

Zastosowanie analizy DNA w kontroli pochodzenia świń w Polsce

Anna Koseniuk, Anna Radko, Dominika Rubiś, Grzegorz Smolucha, Agnieszka Szumiec

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

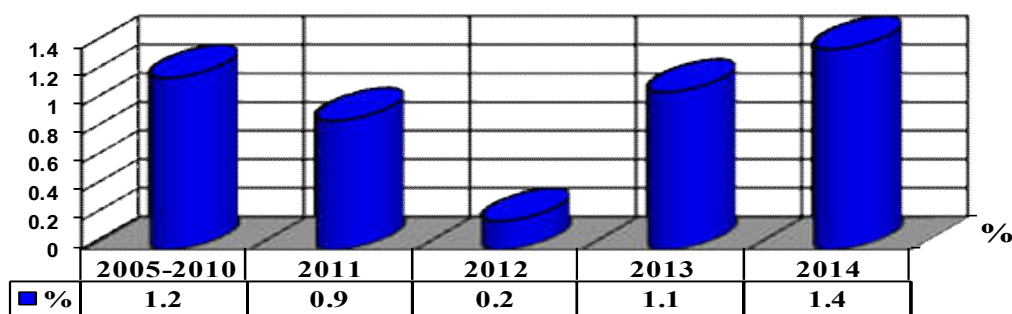
Wprowadzenie

Prawidłowe zapisy w dokumentacji hodowlanej stanowią podstawę doboru zwierząt na rodziców następnych pokoleń, przyczyniając się do uzyskania postępu hodowlanego. Stąd, tak ważne jest zastosowanie odpowiedniej techniki do przeprowadzenia identyfikacji zwierząt i weryfikacji danych rodowodowych.

Nadzór nad kontrolą pochodzenia świń w chlewniach zarodowych prowadzono od 1968 r. w Pracowni Grup Krwi w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki Pawłowice (ZD Pawłowice), przemianowanej później na Pra-

cownię Immunogenetyki (<http://www.zzdpawlowice.pl>).

Do końca 2015 r. kontrolę pochodzenia u trzody chlewnej prowadzono na podstawie grup i białek krwi. Do badań wykorzystywano zestaw 25 reagentów testowych z 9 układów genetycznych (A, B, E, F, G, H, K, L, N). Przeprowadzane testy serologiczne pozwalały, w zależności od rasy świń, na potwierdzenie pochodzenia z 93–96% prawdopodobieństwem (Kamyczek, 1997). Na podstawie systematycznie prowadzonych badań procent wykluczeń w polskiej populacji świń wahał się od 0,2% w 2012 r. do 1,4% w 2014 (rys.1).



Rys. 1. Procent wykluczeń pochodzenia wyliczony na podstawie polimorfizmu grup i białek krwi w badanych chlewniach zarodowych w poszczególnych latach w Polsce

Photo 1. The nine-year rates of paternity misidentification determined from blood group and serum protein polymorphism in herds of Polish pigs

Badanie polimorfizmu antygenów erytrocytarnych wymaga żmudnego i czasochłonnego procesu produkcji reagentów testowych, a testy immunologiczne mogą być wykonywane

tylko z użyciem świeżej (niemrożonej) krwi. Ponadto, takie markery genetyczne jak grupy krwi są wrażliwe na selekcję hodowlaną oraz redukcję liczebności populacji. Czynniki te powodują ob-

niżenie heterozygotyczności populacji. Wpływa to negatywnie na moc testu, a w skrajnych przypadkach uniemożliwia otrzymanie wiarygodnego wyniku. Na te zjawiska odporniejsze są markery DNA (Tapio i in., 2003; Varv i in., 2010).

Polimorfizm STR w hodowli zwierząt

Wraz z rozwojem nowych technik badawczych pojawiła się możliwość weryfikacji pochodzenia zwierząt w oparciu o analizę DNA. W latach 90. XX w. Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (*International Society for Animal Genetics* – ISAG) zaleciło, aby kontrola pochodzenia zwierząt hodowlanych, prowadzona dotychczas w oparciu o grupy krwi i polimorficzne warianty białek, została poszerzona o analizę polimorfizmu DNA. Spośród markerów DNA największe zastosowanie znalazły sekwencje mikrosatelitarne (STR, *short tandem repeat* – krótkie powtórzenia tandemowe), czyli krótkie fragmenty DNA złożone z 1 do 5 nukleotydowych tandemowych powtórzeń DNA, równomiernie rozmieszczonych w genomie eukariotów (Tautz, 1989). Markery mikrosatelitarne analizowane są techniką automatycznego określania długości DNA, wyrażaną w parach zasad (pz) z zastosowaniem reakcji PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy) oraz rozdziału elektroforetycznego w sekwenatorze DNA. Do kontroli pochodzenia szczególne zastosowanie znalazła reakcja PCR typu multiplex, gdzie w mieszaninie reakcyjnej wykorzystuje się nawet kilkanaście par sekwencji starterowych. Takie sekwencje starterowe są znakowane fluorescencyjnymi barwnikami, co umożliwia wykrycie jednocześnie kilkunastu markerów mikrosatelitarnych w jednej ścieżce żelu poliakrylamidowego. Do odczytu rozdziału elektroforetycznego fluorescencyjnie znakowanych fragmentów DNA używane są czytniki laserowe, pozwalające na bezpośredni odczyt wyników w programach komputerowych oraz zachowanie danych w pamięci komputera (Tanaka i in., 1996).

Duża ilość oznaczonych w genomach zwierząt sekwencji mikrosatelitarnych oraz sto-

sunkowo szybka i efektywna technika ich analizy spowodowały, że obecnie stanowią one najliczniejszą grupę markerów stosowanych w badaniu struktury i zmienności genetycznej różnych populacji świń (Nechtelberger i in., 2001; Wang i in., 2004; Zhang i in., 2005), jak również w prowadzeniu kontroli rodowodów (Nechtelberger i in., 2001). Zastosowanie STR do weryfikacji pochodzenia u różnych gatunków zwierząt gospodarskich, ze względu na duży polimorfizm i czułą technikę analizy tych markerów pozwala na uzyskanie 98–99,9% prawdopodobieństwa wykluczenia niewłaściwego rodzica (Radko 2008; Rychlik i in., 2003).

Pierwsze markery mikrosatelitarne wybrane przez FAO i ISAG do badań bioróżnorodności świń opracowano w latach 1998–2003. Stanowiły one dwa zestawy markerów: 15 STR – CGA, IGF1, S0002, S0005, S0026, S0068, S0090, S0101, S0155, S0178, S0215, S0218, S0225, S0226, S0227 i 12 STR – S0228, S0355, S0386, SW24, SW72, SW122, SW240, SW632, SW857, SW911, SW936, SW951.

W 2005 r. ISAG wytypowało minimalny zestaw 12 mikrosatelitarnych markerów do kontroli pochodzenia świń: S070, S230, SW240, SW830, S0059, S0122, SW1430, SW2160, SW2411, SW840, SWC27, TNFB i AMEL gen, który testowano w kolejnych latach.

Aktualnie do rutynowych badań zalecany jest podstawowy zestaw 15 markerów: S0005, S0090, S0101, S0155, S0227, S0228, S0355, S0386, SW24, SW240, SW72, SW857, SW911, SW936 i SW951. Dodatkowo zaproponowano uzupełniający panel 7 STR: IGF1, S0002, S0026, S0215, S0225, S0226 i SW632. W 2014 r. na konferencji ISAG (ISAG Xi'an, Chiny) podano sekwencje starterowe do amplifikacji wytypowanych markerów (tab. 1). Ostatnie wyniki z międzynarodowego testu porównawczego, organizowanego przez ISAG w 2014 r., w którym uczestniczyły 24 laboratoria, z których tylko 9 podało wyniki zgodne w 98–100%, świadczą o tym, że proponowany zestaw markerów wymaga ponownej weryfikacji i walidacji.

Tabela 1. Sekwencje starterowe rekomendowane przez ISAG
Table 1. List of recommended markers with primer information

Marker	Cro.	Size range	Primer (5'-3'): Forward	Primer (5'-3'): Reverse
IGF1	5	197-209	GCTTGGATGGACCATGTTG	CATATTTTTCTGCATAAATTGAACCT
S0002	3q	190-216	GAAGCCCAAAGAGACAACCTGC	GTTCTTTACCCACTGAGCCA
S0005	5	205-248	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA	GCACTTCTGATTCTGGGTA
S0026	16	92-106	AACCTTCCCTTCCCAATCAC	CACAGACTGCTTTTTACTCC
S0090	12	244-251	CCAAGACTGCCTGTAGGTGAATA	GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG
S0101	7	197-216	GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG	GCTCCCTCACACTTACCGCAG
S0155	1q	150-166	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTT	AAAGTGAAAGAGTCAATGGCTAT
S0215	13	135-169	TAGGCTCAGACCTGCTGCAT	TGGGAGGCTGAAGGATTGGGT
S0225	8	170-196	GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA	CAGGTGGAAAGAATGGAATGAA
S0226	2q	181-205	GCACTTTTAACTTTTCATGACTCC	GGTTAAACTTTTTNCCCAATACA
S0227	4	231-256	GATCCATTATAATTTTAGCACAAAGT	GCATGGTGTGATGCTATGTCAAGC
S0228	6	222-249	GGCATAGGCTGGCAGCAACA	AGCCACCTCATCTTATCTACT
S0355	15	243-277	TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG	TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA
S0386	11	156-174	GAA CTC CTG GGT CTT ATT TTC TA	GTC AAA AAT CTT TTT ATC TCC AAC AGT AT
SW24	17	96-121	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC	ATCCAAATGTGCAAGCG
SW240	2p	96-115	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG	AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA
SW632	7	159-180	TGGGTTGAAAGATTTCCTCAA	GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA
SW72	3p	100-116	ATCAGAACAGTGCGCCGT	TTTGAAAATGGGGTGTITCC
SW857	14	144-160	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC	GATCCTCCTCCAAATCCCAT
SW911	9	153-177	CTCAGTCTTTGGGACTGAACC	CATCTGTGGAAAAAAAAAGCC
SW936	15	80-117	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC	GTGCAAGTACACATGCAGGG
SW951	10	125-133	TTTCAAACTCTGGCACCAG	GATCGTGCCCAATGGAC

Analiza loci mikrosatelitarnych w polskiej populacji świń

Od 2016 r. kontrola pochodzenia świń jest prowadzona w Laboratorium Genetyki Molekularnej Instytutu Zootechniki PIB, gdzie został opracowany panel złożony z 14 loci mikrosatelitarnych rekomendowanych przez ISAG. Obejmuje on następujące markery: SW240, SW911, S0101, S0090, SW72, SW857, S0226, S0228, SW936, SW632, S0227, SW24, S0155, S0355, zebrane w 1 plex, czyli możliwe do oznaczenia w jednej mieszaninie.

Reakcję PCR multiplex przeprowadza się z użyciem Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen) oraz fluorescencyjnie znakowanych sekwencji mikrosatelitarnych (barwniki: FAM, VIC, NED, PET).

Otrzymane produkty PCR poddaje się elektroforezie w denaturującym żelu poliakrylamidowym w obecności standardu długości 500 LIZ, w sekwenatorze 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Wynik rozdziału elektroforetycznego, który stanowią fragmenty DNA o różnej długo-

ści, odczytuje się w programie GeneMapper® Software 4.0.

W przeprowadzonych w pierwszym półroczu 2016 r. badaniach na 236 osobnikach różnych ras uzyskano pełne profile DNA we wszystkich analizowanych loci. Świadczy to o prawidłowo dobranych parametrach reakcji PCR, takich jak profil temperaturowy oraz koncentracja starterów w mieszaninie reakcyjnej.

Obecnie prowadzona jest walidacja metody analizy 14 markerów mikrosatelitarnych. Ponadto, planuje się udział Laboratorium Genetyki Molekularnej Instytutu Zootechniki PIB w międzynarodowych testach porównawczych DNA organizowanych przez ISAG.

Podsumowanie

Zastosowanie rekomendowanych przez ISAG starterów do oznaczania STR oraz międzynarodowa standaryzacja wyników w testach porównawczych DNA pozwoli na zachowanie uniwersalności badań rodowodowych świń w Polsce, co ma istotne znaczenie przy imporcie i eksporcie zwierząt, nasienia oraz zarodków.

Literatura

- Kamyczek M. (1997). Badania grup krwi i ich wykorzystanie w kontroli pochodzenia u świń. *Rocz. Nauk. Zoot., Supl.*, 1: 63–66.
- Nechtelberger D., Kaltwasser C., Stur I., Meyer J.N., Brem G., Mueller M., Müller S. (2001). DNA microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. *Anim. Biotechnol.*, 12: 141–144.
- Radko A. (2008). Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification of cattle raised in Poland. *Ann. Anim. Sci.*, 8, 4: 205–216.
- Rychlik T., Radko A., Duniec M. (2003). Ocena przydatności polimorfizmu niektórych markerów genetycznych w kontroli rodowodów owiec. *Med. Weter.*, 59 (11): 1016–1018.
- Tanaka H., Saito M., Tsuji S. (1996). Analysis system of microsatellite polymorphism using automated laser fluorescent DNA sequencer. *Nihon Rinsho*, 54 (2): 322–328.
- Tapio M., Miceikiene I., Vilkki J., Kantanen J. (2003). Comparison of microsatellite and blood protein diversity in sheep: inconsistencies in fragmented breeds. *Mol. Ecol.*, 12: 2045–2056.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17 (16): 6463–6471.
- Varv S., Kantanen J., Viinalass H. (2010). Microsatellite, blood group and protein diversity of Estonian Dairy Cattle Breeds. *Agr. Food Sci.*, 19: 284–293.
- Wang X., Cao H.H., Geng S.M., Li H.B. (2004). Genetic diversity of 10 indigenous pig breeds in China by using microsatellites. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 17: 1219–1222.
- Zhang J.H., Xiong Y.Z., Deng C.Y. (2005). Correlations of genetic heterozygosity and variances with heterosis in a pig populations revealed by microsatellites DNA marker. *Asian Aust. J. Anim. Sci.*, 18: 620–625.

THE USE OF DNA ANALYSIS FOR PIG PARENTAGE VERIFICATION IN POLAND

Summary

Parentage testing of pigs in Poland was supervised from 1968 to the end of 2015 based on blood groups and proteins at the Experimental Station of the National Research Institute of Animal Production in Pawłowice. Although the serological tests confirmed the parentage with a probability of 93–96%, the erythrocyte antigen polymorphism analysis has many shortcomings. Therefore the International Society for Animal Genetics (ISAG) has recommended that the parentage tests of farm animals should be extended with analysis of DNA polymorphism. Among DNA markers, microsatellite sequences have found the widest application in parentage verification of farm animals. Since 2016, pig parentage testing in Poland has been performed at the Laboratory of Molecular Genetics of the National Research Institute of Animal Production, where a panel of markers recommended by the ISAG was developed. It consists of 14 microsatellite loci in one plex. The tests performed in the first half of 2016 with 236 animals of different breeds produced complete DNA profiles for all the loci under analysis. This shows that PCR parameters such as temperature profile and concentration of primers in the reaction mixture, were correctly chosen. In the next stage, a method for analysing 14 microsatellite markers will be elaborated and validated, whereas the Laboratory of Molecular Genetics of the National Research Institute of Animal Production will participate in the international DNA comparison tests organized by the ISAG.



fot. M. Szyndler-Nędza