

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 11

Issue 2

Gödöllő
2015



A MAGYAR CIGÁJA BEHELYEZÉSE AZ EURÓPAI JUHOK KÖZÉ AZ ANYAI EREDET SZERINT (mtDNA CR)

Annus Kata¹, Kovács Endre¹, Sáfár László², Gáspárdy András¹

¹ Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, 1078 Budapest, István u. 2.

² Magyar Juh- és Kecsketenyésztők Szövetsége, 1134 Budapest, Lőportár u. 16.

annus.kata@aotk.szie.hu

Összefoglalás

A cigája régi őshonos juhajtánk. A ritka háziállataink megőrzése során kulcsfontosságú a minél nagyobb genetikai változatosság fenntartása. Elsőként vizsgáltuk e juhajta genetikai változatosságát a mitokondriális DNS szekvencia alapján, valamint hasonlítottuk össze a génbanki szekvenciákkal. Kutatásunk a családon belüli szelekció megvalósításához is támpontul szolgál.

A törzskönyv szerinti ún. ősi őshonos cigája családok leszármazottaitól (valamint két másik fajtaváltozattól, összesen 81 egyedtől) vérmintákat gyűjtöttünk 2014-ben. A mitokondriális DNS kontroll régiójában 98 pozícióban találtunk nukleotid eltérést. Mivel az egyedek közti eltérések csak néhány nukleotidra korlátozódtak, a cigája fajta anyai genetikai háttere egységesnek tűnik. A genetikai vizsgálat eredménye megerősítette a családok/nyájak fajtatörténetből ismert eredetét. A mintáink 94 %-a az európai juhokra jellemző B haplocsoportba tartozott (42 esetben teljes egyezést mutatva a génbanki referenciával: DQ852175.1). Ez a tény a magyar cigája európai juhokkal közös anyai eredetét igazolja.

Az anyai oldal előtérbe helyezése azért is válik fontossá, mert a nőstények nagyobb számban és hosszabb ideig vesznek részt a tenyésztésben, mint a hímek, így a genetikai változatosság megőrzésének nagyobb mértékben lehetnek a letéteményesei.

Kulcsszavak: cigája, mitokondriális DNS, kontroll régió, haplocsoportok

Insertion of Hungarian Tsigai into the sheep of Europe according to maternal origin (mtDNA CR)

Abstract

The Hungarian Tsigai is an old traditional sheep breed. On the course of preservation of the rare domestic animal breeds the maintenance of a greater genetic diversity is essential. In this recent study we analysed first the genetic background in this sheep breed by the use of mitochondrial DNA (mtDNA) sequence, and compared it to the sequences of GenBank. The investigation was also carried out in order to serve data for a sustainable within family selection.

The blood samples were taken from the descendants of the so called eldest families based on the herd book (and from two more breed variants, altogether from 81 individuals) in 2014. The control region of mtDNA showed nucleotide deviation at 98 sites. However, the differences among the individuals were limited to few loci; so the maternal genetic background of the Tsigai breed seems to be unified. The genetic information confirmed the origin of the families/flocks



known from the breed history. Ninety-four percent of the samples belonged to the ovine haplogroup B (in 42 cases with full matches with the reference of GenBank, DQ852175.1). This fact proves the common maternal origin of the Hungarian Tsigai and the European sheep.

A more intense focusing on the maternal side is motivated also by that the females are present at greater number than the males and they remain in breeding for a longer period of time, so they can be the depositaries of realization and maintenance of genetic diversity at a larger extent.

Keywords: Tsigai, mitochondrial DNA, control region, haplogroups

Irodalmi áttekintés

A cigája régen többes hasznosítású fajta volt, a kisázsiai eredetű tiszta gyapjas juhok közé tartozik. A 18. és 19. században élte aranykorát, mint hármashasznú juh: gyapjú-, tej- és hústermelő. Magyarországra kerülésekor finomabb gyapjával kitűnt az akkor jelenlévő juhajták közül. Az elmúlt 200 évben a cigája változó arányban (1-10 %) folyamatosan jelen volt hazánkban. A Kárpát-medencében történő elterjedése során jól alkalmazkodott a különféle földrajzi és éghajlati viszonyokhoz. A 19. század után a gondos tenyésztői munka csökkenésével a fajta elvesztette jelentőségét. Hazánkban sosem vált uralkodóvá, mivel a terjeszkedését a racka jelenléte és a merinó megjelenése akadályozta. A második világháború után a kevés megmaradt őshonos állatból egy 200 anyajuhból álló nyáját tudtak alapítani Karcagon 1950-ben. Ez a csekély számú állat tekinthető a cigája fajta nemzeti génmegőrző program kiindulópontjának (Gáspárdy, 2004).

Napjainkban a cigájának két változatát különíthetjük el. Egyik a génrezerv variáns, az ún. őshonos, míg a másikat erős tejtermelésre irányuló szelekcióval alakították ki. Ez utóbbi variáns, a tejelő cigája a Délvidékről került hazánkba, és azóta is folyamatosan zombori tenyészkosokkal pároztatják az anyákat. Egyes nézetek szerint a tejelő cigája más ajták génjeit is hordozza, ezért a Magyar Juh- és Kecsketenyésztő Szövetség (MJKSZ) hivatalosan önálló fajtvá minősítette.

A hagyományos, őshonos ajták fenntartása során kritikus pont a ritka, nyáj-specifikus genotípusok felismerése és megőrzése, még akkor is, ha ezek kedvezőtlen küllemi vagy termelési tulajdonságokat, esetleg prion-genotípust hordoznak (Fésüs és mtsai, 2004).

A szarvasmarha tenyésztők már régóta különleges jelentőséget tulajdonítanak a gyakran tehén családokként emlegetett anyai vonalaknak. A mitokondrium csak az anyai oldalról adódik át (citoplazmás átörökítés). Zárt DNS hurokban kódolja az ADP-ből az ATP termeléshez szükséges elektron transzport lánc fehérjéinek génjeit (Anderson és mtsai, 1982). Minden sejt több kópiát tartalmaz a mitokondriális DNS-ből (mtDNS), ezek az anyai vonal minden tagjában megegyeznek (Gibson és mtsai, 1997).

A párosujjú patások közül eddig csak a szarvasmarhában (Anderson és mtsai, 1982) és a juhban (Hiendleder és mtsai, 1998) állapították meg a mtDNS teljes szekvenciáját. A szarvasmarha és a juh mtDNS-ének kontroll régiója, eltekintve az ismétlődő szakaszoktól csak 27,6 %-ban tér el egymástól. A juhok között (*O. aries*) Hiendleder és mtsai (1998) állapították meg a fő haplocsoportokat, a juh teljes mtDNS-e 16616 nukleotidból (nt) áll.

Meadows és mtsai (2007) a közel-keleti és új-zélandi juhajtákon belül 5 haplocsoportot különböztettek meg. Az A haplocsoport képviselőit két közép-ázsiai fajtván (karakul/Kazahsztán és gizarr/Tadzsisztán), valamint három Új-Zélandról származó mintában (romney, coopworth és merinó) azonosították (Meadows és mtsai, 2005). A B haplocsoportba tartozó állatokat az európai, közel-keleti és új-zélandi ajtáiban figyelték meg, valamint ebbe a csoportba tartozott az európai muflontól (*O. musimon*) származó minta is.



Tapio és mtsai (2006) a haplocsoportok földrajzi eloszlását figyelték meg. Ázsiában a leggyakoribb haplotípus az A, míg Európában a B haplocsoport terjedt el. Az A csoport tagjait nem találták a Délkelet-Európában vizsgált négy populáció között. A C haplocsoport tagjai főleg a Kaukázusban és Közép-Ázsiában fordultak elő, viszont teljesen hiányoztak Európa keleti részéről. Egy másik tanulmányban (Meadows és mtsai, 2011) a különböző haplotípusokat a mtDNS teljes szekvenciája alapján hasonlították össze. Itt különös figyelmet fordítottak a házasított illetve a vadon élő juhok mtDNS szekvenciájának összehasonlítására.

Egy horvát vizsgálat (Ferencakovic és mtsai, 2013) során az ország területén élő 21 muflon kostól vettek mintát és határozták meg a mtDNS haplotípusukat. Ez alapján mindegyik állat a B haplocsoportba tartozott. Ezek az adatok alátámasztják a kelet-adriai juh egységes anyai eredetét, mely jellemző a többi európai fajtára is.

Jelen kutatásunkban a magyar cigája változatokat vizsgáltuk mtDNS szekvencia alapján. Célunk az őshonos variáns ősi családjainak feltérképezése, a nyájak közötti kapcsolatok meghatározása, a populációk genetikai változatosságának felmérése valamint a cigája fajtaváltozatok haplotipizálása.

Anyag és módszer

A magyarországi cigája fajtaváltozatok jellemzéséhez a következő nyájakat választottuk: Kardoskút (KM) és Csanádpalota (CS) képviselte az alföldi változatot, Budapest (BP) pedig a hegyi változatot. Debrecenből (DB) választottunk állatokat a csókai, Ceglédről (TC) a tejelő és Gödöllőről (SF) a sárgafejű változat jellemzéséhez.

Az anyai családokat az 1995 óta vezetett törzskönyv alapján állapítottuk meg, melyet a MJKSZ bocsátott rendelkezésünkre. A mintavételbe az ősi családok (7, 8 és 9 generáció hosszúságú) tagjait vontuk be.

Családonként 2 állattól, összesen 81 vérmintát vettünk EDTÁ-s vérvételi csövekbe. A mintákat -20 °C-on tároltuk a további feldolgozásig. A DNS-t a SIGMA GenElute Blood Genomic DNA Kit-tel tisztítottuk a gyártó útmutatása szerint. A PCR reakcióhoz 25 µl elegyet állítottunk össze a következők szerint: 2,5 µl dNTP, 2,5 µl puffer, 1,5 µl MgCl₂, 2 µl primer, 1 µl BSA, 0,4 µl Taq-polimeráz (Thermo Scientific) és tisztított víz.

A mtDNS kontroll régiójának 1058 nukleotidból álló szakaszának felszaporításához Meadows (2007) leírása alapján használtuk a primereket: CR-F 5'-AACTGCTTGACCGTACATAGTA-3' és CR-R 5'-AGAAGGGTATAAAGCACCGCC-3' (AF010406; Hiendleder és mtsai, 1998, 15983-592 nucleotide). A PCR gépet a következők szerint állítottuk be: 6 ciklus 94 °C 30s - 54 °C 30s - 72 °C 45s, 6 ciklus 94 °C 30s - 53 °C 30s - 72 °C 45s, és 18 ciklus 94 °C 30s - 52 °C 30s - 72 °C 45s. A terméket SIGMA GenElute PCR Clean-Up Kit-tel tisztítottuk, majd szekvenáltuk.

A kapott szekvenciákat a MEGA6 programmal (Tamura és mtsai, 2013) rendeztük és elemeztük Maximum Composite Likelihood modell használatával, valamint meghatároztuk a nukleotid változatosságot csoporton (fajtaváltozaton) belül és csoportok között. PopART programmal (<http://popart.otago.ac.nz>) median-joining network-öt (Bandelt és mtsai, 1999) hoztunk létre, így megállapítottuk a haplotípusokat és az egyedek közötti kapcsolatokat.



Eredmények és értékelés

A szekvenciák rendezése után 1059 nukleotidból álló szakaszt kaptunk (GenBank AF010406; 15983-592 pozíció). Az összes állatot tekintve (81 egyed) 98 helyen találtunk eltérő nukleotidokat, ebből 47 egyedi eltérés (singleton) volt. Az eltérő nukleotidok száma különböző volt a nyájokban: KM: 32, BP: 11, CS: 27, SF: 10, TC: 20, DB: 65.

Az egyes fajtaváltozatokban előforduló haplotípusok az 1. táblázatban láthatóak. A haplotípusok relatív gyakorisága magas, tehát az egyedek nagy része önálló haplotípust képvisel. A csoporton belüli átlagos nukleotid eltérések a következők szerint alakultak: DB: 0,007; KM: 0,014, CS: 0,004, BP: 0,005, SF: 0,004, TC: 0,010. Ezeket az eredményeket tekintve látható, hogy a KM és TC nyájak mutatták a legnagyobb változatosságot, ezekben a legszerteágazóbb a genetikai háttér. Az nyájak szerinti egy pozícióra jutó átlagos nukleotid eltérések a 2. táblázatban láthatók. Érdekes módon nem találtunk nagy különbségeket a CS, SF és BP nyájak között, tehát feltételezhetjük, hogy ezek közös őssel rendelkeznek.

1. táblázat: Haplotípus gyakoriság a cigája nyájokban

nyájak(1)	n	haplotípusok száma(2)	haplotípusok gyakorisága, %(3)
KM(4)	5	5	100
BP(5)	6	6	100
CS(6)	24	21	87,5
SF(7)	5	4	80
TC(8)	5	5	100
DB(9)	36	30	83,3
összes(10)	81	65	80,2

Table 1: Haplotype frequency in Tsigai flocks

(1)flocks; (2)number of haplotypes; (3)frequency of haplotypes (%); (4)Körös-Maros National Park; (5)Budapest; (6)Csanádpalota; (7)Yellow-faced Tsigai variant; (8)Milking Tsigai; (9)Debrecen; (10)total.

2. táblázat: A csoportok közötti szekvencia páronkénti becsült evolúciós eltérés

	KM(4)	BP(5)	CS(6)	SF(7)	TC(8)	DB(9)
KM(4)	0	0	0	0	0	0
BP(5)	0,011	0	0	0	0	0
CS(6)	0,010	0,004	0	0	0	0
SF(7)	0,011	0,005	0,004	0	0	0
TC(8)	0,014	0,009	0,008	0,008	0	0
DB(9)	0,012	0,006	0,006	0,006	0,010	0

Table 2: Estimates of evolutionary divergence over sequence pairs between groups (4-9)legend see Table 1.



A median-joining network-öt a haplocsoportok meghatározása szempontjából informatív pozíciók alapján szerkesztettük meg. A génbankban található referencia szekvenciákkal történt összehasonlítás alapján a legtöbb mintánk (93,8%) a B haplocsoporthoz tartozott, 42 esetben teljes egyezést mutattak a B referencia szekvenciával (DQ852175.1). Öt olyan állatot (6,2 %; 2 DB, 2 TC, 1 SF) találtunk, melyeket az A haplocsoportba (DQ852101.1) tartozónak ítéltünk. Mindössze egy szekvencia (CS) volt, amely 4 nukleotidban tért el mind az A, mind a B génbanki haplotípustól. A többi, korábban megállapított nagy haplocsoportokba (C, D, E) egyik mintánkat sem tudtuk besorolni.

Emellett a 81 mintaállat 12 fő haplotípust jelenített meg. Előfordult, hogy különböző nyájba tartozó állatok egyforma haplotípussal rendelkeztek, például DB és CS nyájak esetében. Ennek magyarázatát a törzskönyvezést megelőző időszakban élt közös ős adhatja. Mégis a legtöbb haplotípusba az egyazon nyájból származó állatok tartoztak.

Következtetések és javaslatok

A kontroll régióban talált jelentős számú (98) eltérő nukleotid alátámasztja az általunk vizsgált populáció változatosságát. Ugyanez mondható el az egyes nyájokról is, különösen a KM. A TC esetében talált nagyobb nukleotid változatosság a szélesebb genetikai háttérre utalhat. A DB és TC nyájak közötti hasonlóságot feltehetőleg a közös földrajzi eredet (Délvidék – Vojvodina) és természetes élőhely okozta. Ugyanakkor az egyedek közötti és nyájankénti eltérések csak néhány nukleotidra korlátozódtak. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a vizsgált populációk anyai hátterük tekintetében nem állnak annyira távoli kapcsolatban egymással, mint azt korábban feltételeztük.

Legtöbb mintánk a B haplocsoportba tartozott, csak néhány mutatott hasonlóságot az A haplocsoport képviselőivel. Ez a tény megerősíti a magyar cigája európai juhokkal közös anyai eredetét. Az A haplotípusú egyedek feltételezhetően Ázsia távolabbi részéről származtak. A tejelő cigájában talált A csoportba tartozó haplotípusok nem zárják ki a tejelő cigája részleges anyai karakül eredetét sem.

Jelenlegi, a mtDNS kontroll régiójának vizsgálata során kapott eredményeink részben eltérnek a korábbi, mikroszatellita polimorfizmusokkal végzett vizsgálatok eredményeitől. Ez magyarázható a citoplazmás öröklődéssel, miszerint a mai populációk eltérő anyai és apai genetikai háttérrel rendelkeznek. Így elképzelhető, hogy az egyes fajtaváltozatok/nyájak egyediségét az apai oldal erősebben határozza meg. A cigája változatok közötti különbségekért a tenyészkiválasztás illetve a spontán mutációk is felelősek lehetnek.

A jövőben a többi régi juhajtáink anyai vonalainak genetikai hátterének felderítését igen fontosnak tartjuk.

Az őshonos fajták – mint a cigája és változatai – megőrzése során a mtDNS változatossága fontos szerepet kap. További vizsgálatokat tervezünk a mtDNS cytb kódoló szakaszával.

A mtDNS változatosságának megállapításával a hatékony családon belüli szelekciót szeretnénk elősegíteni, valamint iránymutatást adni a tenyésztőknek. A génmegőrzési munka során különös figyelmet kell fordítani az anyai családokra, és meg kell őrizni az ősi családok képviselőit.

Az anyai oldal előtérbe helyezése azért is válik fontossá, mivel a nőstények nagyobb számban és hosszabb ideig vesznek részt a tenyésztésben, mint a hímek, így a genetikai változatosság megőrzésének nagyobb mértékben lehetnek a letéteményesei.



Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatok a SZIE-ÁOTK Kutató Kari Pályázat (KKUK-15269) és a MVH „Genetikai erőforrások megőrzése intézkedés keretében a védett őshonos és veszélyeztetett mezőgazdasági állatfajták megőrzése (1547262485)” c. pályázat támogatásával valósultak meg. Köszönet illeti az összes juhtartót a mintavételekben nyújtott közreműködésükért, a MJKSZ-t a rendelkezésünkre bocsátott törzskönyvi adatokért, és minden munkatársunknak a segítségért.

Irodalomjegyzék

- Anderson S, de Bruijn M. H. L, Coulson A. R, Eperon I. C, Sanger F, Young L. G.* (1982): Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156: 683–717
- Bandelt H, Forster P, Röhl A.* (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37–48
- Ferencakovic M, Curik I, Perez-Pardal L, Royo L. J, Cubric-Curik V, Fernandez I, Alvarez I, Kostelic A, Sprem N, Krapinec K, Goyache F.* (2012): Mitochondrial DNA and Y-chromosome diversity in East Adriatic sheep. *Animal Genetics* 44: 184–192
- Fésüs L, Zsolnai A, Horogh G.P, Anton I.* (2004): A juhok surlókérdője. 2. A prionogenotípusok gyakorisága hazai őshonos juhállományainkban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 126: 670–675
- Gáspárdy A.* (2004): Hungarian native Sheep: the Tsigai. *Living Heritage*
- Gibson J. P, Freeman A. E, Boettcher P. J.* (1997): Cytoplasmic and mitochondrial inheritance of economic traits in cattle. *Livestock Production Science* 47: 15–24
- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A.* (1998): The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Domestic Sheep (*Ovis aries*) and Comparison with the Other Major Ovine Haplotype. *J Mol Evol* 47: 441–448
- Meadows J. R. S, Li K, Kantanen J, Tapio M, Sipos W, Pardeshi V, Gupta V, Calvo J. H, Whan V, Norris B, Kijas J. W.* (2005): Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *Journal of Heredity* 96:494–501
- Meadows J. R. S, Cemal I, Karaca O, Gootwine E, Kijas J. W.* (2007): Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East. *Genetics* 175: 1371–1379
- Meadows J. R. S, Hiendleder S, Kijas J. W.* (2011): Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. *Heredity* 106: 700–706
- PopART*, <http://popart.otago.ac.nz>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S.* (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729
- Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, Cinkulov M, Gonzarenko G, Kiselyova T, Murawski M, Viinalass H, Kantanen J.* (2006): Sheep Mitochondrial DNA Variation in European, Caucasian, and Central Asian Areas. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1776–1783