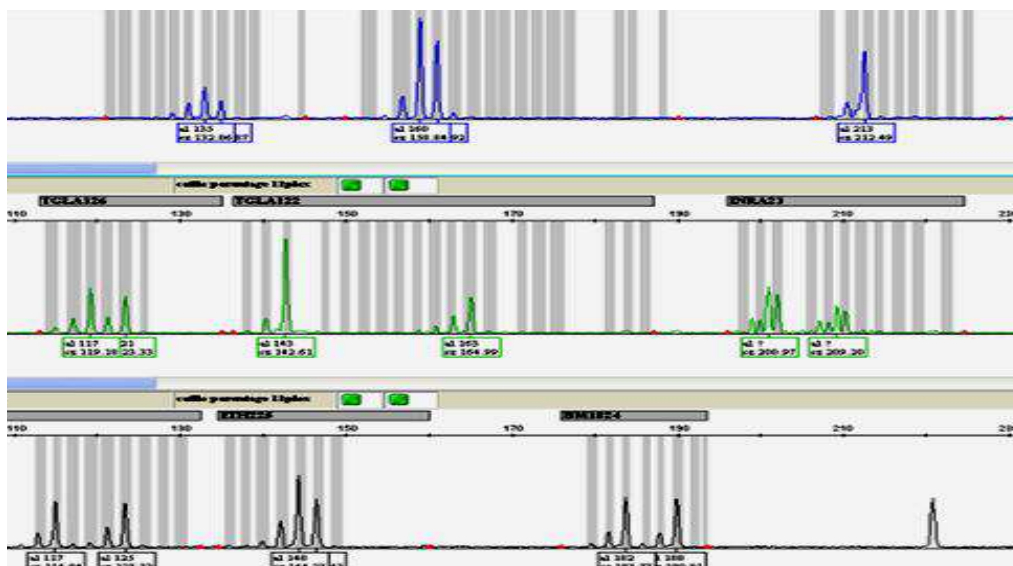
1. Izolacja DNA

2. Amplifikacja fragmentów DNA metodą PCR-multiplex

3. Elektroforeza produktów amplifikacji w denaturującym 7% żelu poliakrylamidowym, w sekwenatorze kapilarnym 3130 xl. AB



4. Analiza wielkości rozdzielonych fragmentów DNA – w liczbie par zasad i ustalenie genotypów (GeneMapper®Software AB)



Metody analizy markerów mikrosatelitarnych DNA

Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych wykonywana jest techniką automatycznej analizy wielkości fragmentów DNA w sekwenatorach DNA, genotypy ustalane są automatycznie w programach komputerowych (Tanaka i in., 1996).

Identyfikacja alleli mikrosatelitarnych sekwencji DNA oraz ustalanie genotypu

Po amplifikacji sekwencji mikrosatelitarnych DNA otrzymuje się różnej długości fragmenty DNA (zawierające różną liczbę kopii motywu nukleotydowego), warunkujące wielkości poszczególnych alleli. Długości zidentyfikowanych alleli określa się podczas rozdziału elektroforetycznego. W trakcie elektroforezy różnej długości produkty PCR migrują w żelu z różną szybkością. Fragmenty dłuższe, o większym ciężarze molekularnym, migrują wolniej niż fragmenty krótsze. Wyniki elektroforezy, w postaci

barwnych prążków na żelu, otrzymuje się dzięki fluorescencyjnie znakowanym starterom, użytym w procesie amplifikacji. Fluorescencyjne sygnały z żelu, skanowane w trakcie rozdziału elektroforetycznego przez czytnik laserowy, w programie komputerowym rejestrowane są w postaci wykresów, przedstawiających długości produktów PCR w kształcie pików. Długości produktów PCR, w parach zasad (pz), odpowiadające wielkościom alleli, określane są w oparciu o fragmenty standardu długości DNA.

Otrzymane dane importowane są do programu komputerowego przygotowanego do ustalania profilu – genotypu charakterystycznego dla danego osobnika. Wielkości alleli w poszczególnych loci, składające się na genotyp, standaryzowane są międzynarodowo w testach porównawczych, organizowanych co dwa lata przez ISAG.

W celu standaryzacji kontroli pochodzenia u owiec na podstawie mikrosatelitarnych sekwencji DNA na Międzynarodowej Konferencji ISAG w 1998 r. wybrano 15 markerów mikrosatelitarnych, które mogłyby być używane w rutynowych testach molekularnych.

Tabela 3. Charakterystyka markerów mikrosatelitarnych testowanych podczas testu porównawczego ISAG: Sheep CT Results 2011–2012

Table 3. Characteristics of microsatellite markers tested by ISAG comparison test: Sheep CT Results 2011–2012

Marker	Liczba laboratoriów <i># Labs included</i>	Brak wyników <i>No result</i>	Liczba błędów <i># Errors</i>	Liczba genotypów <i>Total genotypes</i>	Dokładność markerów <i>Marker accuracy</i>
AME	16		0	320	100,0
CSRD247	24		3	480	99,4
SPS113	15		2	280	99,3
INRA172	18		3	360	99,2
MAF065	25	1	5	499	99,0
INRA023	20		4	396	99,0
McM42	18		4	360	98,9
ETH152 (D5S2)	24		7	480	98,5
OarFCB20	26	9	9	511	98,2
MAF214	20	5	15	395	96,2
INRA063	23		19	460	95,9
INRA006	18	1	16	359	95,5
McM527	24	3	26	477	94,5
INRA005	21		24	418	94,3

Zalecono zastosowanie 3 reakcji multiplex:

Multiplex 1 (proposed by LGS, Cremona, Italy)
 CSRD0247 – HSC – INRA063 – MAF0214 –
 OarAE0129 – OarCP049 – OarFCB11 –
 OarFCB304

Multiplex 2 (proposed by LGS, Cremona, Italy)
 D5S2 – INRA005 – INRA23 – MAF065 –
 McM0527 – OarFCB20 – SPS113

Other markers (proposed by G. Erhardt, Gies-
 sen, Germany)
 BM1258 – BM1329 – BM1818 – INRA231

W wielu ośrodkach naukowych na świecie prowadzone są badania nad opracowaniem

jednolitego testu molekularnego, umożliwiającego kontrolę pochodzenia w oparciu o standardowy zestaw markerów mikrosatelitarnych (Tomasco i in., 2002; Głowatzki-Mullis i in., 2007).

IZ PIB od sześciu lat bierze czynny udział w Międzynarodowych Testach Porównawczych, co pozwoliło zastosować opracowaną metodę analizy STR do potwierdzania danych rodowodowych owiec. W 2011 r. ustalono 2 zestawy markerów, umożliwiające analizę 13 mikrosatelitarnych loci:

Multiplex I: OarFCB304, HSC, OarAE129, MAF214, INRA063, CSRD247;

Multiplex II: OarFCB20, SPS113, D5S2, MAF065, INRA005, McM527, INRA023.

Tabela 4. Zestawienie wyników genotypowania w tescie porównawczym ISAG: Sheep CT Results 2011–2012
 Table 4. Comparison of genotyping results in ISAG comparison test: Sheep CT Results 2011–2012

Kod laboratorium <i>Lab ID</i>	Brak wyników <i>No result</i>	Błędy genotypowania <i>Genotyping errors</i>	Całkowita liczba genotypów <i>Total genotypes</i>	Zgłoszona liczba genotypów <i>Reported genotypes</i>	Dokładność względna <i>Relative accuracy</i>
84414	0	0	280	280	100,0
84428	0	4	280	280	98,6
84434	40	1	280	240	99,6
84435	20	0	260	240	100,0
84448	0	0	260	260	100,0
84451	60	0	260	200	100,0
84462	0	23	280	280	91,8
84467	42	7	260	218	96,8
84475	0	2	260	260	99,2
84483	0	8	280	280	97,1
84486	0	0	280	280	100,0
84487	0	15	280	280	94,6
84501	0	2	280	280	99,3
84535	20	0	280	260	100,0
85067	40	34	260	220	84,5
85081	0	7	280	280	97,5
88267	0	8	280	280	97,1
89696	0	2	280	280	99,3
93047	0	20	280	280	92,9

Na szaro zaznaczono wyniki laboratorium Działu Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt IZ PIB.

Results from the laboratory of the Department of Animal Cytogenetics and Molecular Genetics of the National Research Institute of Animal Production are marked in grey.

W ostatnim międzynarodowym teście porównawczym Sheep Comparison Test ISAG 2011–2012 testowano markery mikrosatelitarne, które mają stanowić podstawowy panel markerów do kontroli rodowodów owiec, rekomendowany przez ISAG (*ISAG Marker Panel*): AME, CSRD247, ETH152, INRA005, INRA006, INRA023, INRA063, INRA172, MAF065, MAF214 (albo SPS113), McM42, McM527 i OarFCB20. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 3. Spośród 27 uczestniczących w teście – 19 laboratoriów, które przedstawiły wyniki dla markerów rekomendowanych przez ISAG, zostało zakwalifikowane do ogólnego zestawienia. Dokładność w ustalaniu genotypów dla tych laboratoriów osiągnęła od 84,5 do 100% (tab. 4).

Opracowane i standaryzowane międzynarodowo zestawy markerów mikrosatelitarnych w laboratorium Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt IZ PIB są pomocne w przypadkach, gdy system kontroli pochodzenia owiec, oparty na grupach krwi, uniemożliwia jednoznaczne wskazanie pary rodzicielskiej. Obecnie dąży się do ustalenia i standaryzacji jednego zestawu, który mógłby być stosowany do weryfikacji rodowodów.

Podsumowanie

Stosowane w Dziale Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt IZ PIB metody

kontroli rodowodów zwierząt, oparte o dużą liczbę cech antygenowych, polimorficznych form białek krwi oraz zestawu rekomendowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG markerów mikrosatelitarnych DNA gwarantuje wiarygodny wynik. Stosowane metody weryfikowane są w organizowanych przez ISAG Międzynarodowych Testach Porównawczych.

Weryfikacja jakości i ujednoczenie nomenklatury reagentów oraz zastosowanie rekomendowanych przez ISAG markerów stanowią o uniwersalności tych badań, dzięki czemu mogą być wykorzystywane w każdym państwie, co ma szczególnie istotne znaczenie przy imporcie i eksporcie zwierząt, nasienia oraz zarodków.

Można przyjąć, że w efekcie prowadzonej kontroli gwarantowana jest wiarygodność danych, zawartych w dokumentacji hodowlanej, dotyczącej pochodzenia. Wyniki kontroli, przekazywane corocznie do wiadomości Polskiego Związku Owczarskiego, pozwalają na podejmowanie decyzji, zmierzających do porządkowania dokumentacji zootechnicznej i korygowania błędnych rodowodów. Eliminacja z hodowli zarodowej osobników o niezgodnym pochodzeniu daje gwarancje uniknięcia skutków, jakie mogłyby wyniknąć w przypadku użycia do rozrodu zwierząt nie pochodzących po wartościowych, podanych w rodowodach rodzicach.

Literatura

- Ashton G.C. (1958). Further B – globulin phenotypes in sheep. *Nature*, 182: 1101–1102.
- Baumung R., Cubric-Curik V., Schwend K., Achmann R. i in. (2006). Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J. Anim. Breed. Genet.*, 123: 265–271.
- Carneiro H., Louvandini H., Paiva S.R., Macedo F. i in. (2010). Morphological characterization of sheep breeds in Brazil, Uruguay and Colombia. *Small Rum. Res.*, 94: 58–65.
- Diez-Tascon C., Littlejohn R.P., Almeida P.A., Crawford A.M. (2000). Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Anim. Genet.*, 31: 243–251.
- Białosuknia W., Kączkowski B. (1924). On the differentiation of various breeds of sheep by means of serological methods. *J. Immunol.*, 9: p. 593.
- Głowatzki-Mullis M.L., Muntwyler J., Gaillard C. (2007). Cost-effective parentage verification with 17-plex PCR for goats and 19-plex PCR for sheep. *Anim. Genet.*, 38: 86–88.
- 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.*, 2 (Suppl. 2): 17–42.
- Materiały ISAG Comparison Test (1999/2000). Insti-

tut für Tierzucht und Genetik Veterinärmedizinische Universität Wien.

Materiały Międzynarodowego Testu Porównawczego (1997/1998). ISAG Comparison Test, Institut für Tierzucht und Genetik Veterinärmedizinische Universität Wien.

Rychlik T., Janik A., Duniec M. (1996). Wykorzystanie badań grup krwi i białek polimorficznych u owiec w praktyce hodowlanej. *Biul. Inf. IZ*, XXXIV, 4: 61–67.

Rychlik T., Radko A., Duniec M. (2003). Ocena przydatności polimorfizmu niektórych markerów genetycznych w kontroli rodowodów owiec. *Med. Wet.*, 59, 11: 1016–1018.

Souza C.A., Paiva S.R., McManus C.M., Azevedo H.C., Mariante A.S., Grattapaglia D. (2012). Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. *Genet. Mol. Res.*, 11 (2): 1217–1229.

Tanaka H., Saito M., Tsuji S. (1996). Analysis system of microsatellite polymorphism using automated laser fluorescent DNA sequencer. *Nippon Rinsho*, 54 (2): 322–328.

Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17, 16: 6463–6471.

Tomasco I., Własiuk G., Lessa E.P. (2002). Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks. *Genet. Mol. Biol.*, 25: 37–41.

Trela J., Filipczuk U. (1985). Wykorzystanie polimorfizmu transferyn i hemoglobiny w kontroli prawidłowości rodowodów u owiec. Sprawozdanie z tematu nr 7163, Kraków.

Żur F., Trela E. (1983). Skuteczność wykrywania niezgodności pochodzenia owiec na podstawie badań grup krwi i typów transferyn. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 265: 215–218.

PEDIGREE VERIFICATION OF SHEEP BASED ON CLASS I AND II GENETIC MARKERS

Summary

Parentage verification based on analysis of genetic markers ensures that sheep pedigree breeding records are correct. Verification results enable eliminating animals of incompatible origin from pedigree breeding, which prevents the possible consequences of breeding animals not derived from valuable parents specified in the pedigrees.

In sheep, class I genetic markers (blood groups, transferrins, albumins and hemoglobin) proved the most useful for studying pedigree consistency. Today, pedigree verification of sheep in Poland is based on analysis of erythrocyte antigens in 6 blood groups and of polymorphic variants of transferrin and hemoglobin.

In recent years, pedigree analysis in farm animals based on erythrocyte antigens and blood serum proteins was extended with analysis of class II genetic markers. Of DNA markers, microsatellite sequences found the greatest use in pedigree control due to the high probability of exclusion (often exceeding 99.99%) and relatively simple identification.

The size of microsatellite alleles at different loci is standardized in international comparison tests organized at two-year intervals by ISAG. The international Sheep Comparison Test 2011–2012 tested microsatellite markers that will form the basic panel of markers for sheep parentage verification recommended by ISAG (ISAG Marker Panel): AME, CSRD247, ETH152, INRA005, INRA006, INRA023, INRA063, INRA172, MAF065, MAF214 (or SPS113), McM42, McM527 and OarFCB20.

The use of the panel of microsatellite DNA markers, standardized by international ISAG tests, at the laboratory of Animal Cytogenetics and Molecular Genetics of the National Research Institute of Animal Production, is helpful where the parentage verification system based on blood groups does not conclusively show the parents. The application of the ISAG Marker Panel makes it possible to confirm pedigree data with almost 100% accuracy.