

Markery mikrosatelitarne DNA w kontroli rodowodów u koni śląskich i pełnej krwi angielskiej

TOMASZ ZĄBEK, MARIAN DUNIEC, EWA SŁOTA, ANNA RADKO

Zakład Immuno- i Cytogenetyki Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa

Ząbek T., Duniec M., Słota E., Radko A.

Efficacy of parentage testing among Silesian and Thoroughbred horses using DNA microsatellite markers

Summary

The aim of this work was to verify the efficacy of 12 horse microsatellite markers (AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10 and VHL20) in parentage control of Silesian horses and Thoroughbreds. The allele identification was performed using automated DNA sizing technology. The effective number of alleles, polymorphism information content (PIC) and probability of exclusion (PE) were estimated. According to the calculated coefficients, the most valuable markers for testing were ASB2 in the Silesian horses and Thoroughbreds and HMS2 in Silesian horses. The probability of exclusion when using only 6 polymorphic loci in Silesian and Thoroughbred horses exceeded 0.99 and increased to 0.999 when all the loci tested were taken under consideration. The obtained results confirm the efficacy of the investigated microsatellite panel for parentage testing among Silesian horses and Thoroughbreds.

Keywords: horse, DNA microsatellite sequences, parentage control

Wiarygodność rodowodów zwierząt jest elementarnym warunkiem skutecznej pracy hodowlanej. W hodowli koni przyczyną nieprawidłowości w zapisach rodowodowych może być między innymi używanie do kojarzeń nie zarejestrowanych ogierów, a także spotykany proceder celowej podmiany źrebiąt. Metodą pozwalającą w wiarygodny sposób zweryfikować pochodzenie badanego osobnika jest analiza markerów genetycznych, takich jak antygeny erythrocytarne, określane mianem grup krwi oraz kilkanaście loci polimorficznych białek i enzymów krwi. Od kilkunastu lat w weryfikacji rodowodów u koni wykorzystuje się także markery mikrosatelitarne DNA.

Sekwencje mikrosatelitarne DNA składają się z jednostek o długości 1-, 2-, 3-, lub 4 par zasad, powtórzonych 10-12 razy. Mikrosatelity występują głównie w niekodujących regionach genomów ssaków, w przybliżeniu co 10 tys. par zasad. Wykrywane w genomie konia mikrosatelity stanowią teoretycznie nieograniczone źródło markerów genetycznych, z których wiele przejawia wysoki polimorfizm u różnych ras koni (3). Dotyczy to również ras reprezentowanych przez liczebnie małe populacje, w dużym stopniu zagrożone inbredem (1).

W loci sekwencji mikrosatelitarnych obserwuje się średnio kilkanaście alleli, reprezentowanych przez stosunkowo krótkie sekwencje nukleotydowe (od 70 do 300 par zasad), co ma ogromne znaczenie diagnostyczne w testach bazujących na częściowo zdegradowanym DNA. Wraz z zastosowaniem multipleksowych reakcji PCR oraz zautomatyzowanej techniki analizy wielkości fragmentów DNA wzrosła efektywność tej grupy markerów w rutynowej kontroli rodowodów koni. Dlatego badania polimorfizmu mikrosatelitów są aktualnie alternatywą dla testów wykorzystujących polimor-

fizm grup krwi i markerów biochemicznych (1, 3, 7). W związku z zaleceniem wprowadzenia wybranego zestawu sekwencji mikrosatelitarnych do rutynowego systemu weryfikacji rodowodów przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG) pojawiła się konieczność oceny przydatności wybranych mikrosatelitów w badaniach polskiej populacji koni.

Celem badań była ocena przydatności dwunastu sekwencji mikrosatelitarnych (AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10 i VHL20) w testach weryfikacji pochodzenia koni śląskich oraz koni pełnej krwi angielskiej z regionu Dolnego Śląska. Wymienione sekwencje tworzą panel rekomendowanych przez ISAG markerów do badań polimorfizmu DNA u koni. Dziewięć z nich (AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10 i VHL20) stanowi minimalny zestaw markerów zalecanych do weryfikacji rodowodów koni.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na próbkach genomowego DNA, wyizolowanego z krwi lub cebulek włosowych od 106 koni śląskich oraz od 111 koni pełnej krwi z rejonu Dolnego Śląska. Konie śląskie reprezentowały zarówno osobniki bez dolewu krwi pełnej angielskiej (43 konie) oraz konie, które w rodowodach posiadają dolew od kilku do ponad 60 procent pełnej krwi angielskiej (63 konie). Są to osobniki pochodzące w pierwszej linii po 22 ogierach śląskich, 4 ogierach oldenburskich i po 6 ogierach pełnej krwi, w liczbie od 1 do 10 potomków po każdym z nich.

Genomowe DNA poddano amplifikacji metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej, z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanych sekwencji starterowych, specyficznych dla loci 12 markerów mikrosatelitarnych. W celu określenia wielkości zamplifikowanych wariantów sekwencji mikro-

satelitarnych, produkty reakcji PCR poddano elektroforezie w 4% żelu poliakrylamidowym, na automatycznym sekwencjatorze DNA – ABI Prism 377. Analizę wielkości rozdzielonych fragmentów DNA przeprowadzono w programie GeneScan, natomiast genotypy badanych koni określono przy zastosowaniu programu Genotyper. W celu oceny przydatności poszczególnych sekwencji mikrosatelitarnych w testach kontroli pochodzenia określono, czy badane populacje koni znajdują się w stanie równowagi genetycznej (test χ^2), a następnie obliczono: efektywną liczbę alleli w locus (n_e) (6), współczynnik polimorfizmu (PIC) (2), współczynnik prawdopodobieństwa wykluczenia błędnie określonego ojcostwa (PE – probability of exclusion) w przypadku gdy znany jest genotyp obojga rodziców dla jednego locus markerowego oraz łącznie dla kilku loci (5). Podstawą obliczeń wymienionych współczynników były frekwencje alleli w loci markerowych, które zidentyfikowano w badanych grupach koni. Wartości szacowanych współczynników zaprezentowano w tabelach 1, 2 i 3 w porządku malejącym.

Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano łącznie 94 allele w loci 12 sekwencji mikrosatelitarnych w badanej grupie koni śląskich oraz 73 allele w grupie koni pełnej krwi (tab. 1 i 2).

Warunkiem przydatności markera genetycznego w testach weryfikacji pochodzenia jest zachowanie stanu równowagi genetycznej w populacji zwierząt objętych kontrolą rodowodów. Odchylenia od tego stanu w postaci zmian we frekwencji genów w locus określonego markera w stosunku do wartości oczekiwanych, mogą być obserwowane w rasach, w których ze względu na małą liczebność bądź chów wsobny, występuje tendencja do kojarzeń w pokrewieństwie i w konsekwencji wzrost stopnia homozygotyczności (9). Z drugiej strony przyczyną braku równowagi genetycznej w populacji może być również nadmierny wzrost udziału genotypów heterozygotycznych, jako efekt wprowadzenia większej stawki rozplodników do rozrodu, w stosunku do określonej w założeniach selekcyjnych. Powyższe odchylenia, wyrażone istotnymi różnicami pomiędzy obserwowaną a oczekiwaną liczbą genotypów, zaobserwowano w locus VHL20 i AHT5 ($p \leq 0,01$) u koni śląskich oraz w locus HMS6 ($p \leq 0,05$) u koni pełnej krwi angielskiej. Wymienione markery wykluczono z dalszych analiz.

Efektywność zastosowania markerów genetycznych w weryfikacji pochodzenia zależy od liczby zidentyfikowanych alleli w locus, ich frekwencji w badanej populacji oraz stopnia ich polimorficzności. Zakłada się, że dla sekwencji mikrosatelitarnych, wykorzystywanych w testach weryfikacji pochodzenia, w badanej populacji powinno występować minimum 5 alleli, których frekwencja powinna być jak najbardziej wyrównana (4).

Różnice między obserwowaną (n) a efektywną (n_e) liczbą alleli w danym locus rzutują na przydatność określonego markera do testów genetycznych – im większe, tym mniejsza przydatność markera do testów (tab. 1 i 2). Porównanie obserwowanej i efektywnej

liczby alleli pozwala jednocześnie określić liczbę alleli, mających największy udział w puli genowej badanych populacji. Większa liczba takich alleli wpływa dodatnio na wartości PIC i PE.

Wartość współczynnika polimorfizmu PIC dla markerów mikrosatelitarnych stosowanych w testach powinna być większa od 0,5 (4). Współczynnik polimorfizmu wyższy od ustalonej wartości charakteryzuje wszystkie badane sekwencje mikrosatelitarne u obu ras koni, za wyjątkiem locus HTG4 u koni pełnej krwi.

Bezpośrednią miarą efektywności markerów w testach weryfikacji pochodzenia jest współczynnik prawdopodobieństwa wykluczenia (PE), który określa prawdopodobieństwo wykrycia błędu w zapisie rodowodu. Efektywność określonej sekwencji mikrosatelitarnej w weryfikacji pochodzenia jest różna, w zależności od

Tab. 1. Zakresy wielkości (pary zasad) i liczba obserwowanych alleli (n) oraz wartości szacowanych współczynników (n_e , PIC i PE) u koni śląskich

Locus	Pary zasad	n	n_e	PIC	PE
ASB2	236-256	10	5,195	0,786	0,636
HMS2	220-248	9	5,18	0,779	0,620
HMS3	152-170	9	4,784	0,76	0,595
HMS7	173-195	7	4,731	0,756	0,588
HTG10	93-113	10	4,184	0,727	0,533
HTG6	82-100	8	3,650	0,679	0,486
AHT4	148-162	5	3,652	0,677	0,479
HTG7	120-132	5	3,259	0,644	0,444
HTG4	129-139	5	3,097	0,627	0,429
HMS6	159-181	8	2,351	0,535	0,353

Tab. 2. Zakresy wielkości (pary zasad) i liczba obserwowanych alleli (n) oraz wartości szacowanych współczynników (n_e , PIC i PE) u koni pełnej krwi angielskiej

Locus	Pary zasad	n	n_e	PIC	PE
ASB2	220-264	10	6,522	0,828	0,692
HTG10	93-13	9	4,541	0,753	0,588
HMS7	173-183	5	4,489	0,742	0,563
HMS3	152-170	6	3,398	0,666	0,480
VHL20	89-101	5	3,37	0,659	0,466
AHT4	148-162	4	3,478	0,664	0,464
AHT5	132-148	6	3,431	0,66	0,463
HMS2	220-240	9	2,509	0,57	0,392
HTG6	84-106	6	2,572	0,552	0,354
HTG7	120-128	4	2,675	0,549	0,337
HTG4	129-139	4	2,161	0,454	0,264

Tab. 3. Wartości współczynnika CPE w zależności od liczby analizowanych markerów mikrosatelitarnych u koni śląskich i pełnej krwi angielskiej

Liczba markerów w teście	Konie śląskie		Pełna krew angielska	
	Locus	CPE	Locus	CPE
1	ASB2	0,6359	ASB2	0,6915
2	HMS2	0,8616	HTG10	0,8731
3	HMS3	0,944	HMS7	0,9445
4	HMS7	0,9769	HMS3	0,9712
5	HTG10	0,9897	VHL20	0,9846
6	HTG6	0,9947	AHT4	0,9917
7	AHT4	0,9972	AHT5	0,9956
8	HTG7	0,9985	HMS2	0,9973
9	HTG4	0,9991	HTG6	0,9983
10	-	-	HTG7	0,9988
11	-	-	HTG4	0,9992

zróznicowania genetycznego określonych populacji koni (3, 7, 8), co potwierdzają także prezentowane badania. Najwyższą wartość PE w sytuacji, gdy znany jest genotyp obojga rodziców uzyskano przy zastosowaniu najbardziej polimorficznych markerów, to jest locus ASB2 u koni śląskich i pełnej krwi oraz HMS2 w populacji koni śląskich (tab. 1 i 2).

Określając przydatność grupy markerów w kontroli pochodzenia, odpowiednia wiarygodność testu zostaje osiągnięta, jeżeli prawdopodobieństwo wykluczenia (CPE) wynosi lub przekracza wartość 0,99 (10). W przypadku kontroli pochodzenia koni taką wartość CPE uzyskuje się testując od 5 do 10 sekwencji mikrosatelitarnych w zależności od rasy (7, 8). Podobną efektywność w weryfikacji rodowodów koni zapewnia badanie około 15 loci, obejmujących układy grupowe krwi i polimorficzne białka (9). Użycie jedynie 6 najbardziej polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych u koni śląskich (ASB2, HMS2, HMS3, HMS7, HTG10 i HTG6) i koni pełnej krwi (ASB2, HTG10, HMS7, HMS3, VHL20 i AHT4), pozwala wykluczyć błędnie ustalone ojcostwo z prawdopodobieństwem większym od 0,99 (tab. 3). Zastosowanie wszystkich analizowanych markerów u obu ras koni wyklucza błędy w rodowodach z prawdopodobieństwem przekraczającym 0,999.

Obliczone wartości prawdopodobieństwa wykluczeń wskazują na dużą przydatność zestawu wybranych sekwencji mikrosatelitarnych w rutynowej kontroli rodowodów koni śląskich i koni pełnej krwi angielskiej. Podane wartości współczynnika PE obliczono przy założeniu, że osobniki podlegające badaniu pochodzą z populacji, w której kojarzenia odbywają się w sposób losowy. W niektórych przypadkach wartość tego współczynnika może być trudna do ustalenia, gdyż zmienia się w zależności od systemu koja-

zeń, w których mogą brać udział konie o różnym stopniu spokrewnienia. Uwzględniając fakt, że przydatność określonych markerów będzie się zmieniać w zależności od stopnia inbredu ras koni objętych kontrolą pochodzenia, należy w miarę potrzeb modyfikować aktualny zestaw sekwencji mikrosatelitarnych, wprowadzając do testów kolejne, bardziej przydatne markery, co ma szczególne znaczenie w badaniu populacji wysoce zimbredowanych. Pomocne w tym kierunku jest ciągle monitorowanie zmian zachodzących w strukturze genetycznej badanych populacji koni w loci wybranych sekwencji mikrosatelitarnych oraz testowanie szerokiego spektrum ras w celu utworzenia drzewa allelicznego dla analizowanych sekwencji.

W związku ze wzrastającą liczbą nowo wykrywanych loci mikrosatelitów w genomie konia i postępem prac nad standaryzacją testu DNA, zastąpienie markerów klasycznych sekwencjami mikrosatelitarnymi DNA w testach weryfikujących pochodzenie jest tylko kwestią czasu, który musi upłynąć, zanim określi się zasady systemu rutynowej kontroli rodowodów z wykorzystaniem polimorfizmu tych markerów. Aktualnie w przypadku ras, u których weryfikacja rodowodów nie była prowadzona w szerokim zakresie, tak jak w rasie koni Quarter hodowanych w USA, związki hodowców decydują się na prowadzenie testów wyłącznie z zastosowaniem polimorfizmu DNA. W ten sposób rodowody koni około 20 ras hodowanych w Stanach Zjednoczonych, Australii, Holandii, Niemczech i Kanadzie są prawie wyłącznie potwierdzane badaniami polimorfizmu DNA. W przypadku ras koni, u których od szeregu lat kontrolę rodowodów prowadziło z wykorzystaniem grup krwi, polimorficznych białek i enzymów erytrocytarnych, markery mikrosatelitarne stanowią na razie uzupełnienie w rutynowo prowadzonych testach.

Piśmiennictwo

- Behara A. M. P., Colling D. T., Gibson J. P.: Genetic diversity in endangered and common Canadian horse breeds. *Anim. Gen.* 1998, 29 (Suppl. 1), str. 16.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, *Am. J. Human Gen.* 1980, 32, 182-190.
- Bowling A. T., Eggleston-Stott M. L., Byrns G., Clark R. S., Dileanis S., Wietum E.: Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim. Gen.* 1997, 28, 247-252.
- Erhardt G.: Empfehlung zum Einsatz der DNA-Typsierung zur Abstammungssicherung. *Züchtungskunde* 1996, 68, 244-245.
- Jamieson A., Taylor St. C. S.: Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Gen.* 1997, 28, 397-400.
- Kimura M., Crow J. F.: The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 1964, 49, 725-738.
- Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K., Andersson L.: Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Gen.* 1994, 25, 19-23.
- Niemczewski C., Żurkowski M.: 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. Papers Rep.* 2000, 1, 5.
- Trommershausen-Bowling A., Clark R. S.: Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Anim. Gen.* 1985, 16, 93-108.
- Vankan D. M., Faddy M. J.: Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings. *Anim. Gen.* 1999, 30, 355-61.

Adres autora: dr inż. Tomasz Ząbek, Masłomiańska 156, 32-091 Michałowice; e-mail: tzabek@izoo.krakow.pl