

# Protocol DNA onderzoek ras identificatie rund

Datum: 5 november 2018

## Betrokken partijen

- Veehouder;
- Rasorganisaties: vereniging voor de fokkerij van het Fries-Hollands ras, stichting Roodbont Fries Vee, vereniging het Brandrode rund, vereniging Lakenvelder Runderen, Blaarkopstichting, Stichting De Witrik en MRIJ studieverenigingen Zuid en Oost;
- Dr. van Haeringen laboratorium BV (VHLGenetics);
- Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN);
- Stichting Zeldzame Huisdierrassen (SZH);
- Erkende stamboeken: Coöperatieve Rundvee Verbetering (CRV), Fries Hollands Rundvee Stamboek (FHRS), stamboek van de vereniging Lakenvelder Runderen en stamboek van de vereniging het Brandrode rund.

## Rollen betrokken partijen

- Veehouder: aanvraag DNA onderzoek bij rasorganisatie en aanmelding paraplubestand;
- Rasorganisaties: aanvraag DNA onderzoek bij VHLGenetics, controle identiteit rund, besluit dat rund behoort tot een specifiek ras en communicatie uitslag met veehouder en stamboek;
- VHLGenetics: genotyperen haarmonsters en toezenden genotyperingen aan CGN;
- CGN: uitvoeren DNA analyse en communiceren uitslag met rasorganisatie;
- SZH: vlaggen van runderen voor het paraplubestand;
- Stamboeken: registratie runderen in stamboek.

## 1. Doel

Niet alle dieren behorende tot zeldzame Nederlandse dubbeldoel runderrassen staan ook ingeschreven in een stamboek, en bovendien zijn afstammingsgegevens soms onvolledig. Met een DNA onderzoek kan worden vastgesteld of dergelijke niet-stamboek-geregistreerde runderen behoren tot een specifiek ras. Dit protocol beschrijft hoe met een DNA onderzoek voor individuele runderen aangetoond kan worden of ze tot een specifiek ras behoren.

## 2. Procedure

De volgende stappen dienen doorlopen te worden om te bepalen of een rund met voldoende waarschijnlijkheid tot een specifiek ras behoort:

- I. Verzamelen DNA monster
- II. Genotyperen DNA monster met de Bovine SNP50 DNA Analysis BeadChip (Illumina)
- III. Waarschijnlijkheid vaststellen dat rund tot een specifiek ras behoort (percentages per ras)
- IV. Uitslag communiceren

### 2.1. Verzamelen van monsters

Ten behoeve van het DNA onderzoek dienen monsters van individuele runderen te worden verzameld. Hoewel monsters kunnen bestaan uit verschillende materialen, is het uitgangspunt haarmonsters. Monsters dienen verzameld te worden volgens de specificatie van VHLGenetics waar de monsters geanalyseerd worden zodat DNA van voldoende kwaliteit en hoeveelheid geïsoleerd kan worden (zie de FAQ op [www.vhlgenetics.com](http://www.vhlgenetics.com)). De veehouder blijft eigenaar van het haarmonster en de gegenereerde data. CGN vraagt middels het inzendformulier toestemming voor gebruik van de data aan de veehouder.

Monsternamen gebeuren onder verantwoordelijkheid van de rasorganisatie waar de veehouder bij is aangesloten en waartoe het rund vermoedelijk behoort. De rasorganisatie tekent voor de controle van de identiteit van het rund (I&R bewijs, oormerk) en de identificatie van het monster. Daarnaast verstrekt de rasorganisatie aan de veehouder de flyer met daarop de procedure voor aanmelding voor het paraplubestand. Het materiaal van elk rund dient apart verzameld te worden en van de juiste identificatie te worden voorzien. Vermenging van DNA materiaal op welke wijze dan ook (van andere runderen in de kudde, planten, mensen) dient voorkomen te worden. Voor elk rund apart wordt een compleet ingevuld inzendformulier meegestuurd met het haarmonster naar VHLGenetics.

### 2.2. Genotypering

De genotypering dient uitgevoerd te worden bij een gecertificeerd en/of geaccrediteerd laboratorium. Het DNA dient gegenotypeerd te worden voor 133 gespecificeerde SNP-merkers (zie bijlage). Deze 133 merkers zijn zo gekozen dat de Nederlandse, zeldzame runderrassen het best van elkaar onderscheiden kunnen worden. De 133 merkers zijn aanwezig op de BovineSNP50 DNA Analysis BeadChip (Illumina), en genotypering dient dus met deze chip te worden uitgevoerd. In Nederland biedt VHLGenetics deze chip aan.

Na genotypering van het DNA moet eerst de kwaliteit worden gecontroleerd. Genotypes van een rund dienen minstens een call-rate van 90% te hebben, d.w.z. dat voor minstens 90% van de merkers op de SNP-chip een uitslag moet zijn verkregen. De call-rate voor de 133 merkers dient 95% te zijn. Dat wil zeggen dat na genotyperen voor maximaal 7 van deze 133 merkers de uitslag mag ontbreken. Als de genotypes van een rund niet aan deze kwaliteitseisen voldoen, dan dient een rund te worden

hertest. Wanneer de kwaliteit van de genotypes onvoldoende is, zal VHLGenetics dit communiceren met de betreffende rasorganisatie. Voor het hertesten dient een nieuw haarmonster te worden aangeleverd.

De meerderheid van de Illumina BeadChips gaat uit van een structuur waarbij 24 monsters gelijktijdig geanalyseerd worden. VHLGenetics verzamelt de monsters en zal de analyse inzetten wanneer 24 monsters (ongeacht welk ras) aanwezig zijn. Coördinatie van de rasorganisatie om het gewenste aantal monsters in te zenden, zal bijdragen aan het tijdsbestek tussen inzenden en ontvangst van resultaten.

VHLGenetics zal de resultaten van de DNA analyse verstrekken in de vorm van Illumina's Genome Studio Final Report. In het Final Report dienen ten minste de volgende kolommen aanwezig te zijn: "Sample Name", "Sample ID", "SNP Name", "Allele1 – Top", "Allele2 – Top". VHLGenetics communiceert het bestand met de genotypering(en) rechtstreeks naar het CGN via email ([CGN.DNA-analyse@wur.nl](mailto:CGN.DNA-analyse@wur.nl)), waarbij een bestand wordt aangeleverd met alleen de 133 merkers, als ook een bestand met alle merkers. Daarnaast wordt het WUR inzendformulier meegestuurd en aangegeven welke runderen zijn ingezonden door welke rasorganisatie.

### 2.3. Percentage ras(sen) vastleggen

Genotyperingen van runderen worden vergeleken met een referentie dataset. In deze dataset bevinden zich genotyperingen van runderen die volgens de stamboekadministratie raszuiver zijn. De genotype data wordt één keer per twee maanden geanalyseerd met het software pakket *STRUCTURE* (v2.3.4; Pritchard *et al.* 2000, *Genetics*, 155:945-959). Hiervoor wordt de procedure *clustering* gebruikt om genotypes van een rund te vergelijken met genotypes van runderen waarvan het ras reeds vaststaat (de referentie dataset). De uitslag van deze procedure is voor hoeveel procent het DNA van het rund afkomstig is van de ras(sen) in de referentie dataset.

### 2.4. Referentiepopulaties

De referentie dataset bevat referentiepopulaties van de Groninger Blaarkop, Brandrode, MRIJ, Fries Hollands, Roodbont Fries vee, Lakenvelder en Holstein-Friesian runderen. De referentiepopulatie van een ras bevat raszuivere runderen waarvan sperma is opgeslagen in de genenbank, eventueel aangevuld met runderen gegenotypeerd in het kader van verschillende onderzoeksprojecten (zie onderstaande tabel). Deze referentiepopulaties dienen regelmatig te worden aangevuld met nieuwe runderen, aangezien populaties door selectie en genetische drift veranderen van samenstelling. Gestreefd moet worden naar referentiepopulaties van tenminste 75 runderen per ras en een aanvulling van de referentiepopulaties per jaar van 5 nieuwe (op basis van afstamming, raszuivere) runderen per ras van verschillende fokkers.

Wanneer een raszuiver rund (met 8/8<sup>ste</sup> bloedvoering) wordt aangeboden ter aanvulling van de referentiepopulatie, dient de rasorganisatie, naast de reguliere procedure, ook een kopie van het

afstammingsbewijs naar het CGN te sturen (Animal Breeding and Genomics, Centrum voor Genetische Bronnen Nederland, t.a.v. Anouk Schurink, Postbus 338, 6700 AH Wageningen) met daarbij de vermelding “aanvulling referentiepopulatie” en het betreffende ras.

*Tabel – referentiepopulaties (status september 2018) van de diverse rassen aanwezig in de referentie dataset, inclusief aantallen en range van geboortjaar.*

Referentiepopulatie - ras	Aantal runderen	Geboortejaren
<b>Groninger Blaarkop</b>	123	1967 – 2014
<b>Brandrode rund</b>	40	1994 – 2012
<b>MRIJ</b>	150	1960 – 2014
<b>Fries Hollands</b>	150	1965 – 2013
<b>Roodbont Fries vee</b>	48	1971 – 2012
<b>Lakenvelder</b>	36	1976 – 2015
<b>Holstein-Friesian</b>	50	

\*Voor 50% van de Groninger Blaarkoppen, 53% van de Brandrode runderen, 30% van de MRIJ en 27% van de Fries Hollands en 100% van de Holstein-Friesian runderen was het geboortjaar onbekend.

## 2.5. Vaststellen tot welk ras het rund behoort

De uitslag van het DNA onderzoek is een percentage per ras. Proefondervindelijk (MSc thesis Mira Schoon, onder begeleiding van Ina Hulsegge, Jack Windig en Anouk Schurink; en wetenschappelijke publicatie Hulsegge *et al.*, in voorbereiding) is vastgesteld dat indien het percentage overeenkomt met de referentiepopulatie van een ras  $\geq 77,5\%$  is, het rund behoort tot dit specifieke ras.

De rassen MRIJ en Brandrode rund waren in het recente verleden nog niet gescheiden, terwijl voor Fries Hollands en Roodbont Fries vee recent vermenging is opgetreden. Voor deze rassen geldt dat indien voor een rund het percentage voor het eigen ras onder de 77,5% ligt, maar het gezamenlijk percentage van de twee genoemde rassen (MRIJ plus Brandrode óf Fries Hollands plus Roodbont Fries vee)  $\geq 77,5\%$  is, het rund tot het specifieke ras behoort, mits het fenotype, de kleur en/of patroon, aan de eisen voor het ras voldoet, te bepalen door de rasorganisatie.

## 3. Communicatie

CGN communiceert de uitslag van het DNA onderzoek naar de rasorganisatie middels een brief. De uitslag bestaat uit een uitspraak op basis van de vastgestelde percentages per ras. De uitspraak die gecommuniceerd wordt, is:

- Volgens CGN onderzoek behoort op basis van DNA het rund (identificatienummer) niet tot het (naam ras) ras.

Of

- Volgens CGN onderzoek behoort op basis van DNA het rund (identificatienummer) tot het (naam ras) ras.

Of

- Volgens CGN onderzoek behoort op basis van DNA het rund (identificatienummer) tot het Brandrode ras, wanneer de uitslagen van het Brandrode en MRIJ ras bij elkaar worden opgeteld.

Of

- Volgens CGN onderzoek behoort op basis van DNA het rund (identificatienummer) tot het Fries Hollandse ras, wanneer de uitslagen van het Fries Hollandse en Roodbont Friesvee ras bij elkaar worden opgeteld.

Of

- Volgens CGN onderzoek behoort op basis van DNA het rund (identificatienummer) tot het Roodbont Friesvee ras, wanneer de uitslagen van het Roodbont Friesvee en Fries Hollandse ras bij elkaar worden opgeteld.

De rasorganisatie besluit dat het rund tot het specifieke ras behoort en communiceert de uitslagen van individuele runderen met de veehouders en het stamboek. Het stamboek registreert de op basis van DNA vastgestelde individuele runderen behorende tot één van de zeldzame Nederlandse dubbeldoel rassen in de hoofdsectie van het betreffende stamboek.

## 4. Kosten

De kosten voor het nemen van een DNA monster, het aanleveren van het monster bij het laboratorium, en de kosten voor genotyperen zijn voor rekening van de veehouder. VHLGenetics stuurt de factuur voor genotypering naar de rasorganisatie. Kosten voor genotyperen bedragen €65 (excl. BTW; prijspeil juni 2018. Dit tarief is onderhevig aan de valutaverschillen tussen USDollar en Euro. Het tarief kan tussentijds aangepast worden bij grote veranderingen in de wisselkoers) per test. Kosten voor een hertest bedragen tevens €65 (excl. BTW) per test. De rasorganisatie factureert aan de veehouder. CGN verstuurt geen factuur, het uitvoeren van de DNA analyses worden vooralsnog gezien als onderdeel van één van de wettelijke onderzoekstaken die CGN uitvoert voor het ministerie van LNV.

De kosten voor het regelmatig aanvullen van de referentiepopulaties zijn voor de betreffende rasorganisaties. Gestreefd moet worden naar referentiepopulaties van tenminste 75 runderen per ras en een aanvulling van de referentiepopulaties per jaar van 5 nieuwe (op basis van afstamming, raszuivere) runderen per ras van verschillende fokkers.

## 5. Literatuurverwijzingen

Pritchard J.K., Stephens M. and Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2):945-959.

## 6. Schematisch overzicht van procedure

Betrokken partijen (oranje), benodigde activiteiten (groen) en communicatie van uitslagen (blauw) omtrent de procedure beschreven in het protocol:

