

# Polimorfizm wybranych sekwencji mikrosatelitarnych i ocena ich przydatności do kontroli pochodzenia w sześciu rasach psów

JOLANTA KLUKOWSKA, TOMASZ JANKOWSKI, MAREK ŚWITOŃSKI

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

Klukowska J., Jankowski T., Świtoński M.

## Polymorphism of selected microsatellites and their usefulness for paternity control in six dog breeds

### Summary

The polymorphism of a total of nine microsatellite loci (CPH3, CPH6, CPH8, 2004, 2010, 2140, 2159, 2168 and 2319) were analysed in six dog breeds (bouvier des Flandres, Yorkshire terrier, bloodhound, dachshund, rottweiler and boxer). All the loci were at least medium polymorphic and the PIC value for all the dogs varied from 0.67 to 0.91. However, a broad variability in the PIC value was found within particular breeds themselves – from 0.16 (CPH3 in bloodhounds) to 0.89 (2319 in dachshunds). The microsatellites which were studied turned out to be very useful for paternity control. The exclusion probability (PE) for the studied breeds, in the case where both parents could be genotyped, varied from 0.9946 (boxer) to 0.9996 (dachshund). In the case where only one parent was available for genotyping the PE varied from 0.6677 (bouvier des Flandres) to 0.7090 (boxer).

**Keywords:** dog, microsatellites, paternity control

W drugiej połowie lat 90. odnotowano gwałtowny postęp w zakresie genetyki molekularnej psa. Był to między innymi efekt uruchomienia w 1993 r. międzynarodowego programu DogMap, w celu zbudowania markerowej mapy genomu tego gatunku (2, 20). Markerowa mapa genomu psa, podobnie jak i innych gatunków zwierząt, oparta jest w głównej mierze na lokalizacji wysoce polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych. Sekwencje te zbudowane są z powtarzalnego motywu kilkunukleotydowego, którego obecność w DNA identyfikuje się przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), z wykorzystaniem sekwencji starterowych specyficznych dla danego locus mikrosatelitarnego. Wysoka polimorficzność tej klasy markerów genetycznych sprawiła, że są one powszechnie wykorzystywane do identyfikacji osobniczej, a w tym do kontroli pochodzenia np. bydła (14) i koni (6).

Kontrola pochodzenia, prowadzona w oparciu o analizę dziedziczenia markerów genetycznych, jest praktykowana od wielu lat u podstawowych gatunków zwierząt domowych: bydła, koni i świń. Jej celem jest weryfikacja zapisów w rodowodach zwierząt. Badania tego typu są niejednokrotnie stosowane także do rozstrzygnięcia sporów sądowych dotyczących m.in.

prawa własności danego osobnika. Przez wiele lat w takich badaniach posługiwano się przede wszystkim serologiczną analizą polimorfizmu układów grupowych krwi oraz elektroforetyczną oceną polimorfizmu białek surowicy krwi. Ograniczona wiedza o tych układach markerowych psa pozwalała na prowadzenie kontroli pochodzenia tylko w niewielkim zakresie (19). Rozbudowa markerowej mapy genomu psa (9, 11, 21) doprowadziła do identyfikacji wieluset polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych, które mogą być z powodzeniem wykorzystane do kontroli pochodzenia psów. Przydatność sekwencji mikrosatelitarnych do takich badań zależy od stopnia ich polimorfizmu. Ze względu na ogromne zróżnicowanie fenotypowe i genetyczne między rasami psów, wskazana jest ocena stopnia polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych w poszczególnych rasach.

Celem niniejszej pracy jest analiza polimorfizmu dziewięciu sekwencji mikrosatelitarnych oraz ocena ich przydatności do kontroli pochodzenia w sześciu rasach psów.

### Materiał i metody

Badaniami objęto 50 nie spokrewnionych osobników, wywodzących się z sześciu ras: bouvier des Flandres (n =

10), yorkshire terrier (n = 8), bloodhund (n = 5), jamnik (n = 11), rottweiler (n = 9) i bokser (n = 7).

Na bazie DNA wyizolowanego z komórek krwi amplifikowano 9 sekwencji mikrosatelitarnych: CPH3, CPH6, CPH8 (4); 2004, 2010, 2140, 2159, 2168 (3) oraz 2319 (10). Stosowano warunki amplifikacji DNA zgodne z opisem zawartym w wym. pracach referencyjnych. Rozdział elektroforetyczny fragmentów wykonywano w automatycznym sekwenatorze DNA – ALFexpress II, a analizę rozdziałów prowadzono w oparciu o program Fragment Manager.

Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych opisywano przy pomocy następujących parametrów: frekwencja alleli, wskaźnik heterozygotyczności (HET) oraz wskaźnik indeksu polimorficzności (PIC) (12). W oparciu o ustalone frekwencje alleli oszacowano prawdopodobieństwo wykluczenia pochodzenia, przy znanym genotypie jednego z rodziców ( $PE_1$ ) i znanych genotypach obu rodziców ( $PE_2$ ) dla poszczególnych mikrosatelitów i dla wszystkich łącznie (5). Ponadto, wyliczono dla poszczególnych loci średnią ważoną długość alleli, jako sumę iloczynów długości i frekwencji poszczególnych alleli w danym locus.

### Wyniki i omówienie

Ogólna liczba alleli dla poszczególnych loci była wysoka i w przypadku sześciu z nich (CPH3, CPH8, 2004, 2140, 2159 i 2319) przekroczyła granicę 10 alleli (tab. 1). Równocześnie w badanych rasach wielkość puli alleli była znacznie mniejsza i zawierała się w przedziale od 2 (locus CPH3 i 2140 u yorkshire terrierów oraz locus 2140 w rasie bouvier des flandres) do 10 (locus 2319 u jamników). Porównanie średniej ważonej długości alleli (wyrażonej liczbą par zasad – pz) ujawniło loci, w których zróżnicowanie rasowe było znikome (np. CPH3 i 2140), ale również i takie gdzie wystąpiły duże różnice – np. loci 2159, 2004 i

CPH8 (tab. 1). W locus CPH8 u rottweilerów obserwowano allele o mniejszych długościach (188, 190, 196, 198 i 204 pz), podczas gdy u bloodhundów i yorkshire terrierów wystąpiły allele dłuższe – odpowiednio 210, 212, 214 i 216 pz u bloodhundów oraz 202, 210, 212, 214 i 216 pz u yorkshire terrierów (ryc. 1). Z kolei w locus 2159 bardzo wysoka średnia ważona dla rasy yorkshire terrierów spowodowana była tym, że allele o bardzo dużej długości (270 pz) występował z dość wysoką frekwencją (0,25). Jeszcze dłuższy allele (286 pz) pojawił się u rottweilerów.

Znaczne zróżnicowanie puli alleli w poszczególnych rasach wpłynęło umiarkowanie na poziom polimorfizmu badanych loci, zarówno przy porównaniu ich między sobą, jak i poszczególnych loci między rasami (tab. 1). Wszystkie analizowane loci okazały się co najmniej średnio polimorficzne, a kilka z nich wykazywało wysoki polimorfizm. Najbardziej polimorficzną okazała się sekwencja 2319, dla której wartość PIC zawierała się w przedziale od 0,770 (rottweiler) do 0,836 (jamnik), a dla całej grupy zwierząt wyniosła aż 0,903. Z kolei sekwencja CPH3 wykazywała najmniej polimorfizm, a wartość PIC zawierała się w przedziale od 0,164 (bloodhund) do 0,644 (yorkshire terrier), a dla całej grupy wyniosła 0,667. Zbliżoną sytuację stwierdzono w locus 2140, bowiem tylko u jamników wartość PIC przekroczyła 0,7, podczas gdy w rasach bouvier des flandres i bloodhund wartość ta była niska – odpowiednio 0,27 i 0,31.

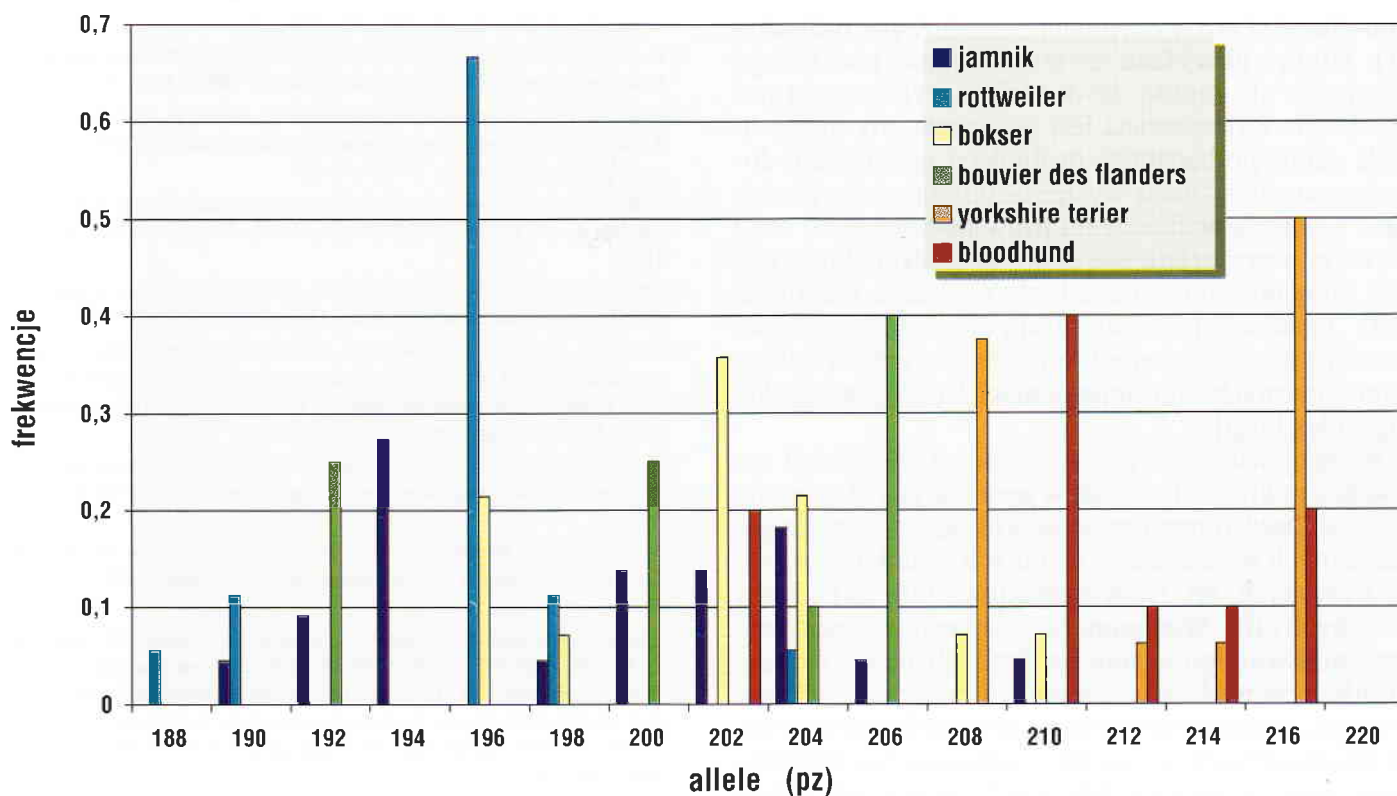
Stwierdzony wysoki polimorfizm badanych loci mikrosatelitarnych wskazuje jednoznacznie na ich przydatność w kontroli pochodzenia psów (tab. 2). Jeśli w badaniach możliwe jest ustalenie genotypu dla obu rodziców, we wszystkich dziewięciu loci, to wartość  $PE_2$  dla całej badanej grupy wyniosła 0,99997, z wa-

Tab. 1. Polimorfizm dziewięciu sekwencji mikrosatelitarnych w sześciu rasach psów

Loci	Rasy																				
	Jamnik			Rottweiler			Bokser			Bouvier des flandres			Yorkshire terrier			Bloodhund			Rasy łącznie		
	n	$\bar{x}_w$	PIC	n	$\bar{x}_w$	PIC	n	$\bar{x}_w$	PIC	n	$\bar{x}_w$	PIC	n	$\bar{x}_w$	PIC	n	$\bar{x}_w$	PIC	n	$\bar{x}_w$	PIC
CPH3	6	178	0,52	4	169	0,47	4	177	0,62	4	171	0,53	4	176	0,64	2	165	0,16	14	173	0,67
CPH6	7	121	0,75	3	121	0,52	3	119	0,55	3	121	0,41	4	121	0,55	4	121	0,67	8	121	0,71
CPH8	9	199	0,82	5	196	0,50	6	202	0,73	4	201	0,65	4	213	0,53	5	210	0,70	16	202	0,91
2004	7	260	0,81	7	257	0,77	5	248	0,74	6	267	0,77	7	267	0,76	4	267	0,65	16	261	0,88
2010	4	230	0,64	5	226	0,65	5	230	0,48	4	232	0,51	5	232	0,54	5	230	0,65	7	230	0,70
2140	6	145	0,75	5	143	0,54	3	137	0,41	2	141	0,27	5	149	0,59	2	141	0,31	12	143	0,78
2159	7	195	0,71	6	198	0,70	5	188	0,70	7	185	0,75	5	214	0,75	6	189	0,77	13	195	0,88
2168	6	218	0,75	4	223	0,69	3	214	0,43	5	215	0,63	4	210	0,64	4	215	0,61	8	216	0,81
2319	10	331	0,84	7	326	0,77	7	325	0,79	9	319	0,82	8	324	0,81	8	325	0,82	17	325	0,90

Objaśnienia: n – liczba alleli,  $\bar{x}_w$  – średnia ważona długości alleli dla danego locus, PIC – indeks stopnia polimorfizmu





Ryc. 1. Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnej w locus CPH8

Tab. 2. Prawdopodobieństwo wykluczenia pochodzenia, szacowane w oparciu o analizę polimorfizmu dziewięciu loci mikrosatelitarnych w sześciu rasach psów – PE<sub>1</sub> (genotypowanie tylko jednego z rodziców) i PE<sub>2</sub> (genotypowanie obu rodziców)

Rasa	PE <sub>1</sub>	PE <sub>2</sub>
Jamnik	0,7001	0,9996
Rottweiler	0,6837	0,9950
Bokser	0,7090	0,9946
Bouvier des flanders	0,6677	0,9951
Yorkshire terier	0,7045	0,9967
Bloodhund	0,6882	0,9956
Łączne	0,6512	0,99997

hnikami od 0,9946 (bokser) do 0,9996 (jamnik). W przypadku, kiedy kontrolę pochodzenia można przeprowadzić jedynie przez porównanie genotypu jednego z rodziców z genotypem potomka, wówczas prawdopodobieństwo wykluczenia (PE<sub>1</sub>) jest wyraźnie mniejsze i dla całej grupy badanych psów wynosi 0,6512, a dla poszczególnych ras wartość ta zawierała się w granicach od 0,6677 (bouvier des flandres) do 0,7090 (bokser).

### Dyskusja

W hodowli psów coraz częściej wykorzystuje się badania molekularne DNA do: identyfikacji nosicieli mutacji genowych, odpowiedzialnych za rozwój cho-

rób dziedzicznych (17); oceny dystansu genetycznego między rasami (8) oraz kontroli pochodzenia (5, 7). Przedstawione w niniejszej pracy wyniki potwierdzają bardzo dużą przydatność analizowanych loci mikrosatelitarnych do kontroli pochodzenia. Stopień polimorfizmu analizowanych loci, oszacowany dla wszystkich psów objętych niniejszymi badaniami, był podobny do wartości opisanych przez innych autorów (3, 4, 7, 10). Podkreślić jednak należy, że w przypadku dwóch ras polimorfizm dwóch loci (CPH3 i 2140) był niewielki. Pomimo tego, że wartość indeksu polimorfizmu (PIC) dla całej grupy badanych psów była wysoka (odpowiednio 0,67 i 0,78 dla CPH3 i 2140), to w rasach bloodhund (loci CPH3 i 2140) oraz bouvier des flandres (locus 2140) ich polimorfizm był bardzo mały. Obserwacja ta wskazuje, że przydatność niektórych markerów mikrosatelitarnych do analizy genetycznej w wybranych rasach może być niewielka. Jednakże ze względu na dość małą liczbę zwierząt objętych niniejszymi badaniami należy do takich uogólnień podchodzić z ostrożnością.

Wnioskowanie o pochodzeniu, na podstawie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych, powinno uwzględniać możliwość wystąpienia spontanicznych mutacji w tych sekwencjach. Przykładem takiej sytuacji jest tzw. allel zerowy opisany w genotypie psa rasy biały owczarek niemiecki (13). W efekcie mutacji we fragmencie DNA rozpoznawanym przez jeden ze starterów dla reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR) nie dochodziło do amplifikacji tej sekwencji. Mutacje mogą wystąpić również w obrębie sekwencji mikrosatelitarnej, czego efektem będzie pojawienie się alle-

lu o długości nie występującej w genotypie rodziców (1). Biorąc powyższe uwarunkowania pod uwagę przyjmuje się zasadę, że decyzja o wykluczeniu pochodzenia formułowana jest wówczas, gdy niezgodność genotypu badanego osobnika z genotypami domniemanych rodziców występuje co najmniej w dwóch loci. Kontrola pochodzenia psów hodowlanych staje się coraz powszechniejszą praktyką. Przykładowo, jest ona obligatoryjna w rasie biały owczarek niemiecki (18). Tendencję tę potwierdzają informacje zamieszczone na stronach internetowych krajowych związków kynologicznych – np. amerykańskich (<http://www.akc.org/index.html>).

Rozwój wiedzy o polimorfizmie i lokalizacji sekwencji mikrosatelitarnych w genomie psa okazuje się również bardzo przydatny do prowadzenia analiz genetycznych w odniesieniu do innych gatunków z rodziny psowatych, np. lisów pospolitych (15, 22) i lisów polarnych (16). Wiadomo, że powszechne stosowanie tzw. podwójnego krycia na fermach lisów istotnie utrudnia prowadzenie racjonalnej pracy hodowlanej. Dlatego, zastosowanie analizy polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych pozwala jednoznacznie rozstrzygnąć, który z samców kryjących samicę jest ojcem miotu lub poszczególnych szczeniąt. Analizy takie z powodzeniem prowadzono u psów (5).

### Podsumowanie

Oceniane sekwencje mikrosatelitarne są wysoce przydatne do analizy kontroli pochodzenia psów. Zaobserwowane niewielkie zróżnicowanie polimorfizmu badanych markerów pomiędzy przedstawicielami sześciu ras wpływa tylko w nieznacznym stopniu na prawdopodobieństwo z jakim można zakwestionować zapis rodowodowy o pochodzeniu. Wartość tego parametru jest bardzo wysoka i przekracza 0,995 dla każdej z analizowanych ras, przy założeniu, że możliwa jest ocena genotypu domniemanych rodziców i potomka. Można jednak założyć, że wartość prawdopodobieństwa wykluczenia (PE) w rasach o małej liczebności i w związku z tym o zawężonej zmienności genetycznej oraz w przypadku wysokiego spokrewnienia między rodzicami, co niejednokrotnie ma miejsce w hodowli psów, będzie wyraźnie niższa od zaprezentowanych w niniejszej pracy.

### Podziękowanie

Uprzejmie dziękujemy Panu dr Maciejowi Szydłowskiemu za pomoc przy wykonywaniu analiz statystycznych. Niniejsze badania zostały wykonane przy wsparciu finansowym Fundacji na rzecz Nauki Polskiej – mgr Jolanta Klukowska jest laureatką konkursu o stypendium krajowe dla młodych naukowców na rok 2001, a prof. Marek Świtoński uzyskał w 2000 r. subsydium naukowe (kontrakt 13/2000)

### Piśmiennictwo

1. Brinkmann B., Klitschar M., Neuhuber F., Huhne J., Rolf B.: Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem

repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 1998, 62, 1408-1415.

2. DogMap Consortium, DogMap: An International Collaboration Toward a Low-Resolution Canine Genetic Marker Map. *J. Hered.* 1999, 90, 3-6.
3. Francisco L. V., Langston A. A., Mellerch C. S., Neal C. L., Ostrander E. A.: A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm. Genome* 1996, 7, 59-362.
4. Fredholm M., Wintero A. K.: Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mamm. Genome* 1995, 6, 11-18.
5. Fredholm M., Wintero A. K.: Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Anim. Genet.* 1996, 27, 19-23.
6. Gralak B., Kurył J., Łukaszewicz M., Żurkowski M.: 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.* 1998, 16, 209-218.
7. Koskinen M. T., Bredbacka P.: A convenient and efficient microsatellite-based assay for resolving parentages in dogs. *Anim. Genet.* 1999, 30, 148-149.
8. Koskinen M. T., Bredbacka P.: Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Anim. Genet.* 2000, 31, 310-317.
9. Lingaas F., Aarskaug T., Gerlach J. A., Juneja R. K., Fredholm M., Sampson J., Suter N., Holmes N. G., Binns M. M., Ryder E. J., van Haeringen W. A., Venta P. J., Brouillette J. A., Yuzbasiyan-Gurkan V., Wilton A. N., Bredbacka P., Koskinen M., Dunner S., Parra D., Schmutz S., Schelling C., Schläpfer Dolf G.: A canine linkage map: 39 linkage groups. *J. Anim. Breed. Genet.* 2001, 118, 3-20.
10. Mellersh C. S., Langston A. A., Acland G. M., Fleming M. A., Ray K., Wiegand N. A., Francisco L. V., Gibs M., Aguirre G. D., Ostrander E. A.: A Linkage Map of the Canine Genome. *Genomics* 1997, 46, 326-336.
11. Neff M. W., Broman K. W., Mellersh C. S., Ray K., Acland G. M., Aguirre G. D., Ziegler J. S., Ostrander E. A., Rine J.: A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 1999, 151, 803-820.
12. Ott J.: Analysis of Human Genetic Linkage. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 1991, s. 25-26.
13. Pieńkowska A., Schelling C.: A G>C transversion within the primer binding site causes a "null" allele of the microsatellite T2201 in the White Shepherd breed. *J. Anim. Breed. Genet.* 2001, 118, 65-68.
14. Radtko A.: Markery mikrosatelitarne DNA w kontroli pochodzenia bydła. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 376-378.
15. Rintamäki M., Tähtinen J.: Genetic Diversity of Farmed Finnish Silver Fox (*Vulpes vulpes*). *Scientifur* 2000, 24, 114-119.
16. Rogalska-Niżnik N., Schelling C., Dolf G., Schlapfer J., Pieńkowska A., Świtoński M.: Localisation of three canine microsatellites on the arctic fox (*Alopex lagopus*) chromosomes. *Vet. Med.* 2000, 45, 314-316.
17. Rothuizen J., Ubbink G. J., van Zon P., Teske E., van den Ingh T. S. G. A. M., Yuzbasiyan-Gurkan V.: Diagnostic value of a microsatellite DNA marker for copper toxicosis in West-European Bedlington terriers and incidence of the disease. *Anim. Genet.* 1999, 30, 190-194.
18. Schelling C., Garbely E., Pieńkowska A., Vennos C., Dolf G., Stranzinger G.: Erfahrungen mit der Abstammungskontrolle bei Schweizer Rassenhunden. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1999, 141, 319-323.
19. Symons M., Bell K.: Canine blood groups: description of 20 specificities. *Anim. Genet.* 1992, 23, 509-515.
20. Świtoński M., Cholewiński G.: Rozwój markerowych map genomów psa i konia. *Post. Biol. Kom.* 2000, 27, 151-163.
21. Werner P., Mellersh C., Raducha M. G., DeRode S., Acland G., Prociuk U., Wiegand N., Aguirre D. D., Henthorn P. S., Patterson D. F., Ostrander E. A.: Anchoring of canine linkage groups with chromosome-specific markers. *Mamm. Genome* 1999, 10, 814-823.
22. Zajac M., Klukowska J., Słomski R., Świtoński M.: Polymorphism of nine canine-derived microsatellites in farm silver foxes (*Vulpes fulvus*). *J. Appl. Genet.* 2000, 41, 43-50.

Adres autora: prof. dr hab. Marek Świtoński, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań; e-mail: switonsk@jay.au.poznan.pl