

## POLIMORFIZM 11 LOCI MIKROSATELITARNYCH U BYDŁA RASY POLSKIEJ CZERWONEJ\*

Barbara Witek-Zawada, Anna Radko

Instytut Zootechniki, Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

*Analizowano polimorfizm 11 markerów mikrosatelitarnych u 38 sztuk bydła rasy polskiej czerwonej. Wykorzystano markery: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 i BM1824 wchodzące w skład komercyjnie dostępnego zestawu do kontroli pochodzenia u bydła. Do identyfikacji poszczególnych alleli wykorzystano technikę automatycznej analizy długości amplifikowanych fragmentów. Zaobserwowano ogółem 86 alleli w 11 loci. Największą liczbą alleli charakteryzował się locus TGLA53 (11 alleli). Najwyższe wartości heterozygotyczności i indeksu polimorfizmu stwierdzono natomiast dla locus ETH3 ( $H = 0,840$ ,  $PIC = 0,822$ ), a najniższe dla SPS115 ( $H = 0,651$ ,  $PIC = 0,622$ ). Średnia heterozygotyczność wyniosła 0,770. Prawdopodobieństwo wykluczenia PE dla pojedynczych markerów wahało się między 0,445 a 0,650, a  $PE_c$  dla 11 loci wyniosło 0,999916.*

Genom organizmów eukariotycznych zawiera zarówno sekwencje kodujące jak i stanowiące zdecydowaną większość genomu sekwencje niekodujące. W rejonach niekodujących znajdują się równomiernie rozmieszczone sekwencje mikrosatelitarne zwane również mikrosatelitami. Są to sekwencje DNA o długości średnio od 60 do 300 par zasad. Składają się one zwykle z 10–50 tandemowych powtórzeń motywów o długości 1–6 par zasad. Sekwencje te charakteryzują się wysokim stopniem polimorfizmu, co czyni je idealnymi markerami genetycznymi (Hirano i in., 1996; Vaiman i in., 1994). Szybki rozwój technik molekularnych umożliwił szerokie zastosowanie mikrosatelitów w analizie zróżnicowania zarówno wewnątrz- jak i międzyrasowego (Janik i in., 2001; Moazami-Goudarzi i in., 1997; Maudet i in., 2002; Radko i in., 2005), mapowaniu genetycznym (Bishop i in., 1994) oraz w identyfikacji osobniczej i kontroli rodowodów (Glowatzki-Mullis i in., 1995).

---

\* Praca wykonana w ramach działalności statutowej IZ, temat nr 3116-1.

Celem niniejszej pracy było określenie polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA w 11 loci u bydła rasy polskiej czerwonej pochodzącego ze stad zachowawczych oraz u bydła, które ma być włączone do programu ochrony zasobów genetycznych.

### Materiał i metody

Materiał stanowiły próbki krwi obwodowej od 25 sztuk krów rasy polskiej czerwonej pochodzących ze stad zachowawczych od hodowców indywidualnych oraz od 13 sztuk krów przeznaczonych do objęcia programem ochrony zasobów genetycznych.

Krew pobierana była do próbek zawierających EDTA i przechowywana w  $-20^{\circ}\text{C}$ . Genomowy DNA izolowano z leukocytów metodą trawienia proteinazą K (Kawasaki, 1990).

Analizowano 11 markerów mikrosatelitarnych rekomendowanych do kontroli pochodzenia u bydła. Wybrane loci to: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 i BM1824. Sekwencje te poddawano amplifikacji w reakcji PCR typu multipleks przy użyciu znakowanych fluorescencyjnie sekwencji starterowych wchodzących w skład komercyjnego zestawu StockMarks for Cattle® Bovine Genotyping Kit (firma Applied Biosystems), zgodnie z protokołem producenta. Reakcje prowadzono w termocyklerze GeneAmp 9600 PCR System (Applied Biosystems). Produkty rozdzielano elektroforetycznie na sekwenatorze DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, w obecności wewnętrznego standardu wielkości ROX 500 (Applied Biosystems). Odczyt sygnału fluorescencji był zapisywany i analizowany przy użyciu programu Gene Scan v 2.1 (Applied Biosystems). Na podstawie uzyskanych wyników, za pomocą programu Genotyper 2.0 (Applied Biosystems) ustalano genotypy badanych zwierząt. Poprawność uzyskanych genotypów była weryfikowana w oparciu o wyniki uzyskane dla próbek referencyjnej o znanym genotypie.

Na podstawie częstości występowania ustalonych alleli w poszczególnych loci, obliczono stopień heterozygotyczności  $H$  według wzoru (Nei i Roychoudhury, 1974):

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n g_i^2$$

gdzie:

$n$  — liczba osobników,

$g_i$  — częstość allelu  $i$  w danym locus.

Dla badanych loci określono również indeks stopnia polimorfizmu PIC (ang. polymorphic information content) (Botstein i in., 1980)

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

gdzie:

$p_i$  — częstość allelu i-tego,

$p_j$  — częstość allelu j-tego.

Ponadto, obliczono prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzica — PE dla poszczególnych loci (Jamieson, 1965).

$$PE = \sum_{i=1}^a p_i(1-p_i)^2 - \sum_{i=2}^a \sum_{j=i}^{i-1} (p_i p_j)^2 [4 - 3(p_i + p_j)]$$

$p_i$ ;  $p_j$  — częstości alleli i-tego i j-tego w populacji.

Na podstawie uzyskanych wartości PE dla poszczególnych loci oszacowano łączne prawdopodobieństwo wykluczenia —  $PE_c$  dla c-locus (Fredholm i Wintero, 1996).

$$PE_c = 1 - (1 - PE_{locus\ 1})(1 - PE_{locus\ 2}) \dots (1 - PE_{locus\ n})$$

## Wyniki

Uzyskane wyniki analizy polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA na podstawie następujących markerów: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 i BM1824 zostały przedstawione w tabeli 1. W badanych 11 loci mikrosatelitarnych stwierdzono ogółem obecność 86 alleli. W poszczególnych loci występowała różna liczba alleli. Najwyższą ich liczbę zaobserwowano dla locus TGLA53 (11). Wysoką liczbą alleli charakteryzowały się również TGLA227 (10) oraz TGLA122 i INRA23 (po 9). Z kolei, najniższą liczbę alleli stwierdzono w locus BM1824 (5). Zaobserwowane allele występowały w poszczególnych loci z różnymi częstościami (tab. 1).

Na podstawie wyliczonych częstości występowania zidentyfikowanych alleli określono polimorfizm 11 sekwencji mikrosatelitarnych DNA u badanej rasy bydła, poprzez oszacowanie współczynnika heterozygotyczności — H oraz indeksu stopnia polimorfizmu — PIC. Wszystkie analizowane loci charakteryzowały się wysokim stopniem heterozygotyczności, o wartości wynoszącej powyżej 0,6. Współczynnik H mieścił się w zakresie od 0,651 (dla SPS115) do 0,840 (dla ETH3). Średnia oczekiwana heterozygotyczność wyniosła 0,770.

Wskaźnik PIC charakteryzuje stopień polimorficzności danego locus. Otrzymane wartości stopnia polimorfizmu były wysokie dla wszystkich loci i przekraczały wartość 0,5. Do najbardziej polimorficznych loci należały: ETH3 (8 alleli, PIC = 0,822), ETH225 (7 alleli, PIC = 0,801), TGLA53 (11 alleli, PIC = 0,797), INRA23 (9 alleli, PIC = 0,786), TGLA227 (10 alleli, PIC = 0,783) i BM2113 (8 alleli, PIC = 0,783).

Tabela 1. Polimorfizm 11 loci mikrosatelitarnych u bydła rasy polskiej czerwonej  
 Table 1. Polymorphism of 11 microsatellite loci in Polish Red cattle

Locus	Liczba alleli No. of alleles	Allele Alleles	Częstość występowania poszczególnych alleli Frequency of alleles	H	PIC	PE
1	2	3	4	5	6	7
TGLA227	10	77	0,026	0,809	0,783	0,628
		79	0,013			
		81	0,263			
		83	0,211			
		87	0,026			
		89	0,079			
		91	0,250			
		93	0,053			
		97	0,066			
BM2113	8	121	0,026	0,811	0,783	0,624
		125	0,039			
		127	0,237			
		131	0,026			
		133	0,053			
		135	0,211			
		137	0,197			
TGLA53	11	146	0,013	0,817	0,797	0,653
		154	0,026			
		158	0,118			
		160	0,329			
		162	0,053			
		164	0,053			
		166	0,092			
		168	0,079			
		170	0,197			
		172	0,026			
ETH10	7	178	0,013	0,724	0,679	0,493
		213	0,013			
		215	0,026			
		217	0,355			
		219	0,355			
		221	0,118			
		223	0,079			
SPS115	7	225	0,053	0,651	0,622	0,445
		248	0,553			
		250	0,092			
		252	0,079			
		254	0,026			
		256	0,105			
258	0,013					
		260	0,132			

cd. tab. 1 — Table 1 contd.

1	2	3	4	5	6	7
TGLA126	7	113	0,013	0,678	0,630	0,437
		115	0,474			
		117	0,263			
		119	0,039			
		121	0,039			
		123	0,158			
		125	0,013			
TGLA122	9	141	0,053	0,763	0,731	0,563
		143	0,316			
		147	0,053			
		149	0,013			
		151	0,342			
		153	0,092			
		157	0,013			
		163	0,053			
		171	0,053			
173	0,013					
INRA23	9	198	0,039	0,810	0,786	0,633
		200	0,171			
		202	0,013			
		204	0,026			
		206	0,145			
		208	0,184			
		210	0,026			
		212	0,026			
		214	0,316			
216	0,053					
ETH3	8	109	0,053	0,840	0,822	0,608
		117	0,276			
		119	0,105			
		121	0,132			
		123	0,039			
		125	0,184			
		127	0,132			
129	0,079					
ETH225	7	140	0,171	0,825	0,801	0,650
		144	0,132			
		146	0,118			
		148	0,211			
		150	0,250			
		152	0,079			
154	0,039					
BM1824	5	178	0,329	0,742	0,696	0,501
		180	0,250			
		182	0,263			
		188	0,132			
		190	0,026			

Przeprowadzona analiza prawdopodobieństwa wykluczenia niewłaściwego rodzica — PE wykazała, że użycie pojedynczego markera mikrosatelitarnego daje prawdopodobieństwo zidentyfikowania niewłaściwego rodzica wynoszące od 0,445 do 0,650, podczas gdy łączne użycie 11 markerów dało  $PE_c = 0,999916$ .

### Omówienie wyników

W przeprowadzonych badaniach określano genotypy badanych zwierząt w 11 loci mikrosatelitarnych. Wybrane do badań markery wchodzą w skład zestawu StockMarks for Cattle Bovine Genotyping Kit i są zalecane przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt — ISAG do kontroli pochodzenia u bydła. Markery te zostały wytypowane do kontroli rodowodów z uwagi na ich duży polimorfizm, wyrównane częstości występowania alleli w poszczególnych loci oraz dobry i powtarzalny rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym.

W badaniach własnych wykazano, że u badanych sztuk bydła rasy polskiej czerwonej omawiane markery charakteryzują się wysokim polimorfizmem. Wyliczone wartości współczynnika heterozygotyczności oraz indeksu stopnia polimorfizmu wyniosły powyżej 0,6.

Najbardziej polimorficznymi loci, dla których wartości H i PIC wyniosły powyżej 0,8, były ETH3 (H = 0,840 i PIC = 0,822) i ETH225 (H = 0,825 i PIC = 0,801).

Wcześniejsze analizy polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA u bydła polskiego czerwonego przeprowadzone na podstawie omawianego zestawu markerów również wykazały wysokie wartości omawianych wskaźników, które dla H wyniosły od 0,61 do aż 0,84, a wartości PIC były wyższe od 0,5. W badaniach tych najwyższy polimorfizm zaobserwowano w loci TGLA227, BM2113 i INRA23, dla których wyliczone wartości PIC i H wyniosły ponad 0,8 (Radko i in., 2004).

Najniższy polimorfizm w przeprowadzonych badaniach własnych stwierdzono w locus SPS115, dla którego otrzymano najniższe wartości H i PIC, wynoszące odpowiednio 0,651 i 0,622, natomiast badania wcześniejsze wykazały najniższy polimorfizm w loci TGLA122 oraz TGLA126, dla których wartości PIC i H wyniosły odpowiednio 0,56 i 0,63 oraz 0,57 i 0,61 (Radko i in., 2004).

Średnia oczekiwana heterozygotyczność dla 11 sekwencji mikrosatelitarnych wyniosła 0,77. Tak wysoką w porównaniu z innymi rasami średnią wartość  $H_{sr}$  dla rasy polskiej czerwonej (pc) stwierdzono już wcześniej w badaniach przeprowadzonych przez Grzybowskiego i Prusaka (2004). W badaniach tych  $H_{sr}$  dla rasy pc wyniosła 0,703 i była wyższa niż u innych ras bydła europejskiego. U rasy tej stwierdzono również największą liczbę alleli — w 26 analizowanych loci mikrosatelitarnych zidentyfikowano 193 allele (Grzybowski i Prusak, 2004).

W przedstawionych badaniach dokonano również oceny przydatności wybranych markerów mikrosatelitarnych do kontroli pochodzenia u bydła rasy pc. Miarą przydatności markerów molekularnych do weryfikacji pochodzenia jest prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzica — PE. Przeprowadzone

badania wykazały, że użycie pojedynczego markera mikrosatelitarnego daje prawdopodobieństwo zidentyfikowania niewłaściwego rodzica wynoszące od 0,445 do 0,650, podczas gdy łączne użycie 11 markerów daje niemal 100% prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzica ( $PE_c = 0,999916$ ).

Stwierdzony duży polimorfizm badanych 11 loci wskazuje jednoznacznie na ich przydatność w badaniu zmienności genetycznej oraz możliwości wykorzystania ich w kontroli pochodzenia bydła rasy polskiej czerwonej.

### Piśmiennictwo

- Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L., Hawkins G.A., Toldo S.S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136 (2): 619–639.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314–31.
- Fredholm M., Wintero A.K. (1996). Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellite. *Anim. Genet.*, 27: 19–23.
- Glowatzki-Mullis M.L., Gaillard C., Wigger G., Fries R. (1995). Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim. Genet.*, 26 (1): 7–12.
- Grzybowski G., Prusak B. (2004). Genetic variation in nine European cattle breeds as determined on the basis of microsatellite markers. III. Genetic integrity of Polish Red cattle included in the breeds preservation programme. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 22: 45–56.
- Hirano T., Nakane S., Mizoshita K., Yamakuchi H., Inoue-Murayama M., Watanabe T., Barendse W., Sugimoto Y. (1996). Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. *Anim. Genet.*, 27 (5): 365–368.
- Jamieson A. (1965). The genetics of transferrin in cattle. *Heredity*, 20: 419–441.
- Janik A., Ząbek T., Radko A., Natonek M. (2001). Evaluation of polymorphism at 11 microsatellite loci in Simmental cattle raised in Poland. *Ann. Anim. Sci.*, 1, 2: 19–29.
- Kawasaki E.S. (1990). Sample preparation from blood, cells and other fluids. W: *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (Wyd. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.) Acad. Press, New York (1990), pp. 146–152.
- Maudet C., Luikart G., Taberlet P. (2002). Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J. Anim. Sci.*, 80 (4): 942–950.
- Moazami-Goudarzi K., Laloe D., Furet J.P., Grosclaude F. (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim. Genet.*, 28 (5): 338–345.
- Nei M., Roychoudhury A.K. (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379–390.
- Radko A., Ząbek T., Słota E., Kowol P. (2004). Analysis of microsatellite DNA polymorphism in Polish Red cattle. *Scientific Messenger of Lviv State Academy of Veterinary Medicine named after S.Z. Gzhytskyj*, 6 (2), 2: 198–202.
- Radko A., Zyga A., Ząbek T., Słota E. (2005). Genetic variability among Polish Red, Hereford and Holstein-Friesian cattle raised in Poland based on analysis of microsatellite DNA sequences. *J. Appl. Genet.*, 46 (1): 89–91.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lepingle A., Velmalala R., Kaukinen J., Varvio S.L., Martin P. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm. Genome*, 5 (5): 288–297.

BARBARA WITEK-ZAWADA, ANNA RADKO

**Polymorphism of 11 microsatellite loci in Polish Red cattle**

## SUMMARY

The polymorphism of 11 microsatellite markers was analysed in 38 Polish Red cattle. Markers TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 and BM1824 from a commercially available kit for cattle parentage verification were used. The allele identification was performed using automated DNA sizing technology. A total of 86 alleles in 11 loci were detected. Locus TGLA53 was found to have the highest number of alleles (11). The highest values of heterozygosity (H) and polymorphism information content (PIC) were observed for locus ETH3 (H = 0.840, PIC = 0.822), and the lowest for locus SPS115 (H = 0.651, PIC = 0.622). The average heterozygosity was 0.770. The probability of exclusion (PE) ranged from 0.445 to 0.650 for individual markers.  $PE_c$  calculated for all 11 loci was 0.999916.

Key words: cattle, Polish Red, polymorphism, microsatellite markers