

Zastosowanie polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA w kontroli rodowodów koni

Agnieszka Fornal, Anna Radko, Tadeusz Rychlik, Agata Piestrzyńska-Kajtoch, Agnieszka Bąk

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

Kontrola rodowodów zwierząt gospodarskich jest nieodzownym elementem pracy hodowlanej. Prowadzenie wiarygodnych rodowodów jest konieczne przy wyborze odpowiednich zwierząt na rodziców przyszłych pokoleń czy też ocenie ich wartości hodowlanej. System kontroli pochodzenia i identyfikacji zwierząt różnych gatunków, oparty na badaniach polimorfizmu antygenów erytrocytarnych i polimorficznych białek, nie zawsze pozwala na jednoznaczne wskazanie pary rodzicielskiej. Dopiero zastosowanie wysoko polimorficznych markerów mikrosatelitarnych, określonych również jako STR (ang. *short tandem repeat*), pozwala na jednoznaczne potwierdzenie pochodzenia.

Sekwencje mikrosatelitarne są sekwencjami niekodującymi, równomiernie rozmieszczonymi w genomie. Są łatwe do identyfikacji przy zastosowaniu amplifikacji techniką PCR, a ich analizy – powtarzalne. Sekwencje te charakteryzują się stabilnym dziedziczeniem i wysokim polimorfizmem, wyrażającym się występowaniem od kilku do kilkunastu wariantów allelicznych w danym *locus* (Bowling i in., 1997; Tautz, 1989).

Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych oraz reakcji PCR-multiplex do ich amplifikacji i automatycznej analizy genotypów w sekwenatorach DNA zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia błędów w rodowodach, dlatego stały się one popularnymi markerami w analizie genetycznej oraz ocenie różnorodności genetycznej takich gatunków zwierząt hodowlanych, jak bydło (Asch i in., 2009; Carolino i in., 2009; Radko i in., 2010; Řehout i in.,

2006), psy (Dimitrijevic i in., 2013; Irion i in., 2005; Radko i Słota, 2009), owce (Baumung i in., 2006; Rychlik i in., 2003; Souza i in., 2012), czy konie (Gralak i in., 1998; Ząbek i in., 2005 a).

Kontrola pochodzenia koni (*Equus caballus*) w oparciu o markery genetyczne jest prowadzona od połowy XX wieku. Początkowo, weryfikacja rodowodów była prowadzona na całym świecie w oparciu o markery klasy I, na które składają się układy grupy krwi, polimorfizm białek krwi i enzymów. Wraz z rozwojem biologii i genetyki molekularnej markery klasy I w kontroli pochodzenia koni zaczęto uzupełniać sekwencjami mikrosatelitarnymi, zaliczanymi do markerów klasy II. W genomie konia zidentyfikowano i scharakteryzowano liczne mikrosatelitarne *loci*. Dzięki elektroforezie kapilarnej możliwe było zastosowanie STR w badaniach o dużej przepustowości oraz w pewnym stopniu zautomatyzowanie analiz, co przyspieszyło prace badawcze z zakresu kontroli pochodzenia (Tozaki i in., 2001).

Pierwszy zestaw 5 mikrosatelitarnych *loci* u koni (HTG2, HTG3, HTG4, HTG5 oraz HTG6) został opisany w 1992 r.; w 1995 liczba opisanych *loci* wzrosła do 129 STR (Gralak i in., 1998). Obecnie w genomie końskim zidentyfikowano i oznaczono ponad 1538 mikrosatelitarnych *loci* (INRA horsemap Database). Gwałtowny wzrost liczby opisanych STR wpłynął na zwiększenie zakresu informacji genetycznej (Tozaki i in., 2001).

Z uwagi na powszechność stosowania polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych, w większości krajów badania z zakresu kontroli

pochodzenia są znormalizowane. Wytyczne, dotyczące kontroli pochodzenia zwierząt, są określone przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG – *The International Society for Animal Genetics*). Kompetencje laboratoriów są weryfikowane poprzez badania porównawcze, organizowane co dwa lata przez ISAG. Testy kompetencji potwierdzają wiarygodność i rzetelność laboratoriów, a poprzez normalizację wyników zapewniają ich porównywalność pomiędzy laboratoriami. W oparciu o wyniki międzynarodowych testów porównawczych wytypowano początkowo 9 sekwencji mikrosatelitarnych (AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10 i VHL20), stanowiących minimalny panel STR zalecany w kontroli pochodzenia koni. Badania z zastosowaniem 9 podstawowych oraz proponowanych innych, uzupełniających markerów, były prowadzone między innymi dla polskich populacji koni półkrwi angloarabskiej (Ząbek i in., 2005 a), koni czystej krwi arabskiej, koni huculskich, śląskich i pełnej krwi angielskiej (Ząbek i n., 2006).

Dalsze badania z zakresu markerów mikrosatelitarnych skupiły się na poszukiwaniu nowych sekwencji, które poszerzyłyby zestaw podstawowy, w celu zwiększenia efektywności w przypadkach potwierdzania domniemanego rodzicielstwa. W wyniku prac badawczych nad polimorfizmem mikrosatelitarnym DNA, prowadzonych na całym świecie, panel rekomendowany przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt został rozszerzony do 12 STR (AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, VHL20). Na podstawie tego zestawu scharakteryzowano wiele ras koni, w tym w Polsce rasy: czysta krew arabska (Gralak i in., 1998), pełna krew angielska (Gralak i in., 1998; Niemczewski i Żurkowski, 2000; Ząbek i in., 2003), śląska (Ząbek i in., 2003), konik polski (Gralak i in., 2001), polski koń zimnokrwisty (Iwańczyk i in., 2006), konik biłgorajski (Ząbek i in., 2005 b) oraz huculska (Fornal i in., 2013; Ząbek i Fornal, 2009).

Obecnie kontrola pochodzenia koni jest prowadzona w oparciu o 12 mikrosatelitarnych *loci*, rekomendowanych przez ISAG, które składają się na minimalny panel STR (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, HMS2, HMS3,

HMS6, HMS7, HTG4, HTG10 i VHL20) (Guthrie, 2010).

W oparciu o analizę sekwencji mikrosatelitarnych przeprowadza się także ocenę użyteczności stosowanego zestawu STR, a także zmienności genetycznej dla poszczególnych ras koni oraz ich struktury genetycznej na podstawie analiz statystycznych. Polimorficzne *loci* mikrosatelitarne zawierają różne warianty alleliczne w obrębie danej populacji, a ich frekwencja względem różnych populacji może być inna. Częstość występowania frekwencji allelu w poszczególnych *loci* może ulegać zmianom, na przykład ze względu na zmianę stanu ilościowego populacji czy wprowadzanie nowych osobników (Radko i Fornal, 2012). Jednym z częściej stosowanych wskaźników zmienności genetycznej jest heterozygotyczność, której wartość, uzyskana dla analizowanego zestawu markerów, jest skorelowana ze stopniem zmienności, obserwowanej w puli genowej badanych populacji. Spadek liczebności populacji, jak również ściśle ukierunkowana selekcja na określone cechy i przestrzeganie kojarzeń w czystości rasowej mogą prowadzić do ograniczenia ich puli genowej i zwiększenia homozygotyczności (Hey i Pinho, 2012). Czynniki te mogą doprowadzić do wzrostu występowania przypadków chorób o podłożu genetycznym, obniżenia odporności na różne choroby (Toro i in., 2011), czy też problemów w rozrodzie (Kulisa i in., 1999). Z tego względu, ocena stopnia polimorfizmu DNA oraz monitorowanie zmian w strukturze, szczególnie dla małych populacji (Alderson, 2005) i ras rodzimych (Tozaki i in., 2001) oraz zagrożonych, ma na celu zachowanie bioróżnorodności i utrzymanie zmienności genetycznej w badanych populacjach koni (Georgescu i in., 2008). Ponadto, analiza zmienności genetycznej z zastosowaniem markerów genetycznych jest przydatna w doborze optymalnego wariantu kojarzenia, mającego na celu minimalizowanie efektów, skorelowanych ze wzrostem inbrodu, szczególnie dla populacji, u których prowadzona jest selekcja na określone cechy użytkowe (Kulisa i in., 1999; Trommershausen-Bowling i Clark, 1985).

Na podstawie analiz populacyjnych dla przebadanych osobników, z zastosowaniem markerów mikrosatelitarnych, określa się przydatność zestawu *loci* w kontroli pochodzenia danych populacji czy ras. Rekomendowane do

kontroli pochodzenia koni markery mikrosatelitarne cechują się wysoką polimorficznością, w ich obrębie zidentyfikowano od kilku do kilkunastu wariantów allelicznych, jednak ich polimorficzność powinna być weryfikowana. Miarą polimorficzności *loci* jest współczynnik PIC (ang. *polymorphism information content*), obliczany w celu monitorowania użyteczności stosowanego zestawu STR. Z uwagi na wysoką polimorficzność tych markerów istnieje niezwykle niskie prawdopodobieństwo, że dowolny osobnik będzie posiadał identyczny profil DNA. Miarą tej wartości jest współczynnik P_{ID} – prawdopodobieństwo identyczności genotypów (*probability of identity*). Prawdopodobieństwo P_{ID} liczone jest dla każdego badanego *locus* na podstawie częstości alleli w tym układzie. Parametr ten określa prawdopodobieństwo, że dwa losowo wybrane osobniki z tej samej populacji będą miały ten sam genotyp w danym *locus* (Botstein i in., 1980; Bowling i in., 1997; Huston, 1998; Tozaki i in., 2001). Innym parametrem, używanym w potwierdzaniu wiarygodności stosowanego u koni zestawu markerów mikrosatelitarnych jest teoretyczne prawdopodobieństwo wykluczenia – PE (ang. *probability of exclusion*). Prawdopodobieństwo to dla 17 mikrosatelitarnych *loci* szacowane jest w przypadku, gdy znany jest genotyp jednego z rodziców, który zwykle kształtuje się na poziomie zbliżonym do

99,5%, natomiast w przypadku określenia pochodzenia względem obojga rodziców wynosi 99,99% (Fornal i in., 2013).

W laboratorium Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego do badań identyfikacji osobniczej i weryfikacji pochodzenia koni stosuje się rekomendowany panel 12 markerów mikrosatelitarnych oraz 5 zalecanych dodatkowych *loci*. Na podstawie rozdziału elektroforetycznego uzyskuje się elektroforegram, będący profilem DNA badanego osobnika. Na podstawie dalszej analizy porównawczej profili potomka oraz jego domniemanych rodziców możliwe jest potwierdzenie lub wykluczenie pochodzenia po rodzicu bądź parze rodzicielskiej.

W podsumowaniu można stwierdzić, że polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych jest z powodzeniem wykorzystywany do identyfikacji osobniczej, kontroli pochodzenia, rozwiązywania kwestii spornych w przypadkach domniemanego pochodzenia po jednym rodzicu lub parze rodzicielskiej. STR znajdują zastosowanie także w ocenie różnorodności genetycznej populacji lub ras koni.

Monitorowanie zmian w obrębie ras lub populacji koni za pomocą markerów genetycznych pozwala na utrzymanie różnorodności i zmienności genetycznej, określenie kierunku rozwoju badanych populacji oraz zapobieganie niekorzystnym efektom genetycznym.

Literatura

- Alderson G.L.H. (2005). The numerical and genetic status of native horse and pony breeds in Britain. *Conservation genetics of endangered horse*, 116: 91–98.
- Asch B. van, Alves C., Gusmao L., Pereira V., Pereira F., Amorim A. (2009). A new autosomal STR nineplex for canine identification and parentage testing. *Electrophoresis*, 30: 417–423.
- 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.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Hum. Genet.*, 32 (3): 314–331.
- Bowling A.T., Eggleston-Stott M.L., Byrns G., Clark R.S., Dileanis S., Wictum E. (1997). Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim. Genet.*, 28 (4): 247–252.
- Carolino I., Sousa C.O., Ferreira S., Carolino N., Silva F.S., Gama L.T. (2009). Implementation of a parentage control system in Portuguese beef-cattle with a panel of microsatellite markers. *Genet. Mol. Biol.*, 32: 306–311.
- Dimitrijevic V., Stevanovic J., Savic M., Petrujkic B., Simeunovic P., Milosevic I., Stanimirovic Z. (2013). Validation of 10 microsatellite loci for their use in parentage verification and individual identification in the Yugoslavian Shepherd Dog Sharplanina. *Ann. Anim. Sci.*, 13, 4: 715–722.
- Fornal A., Radko A., Piestrzyńska-Kajtoch A. (2013).

- Genetic polymorphism of Hucul horse population based on 17 microsatellite loci. *Acta Biochim. Pol.*, 60 (4): 761–765.
- Georgescu S.E., Manea M.A., Costache M. (2008). The genetic structure of indigenous Romanian Hucul horse breed inferred from microsatellite data. *Romanian Biotech. Lett.*, 13 (6): 4030–4036.
- Gralak B., Kurył J., Łukaszewicz M., Żurkowski M. (1998). Applicability of nine microsatellite DNA sequences vs eleven polymorphic blood protein and enzyme systems for the parentage control in Polish Arabian and Thoroughbred horse. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 16 (4): 209–218.
- Gralak B., Niemczewski C., Jaworski Z. (2001). Genetic polymorphism of 12 microsatellite markers in Polish Primitive Horse. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 19 (4): 277–283.
- Guthrie A. (2010). Equine Genetics and Parentage Analysis Workshop, ISAG Conference 2010, Edinburgh, Scotland; http://www.isag.us/Docs/EquineGeneticsParentage_CT.pdf
- Hey J., Pinho C. (2012). Population genetics and objectivity in species diagnosis. *Evolution, Int. J. Organ. Evol.*, 66 (5): 1413–1429.
- Huston K.A. (1998). *Statistical Analysis of STR Data*, pp. 14–15.
- INRA Horsemap Database (2014.03.05); <http://dga.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/summary.operl?BASE=horse>
- Irion D.N., Schaffer A.L., Grant S., Wilton A.N., Pedersen N.C. (2005). Genetic variation analysis of the Bali street dog using microsatellites. *BMC Genetics*, 6, 6.
- Iwańczyk E., Juras R., Cholewiński G., Cothran E.G. (2006). Genetic structure and phylogenetic relationships of the Polish Heavy horse. *J. Appl. Genet.*, 47 (4): 353–359.
- Kulisa M., Pieszka M., Frybes O. (1999). Cięższe bliźniacze w hodowli koni pełnej krwi angielskiej w Polsce w latach 1987–1996. *Med. Wet.*, 55 (10): 689–693.
- Niemczewski C., Żurkowski M. (2000). The genetic structure of four families of Thoroughbred Horse as determined on the basis of the polymorphism of chosen class I and II genetic markers. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 18 (1): 5–17.
- Radko A., Fornal A. (2012). Metody statystyczne stosowane w analizach STR. *Episteme*, 16, II: 219–228.
- Radko A., Słota E. (2009). Application of 19 microsatellite DNA markers for parentage control in Borzoi dogs. *Pol. J. Vet. Sci.*, 12, 1: 113–117.
- Radko A., Słota E., Marczyńska J. (2010). Usefulness of a supplementary set of microsatellite DNA markers for parentage testing in cattle. *Pol. J. Vet. Sci.*, 13: 113–117.
- Řehout V., Hradecká E., Čítek J. (2006). Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. *Czech. J. Anim. Sci.*, 12: 503–509.
- 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.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17 (16): 6463–6471.
- Toro M.A., Meuwissen T.H.E., Fernández J., Shaat I., Mäki-Tanila A. (2011). Assessing the genetic diversity in small farm animal populations. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.*, 5 (11): 1669–1683.
- Tozaki T., Kakoi H., Mashima S., Hirota K.I., Hasegawa T., Ishida N., Miura N., Choi-Miura N.H., Tomita M. (2001). Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J. Vet. Med. Sci.*, 63 (11): 1191–1197.
- Trommershausen-Bowling A., Clark R.S. (1985). Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Anim. Genet.*, 16: 93–108.
- Ząbek T., Fornal A. (2009). Evaluation of the 17-plex STR kit for parentage testing of Polish Coldblood and Hucul horses. *Ann. Anim. Sci.*, 9 (4): 363–372.
- Ząbek T., Duniec M., Bugno M. (2003). Genetic relationships between Silesian, Thoroughbred and Oldenburg horses based on DNA microsatellite polymorphism. *Ann. Anim. Sci.*, 3 (2): 213–224.

Ząbek T., Natonek M., Bugno M., Radko A. (2005 a). Application of microsatellite multiplexes in parentage testing of Polish Half-bred Anglo-Arabian horses. *Ann. Anim. Sci.*, 5 (2): 269–277.

Ząbek T., Nogaj A., Radko A., Nogaj J., Słota E. (2005 b). Genetic variation of Polish endangered

Biłgoraj horses and two common horse breeds in microsatellite loci. *J. Appl. Genet.*, 46 (3): 299–305.

Ząbek T., Żyga A., Radko A., Słota E. (2006). Analysis of genetic variation in Małopolski horses using molecular and pedigree data. *Ann. Anim. Sci.*, 6 (1): 13–27.

THE APPLICATION OF DNA MICROSATELLITE POLYMORPHISM IN PARENTAGE CONTROL

Summary

The International Society for Animal Genetics (ISAG) determines guidelines for class II marker parentage control. At present, ISAG recommends 12 microsatellite loci as a minimal STR panel for parentage control. The usefulness of applicable STR panel is evaluated on the basis of microsatellite sequence analysis. The statistical analysis is used for the evaluation of genetic variability and genetic structure of horse breeds. The microsatellite sequence polymorphism is used successfully for individual genetic identification, parentage control and deciding controversial cases of putative parents. The STRs are also used in evaluation of genetic diversity of horse populations and breeds. The monitoring of changes in horse breeds or populations by using genetic markers allows maintaining diversity and genetic variability, determines the direction of population progress, and prevents unfavourable genetic effects.



Fot.: D. Dobrowolska