

## **Analiza porównawcza polimorfizmu grup krwi i sekwencji mikrosatelitarnych DNA u bydła polskiego czerwonego**

**Tadeusz Rychlik, Anna Radko, Ewa Słota**

Instytut Zootechniki w Krakowie, Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt,  
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Celem badań było określenie polimorfizmu grup krwi oraz wybranych sekwencji mikrosatelitarnych DNA, a także określenie przydatności tych markerów w kontroli prawidłowości rodowodów. Badania polimorfizmu antygenów erytrocytarnych w 11 układach grupowych krwi przeprowadzono u 2322 sztuk bydła rasy polskiej czerwonej, natomiast analizę polimorfizmu mikrosatelitarnego u 62 osobników losowo wybranych z badanej populacji. Oznaczenie składu antygenowego krwi przeprowadzono przy użyciu 78 reagentów, wyprodukowanych w Dziale Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki. Do analizy polimorfizmu DNA wybrano 11 następujących mikrosatelitarnych loci: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824. Na podstawie częstości występowania zidentyfikowanych alleli w loci wybranych markerów wyliczono stopień heterozygotyczności (H), indeks stopnia polimorfizmu (PIC) oraz prawdopodobieństwo wykluczenia rodzica (PE) dla każdego locus. Obliczono również  $PE_C$  na podstawie wszystkich 22 loci łącznie, który osiągnął wartość 99,9999.

**SŁOWA KLUCZOWE:** bydło rasy polskiej czerwonej / antygeny krwinkowe / sekwencje mikrosatelitarne / polimorfizm

Kontrola pochodzenia bydła od dawna jest prowadzona rutynowo na podstawie genetycznie uwarunkowanych cech grupowych krwi [3, 5]. Wykrycie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych DNA zainicjowało wiele badań nad możliwością wykorzystania tego polimorfizmu w kontroli rodowodów, szczególnie u koni [4] i bydła [7, 8, 12]. Kontrola rodowodów bydła w Polsce prowadzona jest obecnie na podstawie analizy polimorfizmu antygenów erytrocytarnych w 11 układach grupowych krwi [11].

Holm i Bendixen [2] wykazali, że prawdopodobieństwo wykluczenia rodzica, wyliczone na podstawie 6 sekwencji mikrosatelitarnych (CSM42, BM2113, ETH225, INRA23, BM1824 i ETH3), wynosi 0,99; natomiast na podstawie analizy 11 układów

grupowych krwi – 0,98. Wykorzystanie wysokopolimorficznych markerów mikrosatelitarnych DNA daje zatem możliwość zwiększenia prawdopodobieństwa wykazania niewłaściwych rodziców do 99,99%. Tak duża skuteczność spowodowała, że ISAG (International Society for Animal Genetics) zaleca, by kontrola pochodzenia bydła, prowadzona dotychczas na podstawie grupy krwi, została poszerzona o analizę polimorfizmu DNA.

Celem badań było określenie polimorfizmu cech antygenowych układów grupowych krwi oraz zalecanych przez ISAG sekwencji mikrosatelitarnych DNA u bydła polskiego czerwonego, a także określenie przydatności tych markerów w kontroli prawdziwości rodowodów.

### **Material i metody**

Badaniami polimorfizmu antygenowego krwi objęto 2322 sztuki bydła rasy polskiej czerwonej (pc), z ośrodków hodowli zarodowych oraz gospodarstw indywidualnych, w których prowadzona jest ocena użyteczności bydła pc. Natomiast analizę polimorfizmu mikrosatelitarnego wykonano u 62 osobników losowo wybranych z badanej populacji.

Antygeny krwinek czerwonych, w układach: A, B, C, F, J, L, M, H', Z, R' i T', identyfikowano za pomocą 78 reagentów testowych w teście hemolitycznym. Wszystkie użyte reagenty testowe, uzyskane w Zakładzie Immuno- i Cytogenetyki Instytutu Zootechniki, poddawane były międzynarodowej standaryzacji w testach porównawczych, organizowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt.

Genotypy badanych zwierząt ustalono na podstawie dziedziczenia, natomiast częstość alleli obliczono metodami ogólnie stosowanymi w tego typu pracach [9].

Do analizy polimorfizmu DNA wybrano 11 mikrosatelitarnych loci (zalecanych przez ISAG do kontroli rodowodów bydła): TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824. Markery te wchodziły w skład zestawu „StockMarks for Cattle II”, przygotowanego przez firmę Applied Biosystems.

Na bazie wyizolowanego genomowego DNA amplifikację sekwencji z wybranych loci wykonano metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR), przy użyciu fluorescencyjnie znakowanych starterów. Markery amplifikowano w jednej mieszaninie reakcyjnej typu 11-plex. Warunki amplifikacji zastosowano zgodnie z protokołem „Protocol for Bovine II Version 2 (Mixed 11 Plex Kit)” firmy Applied Biosystems.

Uzyskane produkty PCR poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w 4% żelu poliakryloamidowym, w laserowym sekwenatorze ABI PRISM 377. Wyniki rozdziału elektroforetycznego analizowano za pomocą programu komputerowego GeneScan 2.1., natomiast wielkości zidentyfikowanych alleli określono stosując program Genotyper 2.0.

Na podstawie częstości występowania poszczególnych alleli grup krwi i sekwencji mikrosatelitarnych wyliczono stopień heterozygotyczności (H) oraz indeks stopnia polimorfizmu (PIC) [1, 6]. Prawdopodobieństwo wykluczenia rodzica (PE), z uwzględ-

nieniem możliwości przebadania obydwu osobników rodzicielskich, wyliczono dla każdego locus [7]. Obliczono również  $PE_C$  na podstawie wszystkich 22 loci łącznie.

## Wyniki i dyskusja

Badanie struktury i zmienności genetycznej zwierząt gospodarskich, dokonywane na podstawie markerów genetycznych klasy I (antygeny erytrocytarne, białka surowicy krwi, oraz antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej), w ostatnich latach poszerzono o analizę markerów klasy II, związanych z polimorficznymi sekwencjami DNA (polimorficzne fragmenty restrykcyjne, sekwencje minisatelitarne i mikrosatelitarne). Spośród markerów klasy II, największe zastosowanie znalazły sekwencje mikrosatelitarne, krótkie tandemowe powtórzenia DNA, określone również jako STR (short tandem repeat). Obecnie stanowią one najliczniejszą grupę markerów genetycznych stosowanych w badaniu struktury genetycznej populacji i ras, zmienności genetycznej zwierząt gospodarskich oraz w kontroli pochodzenia [3, 4, 5, 7, 8, 10].

W prezentowanych badaniach dokonano analizy zarówno polimorfizmu markerów genetycznych należących do klasy I – grup krwi, jak i do klasy II – wybranych sekwencji mikrosatelitarnych DNA.

W badanej populacji, w obrębie jedenastu układów grupowych krwi, wystąpiło łącznie 179 alleli, wśród których najliczniejszą grupę stanowiły allele układów grupowych B (77 alleli) i C (63 allele). W pozostałych układach zaobserwowano dużo mniejsze zróżnicowanie – od 2 do 13 alleli (tab. 1). W obrębie badanych markerów mikrosatelitarnych ustalono 76 alleli. Największą liczbę odnotowano w locus TGLA53 i INRA23 (9 alleli). Pozostałe allele wykazywały dość równomierne rozmieszczenie w poszczególnych loci od 6 do 8, z wyjątkiem loci TGLA122 i BM1824, w których stwierdzono obecność odpowiednio 5 i 4 alleli (tab. 2). Markery genetyczne stosowane w kontroli pochodzenia powinny charakteryzować się dużym polimorfizmem, a równocześnie występować u osobników danej populacji w postaci heterozygotycznej. Na podstawie częstości występowania zidentyfikowanych alleli w analizowanych loci, obliczono wartości wskaźników H i PIC. W grupie markerów genetycznych klasy I wysokim polimorfizmem odznaczały się 4 układy grupowe krwi: C ( $H=0,865$ ;  $PIC=0,855$ ), B ( $H=0,855$ ;  $PIC=0,842$ ), A ( $H=0,815$ ;  $PIC=0,792$ ) i S ( $H=0,758$ ;  $PIC=0,718$ ). Wczesniejsze badania grup krwi także wskazywały na dużą przydatność tych układów grupowych krwi w kontroli rodowodów bydła [11]. Wartości stopnia heterozygotyczności i indeksu polimorfizmu, wyliczone dla pozostałych loci, wyniosły odpowiednio: od 0,112 i 0,106 (dla locus T\*) do 0,278 i 0,239 (dla locus L).

Analiza sekwencji mikrosatelitarnych wykazała, że badane loci charakteryzują się wysokim stopniem polimorfizmu. W poszczególnych loci stwierdzono od 4 do 9 alleli. Wartości PIC obliczone dla każdego markera były wyższe od 0,5, natomiast stopień heterozygotyczności (H) mieścił się w granicach od 0,612 aż do 0,845. Najwyższy polimorfizm zaobserwowano w loci TGLA227, BM2113 i INRA23, dla których wyliczone wartości PIC i H wyniosły ponad 0,8. Najniższy polimorfizm, w przeprowadzo-

**Tabela 1 – Table 1**

Częstość i liczba alleli grup krwi, heterozygotyczność (H), indeks stopnia polimorfizmu (PIC) i prawdopodobieństwo wykluczenia rodzicielstwa (PE) badanej populacji bydła polskiego czerwonego  
 Frequency and number of alleles blood group, heterozygosity (H), polymorphism information content (PIC) and probability of exclusion (PE) for investigated populations of Polish Red Cattle

Locus	Allele	Częstość Frequency	Liczba Number of alleles	H	PIC	PE					
1	2	3	4	5	6	7					
<b>A</b>	A1	0,1197	13	0,815	0,792	0,642					
	A1H	0,0798									
	A1HB4D	0,0144									
	A1B4D	0,0310									
	A2HB4D	0,0076									
	A2	0,0045									
	A2H	0,0027									
	A2B4D	0,0144									
	B4D	0,2381									
	H	0,0027									
	HB4D	0,0596									
	DB8	0,2915									
	A'	0,1314									
	<b>B*</b>	BO1I'2Q"					0,1556	77	0,855	0,842	0,721
BO1YID'I'2Q"		0,0918									
BO3Y2A'2G'P'Q'G"1I'2E'3		0,0312									
BP2Y2G'Q"		0,0361									
BP'1'2Q"		0,0502									
G2O4E'JO'G"2I'2Q"		0,1036									
G3T1B'Q"		0,0438									
11O2QA'2E'1K'Q'1'2		0,0392									
11G'G"1I'2E'3Q"		0,0372									
I2Q"		0,062									
Y2Y'Q"		0,058									
pozostale - others		0,2913									
<b>C*</b>		C1E	0,0487	63	0,865	0,855	0,746				
		C1ER2	0,0543								
	C1EW	0,0454									
	C2R2WC"	0,0693									
	EC"	0,0698									
	EWG"	0,0806									
	R2WX2C"	0,0365									
	R2X2C"	0,0767									
	WC"	0,0458									
	WX2C"	0,0361									
	X2C"	0,0432									
	C'C"	0,0915									
	pozostale - others	0,3021									
	<b>F</b>	F	0,9065					2	0,169	0,155	0,077
V		0,0935									

1	2	3	4	5	6	7
<b>J</b>	J	0,1123	2	0,199	0,179	0,089
	j	0,8877				
<b>L</b>	L	0,1671	2	0,278	0,239	0,119
	l	0,8329				
<b>M</b>	M	0,1371	2	0,237	0,208	0,104
	m	0,8629				
<b>S</b>	SH'	0,1389	12	0,758	0,718	0,531
	SH'U"	0,0006				
	U1	0,0019				
	U1H'	0,0220				
	U1H'H"	0,0032				
	U1H'H"U"	0,0011				
	H'	0,3170				
	H'U"	0,0013				
	H'H"	0,0004				
	U'1	0,2601				
	U'2	0,0228				
	S'	0,2306				
<b>Z</b>	Z	0,4994	2	0,500	0,375	0,187
	z	0,5006				
<b>R'</b>	R'	0,3467	2	0,451	0,350	0,175
	S'	0,6533				
<b>T'</b>	T'	0,0599	2	0,112	0,106	0,053
	t'	0,9401				

\*Obliczenia wykonano dla alleli występujących z częstością powyżej 3% – The calculation was made with regard to the alleles with frequency above 3%

nych badaniach, odnotowano w loci TGLA122 oraz TGLA126, dla których PIC i H wyniosły, odpowiednio: 0,559 i 0,630 oraz 0,570 i 0,612.

Miarą przydatności poszczególnych markerów genetycznych do weryfikacji pochodzenia jest prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwie wpisanych w dokumentację hodowlaną rodziców. Prawdopodobieństwo wykluczenia, oszacowane dla każdego z 22 badanych loci, z uwzględnieniem możliwości przebadania obydwu osobników rodzicielskich, podano w tabeli 1 i 2. Prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzica, obliczone przy użyciu wszystkich badanych loci grup krwi wyniosło 0,99999. Podobną wartość PE (0,9998) wyliczono na podstawie 11 analizowanych loci mikrosatelitarnych. Zastosowanie w kontroli pochodzenia bydła łącznie wszystkich badanych

**Tabela 2 – Table 2**

Liczba alleli i zakres długości (pary zasad), heterozygotyczność (H), indeks stopnia polimorfizmu (PIC) i prawdopodobieństwo wykluczenia rodzicielstwa (PE) dla loci mikrosatelitarnych  
 Number and size range (base pair) of alleles in loci, heterozygosity (H), polymorphism information content (PIC) and probability of exclusion (PE) for investigated microsatellite markers

Marker	Liczba alleli Number of alleles	Zakres długości (pz) Size range (bp)	H	PIC	PE
TGLA227	8	77-103	0,824	0,803	0,660
BM2113	8	121-141	0,830	0,808	0,663
TGLA53	9	154-182	0,775	0,751	0,593
ETH10	7	213-225	0,735	0,700	0,522
SPS115	6	248-258	0,759	0,729	0,556
TGLA126	6	115-125	0,612	0,570	0,382
TGLA122	5	141-169	0,630	0,559	0,360
INRA23	9	200-218	0,842	0,825	0,691
ETH3	8	109-129	0,760	0,732	0,565
ETH225	6	140-152	0,786	0,753	0,579
BM1824	4	178-188	0,688	0,627	0,419

markerów genetycznych daje możliwość wykluczenia niewłaściwego rodzica z 99,9999% prawdopodobieństwem.

Stwierdzony wysoki polimorfizm grup krwi, a także wybranych sekwencji mikrosatelitarnych DNA oraz wyliczone prawdopodobieństwo, z jakim można wykluczyć niewłaściwie podanego rodzica na podstawie obu tych grup markerów, wskazuje na dużą przydatność zarówno grup krwi, jak i polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych DNA w kontroli rodowodów bydła polskiego czerwonego. Przeprowadzone badania wskazują również na duże możliwości zastosowania markerów klasy I i II do analizy zmienności genetycznej u bydła polskiego czerwonego, a uzyskane wyniki mogą posłużyć za punkt wyjścia do śledzenia zmian, jakie będą prawdopodobnie zachodzić w strukturze genetycznej tej rasy pod wpływem prowadzonej pracy hodowlanej.

## PIŚMIENNICTWO

1. BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICKI M., DAVIS R.W., 1980 – Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-31.
2. HOLM L-E., BENDIXEN C., 1996 – Usefulness of microsatellites from the ISAG comparison test for parentage control in Danish Black-and-White cattle. *Animal Genetics* 27 (Suppl. 2), 17-42.
3. JAMIESON A., TAYLOR ST. C.S., 1997 – Comparison of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28, 397-400.

4. LUÍS C., GUS COTHRAN E., OOM M.M., 2002 – Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. *Genetics and Molecular Biology* 25, 131-134.
5. MANCINI M.G., ZANOTTI M., 1989 – Parentage control during the last of the 20 years of the most important Italian cattle breeds. *Animal Genetics* 20 (1), 6.
6. NEI M., ROYCHOUDHURY A.K., 1974 – Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76, 379-390.
7. PEELMAN L.J., MORTIAUX F., A VAN ZEVEREN, DANSERCOER A., MOMMENS G., COOPMAN F., BOUQUET Y., BURNY A., RENAVILLE R., PORTETELLE D., 1998 – Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four belgian cattle breeds. *Animal Genetics* 29, 161-167.
8. RADKO A., ŻYGA 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. *Journal of Applied Genetics* 46 (1), 89-91.
9. RYCHLIK T., 1986 – Grupy krwi jako markery zmian struktury genetycznej w populacji bydła. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, Monografie i Rozprawy, 76-B-1, 1-20.
10. RYCHLIK T., RADKO A., DUNIEC M., 2003 – Ocena przydatności polimorfizmu niektórych markerów genetycznych w kontroli rodowodów owiec. *Medycyna Weterynaryjna* 59, 1016-1018.
11. RYCHLIK T., DUNIEC M., 2004 – Produkcja i standaryzacja reagentów testowych niezbędnych w kontroli pochodzenia bydła. *Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego* 72(1), 315-322.
12. SCHMID M., SAITBEKOVA N., GAILLARD C., DOLFG., 1999 – Genetic diversity in Swiss cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 116, 1-8.

Tadeusz Rychlik, Anna Radko, Ewa Słota

## Comparative analysis of blood group polymorphism and microsatellite DNA sequences in Polish Red cattle

### S u m m a r y

The aim of the study was to analyse blood group polymorphism and selected microsatellite DNA sequences, and to determine the usefulness of these markers for pedigree control. The polymorphism of erythrocyte antigens in 11 blood group systems was investigated in 2322 animals, and microsatellite polymorphism in 62 head of Polish Red cattle. Blood antigens were determined using 78 reagents produced in the National Research Institute of Animal Production. The following 11 microsatellite loci were selected for analysis of DNA polymorphism: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, and BM1824. Based on the frequency of identified alleles at the loci of selected markers, degree of heterozygosity (H), polymorphic information content (PIC) and paternal exclusion probability (PE) were calculated for each locus.  $PE_C$  calculated based on all 22 loci was 99.9999.

