

A gidrán fajta genetikai változatosságának jellemzése mitokondriális DNS polimorfizmusokkal

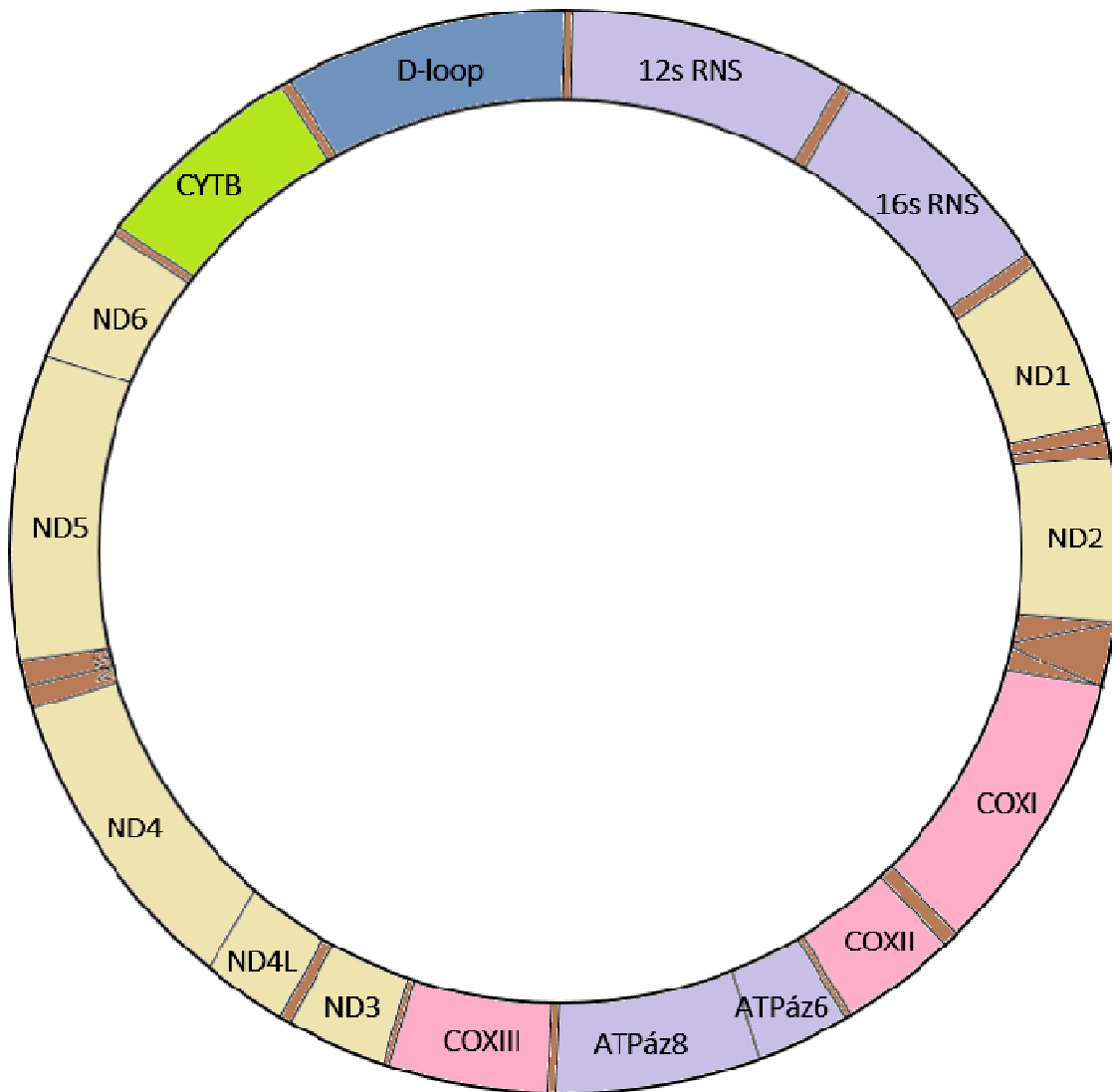
***Kusza Szilvia – Sziszkosz Nikolett – Mihók Sándor,
(Debreceni Egyetem Állattenyésztéstani Tanszék)***

A bármilyen okból kevés egyedszámra apadt, vagy innét felszaporított fajták tenyésztésének egyik kiemelkedő feladata a megmaradt genetikai diverzitás őrzése. A gidrán európai viszonylatban is az egyik leghányatottabb sorsú háta hasznosítású anglo-arab jellegű félvér populáció, s jelenlegi aktív tenyésztőközösségnek és a kutatói állománynak fontos feladata a genetikai diverzitásának fenntartása. A tudomány fejlődésével lehetőség nyílik a molekuláris genetika eszköztárához nyúlni, egyes gének, szakaszok markerként szolgálhatnak, segíthetnek a különböző fajták genetikai változatosságának 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, mint amilyen a citokróm-b (CYTB), citokróm-c oxidáz (COI/II), riboszómális RNS gének (16S, 5S, 28S) és a fehérjét nem kódoló hipervariábilis (D-loop) régió, többek között a filogenetikai kutatásokhoz alapot kínáló szakaszokat jelentenek. Így a hazai génmegőrzési gyakorlatban az ilyen kutatásoknak pótolhatatlan jelentősége van.

Az élő szervezet sejtjeiben több száz mitokondrium található, és ezek a mitokondriumok az energia-anyagcseréért felelős sejtszervecskék. A sok energiát felhasználó sejtekben különösen sok mitokondrium található, ennél fogva a sejt metabolikus tevékenysége és a mitokondriumok nagyobb száma között határozott összefüggés áll fenn. A mitokondriumoknak a sejtmagtól teljesen független genetikai rendszerük van, a sejtmag genetikai információját egészíti ki. A citoplazmában foglalnak helyet, összterfogatuk a citoplazmának akár a 25 százalékát is elérheti. Osztódásuk szorosan nem kapcsolható a sejtmag osztódásához, öröklésmenetükben a magi örökléstől különböző törvényszerűségek érvényesülnek. Az önálló genommal rendelkező mitokondrium az emlősökben kettős szálú, kör alakú DNS-molekula (1. ábra).

1. ábra

A mitokondriális DNS cirkuláris köre



A hímivarsejt mitokondriális DNS-e (mtDNS) nem egészíti ki a sejtmag genetikai információját, mivel a hímivarsejteknek csak a feji része jut be a petesejtbe, a mitokondriumokat tartalmazó nyaki része a petesejten kívül marad és degradálódik. Ilyenformán az ivadékok mtDNS-üket a petesejt citoplazmájából öröklik. A mtDNS ezen ok alapján ad lehetőséget az anyai származás ellenőrzésére.

Az mtDNS nem tartalmaz úgynevezett DNS-intronokat (nem kódoló szakaszokat), vagy csak nagyon rövideket és nincs rekombinációja sem. Normál esetben egy sejten belül a mtDNS-ek nagy része azonos. Az mtDNS a belső membrán belső felszínéhez közel helyeződik, ahol az oxigén szabadgyökök nagyobb mennyiségben képződnek, ezáltal sokkal sérülékenyebb és mutációk kialakulására érzékenyebb, mint a magi DNS. (A sejtmagi DNS-nél kb. tízszer nagyobb a mutációs ráta.)

Az mtDNS-nek nincs hibajavító rendszere sem, vagyis a kialakult hibák (mutációk) nem kerülnek kijavításra, ennél fogva az igazolható mutációs ráta nagyobb, mint a sejtmaggenom esetében.

A hibajavító rendszer hiánya miatt a hibák (örökletes változások) az évszázadok során felhalmozódnak, nyomon követhetők. A nagy evolúciós rátán túl jellemző még az mtDNS-re a magas szintű polimorfizmus. Ennek és az anyai öröklődésnek köszönhetően az mtDNS az anyai származás tisztázásának és a genom fejlődése modellezésének igen kiváló és biztos módszere. A nagyobb mutációs ráta alatt azt kell értenünk, hogy azok 80100 generációnként várhatók, ennél fogva az általában 1020 generációt átfogó vizsgálatok folyamán nem kell új mutációra számítani. Ennek köszönhetően az mtDNS a fajta történetével és a fajta populációgenetikai szerkezetével kapcsolatban is érdekes ismeretet nyújt.

A ló 16 660 bázispár hosszúságú, genetikai információval telt mtDNS-e lehetőséget nyújt genetikailag roppant hasonló csoportok (egy haplocsoportba tartozó egyedek) kialakítására, kancacsoportok egymástól való elkülönítésére, a törzskönyvi nyilvántartás szerint nem oda való beékelődése, ennél fogva a törzskönyvvvezetési hibák feltételezésére is. Az mtDNS anyai ágon történő öröklődése útbaigazítást ad a géntartalék-megőrzésbe vont egyedek anyai alapítók szerinti csoportjai helyállóságáról. Az mtDNS-analízis képes cáfolatot adni a római mondásra is, ami szerint „Mater semper certe est”, az anya mindig biztos.

Márpedig, hogy léteznek hibásan rögzített törzskönyvi adatok, azt kellően bizonyítja egy hasonló nemzetközi vizsgálat a lipicai lófajtában, ami kimutatta, hogy minden 70 törzskönyvi bejegyzés átlagosan egy hibával járt. Például a teljes európai lipicai populációt legalább 8 százalékban érintik a hibás anyai származások.

A származásanalízis során a törzskönyvi adatoknak és a molekuláris genetikai adatoknak egyaránt van előnyük és hátrányuk. A törzskönyvi adatok az emberi mulasztásokra nagyon érzékenyek, a molekuláris-genetikai adatok pedig a mutációs ráta függvényei. Miután általában 80100 nemzedékenként várható érdemleges örökletes változás, így a molekuláris genetikai eredmények alapján kevesebb tévedés adódik az anyai oldalon történő származásmegállapításban, mint a törzskönyvi adatok alapján végzett analízisben. A két módszer együttes alkalmazása teszi lehetővé, hogy a módszerek hátrányainak feloldásával aránylag jó áttekintést lehessen kapni az állományokról.

Hangsúlyozni szeretnénk, hogy vizsgálatunk célja a genetikai különbségek felismerése, ami hasznos lehet a fajtavédelmi tervek megvalósításához, genetikai státuszuk megértéséhez, de nyilván a génmegőrzési munka további folytatásához is nagy segítséget ad. Miután a fajta tenyésztéstörténetét sok-sok szenvedés tarkítja, köztük számtalan ménesáttelepítés és -létesítés, egyedek kényszerű immigrációja, könnyen előfordulhatnak a törzskönyvvvezetés során ki nem mutatott vagy ki nem mutatható rokonkapcsolatok, vagy éppen azok hiánya. Ezeknek a vizsgálatoknak célja fényt deríteni arra is, vajon a ma önállóan mondott és elfogadott kancacsalladok molekuláris-genetikai értelemben valóban azok-e, kell-e valamelyiket megfeszített munkával fenntartani, vagy beolvasztható-e egy másikba, mert a vizsgálatok arra utalnak!

Az 1. ábrán bemutatott, genetikai információval teli, 16 660 bázispár hosszúságú, kettős szálú, kör alakú mtDNS molekula minden tekintetben kétségtelen bizonyosságú eredményt csak teljes szekvencia-sorrendjének meghatározása esetén adna. Az esetek nagy részében erre a roppant időigényű és irreálisan költségemésztő vizsgálatra csak a legjobb anyagi forrással rendelkező genetikai laboratóriumokban szokott sor kerülni. Általában a mitokondriális DNS-nek egy kb. 1000 bázispárú (esetenként hosszabb) szakaszát vizsgálják részletesen, de az automatizált szekvenálás során a szekvencia két végénél 100100 bázispárnyi szekvencia értelmezhetlenné válik. Értelmezhető eredményt mintegy 750 bázispár ad.

A közleményben ismertetett eredmények a citokróm-b és a D-loop régió vizsgálatán alapulnak. A citokróm-b régió kitűnően alkalmazható filogenetikai vizsgálatokban, annak kiváló jelzője. A régió 1350 bázispár hosszúságú, igen gyakran alkalmazott vizsgálati hely a filogenetikai elemzésekhez. A D-loop régió a DNS cirkuláris körnek leginkább polimorf szakasza, ennél fogva haplotípusok elkülönítésére különösen alkalmas. Vizsgálata is igen gyakori különböző diverzitásvizsgálatokban. Fontos különbség a két régió között, hogy a citokróm-b kódol fehérjét, míg a D-loop-ról nem íródik át fehérje, ennek köszönhetően nincs rajta szelekciós nyomás, hipervariábilis. A végső statisztikai értékelés során a citokróm-b régióban 684 nukleotidnak, a D-loop régióban 197 nukleotidnak a vizsgálata valósult meg.

A törzskönyvi nyilvántartás szerinti valamennyi ma létező kancacsaládból mintákat vizsgáltunk. Néhány alkalmatlan minta kizárásával a végső elemzés során a citokróm-b régió vizsgálatánál 251, a D-loop régiónál pedig 246 mintát értékeltünk. A 31 törzskönyv szerinti kancacsaláddal szemben citokróm-b szakasz vizsgálata során 24, a lényegesen változatosabb D-loop régió vizsgálatakor 32 haplotípust sikerült elkülöníteni. Egyes haplotípusok esetében mindkét régió vizsgálatánál azonos az eredmény, ugyanazok az egyedek kerültek egy-egy haplocsoportba. Az mtDNS-régiók vizsgálatával 163 minta (163 kanca) esetében a kapott eredmények megegyeznek a méneskönyvi adatokkal, mert vagy az egyik vagy mindkét régiónál a haplotípusokba sorolás megegyezett a méneskönyv szerinti kancacsaládokkal. (Egy-egy haplotípus egy-egy kancacsaládot feltételez.)

A két régióval való vizsgálat és összevetés rendkívül fontosnak bizonyult, mert a D-loop régió képes volt jól elkülöníteni a mezőhegyesi 2-es, a mezőhegyesi 3-as, a mezőhegyesi 19-es, és a borodi 2-es kancacsaládot. Meglepő, szakmailag roppant érdekes, hogy a borodi 1-es és a borodi 7-es kancacsalád egyedei a D-loop régió vizsgálata alapján ugyanabba a haplotípusba tartoznak, elkülönítésük a citokróm-b régió alapján sem sikerült. Kellő óvatossággal, de azt állíthatjuk, hogy esetükben nem kettő, hanem egy kancacsaláddal állunk szemben. A törzskönyvi nyilvántartás szerint a borodi 7-es pillanatnyilag kifejezetten veszélyeztetett kancacsalád, mindössze két élő tenyészkancája van. A pekingi olimpiára (military szakágban) minősült egyedek évek óta képtelenség termékenyíteni, a másik, fenotípus-tulajdonságában és ismert teljesítményében kedvezőtlenebb, szaporodásbiológiai szempontból rendben van. A borodi 1-es kancacsalád rendkívül népes. A jelenleg kettő családnak tekintett alapító ugyanazon ménesből, Sütvényből került Borodpusztára, majd Marócpusztára.

A citokróm-b régió a borodi 14-es, a borodi 18-as és a mezőhegyesi 1-es kancacsalád elkülönítésében volt segítségre. Újra bebizonyosodott, hogy némely esetben akár kettőnél több régió vizsgálata is indokolt. Több marker használata megbízhatóbb eredményhez vezethet a kancacsaládok ellenőrzése során.

A lipicai lófajta mtDNS-vizsgálata esetén kapott 8 százalékos „hibás” származással szemben a gidrán esetében mindössze 4,4 százalékban tételezhető fel a törzskönyvvezetés pontatlansága, fordulhatott elő tévedés a származásvezetésben. Pillanatnyilag mintegy háromtucatnyi azoknak a mintáknak a száma, amelyek további vizsgálatot igényelnek, és a jelenlegi eredmények alapján minősítésük tévedésre adhat okot.

A szekvenciák közötti különbségek egyik legszemléletesebb ábrázolási módja a törzsfakészítés. Ezeket a fákat úgy készíti el a bioinformatikai program, hogy a vizsgált szakaszokat azonosságuk, illetve különbözőségük alapján veti össze. A szakaszokban azonos nukleotidokkal rendelkező egyedek egy, a különböző nukleotidokkal rendelkezők másik csoportba, haplocsoportba kerülnek. Ennek megfelelően a genetikailag egymáshoz leginkább

hasonlító egyedek azonos, míg a különböző egyedek távolabbi ágakra kerülnek egymástól a vizsgált szakasz tükrében. A citokróm-b régióra elkészült filogenetikai törzsfát a 2. *ábra*, a D-loop régióra elkészültet a 3. *ábra* szemlélteti. A nagy egyedszámra való tekintettel a két törzsfát kör alakban ábrázoljuk és a kedvezőbb szemléltetőség érdekében más-más színek jelzik a különböző haplotípusokat. A bemutatott filogenetikai törzsfák belső körén a méneskönyvi kancabesorolást egyértelműen lehetővé tevő egyedi azonosítók, külső körívén az egyed törzskönyvi nyilvántartás szerinti kancacsaládba sorolása látható.

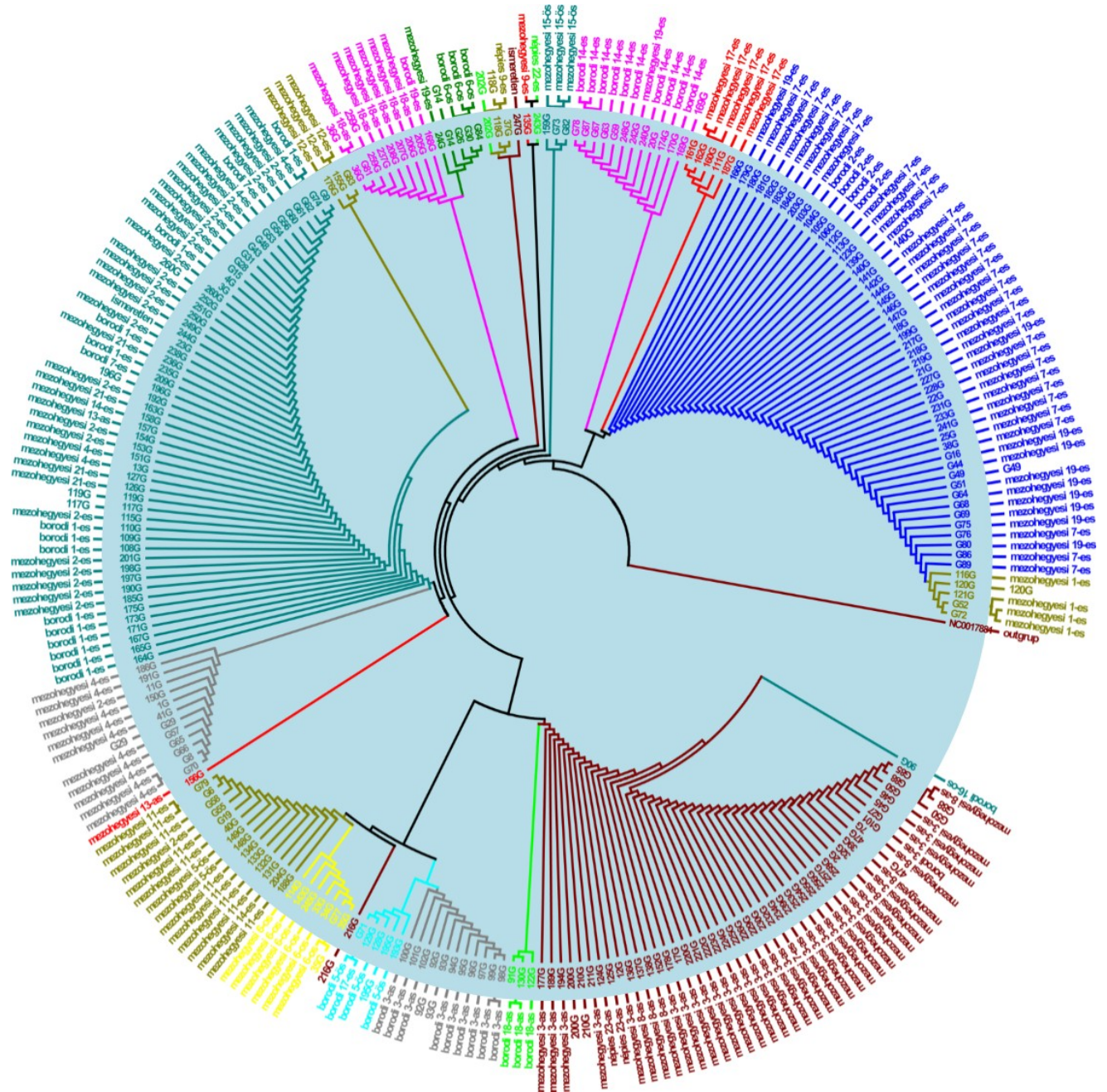
Érdekes jelenséget tárt elénk a mezőhegyesi 4-es kancacsalád vizsgálata. A vizsgált szakaszok nukleotidjainak összehasonlítása a kancacsaládon belül két alcsoportot körvonalaz. A kancacsalád 1788-al kezdődő leszármazási ága közel száz év után kettényílt, mindkét ág jelentősen bokrosodott, szinte elkülönült, amit alátámasztott, illetve megjelenített a mtDNS-vizsgálat is. Génmegőrzés szempontjából fontos lehet az alcsoportok külön kezelése, szinte két családként tekinteni rá és mindkét bokorból való egyedek tenyésztésbe állításával az örökítő anyag továbbadásáról gondoskodni. Így válhat lehetővé a családban felhalmozott örökítő anyag megőrzése, a diverzitás további évszázadokra való fenntartása.

A jövőbeni fajtafenntartás sikere szempontjából kifejezetten örömteli, hogy a molekuláris genetikai vizsgálat szerint a feltételezettnél sokkal több kancacsalád mutatkozott igen diverznek. Ez abban mutatkozott meg, hogy a törzskönyv szerinti kancacsaládba tartozáson túl különböző haplocsoportokba is besorolhatók voltak. Némelyiknek a kevés élő egyedszám ellenére a teljes genetikai diverzitás elvesztése nélkül is sikeres lehet a felszaporítása. Ez a következő évek génmegőrzésének fontos feladata. Ilyen kancacsalád a mezőhegyesi 1-es, a mezőhegyesi 6-os, a mezőhegyesi 12-es, a mezőhegyesi 13-as, a mezőhegyesi 15-ös, a borodi 2-es, a borodi 6-os, és népies 22-es. Bár elég diverznek mutatkozott a mezőhegyesi 9-es kancacsalád is, sikeres felszaporítása óriási tenyésztői feladat lesz, hiszen egyetlen idetartozó kanca él egész Európában. Igaz, sikerült magyar tulajdonba megszerezni.

Az is kétségtelen, hogy csak akkor lesz a génmentésnek sikere, ha minél többen átérzik ennek a szükségességét, e szellemiséggel azonosulni tudnak, és a kislétszámú kancacsaládok legalább két tenyésztetben előfordulnak, ott rendszeresen szaporodnak.

2. ábra

A citokróm-b régió alapján elkészült filogenetikai törzsfa



3. ábra

A D-loop régió alapján elkészült filogenetikai törzsfa

