

Méneskönyvi és molekuláris genetikai egybeesések a gidrán kancacsaládjainál az mtDNS alapján

Szigosz Nikolett – Kusza Szilvia – Jávör András – Mihók Sándor

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen
sziszkosz@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A gidrán hagyományos magyarországi lófajta többször is a kihalás szélére került. A többszöri palacknyakhatás ellenére, genetikai diverzitásának egy részét megőrizte, fogathajtásban és díjugratásban is igen komoly eredményeket ér el. Hazánkban kívül csak Bulgária és Románia rendelkezik még kisebb gidrán állománnyal, ezért a világörökség szempontjából is fontos fajtatisztán történő fenntartása. Tanulmányunk alapján a gidrán kancák mitokondriális DNS szakaszainak vizsgálata adja, kihasználva a mtDNS speciális öröklődési sajátosságait. Vizsgálataink során 251 kancától vett szőrminta vizsgálatát végeztük el, melyek különböző magyarországi ménesekből származtak, és az általunk vizsgált szakaszok a citokróm b és a D-loop régióban találhatók. A beérkező minták közül a végső analízis során a citokróm b régió esetén 251, a D-loop régió esetén pedig 246 minta került értékelésre. A vizsgált két régió eltérő mutációs rátával rendelkezik, ennek megfelelően különbözik a haplotípusok száma és a mintáink haplotípusokba történő besorolása is. A két régió haplotípusai nagyrészt megfeleltethetők a méneskönyvi kancacsaládokkal, esetleges méneskönyvi elírásról csak pár esetben beszélhetünk. Fontos lehet azoknak a kancacsaládoknak a megőrzése, tenyésztésben tartása, melyek molekuláris genetikailag is igen diverznek mutatkoztak a többi kancacsaládhoz viszonyítva, viszont a kihalás szélére kerültek.

Kulcsszavak: mitokondriális DNS, citokróm b, D-loop, gidrán, kancacsalád, méneskönyv

SUMMARY

The traditional Hungarian horse breed, Gidran has been close to the edge of extinction several times. Despite the multiple bottleneck effect, the breed has retained a part of its genetic variability, and performed prominently in carriage driving and show-jumping competitions. Maintaining of the Gidran breed is important in the point of view of world heritage; because besides Hungary, smaller Gidran populations exist only in Bulgaria and Romania. Taking advantage of the special inheritance features of mtDNA, our study focused on two mtDNA regions of Gidran mares. Altogether, 251 hair samples from various Hungarian studs were examined. The analysis was successfully made in case of 251 samples of the cytochrome b and in case of 246 samples of D-loop regions. Because of the distinct mutation rates of the two mtDNA markers, the number of the haplotypes and the way of grouping samples into haplotypes was different. Our key finding was that most haplotypes may be compatible with mare families of the stud book; however incidental mistakes in stud book have occurred only in a few cases. Our results indicate the importance of the preservation and breeding those mare families, which are molecular genetically more diverse than the others, and are in the edge of extinction.

Keywords: mitochondrial DNA, cytochrome b, D-loop, Gidran, mare family, studbook

BEVEZETÉS

A gidrán lófajtának különleges genetikai értéke miatt fontos a tenyésztésben tartása, létszámadata miatt génmegőrzésre szorul, hazai kitenyésztése folytán védelmet érdemel. A gidrán a tudatos tenyésztői munkának köszönhetően Mezőhegyesen alakult ki, s sportteljesítményét tekintve immár 150 éve az élvonalon van. Az eredeti gidrán állományt tizenhat őspanyára lehetett visszavezetni, de az idők során sajnos több család is kihalt. A román megszállást követően hatalmas veszteség érte a fajtát, az akkori leltár szerinti majdnem száz gidrán kancából mindössze tizenhárom egyed maradt meg (Mihók et al., 2003). Később sikerült a kancalétszámot növelni, viszont a II. világháború után csak huszonnyolc menekített kanca érkezett vissza Németországból. Sajnos elmondható, hogy a gidrán európai viszonylatban az egyik leghányatottabb sorsú háttas félvér populáció (Mihók, 2002). A FAO DAD-IS (Domestic Animal Diversity Information System database of the FAO; internet cím: <http://dad.fao.org/>) adatai alapján a magyarországi gidrán állomány 298 kancá-

val és 21 ménnel rendelkezik. Hazánkban kívül Bulgáriában és Romániában találhatók még kisebb gidrán populációk (kevesebb, mint 50 ló). A romániai és bulgáriai populációk státusza kritikusnak mondható, a hazai populációk státusza sem ad megnyugvási okot, a veszélyeztetett kategóriába tartozik (DAD-IS, 2014). Az előbb leírtakból egyértelműen következik, hogy a gidrán fajta genetikai diverzitásának a megőrzése a jelenleg aktív tenyésztőközösségnek és kutatói állománynak egyaránt fontos feladata. 1992-től a Kisbéri-félvér és Gidrán Lótenyésztő Országos Egyesület a fajta fenntartója és a nemesítője, így szervezett keretek között folyik a tenyésztés.

Napjainkban egyre inkább jellemző, hogy a különböző nemzetek törekednek a saját, őshonosnak számító fajtáik megőrzésére, aminek során a tudomány gyakorlatra értett eredményeit igyekeznek beépíteni a tenyésztési programjaikba. Gyakoriak a genetikai diverzitásuk megtartására, valamint növelésére irányuló kutatások, sokszor a molekuláris genetikai eszköztárhoz nyúlnak segítségül a megvalósítás folyamatában (Yang et al., 2002, Lopes et al., 2005). Egyes gének, szakaszok mar-

kerként szolgálhatnak, amelyek segíthetnek a különböző fajták genetikai diverzitásának feltérképezésében. A diverzitással kapcsolatos vizsgálatok során leggyakrabban használt markerek közé a DNS mikroszatellitek, SNP-k (Single Nucleotide Polimorphism), Y-kromoszóma és mitokondriális DNS szakaszok tartoznak. A mitokondriális szekvenciák az evolúciós és filogenetikai kutatásokhoz alapot kínáló szakaszokat jelentenek, mint például a citokróm b (CYTB), citokróm c oxidáz (COI/II), riboszómális RNS gének (16S, 5S, 28S) és a fehérjét nem kódoló hipervariábilis (D-loop) régió (Bruford et al., 2003).

Tanulmányunk alapját a gidrán kancák mitokondriális DNS szakaszainak a vizsgálata adja, kihasználva a mtDNS speciális öröklődési sajátosságait. A mtDNS ugyanis több tulajdonságát tekintve is különbözik a genomiális DNS-től. Anyai ágon öröklődik és a hibajavítás hiánya következtében polimorfizmusok gyakrabban alakulnak ki. Az általunk vizsgált szakaszok között a legfontosabb különbség, hogy a citokróm b kódol fehérjét, míg a D-loop-ról nem íródik át fehérje, ennek köszönhetően nincs rajta szelekciós nyomás, hipervariábilis. A mtDNS citokróm b génjének különböző szakaszait több tanulmány is használta már filogenetikai analízisekhez (Esposti et al., 1993), ugyanakkor a D-loop régió vizsgálata is igen gyakori különböző diverzitás vizsgálatokban (Jansen et al., 2002, Cieslak et al., 2010, Priskin et al., 2010). A szekven-

ciák közötti különbségek egyik legszemléletesebb ábrázolási módja a törzsfakészítés, mely során a genetikailag egymáshoz leginkább hasonló egyedek azonos, míg a különböző egyedek távolabbi ágakra kerülnek egymástól a vizsgált szakasz tükrében.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálataink során több mint 250 kancától vett szőrminta vizsgálatát végeztük el, amelyek különböző magyarországi ménesekből származtak. A vizsgálathoz a törzskönyvi nyilvántartás szerinti valamennyi, ma létező kancacsaládból sikerült a minták beszerzése, amik az alábbiak: borodi 1-es, borodi 2-es, borodi 3-as, borodi 5-ös, borodi 6-os, borodi 7-es, borodi 14-es, borodi 17-es, borodi 18-as, borodi 19-es, mezőhegyesi 1-es, mezőhegyesi 2-es, mezőhegyesi 3-as, mezőhegyesi 4-es, mezőhegyesi 5-ös, mezőhegyesi 6-os, mezőhegyesi 7-es, mezőhegyesi 8-as, mezőhegyesi 9-es, mezőhegyesi 11-es, mezőhegyesi 12-es, mezőhegyesi 13-as, mezőhegyesi 14-es, mezőhegyesi 15-ös, mezőhegyesi 17-es, mezőhegyesi 18-as, mezőhegyesi 19-es, mezőhegyesi 21-es, népies 9-es, népies 22-es, népies 23-as. A beérkező minták közül a végső analízis során a citokróm b régió vizsgálatánál 251, a D-loop régió pedig 246 minta került értékelésre. A DNS izolálása szőrhagymából történt (FAO/IAEA, 2004). A PCR során a következő primerpárokat alkalmaztuk:

- D-loop régióban: 15444F 5'-ACCATCAACACCCAAAGCTG-3'
15742R 5'-GCTGATTTCCTCGCGGCTTGGTG-3' (Priskin et al., 2010);
- Cyt-b régióban: 14115F5'-TTCCACGTGGAATCTAACC-3'
15206R5'-ACTAACATGAATCGGCGGAC-3' (Sziszkosz et al., 2013).

A minták szekvenálását az Eurofins MWG Operon és a Macrogen Europe cégek végezték. Az eredmények bioinformatikai értékelése során a leolvasott nukleotidok helyességét a Codon Code Aligner v. 4.2.7 (Codon Code Corporation, 2014) programmal ellenőriztük. A szekvenciákat a ClustalW (Larkin et al., 2007) programmal hasonlítottuk össze, a statisztikai analízisek során a jModelTest (Posada, 2008), MEGA6 (Tamura et al., 2013) és a dnap5 (Rozas et al., 2009) programcsomagokkal számoltunk. A filogenetikai fák készítése során a Maximum-Likelihood, „legnagyobb valószínűség” módszert alkalmaztunk (Hasegawa et al., 1985). Kitegintésként (outgroup-ként) mindkét esetben a számar (*E. asinus*, NC001788) szekvenciáját használtuk. Az illesztés után a végső statisztikai értékelés során a citokróm b régió belül 684 nukleotidnak, a D-loop régió belül pedig 197 nukleotidnak a vizsgálata valósult meg.

EREDMÉNYEK

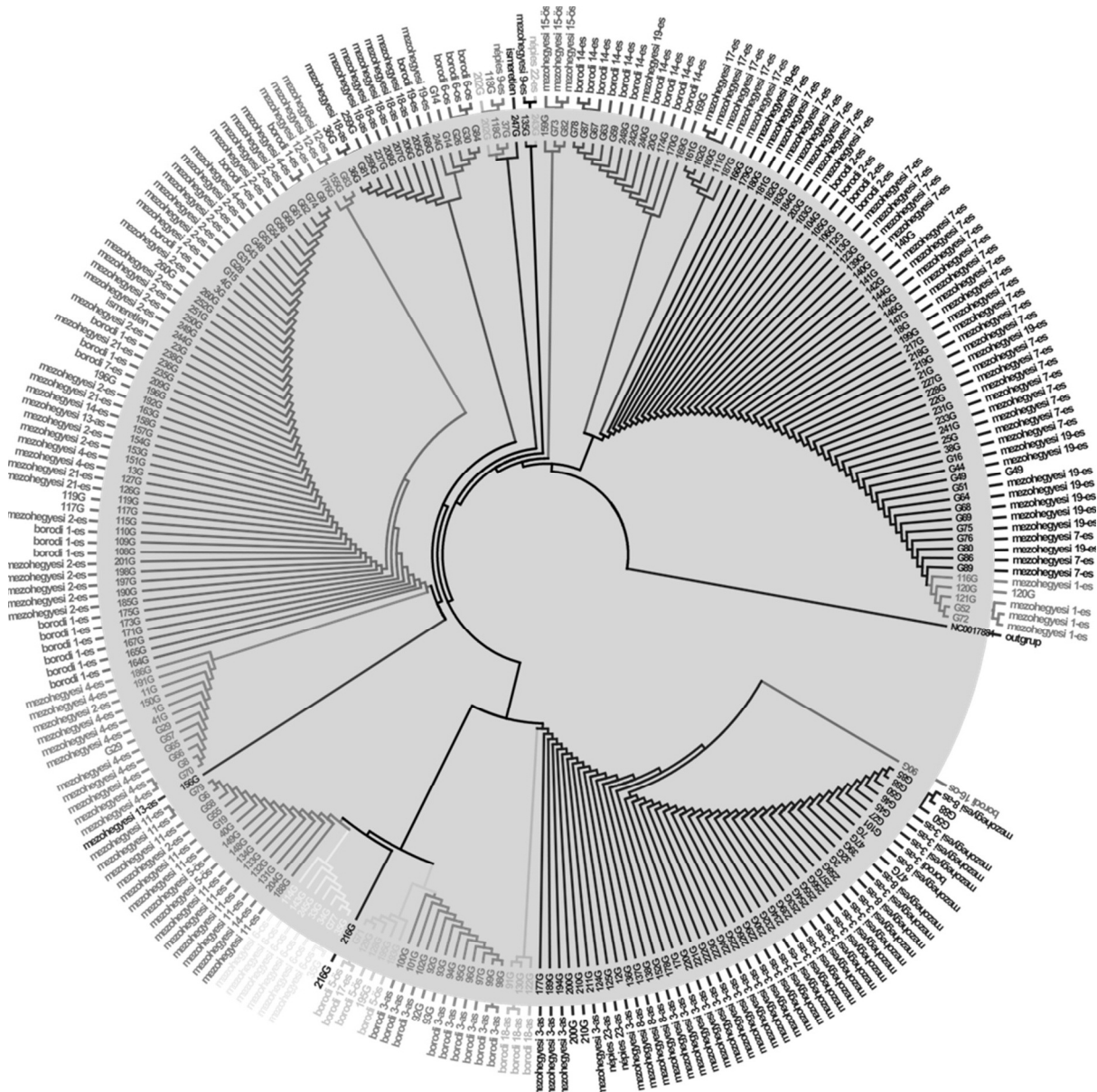
A szekvenciák ellenőrzése és korrigálása után a filogenetikai törzsfa elkészítése következett. Mindkét régióra külön-külön készítettünk filogenetikai törzsfákat, az első ábrán a citokróm b régió vizsgálata által kapott eredmények láthatóak (1. ábra), míg a második ábra a D-loop régió analízise által kapott eredményeket tartalmazza (2. ábra). A nagy egyedszámmra való tekintettel a törzsfa kör alakban került ábrázolásra és a jobb

átláthatóság kedvéért a szürke különböző árnyalatai jelzik a különböző haplotípusokat. Mindkét filogenetikai fa bemutatásánál a belső körben találhatóak a minták egyedi azonosítói, mely alapján a kancák egyértelműen beazonosíthatóak, a méneskönyvekben visszakereshetőek. A külső köríven az egyed törzskönyvi nyilvántartás szerinti kancacsaládba sorolása látható.

A vizsgált régiók eltérő mutációs rátával rendelkeznek, ennek megfelelően különbözik a haplotípusok száma és a mintáink haplotípusokba történő besorolása is. A citokróm b szakasz vizsgálata során a 31 törzskönyv szerinti kancacsaláddal szemben 24 haplotípust sikerült elkülöníteni. Egyes haplotípusok esetében mindkét régió vizsgálatánál azonos eredményeket kaptunk, ugyanazok az egyedek kerültek egy-egy haplocsoportba, viszont egyes kancák esetében nem így történt.

Összesen 163 minta esetében mondhatjuk el, hogy a kapott eredmények megegyeznek a méneskönyvi adatokkal. Ezekben az esetekben vagy az egyik vagy mindkét régiónál a haplotípusokba sorolás azonos volt a méneskönyv szerinti kancacsaládokkal, tehát az egy haplotípusba sorolt egyedek egy kancacsaládba tartoznak. Az összes egyedszámot tekintve 11 esetben mondhatjuk azt, hogy olyan haplocsoportba kerültek, melyek más kancacsaládokra jellemzőek, így valamilyen eltérésről lehet szó. A tizenegyből két minta esetében mindkét marker vizsgálata ezt támasztja alá.

1. ábra: A 251 gidrán kanca citokróm b régiójának analizisével elkészített cirkuláris filogenetikai törzsfá



Megjegyzés: Maximum Likelihood fa elkészítése során az úgynevezett bootstrap, azaz megismételhetőségi érték 1000 volt, kitekintésként a számár (*Equus asinus*) szekvenciáját használtuk

Figure 1: Circular shape phylogenetic tree based on Cyt-b regions of 251 Gidran mares

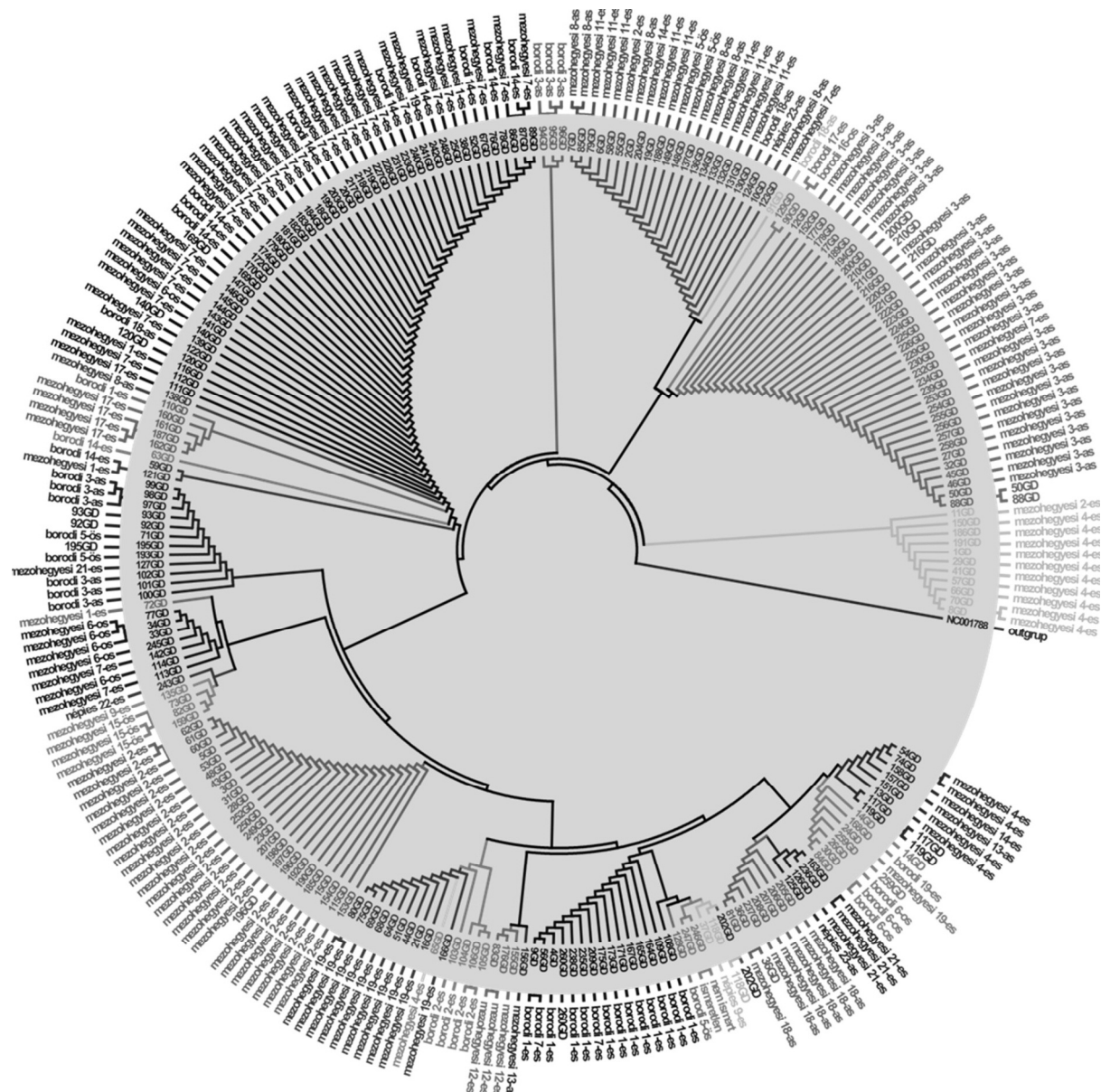
Note: 1000 bootstrap replications were used for the preparation of Maximum Likelihood tree, DNA sequence of donkey (*Equus asinus*) was used as an outgroup

Az egyiknél (saját azonosítóm szerint: 11-es, ménes-könyvi azonosító: GI01040Gi21) mindkét marker szerint a mezőhegyesi 4-es kancacsaldba tartozik, ugyanakkor a méneskönyv szerint a mezőhegyesi 2-esbe. A másíknál a méneskönyv szerint a mezőhegyesi 19-es kancacsaldba tartozik (egyéni azonosító szerint: 24-es, a méneskönyvi azonosító: GI98045Gi11), míg eredményeink alapján mindkét marker szerint a borodi 6-os kancacsaldba tartozó egyedekkel alkot egy haplotípust.

A D-loop régió vizsgálatakor több haplotípust állapítottunk meg, 32 haplotípus különült el. Ennek köszönhetően olyan kancacsaldok is feltérképezhetőkké váltak, melyeket a citokróm b régió vizsgálatával nem sikerült elkülönítenünk. Ilyenek voltak a mezőhegyesi

2-es, mezőhegyesi 3-as, mezőhegyesi 19-es, borodi 2-es, viszont egyes kancacsaldok vizsgálatánál a citokróm b régió mutatkozott informatívabbnak, így a borodi 14-es, a borodi 18-as, a mezőhegyesi 1-es kancacsaldok (1. ábra) egyedei külön haplotípusba rendeződnek. A borodi 1-es és a borodi 7-es kancacsaldok egyedei a D-loop régió vizsgálata alapján ugyanabba a haplotípusba tartoznak, elkülönítésük a citokróm b régió alapján sem sikerült. Az alábbi kancacsaldok elkülönítése nem sikerült egyik régió esetében sem: mezőhegyesi 7-es, 8-as, 11-es, 13-as, 14-es, 5-ös, illetve a borodi 18-as és a népies 23-as. Érdekes, hogy a mezőhegyesi 4-es kancacsald egyedeire mindkét markernél két különböző haplotípus is jellemző volt.

2. ábra: A 246 gidrán kanca D-loop régiójának analizisével elkészített cirkuláris filogenetikai törzsfá



Megjegyzés: Maximum Likelihood fa elkészítése során az úgynevezett bootstrap, azaz megismételhetőségi érték 1000 volt, kitekintésként a számár (*Equus asinus*) szekvenciáját használtuk

Figure 2: Circular shape phylogenetic tree based on D-loop regions of 246 Gidran mares

Note: 1000 bootstrap replications were used for the preparation of Maximum Likelihood tree, DNA sequence of donkey (*Equus asinus*) was used as an outgroup

KÖVETKEZTETÉSEK

A gidrán fajta életben tartása elkötelezett génmegőrzési munka eredménye, a genetikai sokszínűségének a megőrzése, illetve növelése további cél lehet, nem csak a tenyésztők számára. Jelen tanulmányban a méneskönyvi adatokat és a molekuláris genetikai egybeeséseket hasonlítottuk össze a gidrán lovak kancacsaládjainál a mtDNS két különböző szakasza alapján. Eddigi vizsgálataink szerint elmondható, hogy több marker használata megbízhatóbb eredményhez vezethet a kancacsaládok ellenőrzése során. Az általunk vizsgált két régió haplotípusai nagyrészt megfeleltethetők a méneskönyvi kancacsaládokkal, esetleges méneskönyvi elírás-

ról csak 2–3 esetben beszélhetünk. Azokban az esetekben, ahol a két régió vizsgálata eltérő eredményekhez vezetett további analízisek javasoltak. Fontos lehet azoknak a kancacsaládoknak a megőrzése, melyek molekuláris genetikailag is igen diverznek mutatkoztak a többi kancacsaládhoz viszonyítva, ugyanakkor már csak pár kanca van a tenyésztők kezén.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnénk köszönetet mondani a Kisbéri és Gidrán Lótenyésztő Országos Egyesületnek a tanulmány finanszírozásáért és a minták rendelkezésre bocsátásáért.

IRODALOM

- Apostolidis, A. P.–Alifakiotis, T.–Mamuris, Z.–Karkavelia, E. (2000): PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA cytochrome b gene among Greek horse breeds. *Italian Journal of Zoology*. 67. 2: 159–162.
- Bruford, M. W.–Bradley, D. G.–Luikart, G. (2003): DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 4. 11: 900–910.
- Cieslak, M.–Pruvost, M.–Benecke, N.–Hofreiter, M.–Morales, A.–Reissmann, M.–Ludwig, A. (2010): Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLoS One* 5. 12. e15311.
- CodonCode Aligner v. 4.2.7–CodonCode Corporation (2014): www.codoncode.com
- DAD-IS (Domestic Animal Diversity Information System database of the FAO (2014): <http://www.fao.org/dadis/>
- Esposti, M. D.–De Vries, S.–Crimi, M.–Ghelli, A.–Patarnello, T.–Meyer, A. (1993): Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1143. 3: 243–271.
- FAO/IAEA (2004): Agriculture Biotechnology Laboratory. Handbook of Laboratory Exercises. IAEA Laboratories. Seibersdorf. Austria.
- Hasegawa, M.–Kishino, H.–Yano, T. A. (1985): Dating of the human–ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22. 2: 160–174.
- Jansen, T.–Forster, P.–Levine, M. A.–Oelke, H.–Hurles, M.–Renfrew, C.–Weber, J.–Olek, K. (2002): Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99. 16: 10905–10910.
- Larkin, M. A.–Blackshields, G.–Brown, N.–Chenna, R.–McGettigan, P. A.–McWilliam, H.–Valentin, F.–Wallace, I. M.–Wilm, A.–Lopez, R. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23. 21: 2947–2948.
- Lopes, M. S.–Mendonça, D.–Cymbron, T.–Valera, M.–Da Costa-Ferreira, J.–Da Câmara Machado, A. (2005): The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. *Animal Genetics*. 36. 3: 196–202.
- Mihók S. (2002): Az elkötelezett génmegőrzés eredménye: újra él a gidrán. [In: Jávor A.–Mihók S. (szerk.) *Génmegőrzés – Kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről.*] Lícium–Art Könyvkiadó és Kereskedelmi Kft. Debrecen. 7–22.
- Mihók S.–Pataki B. (szerk.) (2003): *Melegvérű lófajták. Lófajták. Mezőgazda Kiadó. Budapest.* 16–78.
- Posada, D. (2008): jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25. 7: 1253–1256.
- Priskin, K.–Szabó, K.–Tomory, G.–Bogácsi–Szabó, E.–Csányi, B.–Eördögh, R.–Downes, C. S.–Raskó, I. (2010): Mitochondrial sequence variation in ancient horses from the Carpathian Basin and possible modern relatives. *Genetica*. 138: 211–218.
- Rozas, J.–Librado, P.–Sánchez-DelBarrio, J.–Messeguer, X.–Rozas, R. (2009): DnaSP v5. *DNA*. 9. 10. 16.
- Sziszkosz N.–Kusza Sz.–Jávor A.–Mihók S. (2014): A hucul kanca-családok azonosítása mtDNS markerrel. *Acta Agraria Debreceniensis*. 57: 75–79.
- Tamura, K.–Stecher, G.–Peterson, D.–Filipski, A.–Kumar, S. (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30. 12: 2725–2729.
- Yang, Y. H.–Kim, K. I.–Cothran, E. G.–Flannery, A. R. (2002): Genetic Diversity of Cheju Horses (*Equus caballus*) Determined by Using Mitochondrial DNA D-loop Polymorphism. *Biochemical Genetics*. 40. 5–6: 175–186.
- Yue, X. P.–Qin, F.–Campana, M. G.–Liu, D. H.–Mao, C. C.–Wang, X. B.–Lan, X. Y.–Chen, H.–Lei, C. Z. (2012): Characterization of cytochrome b diversity in Chinese domestic horses. *Animal Genetics*. 43. 5: 624–626.

