

## Ćwiczenie C04b

### Markery genetyczne

#### Markery genetyczne i ich zastosowania. Markery izoenzymatyczne. Markery DNA.

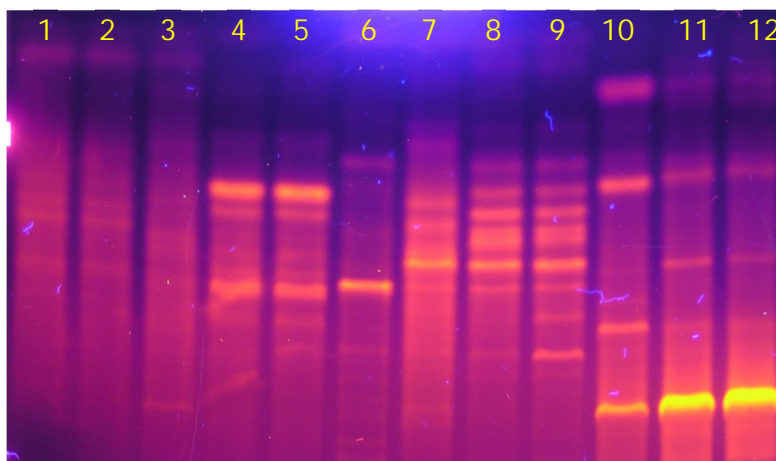
Prof. dr hab. Roman Zieliński

### 1. Markery genetyczne i ich zastosowania

#### ➔ 1.1. Pojęcie markera genetycznego

Marker genetyczny to gen lub sekwencja DNA o znanym położeniu na mapie genetycznej. Marker powinien być polimorficzny, uwarunkowany jednogenowo oraz nie powinna występować interakcja genotypowo-środowiskowa.<sup>1</sup>

Markery genetyczne od lat wykorzystywane są w badaniach biologicznych, medycznych, diagnostyce, hodowli. Początkowo markerami były łatwo rozróżnialne cechy fenotypowe, które wykorzystywano do konstrukcji map genetycznych, a także w hodowli. Wprowadzenie markerów izoenzymatycznych zrewolucjonizowało genetykę populacyjną umożliwiając analizę wielu osobników w krótkim czasie. Za sprawą kodominacji możliwe stało się przełożenie



Rys. 1.1. Identyfikacja gatunków pijawek przy pomocy markerów DNA opartych o bakteryjny gen *KatG* (markery B-SAP). Ścieżki: 1,2: *Theromyzom maculosum*, 3: *Theromyzom tessulatum*, 4, 5: *Helobdella stagnalis*, 6: *Aboglossiphonia pepilosa*, 7: *Placobdella costata*, 8, 9: *Hemiclepis marginata*, 10: *Glossiphonia concolor*, 11, 12: *Glossiphonia complanata*.

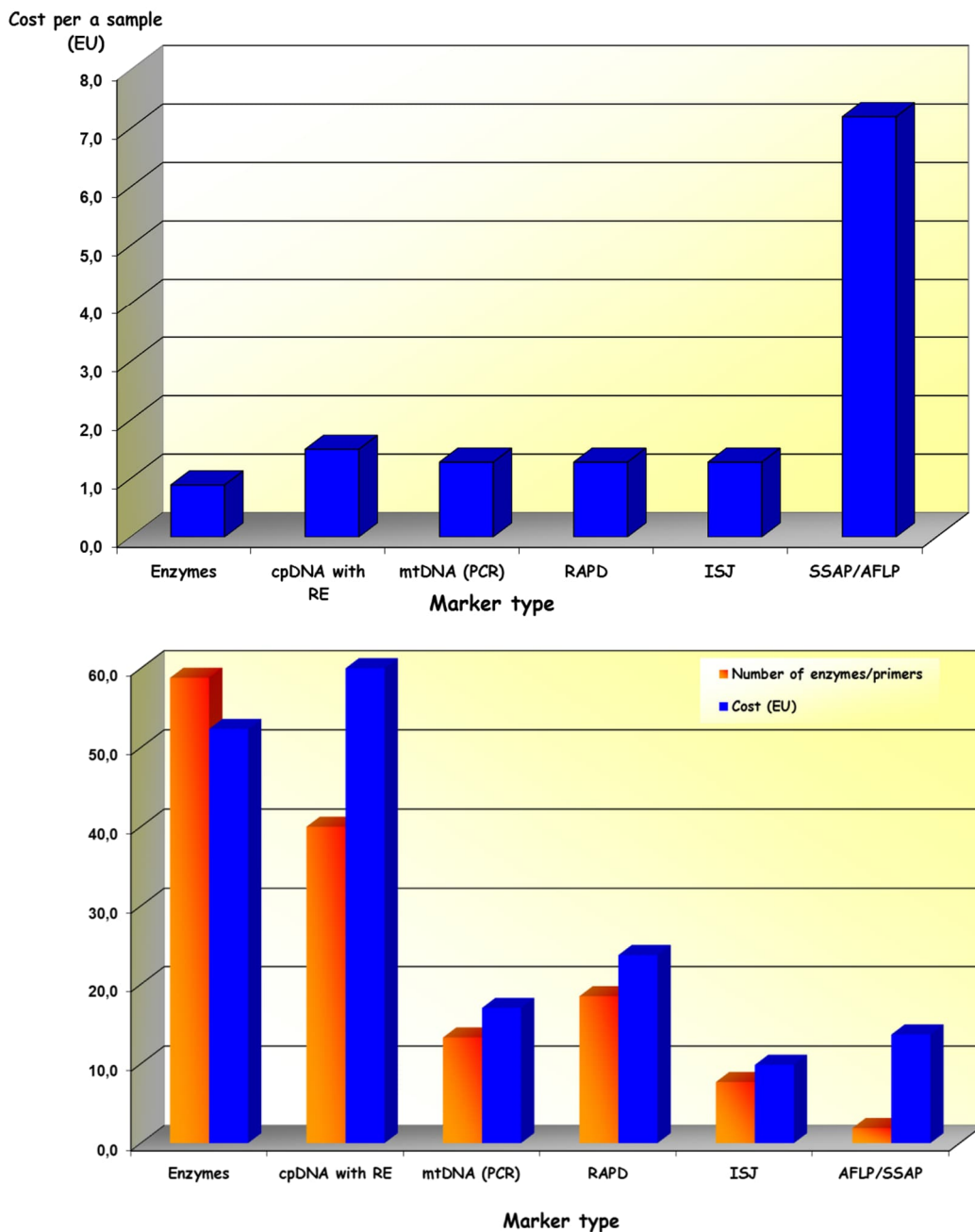
<sup>1</sup> Markerem genetycznym jest gen np. kodujący cechę fenotypową lub białko/enzym. Markerem genetycznym może być także sekwencja DNA. Definicje, które identyfikują marker genetyczny tylko z sekwencją DNA są błędne. Sekwencja DNA to jeden z typów markerów genetycznych.

obserwowanych fenotypów enzymatycznych na genotypy, co pozwoliło na ocenę częstości alleli w populacji oraz poziomu polimorfizmu. Niestety liczba markerów izoenzymatycznych jest zbyt mała, aby wykorzystać je do konstrukcji wysyconych map genetycznych. Dopiero analiza DNA, zwłaszcza z wykorzystaniem PCR dostarczyła niemalże nieograniczonej ilości markerów, które znalazły zastosowanie zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych, w tym w diagnostyce. Markery można wykorzystać do identyfikacji osobników w populacji, gatunków (tzw. markery gatunkowe), a także do szacowania ryzyka chorób genetycznych.

### 1.2. Podział markerów genetycznych:

- Markery morfologiczne, np., barwa kwiatu, barwa oczu, barwa ciała u *D. melanogaster*.
- Markery molekularne:
  - ▶ markery izoenzymatyczne, np., dehydrogenaza mleczanowa, aminopeptydaza, esteraza;
  - ▶ markery DNA, np., mikrosatelity (SSR), markery AFLP, STS.

Tabela 1. Charakterystyka markerów genetycznych		
Typ	Korzyści	Ograniczenia
Morfologiczne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Łatwa analiza</li> <li>• Niski koszt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominacja</li> <li>• Zależność od czynników środowiskowych</li> <li>• Ograniczona liczba</li> </ul>
Izoenzymatyczne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niski koszt</li> <li>• Kodominacja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zależność ekspresji od tkanki i stanu fizjologicznego</li> <li>• Ograniczona liczba</li> </ul>
Markery RFLP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nie wymagają wiedzy o sekwencji</li> <li>• Kodominacja</li> <li>• Brak wpływu środowiska</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kosztowne i czasochłonne</li> <li>• Duża ilość DNA o wysokiej jakości</li> <li>• Trudna automatyzacja</li> <li>• Użycie izotopów</li> </ul>
Markery SSR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kodominacja</li> <li>• Niewielka ilość DNA</li> <li>• Wysoki polimorfizm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konieczna znajomość sekwencji</li> <li>• Stosunkowo drogie</li> </ul>
Markery AFLP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niewielka ilość DNA</li> <li>• Wysoki polimorfizm</li> <li>• Nie wymagają wiedzy o sekwencji</li> <li>• Możliwa automatyzacja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominacja</li> <li>• Czasochłonne</li> <li>• Trudne technicznie</li> <li>• Kosztowne</li> </ul>
Markery SSAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niewielka ilość DNA</li> <li>• Wysoki polimorfizm</li> <li>• Możliwa automatyzacja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominacja</li> <li>• Wymagana wstępna wiedza o sekwencji</li> <li>• Trudne technicznie</li> <li>• Kosztowne</li> </ul>

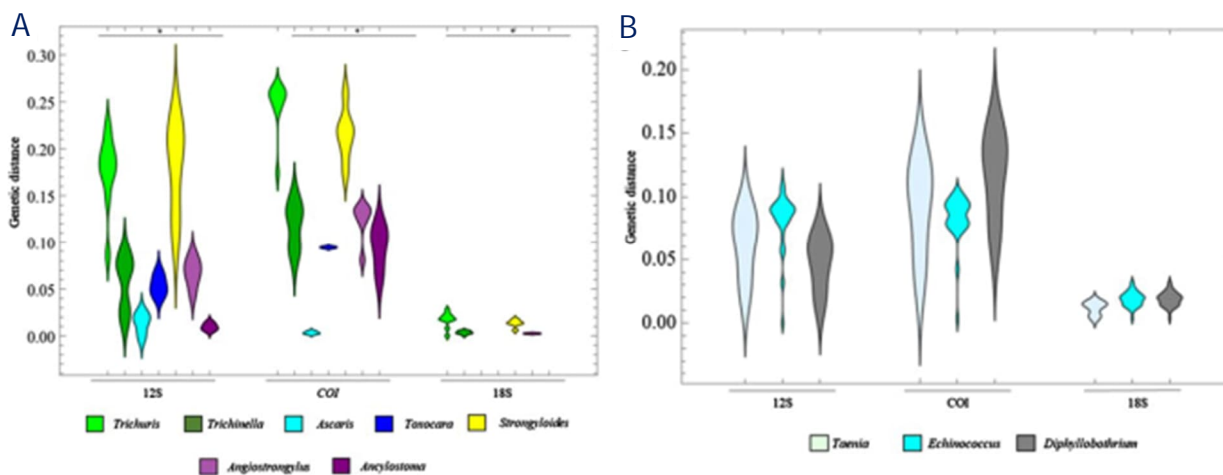


Rys. 1.2. Koszt analizy przy pomocy różnych typów markerów genetycznych. Góra: koszt analizy jednej próby. Dół: liczba enzymów/starterów jaką należy wykorzystać aby ujawnić 100 loci (lub prążków) oraz koszt analizy w przeliczeniu na 100 loci (lub prążków). Markery enzymatyczne wydają się najtańsze gdy analizujemy jedynie koszt próby. Jednocześnie są one jednymi z droższych, jeżeli oszacujemy koszt ujawnienia 100 loci. Biorąc pod uwagę liczbę loci, bardziej ekonomiczna jest analiza przy pomocy markerów AFLP/SSAP.

### 1.3. Zastosowania

#### 1.3.1. Identyfikacja gatunków pasożytniczych

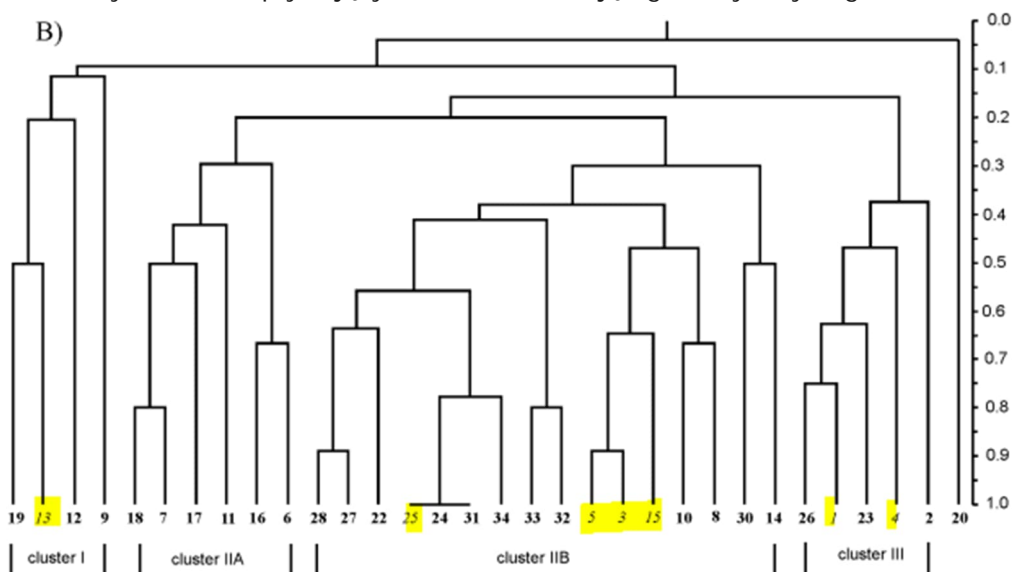
Najczęściej wykorzystuje się cztery klasy markerów: regiony ITS w genach dla rRNA, sekwencje genów dla rRNA, mt rRNA, geny mitochondrialne kodujące białka, w tym *COI* - gen dla podjednostki I oksydazy cytochromowej, *NADH* – gen dla NADH dehydrogenazy. Geny mitochondrialne wykazują większą zmienność sekwencji ze względu na szybszą ewolucję mtDNA. Wyższy stopień konserwacji genów jądrowych dla rRNA wykorzystywany jest w identyfikacji jednostek wyższego rzędu.



Rys. 1.3.1. Zakres odległości genetycznej pomiędzy gatunkami (a) i rodzajami (b) nicieni uzyskany przy pomocy mitochondrialnych genów dla rRNA (12S), genu mitochondrialnego *COI* oraz jądrowych genów dla rRNA (18S). Znaczny zakres zmienności 12S oraz COI wskazuje na użyteczność tych markerów dla identyfikacji gatunków (Chan et al., 2021)

#### 1.3.2. Epidemiologia *Mycobacterium tuberculosis*

W 2019 roku odnotowano 14 mln przypadków gruźlicy, zmarło 1,4 mln osób (śmiertelność 10%). Zrozumienie czynników wpływających na transmisję gruźlicy wymaga technik śledzenia



Rys. 1.3.2. Grupowanie szczepów *M. tuberculosis* otrzymanych od pacjentów z północno-wschodniej Polski na podstawie sekwencji IS6110. Na żółto zaznaczono szczepy lekooporne.

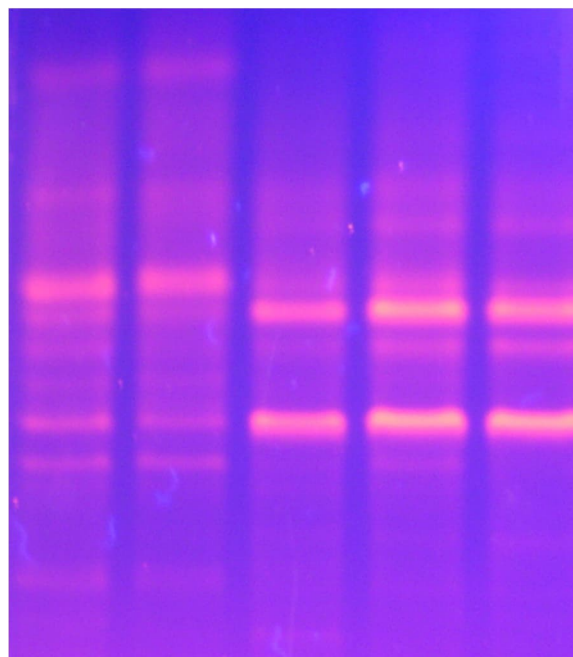
poszczególnych szczepów w różnych populacjach. Epidemiologia molekularna stanowi połączenie biologii molekularnej i epidemiologii. Obejmuje ona analizę rozprzestrzeniania się chorób poprzez identyfikację patogenów i ich zróżnicowania na poziomie molekularnym. Do najczęściej wykorzystywanych markerów należy element insercyjny IS6110 oraz gen *KatG*, który dodatkowo pozwala na różnicowanie szczepów wrażliwych i opornych na izoniazyd (najczęściej stosowany lek przeciwprątkowy).

### 1.3.3. Identyfikacja gatunków roślin na potrzeby kosmetyków

Pochodzenie materiału roślinnego jest istotne dla przemysłu kosmetycznego ze względu na regulacje prawne, etyczne, a także bezpieczeństwo kosmetyków. Zgodnie z Protokołem z Nagoja, rośliny wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym podlegają ścisłej kontroli. Celem jest przeciwdziałanie biopiractwu, a także pewność, że materiał wyjściowy nie jest skażony niepożądanymi związkami.

Identyfikacja gatunków na podstawie morfologii jest obarczona błędami związanymi z oznaczeniem oraz właściwościami danego gatunku. Gatunki taksonomiczne nie zawsze odpowiadają gatunkom biologicznym, co oznacza, że pomiędzy gatunkami taksonomicznymi nie zawsze występuje bariera reprodukcyjna. Gatunki takie łatwo się krzyżują, co skutkuje utratą cech istotnych dla przemysłu kosmetycznego. Markery DNA wykorzystywane są do identyfikacji roślin na poziomie gatunkowym i odmianowym of kilkudziesięciu lat:

- identyfikacja szafranu uprawnego (*Crocus sativus*);
- identyfikacja zanieczyszczeń kurkumy (*Curcuma longa*), gatunkiem dziko rosnącym (*Curcuma zedaria*);
- identyfikacja roślin GMO.



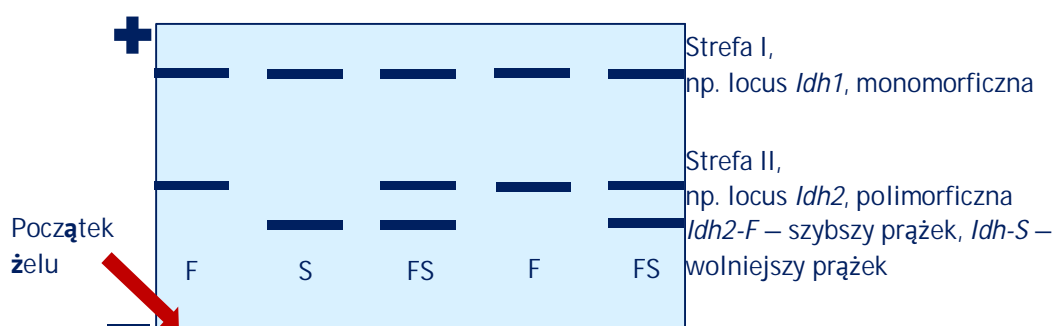
Rys. 1.3.3. Identyfikacja chronionego gatunku *Pinus x rhaetica* w TPN. 1-2: *Pinus sylvestris*, 3-5: *Pinus x rhaetica*.

## 2. Markery izoenzymatyczne

Izoenzymy to formy enzymu, które pełnią taką samą funkcję katalityczną, ale różnią się właściwościami w polu elektrycznym i/lub specyfiką tkankową.

### ➔ 2.1. Odczytywanie zymogramów

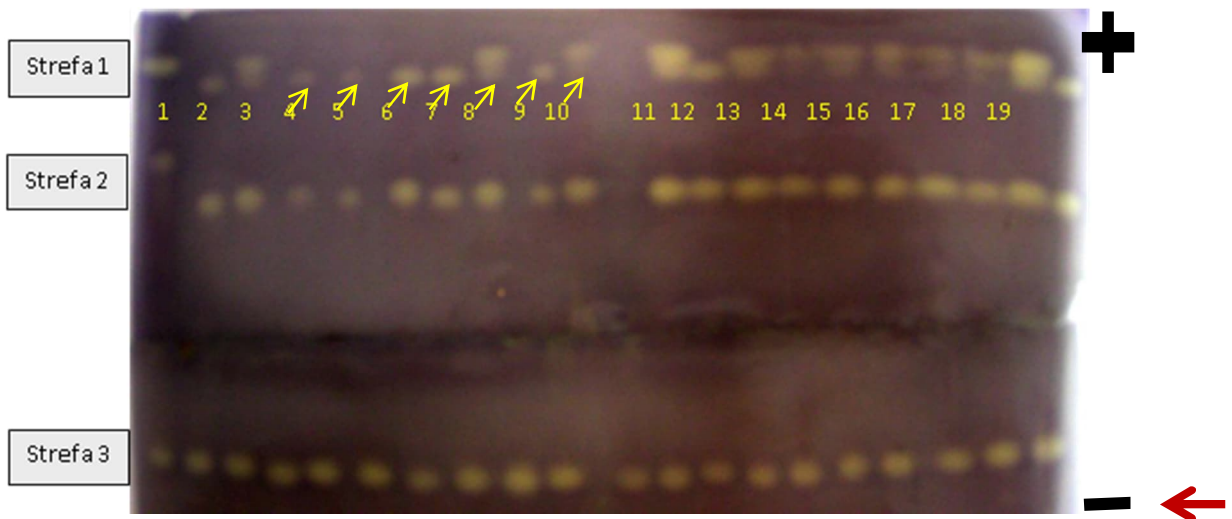
- Enzymy uwidaczniane są na żelu w postaci układu prążków, które mogą występować w kilku strefach. Każda strefa odpowiada jednemu locus. Zmienność w obrębie strefy obserwowana jest jako:
  - ▶ przesunięcie – prążek zmienia pozycję w stosunku do prążka obserwowanego w kontroli, prążek szybszy oznaczamy jako F (fast), prążek wolniejszy jako S (slow), przesunięcie prążka dziedziczy się w sposób kodominujący, czyli u heterozygoty widoczne są wszystkie prążki homozygot rodzicielskich; pozycję prążków oceniamy w stosunku do początku żelu – miejsca nałożenia prób;
  - ▶ null – brak aktywności obserwowany jako brak prążka na żelu, w tym przypadku obecność prążka jest dominująca w stosunku do jego braku;
- Zmienność form enzymu w obrębie strefy wynika z obecności różnych alleli w locus, które dają różny obraz prążków, formy enzymu wynikające z obecności różnych alleli w locus to allozymy.
- Poszczególne strefy odpowiadają izoenzymom kodowanym przez różne loci.
- Zymogram: obraz prążków na żelu.
- Monomer: enzym, który jest aktywny jako pojedyncza cząsteczka.
- Dimer: aktywny enzym składa się z dwóch cząsteczek:
  - ▶ homodimery zbudowane są z dwóch identycznych cząsteczek;
  - ▶ heterodimery zbudowane są z dwóch różnych cząsteczek, np. u heterozygoty.



Rys. 2.1.1. Schemat odczytu żelu przy założeniu, że enzym jest monomerem.



2.1.1. Na rysunku poniżej przedstawiono rozdział elektroforetyczny izoenzymów dysmutazy nadtlenkowej (SOD). Wiedząc, że aktywny enzym jest monomerym zinterpretuj uzyskany żel. Strzałka oznacza miejsce nałożenia prób. Proszę odczytu dokonać w komputerze



- Ile izoenzymów uwarunkowanych różnymi genami widoczne jest na żelu. Oznacz te geny za pomocą symbolu *Sod* i odpowiedniego numeru przyjmując 1 dla izoenzymów o największej ruchliwości. (1 punkt)
- Ile alleli możemy wyróżnić w każdej ze stref? (1 punkt)
- W której strefie obserwujemy allozymy? (1 punkt)
- Przyjmując oznaczenia A1 dla allele warunkującego enzym o wyższej ruchliwości i A2 dla allele warunkującego enzym o niższej ruchliwości podaj genotypy osobników 1–10. (2 punkty)

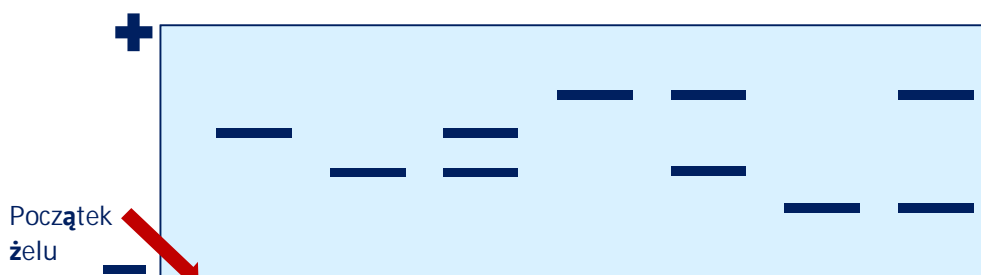
## 2.2. Liczba alleli w locus i dimery

Dla izoenzymów często obserwujemy allele wielokrotne, co oznacza, że w populacji jest trzy lub więcej alleli w locus. Allele te dają prążki o różnej ruchliwości. Wówczas oznaczamy je liczbami wskazującymi na ruchliwość mierzoną drogą przebytą od początku żelu, np. *ldh1-10*, *ldh1-20* itd. Zapis powyższy odczytujemy jako: locus *ldh1*, allel o ruchliwości 10 mm; locus *ldh1*, allel o ruchliwości 20 mm.



2.2.1. Na rysunku 2.1.2. przedstawiono schemat zymogramu dla locus *Mdh*. Aktywny enzym jest monomerym.

- Ile alleli obserwujemy w tym locus?
- Proszę oznaczyć na allele numerami, przyjmując numer 1 dla najszybszego allele i podać genotypy osobników obserwowanych na rys. 2.1.2. (2 punkty)



Rys. 2.1.2. Schemat odczytu żelu przy założeniu, że enzym jest monomerym.

### 2.2.2. Dimery

Dehydrogenaza cytrynianowa (*IDH*) u ssaków występuje w postaci kilku izoenzymów uwarunkowanych różnymi loci. *IDH1* funkcjonuje jako monomer, które szybko migruje w polu elektrycznym i na żelu znajduje się w pobliżu anody. *IDH1* występuje w postaci dwóch allozymów, formy szybszej A1 i wolniejszej, A2. *IDH2* funkcjonuje jako dimer. *IDH2* posiada ładunek dodatni, szybsza forma *IDH2* jest oznaczona jako B1 a wolniejsza jako B2.

- Proszę narysować zymogram, na którym będą widoczne wszystkie możliwe homozygoty w obu loci oraz heterozygota w obu loci.
- Jak odróżnić na żelu heterozygotę dla *IDH1* od heterozygoty dla *IDH2*?
- Z jaką częstością otrzymamy heterozygoty w obu loci jeżeli skrzyżujemy osobnika o genotypie A1A1B1B2 z osobnikiem A2A2B1B2?
- Z jaką częstością otrzymamy heterozygoty w obu loci jeżeli skrzyżujemy dwa osobniki o genotypie A1A2B2B2.
- Jak wyglądałyby wzory u homozygot w locus *IDH1* i heterozygoty w tym locus, gdyby dodatkowo powstawały 2 prążki w wyniku obróbki potranslacyjnej?

## 3. Enzymy restrykcyjne

### 3.1. Cięcie enzymami restrykcyjnymi wybranych sekwencji człowieka

Dehydrogenaza 6-fosfoglukonowa jest istotnym enzymem cyklu pentozowego. Brak tego enzymu u człowieka powoduje hemolizę. Izoenzymy są krótsze od wariantu podstawowego na skutek mutacji typu delecji/insercji, która przesuwaa ramkę odczytu.



#### 3.1.1. Proszę przeprowadzić analizę restrykcyjną genu kodującego 6-PGD.

- Proszę wejść na stronę NEB cutter: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
- W dużej białej ramce proszę wkleić sekwencję dostarczoną w pliku „Human 6PGD”.
- Pozostałe parametry proszę pozostawić bez zmian (minimum ORF length, NEB enzymes, standard sequences).
- Proszę wybrać „submit”.
- Otrzymamy schemat genu i miejsc restrykcyjnych wraz z nazwami enzymów.
- Proszę wybrać „Custom digest”

- Na liście, która się pojawi proszę wybrać *BsmI* i *MspI*.
- Proszę zaakceptować na dole strony „Digest”.



• Następnie korzystając z listy oraz wyników analizy proszę podać następujące informacje.

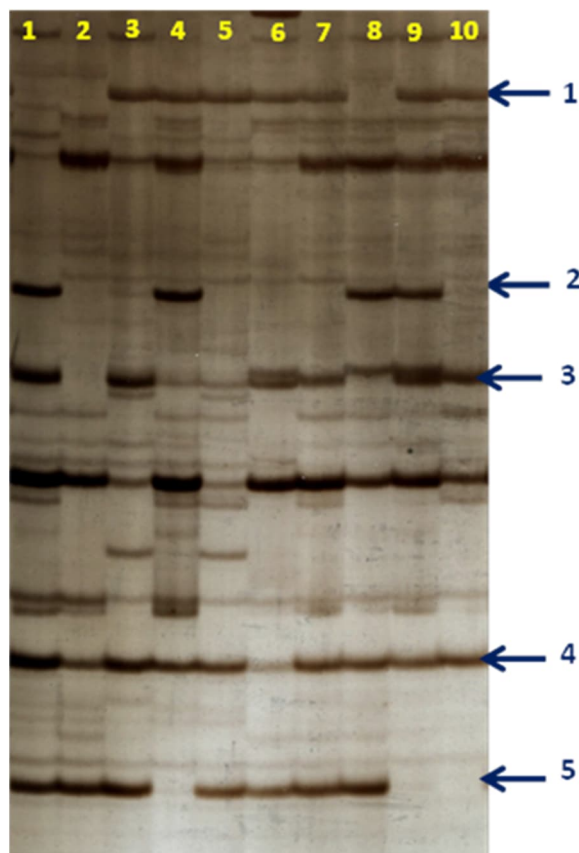
- A. Ile jest miejsc cięcia dla *BsmI*? Proszę podać pozycję cięcia, rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *BsmI*?
- B. Ile jest miejsc cięcia dla *MspI*? Proszę podać pozycję cięcia, rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *MspI*?
- C. Korzystając z pozycji „View gel”, proszę pokazać otrzymane fragmenty na 2% żelu agarozowym.
- D. Ile powstanie fragmentów jeżeli sekwencja genu 6PGD nie jest zmetylowana?
- E. Ile powstanie fragmentów jeżeli sekwencja genu 6PGD jest zmetylowana?
- F. Jaka jest długość fragmentów, które powstaną w wyniku przecięcia genu tylko przez *BsmI*?
- G. Ile jest i jak długie są fragmenty, które powstaną w wyniku przecięcia jednocześnie przez *MspI* i *BsmI*?

## 4. Markery SSAP

### 4.1. Określanie liczby miejsc insercji

Poniżej przedstawiono fragment żelu poliakrylamidowego pokazujący rozdział produktów reakcji SSAP przy użyciu startera komplementarnego do transpozonu CACTA u 10 osobników. Proszę na podstawie stref zaznaczonych strzałkami uzupełnić poniższą tabelę. Proszę odczytu dokonać w komputerze.

Osobnik	Liczba insercji transpozonu CACTA
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	
8.	
9.	
10.	
Średnia liczba insercji w badanej grupie osobników.	
Nr strefy monomorficznej	

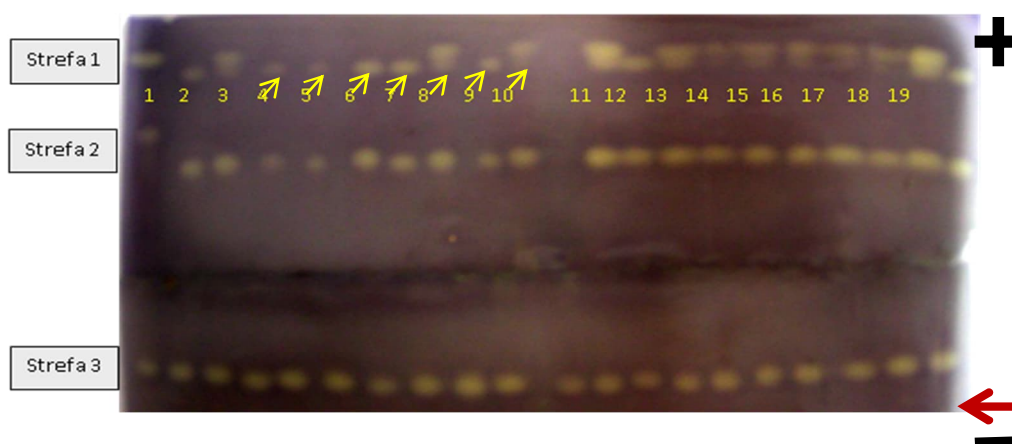


## Odpowiedzi

### 2. Markery izoenzymatyczne

#### 2.1 Odczytywanie zymogramów

2.1.1. Na rysunku poniżej przedstawiono rozdział elektroforetyczny izoenzymów dysmutazy nadtlenkowej (SOD). Wiedząc, że aktywny enzym jest monomerym zinterpretuj uzyskany żel. Strzałka oznacza miejsce nałożenia prób.



A. Ile izoenzymów uwarunkowanych różnymi genami widoczne jest na żelu. Oznacz te geny za pomocą symbolu *Sod* i odpowiedniego numeru przyjmując 1 dla izoenzymów o największej ruchliwości.

• 3 izoenzymy uwarunkowane różnymi genami.

- ▶ Strefa 1: *Sod1*,
- ▶ Strefa 2: *Sod2*
- ▶ Strefa 3: *Sod3*

Enzymy o najwyższej ruchliwości znajdują się najdalej od miejsca nałożenia zaznaczonego strzałką. Wszystkie pokazane izoenzymy mają ładunek ujemny i dlatego przemieszczają się w kierunku elektrody dodatniej (anody)

B. Ile alleli możemy wyróżnić w każdej ze stref?

- Strefa 1: 2 allele (jedyna, w której jest obserwowany polimorfizm)
- Strefa 2: 1 allel
- Strefa 3: 1 allel

C. W której strefie obserwujemy allozymy?

- W strefie 1, różne prążki oznaczają izoenzymy warunkowane allelami jednego genu, są to więc allozymy.

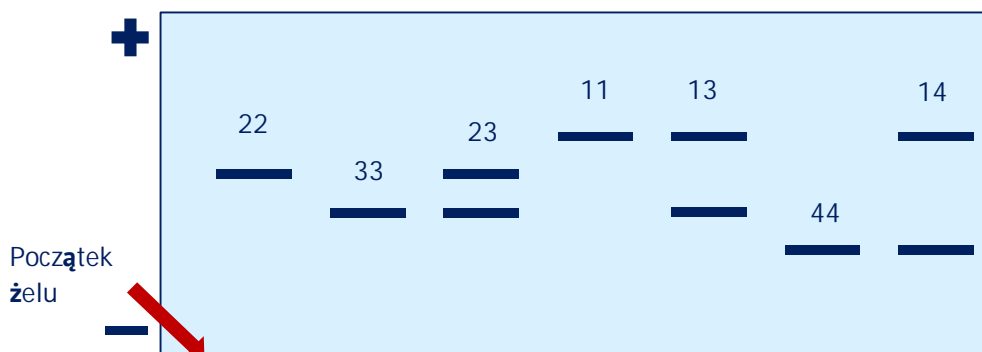
D. Przyjmując oznaczenia A1 dla allele warunkującego enzym o wyższej ruchliwości i A2 dla allele warunkującego enzym o niższej ruchliwości podaj genotypy osobników 1–10.

- A1A1: osobniki 1 i 10
- A2A2: osobniki 2, 4, 5, 6, 7, 9
- A1A2: osobniki 3 i 8

2.2. Liczba alleli w locus i dimery

2.2.1. Na rysunku 2.1.2. przedstawiono schemat zymogramu dla locus *Mdh*. Aktywny enzym jest monomerem

A. Ile alleli obserwujemy w tym locus?  
 B. Proszę oznaczyć na allele numerami, przyjmując numer 1 dla najszybszego allele i podać genotypy osobników obserwowanych na rys. 2.1.2. (2 punkty)

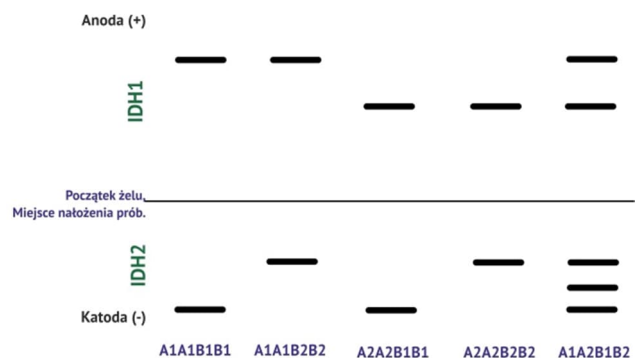


Rys. 2.1.2. Schemat odczytu żelu przy założeniu, że enzym jest monomerem.

2.2.2. Dehydrogenaza cytrynianowa (IDH) u ssaków występuje w postaci kilku izoenzymów uwarunkowanych różnymi loci. IDH1 funkcjonuje jako monomer, które szybko migruje w polu elektrycznym i na żelu znajduje się w pobliżu anody. IDH1 występuje w postaci dwóch allozymów, formy szybszej A1 i wolniejszej, A2. IDH2 funkcjonuje jako dimer. IDH2 posiada ładunek dodatni, szybsza forma IDH2 jest oznaczona jako B1 a wolniejsza jako B2.

A. Proszę narysować zymogram, na którym będą widoczne wszystkie możliwe homozygoty w obu loci oraz heterozygota w obu loci.  
 B. Jak odróżnić na żelu heterozygotę dla *IDH1* od heterozygoty dla *IDH2*?

- *IDH1* migruje w części anodowej a *IDH2* w części katodowej.
- Heterozygoty w locus *IDH1* mają 2 prążki, a w locus *IDH2* — 3 prążki.



C. Z jaką częstością otrzymamy heterozygoty w obu loci jeżeli skrzyżujemy osobnika o genotypie A1A1B1B2 z osobnikiem A2A2B1B2?

• 1/2 = 50%

Gamety	A2B1	A2B2
A1B1	A1A2 B1B1	A1A2 B1B2
A1B2	A1A2 B1B2	A1A2 B2B2

D. Z jaką częstością otrzymamy heterozygoty w obu loci jeżeli skrzyżujemy dwa osobniki o genotypie A1A2B2B2.

• 0%

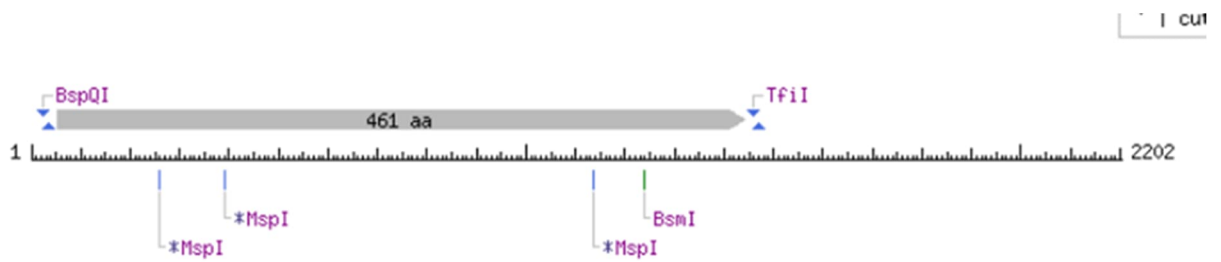
• Oba osobniki są homozygotami w locus *IDH2*, dlatego nie ma możliwości uzyskania heterozygoty w obu loci.

E. Jak wyglądałyby wzory u homozygot w locus *IDH1* i heterozygoty w tym locus, gdyby dodatkowo powstawały 2 prążki w wyniku obróbki potranslacyjnej?



### 3. Enzymy restrykcyjne

#### 3.1. Cięcie enzymami restrykcyjnymi



##### 3.1.1. Dehydrogenaza 6-fosfoglukonowa

A. Ile jest miejsc cięcia dla *BsmI*? Proszę podać pozycję cięcia, rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *BsmI*?

- 1 miejsce cięcia
- pozycja 1238 bp
- Rozpoznaje GAATG<sub>▲</sub>CN<sub>▼</sub> (odczytujemy na liście enzymów)
- Lepkie końce (wynika z zapisu i oznaczenia strzałkami, które pokazują sposób przecięcia).

B. Ile jest miejsc cięcia dla *MspI*? Proszę podać pozycję cięcia, rozpoznawaną sekwencję oraz jaki typ końców powstaje w wyniku cięcia *MspI*?

- 3 miejsca cięcia
- Pozycje: 258 bp; 393 bp; 1138 bp
- Rozpoznaje C<sub>▲</sub>CG<sub>▼</sub>G (odczytujemy na liście enzymów)
- Lepkie końce

C. Korzystając z pozycji „View gel”, proszę pokazać otrzymane fragmenty na 2% żelu agarozowym.

D. Ile powstanie fragmentów jeżeli sekwencja genu 6PGD nie jest zmetylowana?

5

E. Ile powstanie fragmentów jeżeli sekwencja genu 6PGD jest zmetylowana?

2

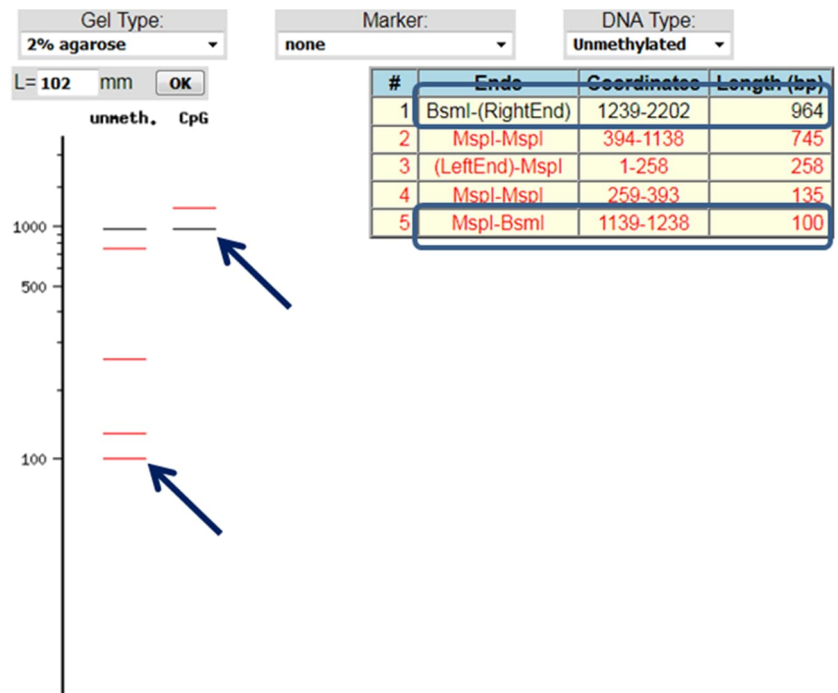
F. Jaka jest długość fragmentów, które powstaną w wyniku przecięcia genu tylko przez *BsmI*?

964 i 1238.

*BsmI* tnie tylko raz zatem powstaną dwa fragmenty. Jeden (od końca 3' nici sensownej) jest opisany w tabeli. Ma on długość 964 bp. Cały gen ma długość 2202 bp, zatem drugi fragment ma długość 2202-964, co daje 1238. Można to także odczytać z tabeli. Skoro fragment od 3' zaczyna się od 1239 bp to pozostaje 1238 bp.

G. Ile jest i jak długie są fragmenty, które powstaną w wyniku przecięcia jednocześnie przez *MspI* i *BsmI*

Jeden fragment o długości 100 bp.



## 4. Markery SSAP

### 4.1. Określanie liczby miejsc insercji

Poniżej przedstawiono fragment żelu poliakrylamidowego pokazujący rozdział produktów reakcji SSAP przy użyciu startera komplementarnego do transpozonu CACTA u 10 osobników. Proszę na podstawie stref zaznaczonych strzałkami uzupełnić poniższą tabelę.

Osobnik	Liczba insercji transpozonu CACTA
1	4
2.	2
3.	4
4.	4
5.	4
6.	4
7.	4
8.	4
9.	4
10.	3
Średnia liczba insercji u w badanej grupie osobników.	3,7
Nr strefy monomorficznej	4 (u wszystkich osobników jest prążek)

