

## Poglavje 6

# Preverjanje porekla z genotipizacijo mikrosatelitnih označevalcev <sup>1</sup>

*Tina Flisar, Špela Malovrh, Milena Kovač*

### 6.1 Uvod

Za ohranjanje genske pestrosti v majhnih populacijah, kot so prašiči pasme krškopoljski prašič, je bistvenega pomena preprečevanje parjenja v sorodu (Kovač in Malovrh, 2012). Izračun koeficientov sorodstva pogosto opravimo na osnovi porekla iz dokumentacije, torej na rodovniških podatkih. Drug način izračuna koeficienta sorodstva temelji na molekularnih analizah, s katerimi preverimo razlike med osebki iste populacije.

Namen prispevka je preverjanje porekla s pomočjo mikrosatelitnih označevalcev. Osredotočili se bomo predvsem na nekompatibilnost med podatki o poreklu prašičev pasme krškopoljski prašič na osnovi dokumentacije in rezultati genotipizacije 18 mikrosatelitnih označevalcev. Določili bomo število napak v poreklu in poskušali poiskati vzroke napak.

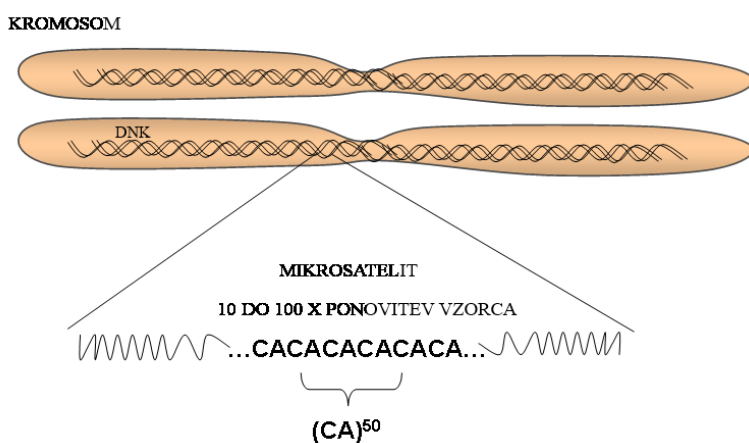
### 6.2 Informacije o genomu

Dedni zapis sesalcev sestavlja več kot tri milijarde sestavnih delov (baznih parov). Poznamo štiri različice, ki jih na kratko označimo s A, T, C in G. Razlike v zaporedju teh sestavnih delov so bistvene za razlike med osebki. Prav vsak osebek ima različno zaporedje, z izjemo enojajčnih dvojčkov. Pravzaprav je med osebki še najmanj razlik v zaporedju v genih, saj imajo geni pomembno funkcionalno vlogo. Med osebki iste populacije je več razlik v tistih regijah, ki niso bistvene za organizem. Delež genov in sorodnih sekvenc znaša okoli 30 %, nekodirajočih pa okoli 70 %. Zanimajo nas informacije tako enih kot drugih. Medtem ko raznolikost med osebki v lastnostih povzročajo predvsem spremembe v zapisih genov, pa nam pomembne informacije prinašajo tudi ponavljajoča se zaporedja DNK (deoksiribonukleinska kislina). Identifikacija osebkov pa temelji na analizi medgenskega zaporedja, med katere spadajo ponavljajoča zaporedja.

Poznamo dve skupini ponavljajočih se sekvenc, ki ju ločimo glede na dolžino ponavljajočega se motiva in na razporeditev v genomu. Minisateliti so tandemske ponovitve, ki so sestavljene iz kratkega nukleotidnega zaporedja (približno 30 baznih parov) in se ponovijo 20 do 100-krat. Pogosto se nahajajo na koncih kromosomov. Druga skupina so mikrosateliti. So kratke tandemske ponovitve vzorca 1 do 5 baznih parov (slika 1). Na sliki prikazujemo mikrosatelit z vzorcem CA. Ponavljajo se od 10 do 100-krat. V genomu so enakomerno

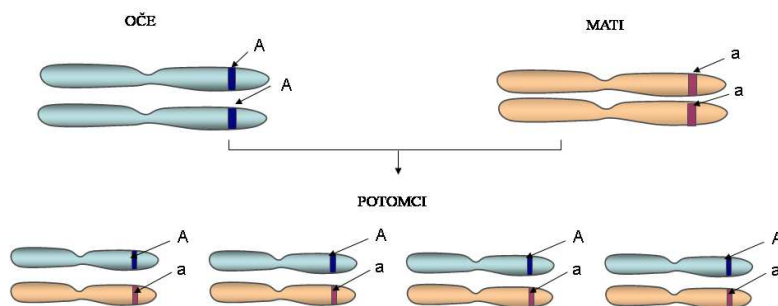
<sup>1</sup>Prispevek je sofinanciran v okviru Javne službe nalog genske banke v živinoreji

razporejeni, skupno pa jih je okoli 3 %. Zaradi polimorfnosti (variabilnosti) jih uporabljamo za identifikacijo osebkov, predvsem za preverjanje porekla.



Slika 1: Shema mikrosatelita

Uporabo mikrosatelitov lahko razdelimo predvsem na 3 skupine uporabe: v prvo lahko uvrstimo genetsko kartiranje in identifikacijo novih lokusov, v drugo skupino spadajo analize na nivoju osebkov, kamor uvrščamo preverjanje starševstva, sledljivost živalskih proizvodov, gensko diagnostiko ter uporabo v forenziki, tretja skupina pa je uporaba na nivoju populacije, kamor uvrščamo vrednotenje genetske pestrosti populacij in filogenetske študije.



Slika 2: Shema dedovanja alel

Mikrosateliti so torej visoko polimorfni lokusi, ki jih v živinoreji lahko izkoriščamo za izdelavo profila DNK, na osnovi katerega lahko nadziramo rodovniške podatke v dokumentaciji. Največkrat jih uporabimo za analizo očetovstva, saj je večkrat dvomljiva identiteta očeta kot matere. Ker diploidni osebki dedujejo eno alelo po materi in drugo po očetu (slika 2), so te analize dokaj enostavne. Na sliki je prikazan primer ene regije z dvema možnima aleloma. Oče je homozigot, saj ima na obeh kromosomih aleli enako dolgi, zato sta obe označeni z A. Mama ima tudi obe aleli iste dolžine, ki pa sta različni od očetove (a). Potomci so heterozigoti (Aa). Na enem kromosomu imajo očetovo alelo, na drugem materino. S testom starševstva preverjamo, ali je prisotna alela, ki je bila indentificirana pri očetu in alela, ki jo nosi mama. Verjetnost potrditve oz. ovržbe očetovstva narašča s številom analiziranih mikrosatelitov (Dovč, 1994). Na informativnost mikrosatelitov ima velik vpliv število alel za posamezen lokus.

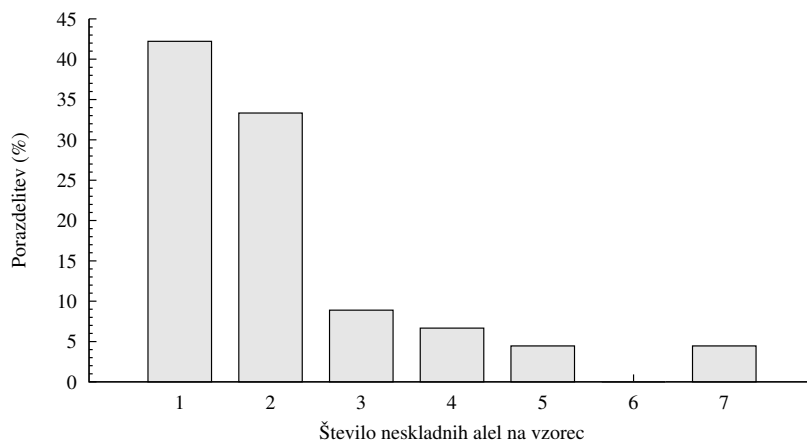
### 6.3 Material in metode

Genski test smo opravili na 86 vzorcih tkiv iz uhljev prašičev pasme krškopoljski prašič. Skupno smo opravili 1476 analiz (po posameznem osebkju in lokusu). Genske analize smo opravili v sodelovanju s Katedro za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo (Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani). Izračun frekvenc alel in heterozigotnost (opazovano, pričakovano ter nepristransko ocenjeno) smo opravili s pomočjo programa GENETIX (Belkhir in sod., 2004). Ocene heterozigotnosti in koeficienti inbridinga po lokusih so podani v poročilu genske pestrosti (Flisar in sod., 2009).

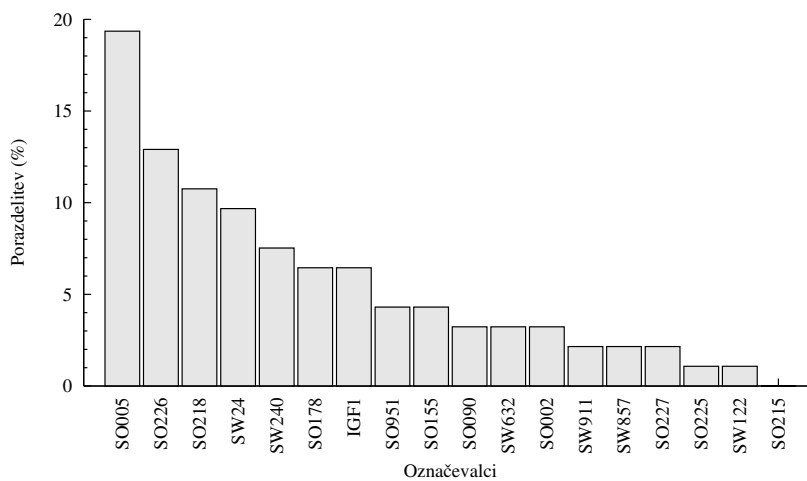
Za genotipizirane živali smo izpisali spol in poreklo (identifikacijsko številko matere in očeta). Poreklo smo sestavili na osnovi dokumentacije, ki jo vodi selekcijska služba. Neskladnost rodovniških podatkov z rezultati mikrosatelitnih analiz smo preverili z računalniškim programom Atlas (atlas Perez-Enciso in sod., 2005). Program nam omogoča preverjanje genotipov med starši in potomci, izpis predlaganih prednikov, slikovni prikaz rodovnika.

### 6.4 Rezultati

Podatke o poreklu zbiramo v okviru rejskega programa SloHibrid (centralna podatkovna zbirka PiggyBank). Informacije o poreklu smo primerjali s poreklom, ki smo ga določili z mikrosateliti. V 93.43 % analiz se je poreklo ujemalo. Pri 83 živalih smo našli različno število neskladij med alelami. Skupno število neskladij je bilo 97, kar od skupnega števila opravljenih analiz (1476) znaša 6.57 %. Izračunali smo delež neskladij med aleli na žival in na označevalec. Število neskladij je večje kot število napak pri odčitavanju dolžine alel, saj ima napačna alela za en osebek lahko za posledico večjega števila neskladij. Pri vseh potomcih, ki so prejeli od starša napačno določeno alelo, bomo ugotovili alelo, ki jo je starš tudi imel. Zato bo število neskladij večje, saj bomo neskladja ugotovili pri vseh potomcih. V primerjavi z ostalimi študijami majhnih populacij je delež neskladij majhen. Volčič (2004) navaja 9.1 % neskladnih genotipov osmih visoko polimorfnihih označevalcev v populaciji ovc jezersko-solčavske in oplemenjene jezersko-solčavske pasme.



Slika 3: Delež osebkov glede na število neskladnih označevalcev

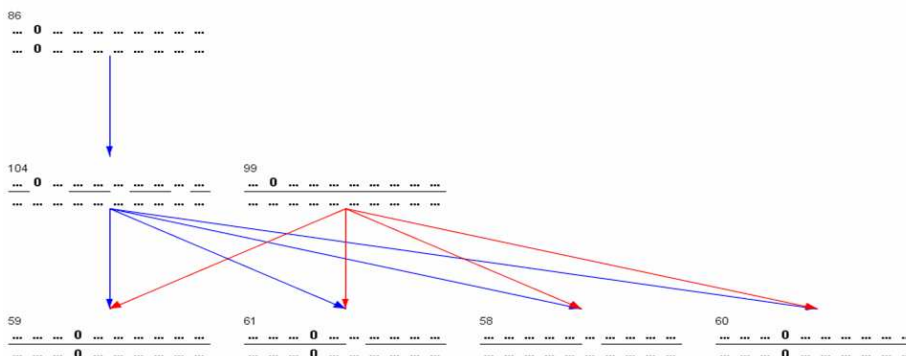


Slika 4: Delež označevalcev glede na število neskladnih alel

Delež osebkov pada s številom neskladnih genotipov označevalcev (slika 3). Delež osebkov z neskladjem enega do dveh označevalcev je znašal kar 75.5 %. Ker je bilo število geno-

tipiziranih označevalcev veliko (18), smo se osredotočili predvsem na podatke v poreklu osebkov, kjer je bilo število neskladnih označevalcev 3 ali več. Genotipiziranih lokusov je bilo v študiji genetske pestrosti veliko, zato je možnost neskladij vsaj ene alele večja kot pri manjšem številu genotipiziranih lokusov. Za izdelavo DNK profila pogosto uporabljamo okoli 10 označevalcev, saj nam zagotovijo zanesljivo analizo sorodstva.

Informativnost mikrosatelitnih lokusov je odvisna od števila mikrosatelitnih lokusov in variabilnost na teh lokusih. Za izdelavo DNK profila moramo izbrati informativne označevalce, pomembno pa je tudi zmanjšanje števila možnih napak na najmanjše možno. Visoko polimorfen označevalec naj bi imel delež heterozigotnosti nad 70 % (Ott, 1992). Lokusi, zajeti v tej študiji, ki so preseglji to mejo so: SO005, SO178, SW240, SW122, SW857 in SO155. Delež neskladij med smo prikazali tudi po označevalcih (slika 4). Največ neskladij smo zabeležili pri označevalcu SO005 (19.35 %), pri katerem smo ugotovili tudi največje število alel na lokus. Veliko neskladij smo našli tudi pri označevalcu SO226 (12.90 %). Velik delež neskladij pri enem označevalcu je lahko tudi posledica težkega odčitavanja dolžine alel zaradi specifičnih vzorcev označevalcev v programu naprave Abi Prism 3100. Pri prašičih je večina mikrosatelitov sekvenca ponovitev vzorca dveh baznih parov, kot npr. TA ali CT, zato je razlika med aleloma pogosto dva bazna para, kar je težko odčitati. Število alel na lokus je podano v prispevku Flisar in sod. (2009). V povprečju smo zabeležili 6.2 različnih dolžin alel na lokus, največ 11 pri SO005, SO215 pa je monomorfen.



Slika 5: Slikovni prikaz rodovnika za merjasca 104, ki ga za posamezno žival izriše Atlas

Program Atlas omogoča prikaz rodovnika, ki ga sestavi s pomočjo genotipov staršev in potomcev. Na sliki 5 smo prikazali shematski prikaz porekla za žival z identifikacijsko številko 104. Modre puščice nakazujejo, da ima merjasec 104 štiri potomce s svinjo, ki ima številko 99. Ker smo genotipizirali in določali lokuse tudi očetu merjasca 104, torej merjascu 86, je iz prikaza razvidno, da je 104 potomec živali 86. Materi merjasca 104 nismo vzeli vzorca.

## 6.5 Zaključki

Rezultati, ki smo jih prikazali, kažejo na neskladja med poreklom, ki je razvidno iz dokumentacije in poreklom na osnovi mikrosatelitnih označevalcev. Delež genotipov, ki niso združljivi med starši in potomci, znaša 6.57 %. V populaciji krškopoljskega prašiča torej prihaja do napak, predvsem moramo biti pozorni na živali, pri katerih se pojavi večje število neskladij. Vzroke neskladij je živalim, ki smo jih zajeli v analizo, težko določiti. Eden od možnih vzrokov so napake pri genotipizaciji, kar lahko ovržemo z večjim številom ponovitev. Vzroki so lahko tudi v pomanjkljivosti in nedoslednosti podatkov na poslanih dnevnikih. Pri reji prašičev je nujno dogodke beležiti sproti, saj se kaj rado zgodi, da kasneje zapišemo napačno identifikacijsko številko očeta. Ker pa je pravilno poreklo ključnega pomena v majhnih populacijah zaradi preprečevanja inbridinga, je dopolnitev in preveritev porekla s podatki iz molekularne genetike, kot npr. DNK profil, možnost, ki jo velja izkoristiti.