
Vizsgálatok egy génrezerv pulykapopulációban

Szőke Szilvia¹ – Komlósi István² – Korom Edit³ –
Ispány Márton⁴ – Mihók Sándor²

Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,

¹Agrárgazdasági és Vidékfejlesztési Kar,
Gazdaságelemzési és Statisztikai Tanszék, Debrecen

²Mezőgazdaságtudományi Kar,
Állattenyésztés- és Takarmányozástani Tanszék, Debrecen

³Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,
Állatbiológiai Intézet, Gödöllő

⁴Debreceni Egyetem,
Természettudományi Kar,

Alkalmazott Matematikai és Valószínűségszámítási Tanszék,

Debrecen
szilvia@helios.date.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A genetikai variancia nagysága igen fontos kis populációknál. Egy génmegőrzés céljából tartott őshonos bronzpulyka populáción végeztünk vizsgálatot, hogy a jelenleg alkalmazott párosítási algoritmus elősegíti-e a genetikai változatosság szintentartását. Mikroszatellit markerek segítségével felmértük a jelenlegi állapotot, és számítógépes szimuláció segítségével a következő 100 generáció helyzetét vizsgáltuk.

Az adatok elemzésénél genetikai variancia helyett az információelméletben használatos entrópiával számoltunk, hogy pontosabban mérhessük fel a populáció helyzetét.

A vizsgálat eredményeképpen elmondhatjuk, hogy a jelenleg alkalmazott rotációs vonalpárosítás megfelelő, de a szelekció során új módszereket alkalmazva az allélok elvesztése ellen többet tehetünk.

Kulcsszavak: génmegőrzés, számítógépes szimuláció, bronzpulyka

SUMMARY

Genetic variability is very important in small populations. We examined an indigenous bronze turkey population which is bred for gene conservation in order to see if the current mating system maintains genetic variability. The present generation was surveyed using microsatellite markers and a computer model was used to simulate changes in the population over 100 generations.

The data was analysed using the concept of entropy from information theory instead of genetic variance so that we could more accurately measure genetic variability.

The results indicate that the breeding method currently in use, rotational line mating, is acceptable with respect to preserving genetic variability, but new selection methods may provide additional protection against the loss of alleles.

Keywords: gene preservation, computer simulation, bronze Turkey

BEVEZETÉS

Cikkünkben egy génmegőrzés céljából fenntartott őshonos bronzpulyka populációban végzett vizsgálataink eredményéről számolunk be. A

vizsgálatunk célja az volt, hogy a jelenleg használt párosítási algoritmust leellenőrizzük, vajon elősegíti-e a genetikai változatosság minél jobb megőrzését.

A populáció létszáma 211 egyed, nemek szerinti eloszlása 38 bak és 173 tojó. A populáció létszámát generációról generációra közel azonos szinten áll. Ezeket az egyedeket kis vonalakban tartják összesen 11-ben. Egy vonalban 3-4 bak és 12-16 tojó található. A vonalból kikelt tojók tenyészállatként a vonal nőivarú egyedeinek utánpótlását szolgálják, a bakok pedig a szomszédos vonal bakjainak tenyészutánpótlását. A tojók átlagosan 19 tojást tojnak. Az egyedek átlagosan két évig élnek. A szaporodási ciklus során a fakkon belüli egyedek véletlenszerűen párosodnak. A tojásokat mind kikeltik. Keltetés után a megtartott bakokat a következő fakkba helyezik, az utolsó fakk bakjai pedig az elsőbe kerülnek. Ezzel a ciklikus mozgattal igyekeznek a tenyésztők a genetikai változatosságot fenntartani.

RÖVID IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A génmegőrzéssel foglalkozók mind tudják, hogy milyen fontos a genetikai variabilitás megőrzése. Ha egy populáció létszáma túl kicsi, ott különböző problémák léphetnek fel. Beltenyésztettség, és annak következtében genetikai leromlás, vagy a genetikai drift következményeképpen allélvesztés. A bottleneck hatást vizsgálták mikroszatellittek és szimuláció segítségével Maudet és társai (2002) védett vadkecske fajtánál (Alpine ibex). Namíbiában őshonos Sanga Cattle genetikai diverzitását vizsgálták mikroszatellites technikák segítségével Nortier és társai (2002). Szintén kis populációnál alkalmazták a mikroszatellit markereket Takeda és társai (1995). Ők a kapott információk és számítógépes szimulációk alapján a rokonsági viszonyok alakulását, a beltenyésztettséget tanulmányozták. Magyarországon őshonos magyar tyúkfajták génmegőrzés céljából fenntartott kis populációkban rendszeresen végeztek vérvizsgálatokat a beltenyésztettség elkerülése érdekében Papp és társai (1999).

Vizsgálatunkban a debreceni DE ATC génrezerv bronz pulyka állományának (144 egyed) genetikai variabilitását mértük fel mikroszatellit markerek felhasználásával.

58 db olyan tyúk mikroszatellitét választottunk ki előzetes irodalmi adatok alapján (Reed et al., 2000), amelyek alkalmazhatóak a pulyka vizsgálatokra is.

A kiválasztott markereket először teszteltük 10 véletlenszerűen kiválasztott egyed vérből preparált DNS mintáján.

A primer párok alkalmasságát „touch-down” PCR reakcióban, 3 hőmérsékleti programon (61-51°C, 63-53°C, 65-55°C), és 3 eltérő magnézium koncentráció (2 mM; 2,5 mM; 3 mM) mellett a 96 férőhelyes PTC-200 DNA Engine PCR gépben (MJ Research) vizsgáltuk.

A PCR reakciókat 5 µl végtérfogatban (0,1 U Taq polimeráz, x10 puffer, 0,8-0,8 mM dNTP, 0,001 µg BSA, 200-200 nM primerenként és 10 ng DNS) végeztünk. Az amplifikáció körülményei a következők voltak: reakciót megelőző denaturáció 95°C 3 perc; 95°C 30 másodperc, annealing hőmérséklet 30 másodperc, 72°C 30 másodperc; 35 cikluson keresztül; végső lánchosszabbítás 72°C 5 percig. Az annealing hőmérséklet az első 10 ciklusban 65/63/61°C-ről 55/53/51°C-ra csökkentettük ciklusonként 1°C-változtatással, a további 25 ciklusban az annealing hőmérséklet változatlan volt.

A kapott termékek elválasztását kapilláris elektroforézissel ABI Prism 310 Genetic Analyser-en végeztük, és az adatok elemzéséhez a GeneScan Analysis és Genotyper Software programokat használtuk. A PCR termékek méretének meghatározásához a TAMRA500-as standardot alkalmaztunk.

Az előzetes eredmények alapján a genotípus meghatározáshoz összeállítottunk egy 8 mikroszatellit magában foglaló vizsgálati szettet (ADL0149, ADL0150, DL0266, ADL0272, ADL0292, ADL0293, MCW0018, MCW0080). A szettet használatkor 3 multiplex PCR reakcióban amplifikáltuk a primereket, és egy kapilláris elektroforézist követően határoztuk meg a genotípust.

A jelenlegi állapotot szolgált a szimuláció alapjául. A számítógépes program a MATLAB (1992) szoftver felhasználásával készült. A programot a MATLAB saját fejlesztő nyelvén írtuk.

Az adatok átkódolásra kerültek a könnyebb feldolgozhatóság érdekében. Mivel a kiindulási adatokban a 2. lókuszon genetikailag egységes homozigóta volt az állomány, ezért a szimulációs programban csak 7 lókuszt szerepelt. A lókuszonkénti allélok számát megtartottuk, maximum 4-et. A kiindulási allélgyakoriságokat táblázatba foglaltuk (1. táblázat).

A vérmintából származtatott adatokból indultunk ki, majd a használt párosítási és szelekciós eljárást leprogramozva megnéztük, hogy milyen lesz az állomány száz generáció múlva. A szimulációt 400-szor ismételtük, majd a kapott állományokat összehasonlítottuk a jelenlegivel.

Kiindulási allélgyakoriság

Lókuszt(1)	Allél(2)	Allélgyakoriság(3)
ADL0292	118	0,0035
	128	0,9444
	130	0,0035
	132	0,0347
ADL0293	81	0,0038
	99	0,9923
	108	0,0038
ADL0272	160	0,7698
	168	0,2302
ADL0149	222	0,1750
	224	0,8214
	228	0,0036
ADL0266	84	0,0075
	96	0,7239
	104	0,2686
ADL0150	120	0,0074
	138	0,9926
MCW0080	276	0,9550
	280	0,0450

Table 1: Frequency of alleles in the base population
Locus(1), Alleles(2), Frequency of alleles(3)

A szimuláció során az információelméletben használatos Shannon-féle entrópiával számoltunk. Eredetileg egy $p = \{ p(x); x \in X \}$ eloszlású ξ diszkrét valószínűségi változó által szolgáltatott információ mennyiségének mérésére Shannon a

$$H = H(\xi) = - \sum_{x \in X} p(x) \log_2 p(x)$$

mennyiséget vezette be, ahol X egy információ forrás jelkészlete, vagy ábécéje, ennek a halmaznak az elemei x-ek, a jelek, vagy szavak. A ξ értékei a forrás által kibocsátott jelek (Baróti et al., 1993). Az eredeti kettes alapú logaritmus helyett használható más alapú logaritmus is, az entrópia tulajdonságai megmaradnak, csak az információ mennyiség „mértékegysége” lesz más. Mi természetesen alapú logaritmust használtunk.

A gyakorlatban a genetikai változatosság mérésére a varianciát használják általában. A variancia helyett azért választottuk az entrópiát, mert érzékenyebben írja le a gének változatosságát. A variancia a várható érték körüli ingadozás mértékét mutatja, s így függ a szimuláció során az egyes géneknek adott értékektől. Ezzel szemben az entrópia csak az allélgyakoriságtól függ, de nem számít az allél számértéke. A génmegőrzési problémák tárgyalásánál azért célszerű az entrópia segítségével jellemezni a populációt, mert ha egy allélgyakorisága csökken, akkor csökken az entrópia is. Ha egy populációban sikerül szinten tartani vagy esetleg emelni ezt az értéket, akkor azt jelenti, hogy az allélok kiesésének valószínűségét sikerült lecsökkenteni, illetve tartósan alacsonyan tartani. A mellékelt táblázatban feltüntetjük, hogyan változik az

entrópia értéke, ha kettő, illetve három allél található egy lókuszon, illetve, ha változik az allélgyakoriság (2., 3. táblázat).

2. táblázat

Entrópia értékek két allél esetén

Allélgyakoriság(1)		Entrópia(2)
0,1	0,9	0,325083
0,2	0,8	0,500402
0,3	0,7	0,610864
0,4	0,6	0,673012
0,5	0,5	0,693147

Table 2: Entropy values in the two-allele case
Frequency of alleles(1), Entropy(2)

3. táblázat

Entrópia értékek három allél esetén

Allélgyakoriság(1)			Entrópia(2)
0,1	0,1	0,8	0,639032
0,1	0,2	0,7	0,801819
0,1	0,3	0,6	0,897946
0,1	0,4	0,5	0,943348
0,2	0,2	0,6	0,950271
0,2	0,3	0,5	1,029653
0,2	0,4	0,4	1,054920
0,3	0,3	0,4	1,088900
0,33	0,33	0,33	1,098612

Table 3: Entropy values in the three-allele case
Frequency of alleles(1), Entropy(2)

Egy másik szimulációs programmal arra kerestük a választ, hogy egy-egy ritka allél milyen gyorsan eliminálódik a populációból. Ennél 9 esetet vizsgáltunk meg. A ritka allél gyakorisága 0,0035, 0,007 illetve 0,0105 volt a kiindulási állományban. Ez azt jelenti, hogy a 144 egyedből egy, kettő vagy három egyed rendelkezett a ritka alléllal. Ezen belül a hordozó egyedek különböző neműek lehettek, így jött ki a kilenc különböző eset. Minden esetet 100 generáción keresztül figyeltük, és mindegyiket 400-szor futtattuk le.

A szimulációs programoknál fontos probléma a véletlen szám generálása. A MATLAB beépített véletlen szám generátora a lineáris kongruenciák módszere alapján működik: seed=(77 seed) mod (231-1) (MATLAB Reference Guide, 1992). Mivel a szimulációs program futása hosszú időt vett igénybe, ezt egyetlen alkalommal nem lehetett elvégezni. Hogy az adatok ismétlődését elkerüljük, minden 100. futás után a véletlen szám generátor magját átállítottuk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A populáció minden lókuszára nézve Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. A számításokat χ^2 próbával végeztük. A statisztikai elemzés kimutatta, hogy az egyensúlyi állapot minden szokásos szignifikancia szinten fennáll minden lókuszon.

A kapott genotípus adatokból kiszámítottuk a várt (He = 0.165) és a tényleges heterozigótizációs értéket (Ho = 0.164). Ez az alacsony érték a pulykákra jellemző sajátosság (Korom et al., 2003).

Az entrópia segítségével az állomány „rendezetlenségét” kívántuk számszerűsíteni. Az entrópiát lókuszonként mértük, értéke egy nemnegatív szám lehet, melynek mértéke függ a lókuszon található allélok számától és az egyes allélok relatív gyakoriságától. Minimális, vagyis nulla, ha a lókuszon egyetlen allél szerepel, arra homozigóta a populáció. Maximális az értéke, ha minden allél azonos gyakorisággal szerepel.

Példánkban a lókuszek és az allélok számát figyelembe véve az összentrópia értéke akkor lett volna maximális, ha az első lókuszon minden allél gyakorisága 0,25, a másodikon 0,33, a harmadikon 0,5 a negyediken és az ötödiken 0,33 végül a hetedikén 0,5 lett volna. Ezekhez az allélgyakoriságokhoz tartozó összentrópia 6,76. A kapott adatok alapján ebben az adott populációban a szimulációs futások során 1,6-2,9 közötti értékeket vett fel. Egy-egy futás során erősen ingadozott az értéke, de az összes futtatás utáni átlagértékek 2,17 körül stabilizálódtak.

Az allélvesztés. A számítógépes szimulációk során rögzítettük, hogy egy ritka allél hányadik generációban vész el. Megvizsgáltuk, hány generáció kell az allélgyakoriság nullává válásához, ha a populációban egy, kettő illetve három egyed rendelkezik ezzel a ritka géneváltozattal. Külön kellett kezelni a nemeket, hiszen a szelekció miatt eltérő esélye van egy baknak illetve egy tojónak génjei továbbadására. Annak a valószínűsége, hogy egy bak ritka (kezdeti allélgyakoriság 0,0035) allélját a szelekció során kiválasztott valamely fakkbeli egyed örökli egy adott generációban:

$$P(A) = 1 - P(\bar{A}) = 1 - \frac{\binom{150}{1}}{\binom{180}{1}} \approx 0,166$$

Ugyanez egy tojó esetében mindössze:

$$P(B) = 1 - P(\bar{B}) = 1 - \frac{\binom{170}{1}}{\binom{180}{1}} \approx 0,055$$

400 futtatás után megállapítottuk az átlagos értékeket és az eredmények a 4. táblázatban olvashatók.

Azt a tényt, hogy az állomány Hardy-Weinberg egyensúlyban volt biztató jelként értékeltük. Mivel nem tapasztaltunk sem heterozigóta hiányt sem többletet, ez azt sugallta, hogy az állomány párosítása közel áll a véletlenszerű párosodáshoz.

A szimulációs kísérlet eredménye jól igazolta azt a feltevésünket, hogy a nem jelentősen befolyásolja egy ritka allél elvesztésének a valószínűségét a jelenlegi párosítási rendszerben. Ha 144 egyedből

csak egy tojó rendelkezett a ritka alléllal, az esetek 85,5%-ban az első 5 generáció alatt elveszett az allél és csak 2,8%-ban maradt meg tartósan, 25 generáción

túl. Egy bak esetében 21,5%-os relatív gyakorisággal veszett el az allél, és 48,5%-ban maradt meg (1., 2., 3. ábra).

4. táblázat

A szimuláció eredményei

Kezdeti allélgyakoriság (1)	A gén-hordozó(2)	Az allélvesztés átlagosan hányadik generációban következik be(3)	Az esetek hány százalékában következett be az allélvesztés az első 5 generációban (10 év)(4)	Az esetek hány százalékában maradt meg a gén 25 generáción túl (50 év)(5)	Az esetek hány százalékában maradt meg a gén 100 generáción túl (200 év)(6)	Az adatok szórása (7)
0,0035	1 tojó(8)	4,4	85,5%	2,8%	0,0%	11,2
	1 bak(9)	40,3	21,5%	48,5%	6,5%	37,1
0,007	2 tojó	7,6	71,0%	6,8%	0,3%	14,4
	1 tojó 1 bak	43,8	19,8%	53,3%	7,8%	38,1
	2 bak	57,0	5,5%	72,0%	1,3%	34,4
0,0105	3 tojó	24,6	43,5%	30,5%	1,0%	30,8
	2 tojó 1 bak	45,2	15,3%	60,0%	5,3%	34,9
	1 tojó 2 bak	63,3	6,3%	76,0%	24,0%	36,6
	3 bak	78,3	1,0%	88,0%	33,8%	29,9

Table 4: The result of the simulation

Frequency of alleles(1), Gene owner(2), Average allele retention period (number of generations)(3), Percent of cases the allele is lost in the first 5 generations (10 years)(4), Percent of cases the allele remained after 25 generations (50 years)(5), Percent of cases the allele remained after 100 generations (200 years)(6), Standard deviation (generations)(7), Hen(8), Tom(9)

1. ábra: Az allélvesztések száma a generációk függvényében (A ritka allélt 1, 2 vagy 3 tojó hordozza)

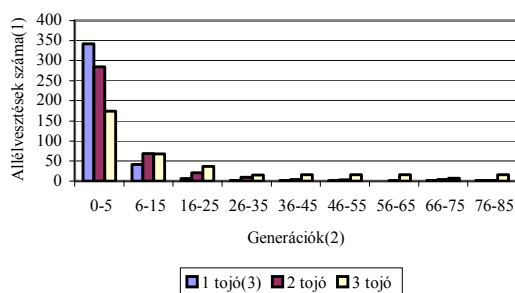


Figure 1: In which generation was lost the allele, when the base population the gene owner were 1, 2 or 3 hens
Number of the lost of the allele(1), Generations(2), Hen(3)

2. ábra: Az allélvesztések száma a generációk függvényében (A ritka allélt 1, 2 vagy 3 bak hordozza)

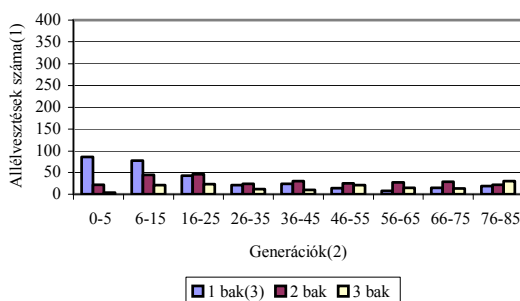


Figure 2: In which generation was lost the allele, when the base population the gene owner were 1, 2 or 3 toms
Number of the lost of the allele(1), Generations(2), Tom(3)

3. ábra: Az allélvesztések száma a generációk függvényében (A ritka allélt 3 egyed hordozza)

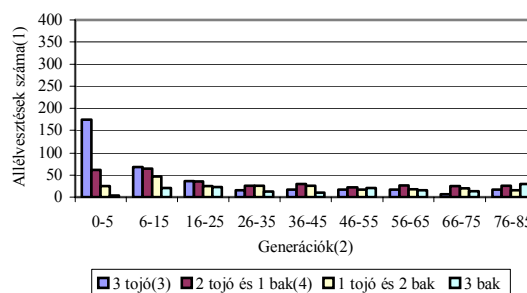


Figure 3: In which generation was lost the allele, when the base population the gene owner were 3 animals
Number of the lost of the allele(1), Generations(2), Hen(3), Tom(4)

Azokat az adatokat, hogy az allélvesztés átlagosan hányadik generációban következett be az 1 tojó esetét kivéve óvatosan kell kezelni, mert a szimulációs program csak 100 generáción keresztül figyelte a populációt, ez 200 évet jelent a pulykák esetében. A kapott eredményekből azonban nem derült ki hogy az a bizonyos allél a 101-dik generációban vagy a 149. generációban veszett el. Ezen esetek mindegyike százás értékkel szerepelt a számolásokban. 3 bak esetén ez az adatok harmadát érinti, tehát a 78,3-es átlagérték jelentősen alábecsült.

Szórás. Jelentős különbségek mutatkoztak az adatok szórásában. Míg 0,0035-ös allélgyakoriságnál a tojók adatainak 11,2, a bakok adatainak 37,1 volt a szórása.

Az entrópiával kapcsolatos számítások azt igazolják hogy a gyakorlatban használt párosítási algoritmus jónak tekinthető, amennyiben a

tenyésztési cél a genetikai változatosság fenntartása. Az entrópia a kezdeti értékhez közel stabilizálódott. Fontos hangsúlyozni, hogy ez statisztikailag érvényesül, hiszen nagy egyéni eltérések mutatkoznak. A folyamatban igen nagy a véletlen szerepe, és ez adott esetben óhatatlanul is együtt jár a gének elvesztésével.

Amennyiben ilyen kis állományban egy-egy állélt csak egy-két egyed képvisel (a kezdeti allélgyakoriság 0,01 alatt van) és ezt szeretnénk megőrizni, úgy ezekre az egyedekre külön oda kell

figyelni. Nem elég a véletlenre bízni, hogy megmaradnak-e, tenni is kell érte. Elsősorban az állomány létszámát fenntartó szelekció során kell esetenként több utódját megtartani az ilyen egyedeknek.

A kapott adatok szórásainak vizsgálata azt mutatja, hogy hiába magas a valószínűsége egy ritka allél megmaradásának bakok esetén, a valóságban a véletlen szeszélye folytán az egyetlen populációnk ritka allélje könnyen elveszhet.

IRODALOM

- Baróti Gy.-Bognár J.-Fejes Tóth G. (1993): Valószínűségszámítás. Nemzeti Tankönyvkiadó, 255.
- Korom E.-Nagy T.-Kovács B. (2003): Tyúk mikroszatellitek felhasználása pulyka populáció genetikai jellemzésére. V. Magyar Genetika Kongresszus
- Maudet, C.-Miller, C.-Bassano, B. (2002): Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex (*Capra ibex*). *Molecular Ecology*, 11, 421-436.
- Nortier, C. L.-Els, J. F.-Kotze, A. (2002) Genetic diversity of indigenous Sanga Cattle in Namibia using microsatellite markers. 7th World Congress in Genetic Applied to Livestock Production. Montpellier, France
- Papp, M.-Koppány, G.-Szalay, I. (1999): One decade of experiments on immunogenetic studies (blood typing) used for gene conservation of Hungarian native chicken breeds. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 48. 6. 791-793.
- Reed, K. M.-Mendoza, M. K.-Beattie, C. W. (2000): Comparative analysis of microsatellite loci in chicken and turkey. *Genome*, 43. 796-802.
- Takeda, H.-Obata, T.-Furukawa, T. (1995): Use of marker information to maintain variability in small population. *Animal Genetic Resources – International Workshop*, Tsukuba, Japan
- MATLAB Reference Guide (1992): The MATH WORKS INC. 401.