

THE USE OF DNA-MICROSATELLITES FOR VERIFICATION OF PEDIGREE OF HORSES

VYUŽITIE DNA-MIKROSATELITOV PRI OVEROVANÍ PÔVODU KONÍ

Burócziová M., Čermáková J., Dvořák J.

Ústav morfológie, fyziológie a genetiky zvierat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: monikaburocziova@yahoo.ca, dvorakJ@mendelu.cz

ABSTRACT

The modern breeding requires that the parentage of animals and their pedigree be determined and known positively. There are several methods that are applicable for identifying individual animals: the description of colour and marks, blood types, microchips, hot branding. The use of DNA-microsatellites has become an important method for the verification of parentage. In the population of horses, it is possible to identify individual horses using DNA genotypes of 17 microsatellite markers. This research concerns the variability of microsatellite markers in genotypes of horses. Slovak and Czech thoroughbred representatives from European breeds and Quarter horse and American Paint horse representatives from North American breeds were analysed for 17 microsatellite markers (AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, VHL20, HTG6, HMS2, HTG7, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, LEX3) recommended by the International Society of Animal Genetics. The allele frequencies, polymorphic information content, paternity exclusion probability and theoretical heterozygosity have been calculated.

Keywords: microsatellite, horses, pedigree

ABSTRAKT

Pri modernom šľachtení je nevyhnutné jednoznačne určiť rodokmeň a pôvod zvierat. Existuje niekoľko metód, ktoré je možné uplatniť pri identifikácii jednotlivých zvierat: opis farby a odznakov, analýzou krvnej skupiny, použitím mikročipov alebo výpalmi. Využívanie DNA mikrosatelitov sa stalo dôležitou metódou pre overovanie rodičovstva. V populácii koní je použitím sedemnástich mikrosatelitných markerov možné identifikovať jednotlivé zvieratá. Pri výskume týkajúcom sa viability mikrosatelitných markerov v genotypoch koní sa analyzovalo sedemnást' mikrosatelitných markerov (AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, VHL20, HTG6, HMS2, HTG7, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, LEX3), ktoré odporúča Medzinárodná spoločnosť pre genetiku zvierat (International Society of Animal Genetics – ISAG). Vypočítavali sa alelové frekvencie, polymorfny informačný obsah, pravdepodobnosť vylúčenia z paternity a teoretická heterozygótneš.

Klíčové slova: mikrosatelity, kone, pôvod

ÚVOD

Objektívna kontrola pôvodu koní je neodmysliteľnou požiadavkou pre účinný plemenársky program. Metódy molekulárnej genetiky, ktoré umožňujú určiť rodičovstvo s vysokou presnosťou sú založené na určovaní hypervariabilných DNA mikrosatelitov. Variabilita mikrosatelitných markerov v genóme koní je vysoká, a preto boli tieto krátke tandemové repetície v poslednom desaťročí úspešne využívané k identifikácii jedincov v populácii koní a v testovaní paternity. (Civáňová et al., 2003). Prostredníctvom písmen vyjadrujeme genotypy pričom jednotlivé písmená charakterizujú určitú alelu. Spoľahlivosť overovania pôvodu prostredníctvom mikrosatelitného panelu je 99%.

MATERIÁL A METODIKA

Na analýzu sme použili ejakuláty, krv a chlpové cibulky koní, ktoré pochádzali od súkromných majiteľov koní. K testu bolo využitých 65 jedincov plemena Český teplokrvník, 54 jedincov plemena Slovenský teplokrvník, 28 jedincov plemena Quarter Horse a 19 jedincov American Paint Horse. Na vyhodnocovanie jednotlivých mikrosatelitov bol použitý automatický sekvenátor ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) a GeneScan Analysis Software v. 3.1. Výpočet teoretickej heterozygótnosti sa prepočítaval podľa NEI /1987/ a podľa BOTSTEINA sa vypočítavali PIC hodnoty /polymorfný informačný obsah/.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri porovnávaní plemien Českého teplokrvníka so Slovenským teplokrvníkom sme zistili vysokú variabilitu u mikrosatelitných markerov. Zo zistených údajov vyplýva, že variabilita je u Českého teplokrvníka mierne vyššia ako u Slovenského a tiež plemeno Quarter Horse vykazuje vyššiu variabilitu ako American Paint Horse. Zarovň môžeme konštatovať, že genetická variabilita je vyššia u európskych plemien v porovnaní s americkými.

Na základe analýzy 17 mikrosatelitných lokusov u koní, u celkom 166-tich jedincov, štyroch rôznych plemien a z vypočítaných hodnôt môžeme konštatovať, že vykazujú dostatočnú variabilitu pre identifikáciu jedincov.

Tabuľka č. 1: Základná charakteristika MS lokusov

Lokus	Plemeno	N	Počet alel	H	PIC	PE1	PE2	PE3
ATH4	ČT	65	8	0,7242	0,6758	0,4812	0,3095	0,6607
	ST	54	4	0,7123	0,6560	0,4492	0,2820	0,6184
ATH5	ČT	65	6	0,7913	0,7586	0,5846	0,4053	0,7640
	ST	54	6	0,7701	0,7321	0,5496	0,3714	0,7302
HSM1	ČT	65	6	0,6018	0,5239	0,3239	0,1897	0,4783
	ST	54	4	0,6153	0,5412	0,3351	0,1944	0,4889
HSM2	ČT	65	7	0,7793	0,7486	0,5790	0,3993	0,7659
	ST	54	7	0,7611	0,7241	0,5444	0,3660	0,7297
HSM3	ČT	65	8	0,7724	0,7428	0,5736	0,3923	0,7637
	ST	54	7	0,7698	0,7344	0,5585	0,3809	0,7437
HSM6	ČT	65	5	0,7373	0,6948	0,5063	0,3294	0,6902
	ST	54	6	0,6446	0,5922	0,3997	0,2353	0,5813
HSM7	ČT	65	7	0,8257	0,8016	0,6491	0,4750	0,8239

	ST	54	7	0,8149	0,7891	0,6320	0,4562	0,8103
HTG4	ČT	65	5	0,6123	0,5360	0,3358	0,1983	0,4637
	ST	54	5	0,5509	0,4576	0,2629	0,1543	0,3956
HTG6	ČT	65	7	0,7305	0,6861	0,4978	0,3235	0,6824
	ST	54	7	0,7202	0,6714	0,4767	0,3051	0,6566
HTG7	ČT	65	4	0,6187	0,5659	0,3693	0,2072	0,5431
	ST	54	5	0,7043	0,6522	0,4518	0,2822	0,6279
HTG10	ČT	65	11	0,8494	0,8321	0,6997	0,5345	0,8684
	ST	54	9	0,8197	0,7965	0,6468	0,4733	0,8263
VHL20	ČT	65	8	0,7909	0,7613	0,5960	0,4182	0,7806
	ST	54	7	0,7417	0,7035	0,5636	0,3458	0,7138
ABS2	ČT	65	10	0,8427	0,8240	0,6875	0,5202	0,8590
	ST	54	8	0,8242	0,8016	0,6531	0,4710	0,8306
ABS17	ČT	65	10	0,8004	0,7765	0,6216	0,4439	0,8087
	ST	54	9	0,8053	0,7854	0,6389	0,4623	0,8286
ABS23	ČT	65	7	0,7747	0,7435	0,5733	0,3936	0,7615
	ST	54	7	0,8184	0,7925	0,6354	0,4596	0,8119
CA425	ČT	65	7	0,6547	0,6057	0,4104	0,2413	0,5917
	ST	54	6	0,6830	0,6259	0,4261	0,2627	0,6016
LEX3	ČT	65	9	0,8436	0,8245	0,6871	0,5195	0,8577
	ST	54	8	0,7917	0,7616	0,5952	0,4175	0,7787

/N-počet jedincov, H-očakávaná heterozygótnosť, PIC-polymorfný informačný obsah,
PE-pravdepodobnosť vylúčenia z paternity/
/ČT-český teplokrvník, ST-slovenský teplokrvník/

Tabuľka č.2 :Kombinovaná pravdepodobnosť vylúčenia z paternity

CEP		CEP1	CEP2	CEP3
	ČT	0,9998	0,9950	0,9999
	ST	0,9998	0,9914	0,9999

Tabuľka č.3: Základná charakteristika MS lokusov

Lokus	Plemeno	N	Počet alel	H	PIC	PE1	PE2	PE3
ATH4	QH	28	6	0,7539	0,7114	0,5211	0,3442	0,7002
	PH	19	5	0,6711	0,6377	0,4391	0,2715	0,6170
ATH5	QH	28	5	0,7755	0,7405	0,5615	0,3815	0,7435
	PH	19	5	0,6938	0,6419	0,4449	0,2759	0,6245
HSM1	QH	28	5	0,5664	0,5172	0,3305	0,1737	0,5029
	PH	19	4	0,5720	0,4792	0,2808	0,1671	0,4191
HSM2	QH	28	8	0,8112	0,7848	0,6270	0,4515	0,8066
	PH	19	5	0,7562	0,7143	0,5252	0,3482	0,7046
HSM3	QH	28	5	0,7772	0,7403	0,5588	0,3799	0,7382
	PH	19	7	0,8089	0,7811	0,6193	0,4422	0,7980
HSM6	QH	28	5	0,5645	0,5136	0,3257	0,1708	0,4952
	PH	19	4	0,4585	0,4208	0,2529	0,1088	0,4064
HSM7	QH	28	6	0,7590	0,7114	0,5387	0,3595	0,7227
	PH	19	5	0,7035	0,6547	0,4589	0,2868	0,6401
HTG4	QH	28	6	0,6021	0,5543	0,3675	0,2041	0,5501
	PH	19	5	0,7424	0,6980	0,5064	0,3308	0,6865

HTG6	QH	28	5	0,7319	0,6840	0,4877	0,3144	0,6653
	PH	19	4	0,6634	0,5948	0,3822	0,2297	0,5408
HTG7	QH	28	4	0,7156	0,6629	0,4603	0,2899	0,6339
	PH	19	4	0,6551	0,5881	0,3770	0,2239	0,5367
HTG10	QH	28	8	0,8361	0,8156	0,6731	0,5026	0,8464
	PH	19	6	0,7947	0,7634	0,5930	0,4143	0,7731
VHL20	QH	28	8	0,8246	0,8015	0,6514	0,4775	0,8280
	PH	19	8	0,8296	0,8078	0,6613	0,4889	0,8367
ABS2	QH	28	9	0,8380	0,8197	0,6827	0,5138	0,8573
	PH	19	10	0,7964	0,7720	0,6179	0,4412	0,8071
ABS17	QH	28	9	0,7276	0,6924	0,5172	0,3380	0,7146
	PH	19	9	0,7895	0,7623	0,6035	0,4266	0,7927
ABS23	QH	28	7	0,8029	0,7753	0,6143	0,4373	0,7963
	PH	19	6	0,7700	0,7340	0,5562	0,3779	0,7403
CA425	QH	28	6	0,6645	0,6258	0,4396	0,2612	0,6338
	PH	19	6	0,5983	0,5525	0,3663	0,2014	0,5497
LEX3	QH	28	9	0,8309	0,8121	0,6723	0,5014	0,8502
	PH	19	8	0,8171	0,7930	0,6408	0,4666	0,8203

/N-počet jedincov, H-očakávaná heterozygótnosť, PIC-polymorfný informačný obsah,
PE-pravdepodobnosť vylúčenia z paternity/
/QH-quarter horse, PH- american paint horse/

Tabuľka č.4:Kombinovaná pravdepodobnosť vylúčenia z paternity

CEP		CEP1	CEP2	CEP3
	QH	0,9998	0,9943	0,9999
	PH	0,9996	0,9878	0,9999

ZÁVER

Pravdepodobnosť vylúčenia nesprávneho rodiča, ak je známy genotyp potomka a oboch rodičov je 99,98% u ČT, 99,98 % u ST, 99,98% u QH a 99,96 % u PH. Pri neznámom genotype potomka a oboch rodičov je pravdepodobnosť vylúčenia nesprávneho rodiča 99,50% u ČT, 99,14% u ST, 99,43% u QH a 98,78% u PH. Pravdepodobnosť vylúčenia oboch rodičov, ak je známy genotyp potomka i oboch rodičov je 99,99% u ČT, 99,99% u ST, 99,99% u QH a 99,99% u PH.

Pre rutinné testovanie rodičovstva sú podľa uvedených analýz a výpočtov vhodné používať mikrosatelitné panely.

LITERATÚRA

Civáňová et al.:Hodnotenie informatívnosti mikrosatelitných markerov využívaných pri overovaní rodičovstva u hovädzieho dobytku. MendelNET'03, MZLU Brno, 2003, 53.

Burócziová et al.: Pedigree verification in horses using microsatellite markers. 4. Biologické dni, UKF Nitra, 2005, 391.