

# Ocena polimorfizmu mikrosatelitarnych loci DNA uzupełniającego zestawu STR do kontroli rodowodów bydła simentalskiego

ANNA RADKO, TADEUSZ RYCHLIK, DOMINIKA RUBIŚ

Dział Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki – PIB, 32-083 Balice k. Krakowa

Radko A., Rychlik T., Rubiś D.

## Evaluation of the polymorphism of DNA microsatellite loci from a complementary STR panel for parentage verification in Simmental cattle

### Summary

To date, there is no complementary panel of markers that could be used internationally in cases of disputed parentage. The Department of Animal Cytogenetics and Molecular Genetics of the National Research Institute of Animal Production has developed a complementary panel of microsatellite loci, which is used when the standard panel is insufficient for parentage determination. Among the markers tested, the following panel of microsatellite sequences was chosen to complement the panel of markers available at the National Research Institute of Animal Production: CSRM60, ILSTS065, CSSM066, BM1818, INRA072, AGLA293, INRA222, INRA092 and HUJI177.

The aim of the study was to determine the polymorphism of the panel of STR markers by estimating the degree of expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosity, the polymorphic information content (PIC), the power of discrimination (PD) and the probability of exclusion (PE1 and PE2)

The 63 alleles identified at 9 loci in 174 head of Simmental cattle were used to estimate the degree of heterozygosity and polymorphism in the cattle population examined. A high degree of observed heterozygosity and polymorphism (over 60%) was found in all the markers analysed except AGLA293 and CSSM66.

The power of discrimination, calculated for each marker, was  $PD > 0.8$ . Lower values of this parameter were observed only for AGLA293 and CSSM66.

The probability of paternity exclusion on the basis of the newly developed panel of 9 STR loci was 97.74% when the genotype of one parent was known and 99.86% when the genotypes of both parents were known.

**Keywords:** cattle, parentage control, microsatellite DNA markers

Polimorficzne mikrosatelitarne *loci* (STR – *short tandem repeat*) znalazły szerokie zastosowanie w weryfikacji rodowodów bydła. U bydła sekwencje mikrosatelitarne opisali w 1990 r. Fries i wsp. (6). Dotychczas w genomie bydła zidentyfikowano ponad 2000 sekwencji mikrosatelitarnych (<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap/intro.pl>), które ze względu na wysoki stopień polimorfizmu oraz stosunkowo łatwą i szybką identyfikację stały się w ostatnim czasie najliczniejszą klasą markerów genetycznych stosowanych zarówno w badaniach teoretycznych, jak i bezpośrednio związanych z hodowlą zwierząt gospodarskich (1, 8, 11, 16).

Przeprowadzone badania wykazały, że wykorzystanie kilkunastu wysoko polimorficznych markerów mikrosatelitarnych ( $PE > 0,5$ ) daje ponad 99,9% praw-

dopodobieństwo potwierdzenia właściwie ustalonego rodowodu (4, 7, 9, 16, 18). Tak duża skuteczność spowodowała, że Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG (International Society for Animal Genetics) zaleciło w 1996 r., by kontrolę pochodzenia bydła prowadzoną dotychczas w oparciu o grupy krwi zastąpić analizą polimorfizmu DNA. Stosowanie kompatybilnych paneli markerów genetycznych przez laboratoria zajmujące się identyfikacją osobniczą czy kontrolą rodowodów zapewnia porównywalność i możliwość weryfikacji wyników. W celu standaryzacji panelu markerów mikrosatelitarnych DNA do kontroli rodowodów bydła, na Międzynarodowej Konferencji ISAG w 1996 r. zaproponowano zestaw 11 markerów mikrosatelitarnych, które mogłyby być stosowane w rutynowych testach molekular-

nych (BM2113, BM1824, ETH3, ETH10, ETH225, INRA23, SPS115, TGLA53, TGLA227, TGLA126, TGLA122). W 1998 r. ISAG zaleciło, by 6 mikrosatelitarnych *loci*: BM2113, BM1824, SPS115, TGLA227, TGLA126, TGLA122 stanowiło minimalny zestaw markerów wykorzystywany do kontroli pochodzenia u bydła, w 2000 r. zestaw ten rozszerzono o 3 kolejne markery: ETH10, ETH225 i INRA23. Obecnie, zgodnie z decyzją podjętą na Konferencji ISAG w Amsterdamie w 2008 r., rekomendowany jest zestaw 12 markerów STR, w którym podstawowy panel 9 mikrosatelitarnych *loci* został poszerzony o ETH3, TGLA53 i BM1818.

W Instytucie Zootechniki PIB, sprawującym nadzór nad kontrolą rodowodów bydła w Polsce, analizy polimorfizmu mikrosatelitarnego u bydła prowadzone są od 1998 r. W trakcie tych badań przeprowadzono testy DNA dla ponad 23 tys. sztuk bydła. Przy tak dużej ilości badań istnieje zagrożenie, że w niektórych przypadkach, np. u osobników pochodzących ze stad podlegających ostrej selekcji czy zwierząt blisko spokrewnionych, zalecany zestaw markerów DNA może być niewystarczający do jednoznacznego potwierdzenia danych rodowodowych. Podobna sytuacja może zaistnieć w przypadku analizy danych rodowodowych u bydła związanego z międzynarodową wymianą zwierząt, głównie importem i eksportem materiału genetycznego wartościowych osobników, których dane rodowodowe potwierdzane są certyfikatem DNA. W związku z tym większość laboratoriów prowadzących analizy rodowodowe poszerza obowiązujący zestaw o dodatkowe markery. Taką konieczność potwierdzają również działania ISAG prowadzące do rozszerzenia podstawowego panelu *loci* STR. Dotychczas nie podano jednak dodatkowego, uzupełniającego panelu markerów uznawanego w skali międzynarodowej, który w razie potrzeby mógłby być wykorzystywany w sytuacji spornego pochodzenia. W Dziale Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt również opracowano uzupełniający panel 9 sekwencji mikrosatelitarnych (17). Zestaw ten zawiera *locus* BM1818, obecnie zalecany do rutynowych badań oraz STR: CSRM60, ILSTS065, CSSM066, INRA072, AGLA293, INRA222, INRA092 i HUJI177, który obok panelu podstawowego wykorzystywany jest do weryfikacji rodowodów w przypadkach, kiedy stwierdzenie pochodzenia na podstawie rekomendowanego zestawu nie jest jednoznaczne.

Celem badań było określenie polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych uzupełniającego zestawu markerów DNA do potwierdzania danych rodowodowych bydła simentalskiego.

### Materiał i metody

Materiałem doświadczalnym do identyfikacji polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA były próbki: krwi, tkanki ucha, nasienia, cebulek włosowych od 174 osobników bydła simentalskiego (SM) objętych rutynową kontrolą rodowodów w IZ PIB.

Badania obejmowały określenie polimorfizmu 9 markerów STR zawartych w certyfikatach DNA wystawionych przez inne laboratoria prowadzące badania rodowodowe oraz ocenę możliwości zastosowania ich w laboratorium IZ PIB. Testowano uzupełniający panel STR: CSRM60, ILSTS065, CSSM066, BM1818, INRA072, AGLA293, INRA222, INRA092 i HUJI177.

Genomowe DNA izolowano z próbek krwi obwodowej i cebulek włosowych przy użyciu proteiny K według metody opisanej przez Kawasaki (13), z tkanki ucha – zestawem prepGEM™ Tissue (ZyGEM) i nasienia przy pomocy zestawu Sherlock AX firmy A&A Biotechnology do izolacji DNA z śladów biologicznych. Na bazie wyizolowanego DNA przeprowadzono amplifikację metodą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR-multiplex, przy użyciu fluorescencyjnie znakowanych sekwencji starterowych przygotowanych przez firmę BIONOVO. Multipleksową reakcję PCR wykonano w mieszaninie reakcyjnej Master Mix przygotowanej przez firmę QIAGEN. Proces termiczny przeprowadzono na amplifikatorze GeneAmp PCR System 9600 firmy Applied Biosystem, stosując opracowany proces termiczny: 3 min. wstępnej denaturacji DNA w temperaturze 98°C, następnie 30 cykli obejmujących denaturację w temperaturze 98°C przez 15 s., przyłączanie starterów do matrycy w temperaturze 57°C w ciągu 75 s., wydłużanie starterów w 72°C przez 30 s. i końcowe wydłużanie starterów w temperaturze 72°C w czasie 60 min.

Otrzymane produkty PCR poddano elektroforezie w denaturującym 7% żelu poliakrylamidowym w obecności standardu długości 500 ROX, w sekwenatorze 3100xL. Wynik rozdziału elektroforetycznego, fragmenty DNA o różnej długości, odczytano w programie GeneMapper.

Uzyskane dane wykorzystano do analizy statystycznej. Oszacowano wartości heterozygotyczności oczekiwanej  $H_E$  i obserwowanej –  $H_O$  (14), indeks stopnia polimorfizmu – PIC (3), prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa dla każdego *locus* –  $PE_1$  w przypadku, gdy znany jest genotyp jednego z rodziców i gdy znane są genotypy obojga rodziców  $PE_2$  (10) oraz łączne prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa – CPE dla wszystkich 9 *loci* łącznie (5).

Obliczenia wykonano w przygotowanym własnym programie statystycznym IMGBOVSTAT – IZOO PIB.

### Wyniki i omówienie

Wiele laboratoriów, obok podstawowego zestawu 11 mikrosatelitów, wykorzystuje inne sekwencje mikrosatelitarne. We Francji laboratorium Labogena na wystawianych certyfikatach DNA dodatkowo podaje genotyp w *loci*: HUJI177, ILSTS65, INRA72, INRA92, INRA135, INRA177 i INRA222, w USA laboratorium Holstein Association w *loci*: BM1818, CYP21, RM67, MGTG4B i SPS113, a w Kanadzie w BM1818, CSSM066 i HEL1.

Dotychczas nie podano dodatkowego uzupełniającego panelu markerów, który, w razie potrzeby, mógłby być wykorzystywany międzynarodowo i pomocny w sytuacji spornego pochodzenia. Dlatego w Dziale Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt IZ PIB ustalono dodatkowy zestaw *loci* STR, którego skład był zależny od markerów zawartych w certyfikatach

Tab. 1. Polimorfizm analizowanych markerów mikrosatelitarnych DNA w badanej populacji bydła simentalskiego

Locus	L. alleli	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	PIC	PD	PE <sub>1</sub>	PE <sub>2</sub>
AGLA293	5	0,5000	0,4953	0,4666	0,7177	0,1349	0,2976
BM818	5	0,7313	0,7317	0,6850	0,8708	0,3144	0,4891
CSRM60	6	0,7568	0,8100	0,7836	0,9324	0,4466	0,6239
CSSM66	8	0,4054	0,4548	0,4412	0,6446	0,1200	0,2875
HUJI177	6	0,7703	0,7838	0,7539	0,9196	0,4051	0,5852
ILSTS065	7	0,7162	0,6897	0,6468	0,8524	0,2805	0,4565
INRA72	6	0,6351	0,6744	0,6145	0,8378	0,2533	0,4138
INRA92	9	0,8243	0,7890	0,7649	0,9284	0,4277	0,6076
INRA222	11	0,8378	0,8670	0,8529	0,9606	0,5763	0,7332
Razem	63						
Średnia		0,6863	0,6995	0,6677	0,8515		
CPE						97,74%	99,86%

Objaśnienia: H<sub>E</sub> – stopień heterozygotyczności oczekiwanej; H<sub>O</sub> – stopień heterozygotyczności obserwowanej; PIC – indeks stopnia polimorfizmu; PD – siła dyskryminacji; PE – prawdopodobieństwo wykluczenia (PE<sub>1</sub> – w przypadku znajomości genotypu jednego z rodziców i obu rodziców PE<sub>2</sub>); CPE – łączna wartość prawdopodobieństwa wykluczenia

wystawionych przez inne laboratoria, a jednocześnie były one testowane w międzynarodowych testach porównawczych ISAG i miały określone (standaryzowane) międzynarodowo allele, co pozwala na porównywanie wyników między laboratoriami.

Spośród testowanych STR ustalono następujący zestaw sekwencji mikrosatelitarnych DNA: CSRM60, ILSTS065, CSSM066, BM1818, INRA072, AGLA293, INRA222, INRA092 i HUJI177, który stanowi uzupełniający panel markerów DNA w IZ PIB. Wybrano markery tak, by mogły być amplifikowane w jednej reakcji PCR-multiplex, co skraca czas oraz zmniejsza koszt przeprowadzanych analiz.

Podczas analizy polimorfizmu w badanych mikrosatelitarnych *loci* w populacji liczącej 174 sztuki rasy SM hodowanego w Polsce, zidentyfikowano 63 allele. Liczba alleli w *locus*, która może świadczyć o zmienności genetycznej, mieściła się w granicach od 5 dla AGLA293 i BM1818 do 11 alleli dla INRA222. W badanej populacji bydła dużą liczbą alleli obok *locus* INRA222 odznaczał się również marker INRA92 (9 alleli) i CSSM66 (8 alleli). Rozkład poszczególnych alleli w *locus* był dość zróżnicowany, za wyjątkiem układu AGLA293, w którym na razem ustalonych 5 alleli jeden o długości 230 pz odznaczał się wyższą częstością równą 0,828, co może ograniczać jego przydatność do badań identyfikacyjnych. Podobną sytuację zaobserwowano w *locus* CSSM66, w którym spośród ustalonych 8 alleli jeden o długości 185 pz charakteryzował się wyższą częstością równą 0,742. Na obecnym etapie badań nie można stwierdzić jednoznacznie, co jest przyczyną częstszego występowania pewnych alleli w danym *locus*, można jednak przypuszczać, że dany marker może być położony w re-

gionie genomu, w którym znajdują się *loci* ważne z punktu widzenia prowadzonej pracy hodowlanej.

Zidentyfikowane allele posłużyły do oszacowania stopnia heterozygotyczności oraz polimorfizmu w badanej populacji bydła. Spośród analizowanych markerów, z wyjątkiem AGLA293 oraz CSSM66, wykazano wysoki stopień heterozygotyczności obserwowanej oraz polimorfizmu, wynoszący ponad 50%. Średnia wartość heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej wynosiły, odpowiednio, 0,6863 i 0,6995. Obliczona średnia dla indeksu PIC wynosiła 0,6677. Wartości heterozygotyczności obserwowanej (H<sub>O</sub>), oczekiwanej (H<sub>E</sub>) oraz indeksu stopnia polimorfizmu (PIC) dla *locus* w odniesieniu do każdej z badanych ras przedstawiono w tab. 1. Największe wartości H<sub>O</sub> odnotowano w *locus* INRA222. Podobnie kształtował się stopień

polimorfizmu badanych markerów, największe wartości, wyższe od 0,8, otrzymano w *locus* INRA222. Wartości H<sub>O</sub> niższe od 0,5 zaobserwowano w *locus* AGLA293, w którym stwierdzono przewagę częstości występowania jednego z alleli, co w konsekwencji spowodowało obniżenie polimorfizmu w obrębie tego *locus*. Niższy polimorfizm zaobserwowano również w *locus* CSSM66, gdzie H<sub>O</sub> wyniosła jedynie 0,4054, a PIC – 0,4412. Można zatem przypuszczać, że tak znaczne obniżenie stopnia heterozygotyczności i polimorfizmu u bydła simentalskiego może być związane z położeniem tego *locus* w regionie, w którym znajdują się *loci* cech podlegających ostrej selekcji u tej rasy. Zależność alleli zidentyfikowanych w *locus* CSSM66 od cech produkcyjnych badanej populacji bydła simentalskiego jest tylko przypuszczeniem, które należałoby potwierdzić bądź wykluczyć na podstawie szerszych badań.

Bezpośrednim wskaźnikiem określającym przydatność ocenianych paneli STR dla potrzeb identyfikacji osobniczej jest siła dyskryminacji. Zastosowanie tylko 6 polimorficznych markerów (BM2113, BM1862, BMc701, BM2934, TGLA122 i BM720) u bydła holsztyno-fryzyjskiego dało siłę dyskryminacji wynoszącą 0,99997 (12). W prezentowanych badaniach, w większości *loci* wyliczone wartości PD dla każdego z analizowanych markerów osiągnęły wartości PD > 0,7 (tab. 1). Średnia wartość dla tego parametru była równa 0,8515. Dla 4 *loci*: CSRM60, HUJI177 i INRA92 i INRA222 wartości siły dyskryminacji były wyższe od wartości 0,9. Mniejsze wartości tego parametru zaobserwowano jedynie w odniesieniu do 2 markerów: dla AGLA293 równe 0,7177 oraz dla CSSM66 – 0,6446. Kumulatywna siła dyskryminacji wyliczona

na podstawie zestawu analizowanych STR była bliska jedności. Wysoka siła dyskryminacji multipleksu wskazuje na możliwość jego wykorzystania w identyfikacji osobniczej.

Prawdopodobieństwo, z jakim można potwierdzić bądź wykluczyć pochodzenie danego osobnika po danej parze rodzicielskiej, oszacowane jest za pomocą prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa – PE. Parametr ten, szacowany na podstawie panelu STR zalecanego przez ISAG do kontroli rodowodów, powszechnie stosowany jest do określenia prawdopodobieństwa wykluczenia, z jakim można potwierdzić dane rodowodowe bydła różnych ras (4, 7, 15, 18, 19). W badaniach własnych wyliczone PE dla każdego markera u badanej rasy bydła (tab. 1) posłużyły do wyliczenia łącznego prawdopodobieństwa wykluczenia w przypadku, gdy znane są dane jednego z rodziców – CPE<sub>1</sub> i w przypadku, gdy możliwa jest analiza obojga rodziców – CPE<sub>2</sub>. Zastosowanie zestawu wybranych 9 loci STR dla CPE<sub>1</sub> wyniosło od 97,74%, natomiast w przypadku znajomości genotypów obu rodziców CPE<sub>2</sub> od 99,86% (tab. 1).

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań można stwierdzić, że testowany zestaw markerów mikrosatelitarnych DNA odznacza się dużym polimorfizmem, a wysoka siła dyskryminacji multipleksu wskazuje na celowość zastosowania go do weryfikacji rodowodów bydła, głównie w przypadkach, kiedy nie można jednoznacznie stwierdzić pochodzenia osobnika na podstawie panelu podstawowego. Ponadto przeprowadzone badania pozwolą na rozszerzenie bazy danych buhajów, objętych kontrolą rodowodów na podstawie antygenów erytrocytarnych i 11 loci mikrosatelitarnych, o dodatkowy zestaw markerów DNA.

### Piśmiennictwo

1. Arranz J. J., Bayón Y., San Primitivo F.: Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Anim. Genet.* 1996, 27, 415-419.
2. Beckmann J. S., Weber J. L.: Survey of human and rat microsatellites. *Genom.* 1992, 12, 627-631.
3. 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. Hum. Genet.* 1980, 3, 314-331.
4. Carolino I., Sousa C. O., Ferreira S., Carolino N., Silva F. S., Gama L. T.: Implementation of a parentage control system in Portuguese beef-cattle with a panel of microsatellite markers. *Genet. Mol. Biol.* 2009, 32, 306-311.
5. Fredholm M., Wintero A. K.: Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellite. *Anim. Genet.* 1996, 27, 19-23.
6. Fries R., Eggen A., Stranzinger G.: The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genom.* 1990, 8, 403-406.
7. Goor L. H. P. van de, Koskinen M. T., van Haeringen W. A.: Population studies of 16 bovine STR loci for forensic purposes. *Int. J. Legal.* 2011, 125, 111-119.
8. Heyen D. W., Beever J. E., Da Y., Evert R. E., Green C., Bates S. R. E., Ziegler J. S., Lewin H. A.: Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim. Genet.* 1997, 28, 21-27.
9. Holm L.-E., Bendixen C.: Usefulness of microsatellites from the ISAG comparison test for parentage control in Danish Black-and-White cattle. *Anim. Genet.* 1996, 27, 17-42.
10. Jamieson A.: The genetics of transferrin in cattle. *Heredity* 1965, 20, 419-441.
11. Janik A., Ząbek T., Radko A., Natonek M.: Evaluation of polymorphism at 11 microsatellite loci in Simmental cattle raised in Poland. *Ann. Anim. Sci.* 2001, 1, 19-29.
12. Jia M. W., Yang L. G., Guan F., Lu H. X., Jin S. H.: The polymorphism distributions of six STR loci in dairy cattle and beef cattle. *Hereditas* 2004, 26, 309-314.
13. Kawasaki E. S.: Sample preparation from blood, cell and other fluids, [w:] PCR Protocols; A Guide to methods and applications. Academic Press, New York 1990, 146-152.
14. Ott J.: Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Genet.* 1992, 51, 283-290.
15. Radko A.: Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification of cattle raised in Poland. *Ann. Anim. Sci.* 2008, 8, 205-216.
16. Radko A., Słota E.: Polymorphism of 11 microsatellite DNA recommended by parentage control in bulls Holstein Friesian cattle breeds in Poland. *Ann. Anim. Sci.* 2007, 7, 189-196.
17. Radko A., Słota E., Marczyńska J.: Usefulness of a supplementary set of microsatellite DNA markers for parentage testing in cattle. *Pol. J. Vet. Sci.* 2010, 13, 113-117.
18. Řehout V., Hradecká E., Čitek J.: Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. *Czech. J. Anim. Sci.* 2006, 12, 503-509.
19. Stevanovic J., Stanimirovic Z., Dimitrijevic V., Maletic M.: Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). *Czech J. Anim. Sci.* 2010, 55, 221-226.
20. Tautz D.: Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1989, 16, 6463-6471.

Adres autora: dr inż. Anna Radko, ul. Bitschana 2/5, 31-410 Kraków;  
e-mail: arys@izoo.krakow.pl