

OCENA POLIMORFIZMU MARKERÓW MIKROSATELITARNYCH DNA U KONIKÓW POLSKICH

EVALUATION OF POLYMORPHISM OF DNA MICROSATELLITES OF POLISH KONIK

Abstrakt. Tematem prezentowanej pracy była analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA u 118 osobników rasy konik polski. Zastosowano zautomatyzowaną technikę analizy wielkości fragmentów DNA wykorzystując komercyjny zestaw starterów przeznaczony do kontroli pochodzenia koni. Identyfikowano allele z 17 następujących mikrosatelitarnych loci: AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, VHL20, ASB17, ASB23, HTG6, HTG7, CA425, HMS1, LEX3. Wszystkie badane mikrosatelitarne markery DNA charakteryzowały się wysokim polimorfizmem za wyjątkiem *loci* HTG4 i HTG6. Najwyższe wartości szacowanych parametrów H_o , PIC i PD dotyczyły *locus* HMS6 ($H_o = 0,822$, PIC = 0,728 i PD = 0,903). Prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa obliczone dla zestawu 17 STR wynosiło 0,9996 dla PE_1 i 0,9981 dla PE_2 .

Słowa kluczowe: *mikrosatellity, kontrola rodowodów, konie*

Summary. The aim of the present study was the evaluation of microsatellite DNA markers for paternity control in horses. Polymorphism of 17 microsatellite markers were studied in 118 Polish Konik. Under consideration were markers from commercially available kit for horses parentage verification (AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, VHL20, ASB17, ASB23, HTG6, HTG7, CA425, HMS1, LEX3). The allele identification was performed using automated DNA sizing technology. All the DNA microsatellite markers were highly polymorphic except for HTG4 and HTG6 *loci*. The highest values of estimated coefficient of heterozygosity (H_o), the polymorphic information content (PIC) and power of discrimination (PD) parameters concerned *locus* HMS6 ($H_o = 0,822$, PIC = 0,728, PD = 0,903). The probability of sire exclusion calculated for the set of 17 STR were 0,9981 for PE_1 and 0,9998 for PE_2 .

Key words: *mikrosatellites, parentage control, Polish Konik*

WSTĘP

Sekwencje mikrosatelitarne, określone również jako STR (short tandem repeat), są fragmentami DNA o długości od 60 do 300 par zasad (pz), występującymi głównie w regionach niekodujących genów i rozproszonymi równomiernie w genomie co 6 do 10 tysięcy par zasad (kpz). Składają się one z 10 do 50 powtórzeń jedno- do sześci nukleotydowego motywu i charakteryzują się wysokim polimorfizmem [Tautz 1989]. Znaczący postęp w badaniach nad identyfikacją, charakterystyką i polimorfizmem sekwencji mikrosatelitarnych DNA przyniosło zastosowanie multipleksowych reakcji PCR oraz zautomatyzowanej techniki analizy wielkości fragmentów DNA. Mikrosatelity stały się powszechnie stosowanymi markerami między innymi w programach mapowania genomu [Botstein i in. 1980], analizie zróżnicowania wewnątrz i międzyrasowego [Curik i in. 2003, Groeneveld L.F. i in. 2010, Sávio P.R. i in. 2008] oraz w identyfikacji i mapowaniu *loci* cech ilościowych (QTLs) [Diesterbeck i in. 2007]. STR szczególne znaczenie znalazły w identyfikacji osobniczej i kontroli pochodzenia [Luís i in. 2002, Lee i Cho 2006]. W kraju przeprowadzono badania nad polimorfizmem mikrosatelitarnym DNA u koni arabskich i pełnej krwi [Gralak i in. 1998] oraz koni małopolskich [Ząbek i in. 2006]. W prezentowanej pracy przedstawiono analizę markerów mikrosatelitarnych wytypowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (International Society for Animal Genetics – ISAG) u konika polskiego będącego rodzimą rasą koni wywodzącą się od tarpana.

Celem przeprowadzonych badań była analiza polimorfizmu 17 *loci* mikrosatelitarnych DNA u konika polskiego oraz ocena przydatności zestawu markerów do kontroli pochodzenia w tej rasie.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki krwi od 118 koników polskich (kn) pochodzących po 20 ogierach, zgromadzone w ramach kontroli pochodzenia koni w IZ PIB. Krew do analiz przechowywano w probówkach z dodatkiem EDTA w temperaturze -20°C. DNA izolowano przy użyciu zestawu Wizard DNA purification kit (Promega) wg procedur podanych przez producenta. Reakcję PCR przeprowadzono za pomocą komercyjnego zestawu do jednoczesnej amplifikacji 17 sekwencji mikrosatelitarnych specyficznych dla koni produkcji Finnzymes Diagnostics. Zestaw ten zawiera mieszaninę 17 par sekwencji starterowych, jeden z każdej pary starterów znakowany jest na końcu 5' fluorescencyjnym barwnikiem - 6-FAM, JOE i NED. Umożliwia on oznaczenie 12 *loci*: AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, VHL20, ASB17, ASB23 podstawowy i 5 dodatkowych *loci*: HTG6, HTG7, CA425, HMS1, LEX3 stanowiących panel STR rekomendo-

wanych przez ISAG do weryfikacji rodowodów koni. Do amplifikacji zastosowano warunki zgodne z protokołem producenta zestawu. Produkty reakcji PCR poddano elektroforezie kapilarnej w 4% żelu poliakrylamidowym w sekwenatorze ABI 3130xl (Applied Biosystems), z użyciem standardu wielkości LIZ500. Analizę uzyskanych fragmentów DNA i weryfikacji profili w 17 mikrosatelitarnych *loci* wykonano w programie GeneMapper 4.0.

Na podstawie częstości występowania zidentyfikowanych alleli wyliczono heterozygotyczność obserwowaną (H_o) i oczekiwaną (H_e) [Nei 1978], indeks stopnia polimorfizmu (PIC) [Botstein i in. 1987] oraz siłę dyskryminacji (PD). Oszacowano także prawdopodobieństwo wykluczenia pochodzenia na podstawie pojedynczego *locus* w przypadku, gdy znany jest genotyp jednego z rodziców (PE_1) i obojga rodziców (PE_2) oraz prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa - PE_C na podstawie wszystkich 17 analizowanych *loci* [Jamieson i Taylor 1997, Kimberly 1998]. Obliczenia wykonano z wykorzystaniem własnego programu statystycznego Imgbov-Stat, obsługującego bazę danych IZ PIB.

WYNIKI I DYSKUSJA

Sekwencje mikrosatelitarne DNA są grupą markerów genetycznych, która zgodnie z zaleceniem Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Zwierząt z 1996 r. powinna być stosowana równolegle z grupami krwi do kontroli pochodzenia koni. Dotychczas wyniki różnych badań wskazują, że do kontroli pochodzenia powinny być wybrane sekwencje mikrosatelitarne DNA charakteryzujące się wysokim polimorfizmem, dobrze zrównoważoną częstością występowania alleli w poszczególnych *loci*, dla których wartości wskaźników PIC, H_o oraz PE_2 dla pojedynczych *loci* osiągają wartość powyżej 0,5. Ponadto, powinny charakteryzować się dobrą rozdzielczością elektroforetyczną produktów amplifikacji w żelu poliakrylamidowym i powtarzalnością wyników przy określaniu wielkości poszczególnych alleli [Botstein i in. 1980]. W badanej rasie koni, w trakcie elektroforezy, poszczególne produkty PCR wyraźnie się rozdzielały, słabszy sygnał wynikający ze słabszej amplifikacji zaobserwowano jedynie w *locus* AHT5 u 15 osobników oraz w HMS3 u 12 osobników.

Łącznie w 17 analizowanych mikrosatelitarnych *loci* zidentyfikowano ogółem 114 alleli, których liczba w zależności od *locus* wynosiła od 3 (*locus* HTG6) do 10 (*locus* HTG10), średnia liczba alleli wynosiła 6,71. W większości przypadków allele zidentyfikowane w poszczególnych *loci* występowały ze zróżnicowaną częstością. Na podstawie częstości alleli oszacowano wskaźniki polimorfizmu badanych markerów. W tabeli 1. zostały zestawione parametry dla każdego polimorficznego *locus* badanej populacji. Większość

analizowanych STR charakteryzowała się wysokimi wartościami wskaźników H_o , H_e , PIC i PD wynoszącymi wartość ponad 0,5. Wyjątek stanowiły markery HTG4 z podstawowego panelu STR wymaganego do weryfikacji pochodzenia koni oraz HTG6 z panelu dodatkowego. Wartości H_o i PIC dla HTG4 wyniosły odpowiednio 0,466 i 0,382 oraz dla HTG6 - 0,076 i 0,073.

Wyliczona siła dyskryminacji dla tych markerów również przyjęła najniższe, spośród badanych *loci*, wartości 0,646 dla HTG4 i jedynie 0,144 dla HTG6. Natomiast najwyższym polimorfizmem odznaczał się marker HMS6, dla którego wartości H_o , PIC i PD osiągnęły odpowiednio 0,822, 0,728 i 0,903. Wysokim polimorfizmem (H_o , PIC i PD wyższym od 0,7) charakteryzowało się aż 8 badanych *loci* (Tab. 1).

<i>Locus</i>	Liczba alleli	H_o	H_e	PIC	PD	PE ₁	PE ₂
AHT4	6	0,7542	0,7379	0,6962	0,8808	0,3349	0,5111
AHT5	7	0,7627	0,7743	0,7407	0,9140	0,3878	0,5666
ASB2	8	0,7797	0,7218	0,6945	0,8947	0,3375	0,5236
HMS2	7	0,6441	0,6837	0,6360	0,8505	0,2730	0,4443
HMS3	6	0,7542	0,7731	0,7419	0,9115	0,3892	0,5700
HMS6	6	0,8220	0,7640	0,7277	0,9028	0,3671	0,5469
HMS7	7	0,5763	0,6965	0,6416	0,8607	0,2762	0,4423
HTG10	10	0,6780	0,7798	0,7468	0,9138	0,3957	0,5741
HTG4	4	0,4661	0,4048	0,3816	0,6462	0,0865	0,2303
HTG6*	3	0,0763	0,0741	0,0727	0,1438	0,0027	0,0374
HTG7*	4	0,5593	0,5973	0,5402	0,7703	0,1880	0,3428
VHL20	9	0,7966	0,7665	0,7320	0,8901	0,3806	0,5585
ASB17	9	0,7542	0,7415	0,7068	0,8778	0,3515	0,5311
ASB23	8	0,7119	0,7346	0,6878	0,8723	0,3222	0,4950
CA425*	6	0,6780	0,6849	0,6514	0,8687	0,2865	0,4699
HMS1*	7	0,7288	0,7448	0,7054	0,8986	0,3452	0,5228
LEX3*	7	0,4661	0,7732	0,7408	0,8992	0,3887	0,5683
Średnia	6,71	0,6476	0,6737	0,6379	1-0,3x10 ⁻¹⁴	0,998092	0,999986

Tab. 1. Wskaźniki polimorfizmu dla każdego locus zestawu 17 mikrosatelitarnych *loci*. * dodatkowe markery mikrosatelitarne

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano wyraźną różnicę w wartościach H_o i H_e dla LEX3 ($H_o = 0,466$, $H_e = 0,773$) może to być spowodowane faktem, że marker ten zlokalizowany jest na chromosomie X.

Kumulatywna wartość siły dyskryminacji (PD_C) jest ważnym parametrem określającym przydatność zestawu STR do identyfikacji osobniczej. W badaniach własnych, na podstawie 17 *loci* mikrosatelitarnych parametr ten osiągnął wartość bliską jedności ($PD_C = 1-0,3 \times 10^{-14}$).

W celu określenia przydatności ocenianych markerów do kontroli pochodzenia wyliczono prawdopodobieństwo wykluczenia pochodzenia dla każdego *locus* i dla wszystkich 17 *loci* łącznie, gdy znany jest genotyp jednego rodzica (PE_1) i obojga rodziców (PE_2). Wartość PE_1 w badanej rasie koni obliczone na podstawie pojedynczych *loci* mieściło się w przedziale od 0,003 w *locus* HTG6 do 0,396 w HTG10, natomiast PE_2 od 0,0374 do 0,5741 odpowiednio dla tych samych markerów (Tab. 1). Łączne prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa (PE_C) na podstawie 17 analizowanych STR dla PE_1 wyniosło 99,809%, a dla PE_2 powyżej 99,998%.

WNIOSKI

Wysokie wartości omawianych wskaźników H_o , PIC i PD oraz wyliczone wysokie łączne prawdopodobieństwo wykluczenia pochodzenia wskazują na znaczny stopień zmienności genetycznej analizowanej populacji koni oraz świadczą o przydatności analizowanego zestawu 17 markerów mikrosatelitarnych DNA do badań weryfikacji rodowodów konika polskiego.

LITERATURA

- Botstein D. White R.L. Skolnick M. Davis R.W. 1980. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism*. Am. J. Human Genet., 32: 182 – 190.
- Curik I. Zechner P. Sölkner J. Achmann R. Bodo I. Dovc P. Kavar T. Marti E. Brem G. 2003. *Inbreeding, Microsatellite Heterozygosity, and Morphological Traits in Lipizzan Horses*, Journal of Heredity 94 (2): 125-132.
- DAD-IS (Domestic Animal Diversity Information System hosted by FAO) 2012.02.12 <http://dad.fao.org>
- Diesterbeck U.S., Hertsch B. & Distl O. 2007. *Genome-wide search for microsatellite markers associated with radiologic alterations in the navicular bone of Hanoverian warmblood horses*. Mamm. Gen. 18: 373–81.

- Gralak B., Kuryl J. and Niemczewski C. 1998. *Usefulness of a set of seven microsatellites for parentage control in Arabian Horse and Thoroughbreds in Poland*. Anim. Genet. 29 (Suppl. 1):16.
- Groeneveld L.F. Lenstra J.A. Eding H. Toro M.A. Scherf B. Pilling D. Negrini R. Finlay E.K. Jianlin H. Groeneveld E. Weigend S. 2010. *Genetic diversity in farm animals - a review*. Animal Genetics 41: 6-31.
- Jamieson A., Taylor S.C.S. 1997. *Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion*. Anim. Genet., 28: 397 – 400.
- Kimberly A.H. 1998. *Statistical Analysis of STR Data*. Profiles in DNA 3: 14-15.
- Lee S, i Cho G. 2006. *Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing*. J. Vet. Sci. 7: 63-67.
- Luís C., Cothran E Gus and Oom M.M. 2002. *Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing*. Genet. Mol. Biol., 25: 131-134.
- Nei M. 1978. *Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals*. Genetics 89: 583–590.
- Sávio P.R. Evonnildo C.G. Artur S. Maria P.C.S. 2008. *Genetic variability and efficiency of DNA microsatellite markers for paternity testing in horse breeds from the Brazilian Marajó archipelago*. Genetics and Molecular Biology, 31 (1): 68-72.
- Tautz D. 1989. *Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers*. Nucleic Acids Res 17 (16): 6463-6471.
- 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: 13-27.

Adres do korespondencji:

dr hab. Anna Radko, mgr Agnieszka Fornal
Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy
e-mail: arys@izoo.krakow.pl, aforنال@izoo.krakow.pl

Opiekun naukowy: *prof. dr hab. Ewa Słota*