

Znaczenie markerów mikrosatelitarnych w ocenie zmienności genetycznej rodzimych ras bydła na przykładzie rasy białogrzbietej

Wioletta Sawicka-Zugaj

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

W przypadku gatunków i ras zagrożonych wyginięciem szczególnie ważne jest poznanie ich różnorodności genetycznej na poziomie genomu. Pod pojęciem zmienności genetycznej należy rozumieć naturalne różnice sekwencji DNA występujące w organizmie jednego gatunku. Różnice te mogą być przyczyną zmiany budowy białek, a także czasu i miejsca ich wytwarzania, co wywołuje zmiany w fenotypie. Zmienność genetyczna określana jest przy użyciu markerów genetycznych, do których należą m.in. sekwencje mikrosatelitarne. Nazwa „mikrosatelity” zaproponowana została w 1989 roku przez Litt i Luty [16], choć funkcjonują również inne nazwy: STR (ang. Short Tandem Repeats), SLP (ang. Simple Sequence Length Polymorphism), STRP (ang. Short Tandem Repeat Polymorphism). Jest to najpowszechniejsza grupa wśród markerów należących do II klasy, która wykazuje polimorfizm w ponad 90%. Sekwencje te występują w genomach wszystkich *Eucariota*. Charakteryzują się motywem podstawowym złożonym z kilku nukleotydów (1-6), powtarzającym się od 10 do 50 razy. Ich długość wynosi od 60 do 300 par zasad [7]. Występują głównie w rejonach niekodujących genów, ale można je także zidentyfikować w sekwencjach flankujących czy też rzadziej w sekwencjach kodujących. Cechują się równomiernym rozproszeniem, co 6 do 10 tysięcy pz [15].

Istnieje przekonanie wysunięte przez Ellegren [7], że mikrosatelity cechuje „cykl życiowy” podobny do życia organizmu, tzn. pojawiają się, rosną, a następnie zamierają. Najczęściej zidentyfikowane markery mikrosatelitarne są sekwencjami dwunukleotydowymi [(GT)/CA]_n. Jednostki powtórzone mogą składać się z tego samego rodzaju powtórzeń, są to tak zwane powtórzenia proste. Mogą mieć również układ złożony, tzn. motywy podstawowe są przedzielone inną sekwencją, np. (GT)_nCA-(GT)_n lub też sekwencja, która „dzieli” otoczona jest różnymi motywami podstawowymi, np. (AT)_nCA(GT)_n. Wysoki polimorfizm STR polega na zmiennej liczbie motywów powtarzających się w danym *locus*, ale może być także skutkiem tzw. „ślizgania się” polimerazy, którego efektem jest wydłużanie się sekwencji powtórzonych lub wystąpienie mutacji dynamicznych, doprowadzających nawet do 300-krotnego zwielokrotnienia charakterystycznego motywu sekwencji mikrosatelitarnej [5, 20].

Przy analizie markerów mikrosatelitarnych istotne znaczenie odgrywa reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR), w której jako startery dla polimerazy DNA wykorzystywane są syntetyzowane, na podstawie znajomości sekwencji otaczających mikrosatelity, oligonukleotydy [13]. Technika PCR pozwala na amplifikację

specyficznych fragmentów DNA, których długość określana jest za pomocą elektroforezy lub automatycznego sekwenatora DNA. Istnieje również możliwość takiego ustawienia reakcji PCR, aby w trakcie jednej analizy zidentyfikować allele z wielu *loci* tego samego osobnika. Jest to tzw. multipleks PCR. Przy zastosowaniu tej techniki można, oprócz analizy wybranego *locus*, określić płeć badanego osobnika, dzięki jednoczesnej amplifikacji kilkunastu alleli autosomalnych *loci* mikrosatelitarnych oraz wybranych alleli chromosomów płci [5].

Funkcja mikrosatelitów nie została do końca poznana [3]. Najprawdopodobniej poprzez swoje rozproszenie w genomie mają wpływ na zmniejszanie lub zwiększanie ekspresji genów [18]. Ponadto powtórzenia (GT)_n posiadają funkcje kondensacji i de-kondensacji chromatyny oraz tworzenia tzw. „gorących miejsc” rekombinacji, a powtórzenia (AC)_n wpływają na zwiększenie stopnia kondensacji, hamując przez to proces transkrypcji [21].

Takie cechy mikrosatelitów, jak: duża częstość występowania, wysoki polimorfizm, równomierne rozłożenie w genomie, zdolność dziedziczenia zgodnie z prawami Mendla, a także łatwość identyfikacji przy użyciu metody PCR i elektroforezy, pozwoliły na szerokie zastosowanie tych markerów. Są one wykorzystywane m.in. do charakterystyki struktury populacji, charakterystyki stopnia zimbredowania populacji, szacowania zmienności genetycznej zwierząt, badań nad kontrolą pochodzenia, oceny dystansu genetycznego pomiędzy populacjami, rasami lub określonymi liniami zwierząt, badań filogenetycznych, identyfikacji genów cech ilościowych (QTL), konstrukcji map genowych, a także do prowadzenia selekcji opartej na markerach genetycznych (MAS – ang. Marker Assisted Selection) [6, 14].

Prace nad projektem markerowej mapy bydła (BovMap) rozpoczęte zostały na początku lat dziewięćdziesiątych przez Genmark Company. Objęły one 1518 buhajów z 14 dużych rodzin bydła holsztyńsko-fryzyskiego. Kolejne próby skonstruowania genetycznej mapy bydła podjęte zostały na podstawie od 468 do 1250 markerów mikrosatelitarnych [2, 4]. Wszechstronną mapę, utworzoną na podstawie 3802 mikrosatelit, udało się skonstruować zespołowi Naoya Ihary [10]. Mapy markerowe są powszechnie wykorzystywane do identyfikacji genów odpowiedzialnych za monogenowe choroby genetyczne. [5].

Markery mikrosatelitarne mają także duże znaczenie przy identyfikacji genów warunkujących cechy ilościowe (QTL). Dzięki takim analizom udało się zidentyfikować u bydła kilka *loci* położonych na różnych chromosomach związanych z użytecznością mleczną. Należą do nich: BM711 (chromosom 8); BM2078 (chromosom 18); BM3413 (chromosom 21); BM513, BM1443, BM1905 (chromosom 23); BM4505 (chromosom 26) oraz BM203 (chromosom 27) [1, 11, 17, 22].

Przez długi okres kontrola pochodzenia przeprowadzana była przy użyciu markerów genetycznych I klasy, tj. antygenów erytocytnych oraz polimorficznych białek. Jednakże prawdopodobieństwo wykluczenia na podstawie układów grupowych krwi wynosi 98%, a w populacjach o zwiększonym współczynniku inbrodu dochodzi do zmniejszenia tego wskaźnika z racji zwiększenia udziału homozygot w genotypach [9]. W związku z tym odchodzi się od tych metod ustalania ojcostwa, na rzecz markerów mikrosatelitarnych. Obecnie minimalna liczba mikrosatelitów do kontroli pochodzenia, wskazana przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG), wynosi 9. Są to następujące *loci* mikrosatelitarne: BM2113, BM1824, ETH10, ETH225, ETH3, SPS115, TGLA227, TGLA126, TGLA122. Najczęściej jednak wykorzystywanych jest od 11 do 20 markerów, na których podstawie istnieje 99,99% prawdopodobieństwa wykluczenia niewłaściwego rodzica [19].

W tabelach 1 i 2 przedstawiono wyniki oceny zmienności genetycznej wykonane na populacji 124 krów białogrzbietych na podstawie 11 sekwencji mikrosatelitarnych. Parametrami charakteryzującymi strukturę genetyczną analizowanej populacji są: liczba alleli zidentyfikowanych w poszczególnych *loci* i częstość ich występowania, heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana, wskaźnik polimorficzności. Określono także przydatność wybranego panelu mikrosatelitów w kontroli pochodzenia na podstawie prawdopodobieństwa wykluczenia niewłaściwego rodzica.

W całej analizowanej populacji zidentyfikowano łącznie 108 alleli. W pojedynczym *locus* określono średnio 9,82 allele, a ich liczba wahała się od 5 w *locus* BM1824 do 15 w *locus* TGLA122 (tab. 1). Zgodnie z definicją, że mianem polimorficznego *locus* określamy te, w których częstość najbardziej pospolitego allelu w populacji jest mniejsza niż 0,95 [8], można powiedzieć, że wszystkie analizowane *loci* są polimorficzne. Największą polimorficzność w tej grupie wykazał jednak *locus* TGLA122 (15 alleli), a najmniejszą – BM1824 (5 alleli).

Tabela 1

Liczba alleli zidentyfikowanych w poszczególnych *loci* i ich frekwencja w analizowanej populacji bydła białogrzbietego

Locus	N	Allele	Częstość	Locus	N	Allele	Częstość	Locus	N	Allele	Częstość		
TGLA227	13	79	0,012	SPS115	7	244	0,664	TGLA53	14	151	0,004		
		81	0,028			246	0,037			153	0,222		
		83	0,280			248	0,066			157	0,185		
		85	0,163			250	0,086			159	0,165		
		87	0,020			252	0,111			161	0,153		
		89	0,077			254	0,012			163	0,077		
		91	0,142			256	0,025			165	0,036		
		93	0,033			BM2113	7			126	0,095	167	0,040
		95	0,057							128	0,129	169	0,052
		97	0,004							132	0,099	171	0,012
99	0,130	134	0,276	173	0,008								
101	0,041	136	0,155	175	0,012								
105	0,012	138	0,103	179	0,020								
TGLA122	15	140	0,041	140	0,142			TGLA126	7	115	0,020		
		142	0,161	INRA23	11					199	0,012	117	0,287
		144	0,231							201	0,098	119	0,398
		146	0,004							203	0,012	121	0,123
		148	0,012			205	0,012			123	0,033		
		150	0,099			207	0,191			125	0,102		
		152	0,198			209	0,114			127	0,037		
		154	0,058			211	0,183			BM1824	5	179	0,290
		160	0,004			213	0,081					181	0,149
		162	0,045			215	0,268					183	0,286
164	0,116	217	0,020			185	0,008						
170	0,008	219	0,008	189	0,266								
172	0,008	ETH3	10	109	0,017	ETH225	10	137	0,004				
174	0,008			115	0,054			139	0,021				
184	0,004			117	0,364			141	0,074				
ETH10	9			209	0,012			119	0,091			143	0,008
				213	0,033			121	0,194			145	0,095
				215	0,058			123	0,029	147	0,116		
				217	0,099			125	0,136	149	0,302		
				219	0,384			127	0,095	151	0,326		
				221	0,227			129	0,017	153	0,045		
				223	0,074			131	0,004	155	0,008		
		225	0,079										
		227	0,033										

Tabela 2

Heterozygotyczność obserwowana (H_o), heterozygotyczność oczekiwana (H_e), wskaźnik polimorficzności (PIC) oraz prawdopodobieństwo wykluczenia (PE) w badanej populacji bydła białogrzbietego

Locus	H_o	H_e	PIC	PE
TGLA227	0,715	0,844	0,828	0,860
BM2113	0,655	0,833	0,813	0,840
TGLA53	0,774	0,853	0,836	0,870
ETH10	0,727	0,773	0,747	0,780
SPS115	0,475	0,533	0,510	0,530
TGLA126	0,672	0,731	0,691	0,690
TGLA122	0,752	0,850	0,833	0,870
INRA23	0,813	0,828	0,806	0,830
ETH3	0,744	0,790	0,765	0,790
RTH225	0,777	0,772	0,740	0,760
BM1824	0,806	0,741	0,693	0,660
	0,719	0,777	0,751	0,999

Najwyższą częstością występowania charakteryzował się allel 244 pz w *locus* SPS115. Zgodnie z opinią Hartla i Clarka [8], allel

jest traktowany jako rzadki, jeśli jego częstość jest mniejsza niż 0,005; w ocenianej grupie zwierząt stanowią one blisko 6,5%.

Ze stopniem polimorfizmu ściśle łączy się stopień heterozygotyczności. Łączna wartość heterozygotyczności obserwowanej (H_o) wyniosła 0,719, natomiast heterozygotyczności oczekiwanej (H_e) – 0,777 (tab. 2). Heterozygotyczność obserwowana wahała się od 0,475 w SPS115 do 0,806 w BM1824. W przypadku heterozygotyczności oczekiwanej najniższa wartość wystąpiła również w SPS115 – 0,533, najwyższa natomiast w TGLA53 – 0,853. Różnice między *loci* w stopniu heterozygotyczności są dosyć duże, na co wpływ ma liczba oraz częstość występowania alleli.

Kolejnym wskaźnikiem zróżnicowania genetycznego jest stopień polimorficzności (PIC). W badanej grupie zwierząt osiągnął on średnią wartość 0,751, a w poszczególnych *loci* wahał się od 0,510 dla SPS115 do 0,836 dla TGLA53.

W celu określenia przydatności wybranego zestawu *loci* mikrosatelitów do kontroli pochodzenia obliczono prawdopodobieństwo wykluczenia dla poszczególnych *loci* (PE) oraz łączne prawdopodobieństwo wykluczenia (PEC). Parametr ten określono przy założeniu znajomości genotypów obydwójga rodziców. Najniższą wartość osiągnął *locus* SPS115 (53%), najwyższą natomiast TGLA122 (87%). Na wartości te wpływ miała efektywna liczba alleli zidentyfikowanych w poszczegól-

nych *loci*: SPS115 – 2,142, a TGLA122 – 6,684. Prawdopodobieństwo wykluczenia przy zastosowaniu analizowanego zestawu mikrosatelitów wynosi 99%.

Przeprowadzone badania pozwalają wnioskować, że markery mikrosatelitarne stanowią jedno z podstawowych narzędzi w analizie struktury genetycznej ras objętych ochroną zasobów genetycznych. Dobry zestaw mikrosatelitów DNA pozwala nie tylko na zidentyfikowanie alleli w poszczególnych *loci* mikrosatelitarnych, ale również na ocenę innych ważnych parametrów charakteryzujących stopień zmian zachodzących w zmienności genetycznej analizowanej populacji, tj. stopnia heterozygotyczności, stopnia polimorficzności, czy też niezwykle istotnego prawdopodobieństwa wykluczenia niewłaściwego rodzica.

Literatura: 1. Ashwell M.S., Da Y., Vanraden P.M., Rexroad C.E., JR., Miller R.H., 1998 – *Journal of Dairy Science* 81, 1120-1125. 2. Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M., Shalom A., Kirkpatrick B.W., Ryan A.M., Clayton D., Li L., Neibergs H.L., Zhang N., Grosse W.M., Weiss J., Creighton P., McCarthy F., Ron M., Teale A.J., Fries R., McGraw R.A., Moore S.S., Georges M., Soller M., Womack J.E., Helzel D.J.S., 1994 – *Nature Genetics* 6, 227-235. 3. Bennett P., 2000 – *Molecular Pathology* 53, 177-183. 4. Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L.F., Hawkins G.A., Solinas Toldo S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J., Beattie C.W., 1994 – *Genetics* 136, 619-639. 5. Charon K.M., Świtoński M., 2005 – *Ge-*

netyka zwierząt. PWN, Warszawa. 6. Čítek J., Panicke L., Řehout V., Procházková H., 2006 – *Czech Journal of Animal Science* 51, 429-436. 7. Ellegren H., 2004 – *Nature Reviews Genetics* 5, 435-445. 8. Hartl D.L., Clark A.G., 2009 – *Podstawy genetyki populacyjnej*. Wyd. UW, Warszawa. 9. Holm L.E., Bendixen C., 1996 – *Animal Genetics* 27, 17-42. 10. Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K., Takeda H., Sugimoto M., Mizoguchi Y., Hirano T., Itoh T., Watanabe T., Reed K.M., Snelling W.M., Kappes S.M., Beattie C.W., Bennett G.L., Sugimoto Y., 2004 – *Genome Research* 14, 1987-1998. 11. Jiang Z., De S., Garcia M.D., Griffin K.B., Wu X.-L., Xiao Q., Michal J.J., Sharma B.S., Jansen G.B., 2005 – *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122, 281-284. 12. Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith T.P.L., Lopez-Corrales N.L., Beattie C.W., 1997 – *Genome Research* 7, 235-249. 13. Koreth J., O'Leary J.J., O'D McGee J., 1996 – *The Journal of Pathology* 178, 239-248. 14. Leeb T., Trening B., Rohrer G.A., 2005 – *Animal Genetics* 36, 279-280. 15. Li Y.C., Korol A.B., Fatima T., Nevo E., 2004 – *Molecular Biology and Evolution* 21, 991-1007. 16. Litt M., Luty J.A., 1989 – *American Journal of Human Genetics* 44, 397-401. 17. Longeri M., Polli M., Strillacci M.G., Samore A.B., Zanotti M., 2006 – *Journal of Dairy Science* 89, 3175-3177. 18. Pisarchik A.V., Kartel N.A., 2000 – *Molecular Biology* 34, 303-307. 19. Radko A., 2008A – *Annals of Animal Science*, vol. 8, 3, 205-215. 20. Słomski R., 2008 – *Analiza DNA teoria i praktyka*. WUP, Poznań. 21. Stallignas R.L., Ford A.F., Nelson D., Tonery D.C., Hildebrand C.E., Moyzis R.K., 1991 – *Genomics* 10, 807-815. 22. Van Arendonk J.A.M., Tier B., Kinghorn B.P., 1994 – *Genetics* 137, 319-329.

Ocena łączy hodowców bydła z mleczarniami

Leszek Hądziak

Polska Federacja Hodowców Bydła i Producentów Mleka

W lipcu 2006 r. Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi przekazał Polskiej Federacji Hodowców Bydła i Producentów Mleka prowadzenie oceny wartości użytkowej bydła wraz z laboratoriami oceny mleka i systemem informatycznym SYMLEK. Jednym z głównych zadań, które postawiła sobie PFHBiPM po przejściu oceny, było zwiększenie liczebności ocenianej populacji krów. Było to związane z rozwojem na potrzeby mleczarstwa nowoczesnego zaplecza surowcowego. Zaplecze takie miały stanowić gospodarstwa, w których prowadzono ocenę bydła i doradztwo, stosujące nowoczesne zarządzanie stadami, posiadające zwierzęta o wysokich walorach produkcyjnych i genetycznych. O potencjale produkcyjnym gospodarstw ocenianych może świadczyć fakt, że 20-procentowa populacja krów objęta oceną dostarczała około 44% mleka do przetwórstwa. Rozwój oceny jest zadaniem niezwykle trudnym, między innymi ze względu na bardzo zróżnicowaną i rozdrobnioną strukturę gospodarstw mlecznych w Polsce. Wśród 2,6 mln krów mlecznych ponad 1 mln znajduje się w oborach utrzymujących do 10 sztuk. Takie gospodarstwa, mimo najszczerzej chęci hodowców, nie są w stanie z powodów ekonomicznych korzystać z oceny wartości użytkowej. Mimo tych niekorzystnych uwarunkowań liczba krów ocenianych w ciągu ostatnich 5 lat wzrosła o ponad 100 000 i obejmuje dzisiaj 25% pogłowia krów. Było to możliwe dzięki wysiłkowi wszystkich pracowników zajmujących się oceną, a także coraz lepszej współpracy i wspomaganie oceny

przez podmioty skupujące i przetwarzające mleko, zwłaszcza spółdzielnie mleczarskie. Utwierdza to także w przekonaniu, że podejmowanymi działaniami i staraniami można zwiększać wielkość populacji ocenianej.

Jest wiele powodów przemawiających za wzrostem oceny krów w Polsce. Jednym z nich jest szacowanie wartości hodowlanej materiału męskiego i żeńskiego. Przy szybko upowszechnianej w praktyce selekcji genomowej, rola oceny wartości użytkowej krów będzie wprawdzie traciła swoje dotychczasowe znaczenie i przydatność, ale nikt na razie nie przewiduje szybkiego jej zaprzestania.

Drugim i najważniejszym powodem, dla którego ocena krów jest wręcz niezbędna jest zarządzanie stadem, czyli podejmowanie szybkich, trafnych i skutecznych decyzji dotyczących produkcji i składu mleka, żywienia, selekcji i rozrodu, na podstawie przetworzonych informacji pochodzących z oceny. Jeden ze znanych polskich żywieniowców, mówiąc o przydatności oceny krów do zarządzania stadem, napisał tak: „Czy ktoś wyobraża sobie, aby nowoczesny samochód pozbawiony był czujnika ciśnienia oleju czy prędkościomierza? Jazda takim wozem, prędzej czy później musiałaby zakończyć się awarią lub katastrofą.” Nie jest przypadkiem fakt, że przeciętna wydajność roczna krów ocenianych w Polsce jest wyższa o ponad 2500 kg mleka od przeciętnej wydajności krów w populacji masowej i że ponad 45% mleka kwotowego trafiającego do skupu pochodzi od objętej oceną 25-procentowej krajowej populacji krów. Te różnice i wielkości biorą się stąd, że właściciele stad ocenianych otrzymują regularnie, najczęściej w odstępach miesięcznych, przetworzone informacje o każdym zwierzęciu w stadzie pod kątem wydajności, składu mleka, zawartości komórek somatycznych i mocznika oraz rozrodu. W dostępnych raportach wynikowych informacje te mogą być jeszcze szersze i bardziej szczegółowe. Już niebawem Polska Federacja Hodowców Bydła i Producentów Mleka planuje uruchomienie jeszcze jednej niezwykle ważnej informacji dla hodowców bydła i producentów