

MTA Doktori Értekezés tézisei

**Molekuláris markervizsgálatok mangalica, racka,
merinó, szürkemarha és szarvas állományokon**

Zsolnai Attila
(Ph.D.)

Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézet, Herceghalom
Kaposvári Egyetem, Kaposvár

2019

Tartalom

1.	Kutatások célja	4
2.	Anyagok és módszerek	5
2.1.	Markertípus és kimutatásuk	5
2.2.	Minták, markerek és tipizálásuk	5
2.2.1.	Mangalica, mikroszatellit vizsgálatok	5
2.2.2.	Mangalica, SNP chip vizsgálatok és fajtaspecifikus gyorseszteszt	5
2.2.3.	Racka, mikroszatellit vizsgálatok	6
2.2.4.	Magyar szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok	6
2.2.5.	Szarvas, mikroszatellit	7
2.2.6.	Prion proteint kódoló gén genotipizálása	7
2.2.7.	Merinó kosok vizsgálata termelési tulajdonság és prion protein genotípusok kapcsolatára	7
2.3.	Adatfeldolgozás	8
2.3.1.	Mikroszatellit vizsgálatok:	8
2.3.2.	SNP-chip vizsgálatok:	8
2.3.3.	Juhok surlókór-rezisztencia vizsgálata:	8
3.	Eredmények és értékelésük	8
3.1.	Mangalica, mikroszatellit vizsgálatok	8
3.2.	Mangalica, SNP-chip vizsgálatok és fajtaspecifikus gyorseszteszt	9
3.3.	Racka, mikroszatellit vizsgálatok	12
3.4.	Magyar szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok	14
3.5.	Szarvas, mikroszatellit	16
3.6.	Prion proteint kódoló gén genotipizálása	17
3.7.	Merinó kosok vizsgálata termelési tulajdonság és prion protein genotípusok kapcsolatára	19
4.	Új tudományos eredmények	21
I-III	Mangalica vizsgálatok (lásd 2.2.1 és 2.2.2 fejezet)	21
IV	Racka, mikroszatellit vizsgálatok (lásd 2.2.3 fejezet)	21
V	Magyar szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok (lásd 2.2.4 fejezet)	21
VI	Szarvas, mikroszatellit (lásd 2.2.5 fejezet)	21
VII	Prion proteint kódoló gén genotipizálása (lásd 2.2.6 fejezet)	21
VIII	Merinó kosok vizsgálata, termelési tulajdonság és prion protein genotípusok kapcsolata (lásd 2.2.7 fejezet)	21
5.	Az új tudományos eredmények tagolásának megfeleltethető saját publikációk listája ..	22
6.	Irodalomjegyzék	23
7.	Köszönetnyilvánítás	25

Előzmények

Az elmúlt években a haszonállat genomikai kutatások olyan eredményekhez vezettek, melyek felhasználásával növelhető az állattenyésztési munka hatékonysága. Növekedett a géntérképek sűrűsége, egyre több gén és marker került azonosításra, genomon belüli lokalizálásra és elkezdődött az ismeretek tenyésztési gyakorlatban történő hasznosítása marker szelekciós programokban. Egyes tulajdonságok esetében sikerült pontosan azonosítani a felelős gént, illetve annak mutációját. Kidolgozásra kerültek génpróbák, melyek segítségével meghatározhatók a genotípusok bármely testszövetből izolált genomi DNS minta vizsgálatával. Mára a hazai tenyésztőknél is teret kaptak és széles körben ismertté váltak a molekuláris tulajdonságok felhasználási területei.

A tenyésztőkkel való kapcsolatunk folyamatos oda-vissza információáramlással, a lehetőségek megbeszélésével jellemezhető. Ilyen beszélgetések során alakultak ki azok a vizsgálati irányok melyekből eredmények születtek.

Ebben az értekezésben olyan molekuláris genetikai információk kinyeréséről számolok be különféle állományok esetében, melyek i.) segíthetnek megőrizni a fajtákat olyan állapotban, hogy azok képesek legyenek a környezethez és annak változásához alkalmazkodni ii.) olyan változatok elterjedését tudják elősegíteni, melyek gazdaságilag fontos háziállataink hatékonyabb felhasználását teszik lehetővé. iii.) olyan folyamatokat tárhatnak fel, melyek egyszerű megfigyelések révén nem ismerhetők meg.

Az itt leírt laboratóriumi munkák egy része a herceghalmi Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézet Genetikai laborjában, illetve a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Genetikai laborjában, a szarvas vizsgálatok a Kaposvári Egyetem Molekuláris Biológiai laborjában valósultak meg.

1. Kutatások célja

1. Mangalica esetében vizsgálatunk célja volt a mangalica populáció homogén, vagy nem homogén voltának ellenőrzése mikroszatellit markerekkel; történetesen van-e alapja a korábban színváltozatoknak mondott szőke, fecskehasú és vörös mangalicák külön fajtaként való kezelésének?
2. Az idő múlásával és a technológia fejlődésével rendelkezésre állt a teljes genom vizsgálati lehetőség, mely a mikroszatellit markerek lehetőségeit meghaladja, így a mangalica mikroszatellit vizsgálatokat megismételtük SNP markerekkel. A kutatás során olyan alternatív SNP készletet kerestünk, mely képes a három fajtát hatékony módon megkülönböztetni, illetve élelmiszerek mangalica alkotóját gyors eljárással azonosítani.
3. Racka esetében tudomásunkra jutott, hogy a tenyésztők között diskurzus folyik a fekete és fehér színváltozatok jövőben követendő elkülönülő vagy vegyes tenyésztési tartásáról. Az általunk gyűjtött racka egyedek vizsgálatán keresztül meg akartuk tudni van-e genetikai különbség a két szint képviselő csoport között? Ha ilyen különbség létezik, annak mértéke mekkora?
4. A magyar szürkemarha tenyészetek vizsgálatát a mangalica vizsgálatok eredményei inspirálták. Kíváncsiak voltunk a tenyészetek egymáshoz viszonyított genetikai helyzetére, az állomány genetikai struktúrájára.
5. Szarvas esetében a zártkerti tartás lehetővé teszi a kedvező fenotípusos tulajdonságokkal rendelkező egyedek tenyészállatként való használatát, ugyanakkor a viselkedési jellemzők miatt a megfigyelés nem mindig alkalmas a származási viszonyok eldöntésére. Ezért a háziállatoknál már bevált DNS alapú származásellenőrzési eljárás kidolgozását tűztük ki célul.
6. A juhok surlókór-rezisztenciájával kapcsolt prion protein gén változatainak genotipizálását és eredményeinek felhasználását Európai Unió szabályozás írta elő. Laboratóriumunk alkalmas volt ezen feladat ellátására, de a meghatározási folyamat gyorsítása érdekében célul tűztük ki egy addig erre a célra nem használt genotipizálási eljárás megvalósítását.
7. A prion protein genotípusok meghatározásával és a tenyésztői adatbázis felhasználásával kíváncsiak voltunk arra a magyar és német merinó kos állományon belül, hogy van-e a surlókór rezisztens típusra való szelekciónak negatív hatása a termelési tulajdonságokra?

2. Anyagok és módszerek

2.1. Markertípus és kimutatásuk

Vizsgálatainkban kétféle markert és többféle meghatározási technikát alkalmaztunk.

A mikroszatellit markerek ismétlődő szekvenciariészletek, tipizálásuk annak a néhány bázispár ismétlődésének számbeli változékonyságán alapul, melyek két, csak egy-egy adott genomrészletre jellemző szekvenciariészlet között helyezkednek el. E markereket populációgenetikai paraméterek meghatározására használtuk mangalicában, szürkemarhában, rackában és szarvasban.

SNP markerek (single-nucleotide polymorphism = egyszerű nukleotid-polimorfizmus) kevésbé polimorfak a mikroszatelliteknél és a genomban sűrűbben helyezkednek el azokhoz képest. Egy adott polimorf nukleotidpozícióban általában kétféle nukleotid mutatható ki. Ezt a markertípust használtuk a mangalica fajták egyszerűsített elkülönítésének kifejlesztéséhez. és a prion proteint kódoló változatok jellemzéséhez.

A mikroszatellitek és SNP-k sokszorosításához PCR reakciót alkalmaztunk. A mikroszatellitek hossz, illetve genotípus meghatározására kapilláris elektroforézist használtunk. Szintén kapilláris elektroforézis segítségével határoztuk meg a prion protein genotípusokat is.

Nagy áteresztő képességű genotipizálási eljárás esetében az egyedenként több, mint 60 ezer SNP lókuszt genotipizálását erre a célra szakosodott szolgáltató végezte el.

2.2. Minták, markerek és tipizálásuk

2.2.1. *Mangalica, mikroszatellit vizsgálatok*

A vizsgált minták két különböző évből, illetve tizenöt sertéstelepről származtak (73 fecskehasú, 82 vörös, 123 szőke). Kontrollként 67 duroc mintát használtunk. A mintázott mangalica állományt a fajta magpopulációjaként tartották számon. A mintákat EDTA-val kezelt felületű vércsővekbe gyűjtöttük.

Mikroszatellit lókusztok elemzéshez használt mikroszatellitek (NECHTELBERGER és mtsai, 2001) a következők voltak; S0005, S0090, S0101, S0155, S0355, S0386, SW24, SW240, SW857, SW951, amelyeket a FSAVE (Foundation Safeguard for Agricultural Varieties in Europe) is elfogadott. A DNS sokszorosítást Hybaid Thermal Cyclerrel végeztük. A fragmentumokat ABI310 készülékkel határoztuk meg Genescan és Genotyper programok segítségével.

A mikroszatellit genotípusok analízisét két eltérő évből származó, eltérő egyedekből álló csoporton, illetve az egész mintamennyiségen is elvégeztük.

2.2.2. *Mangalica, SNP chip vizsgálatok és fajtaspecifikus gyorseszteszt*

80 mangalica (24 szőke, 31 fecskehasú, 23 vörös) és 63 nem mangalica (10 pietrain, 12 nagyfehér, 3 H39-es hibrid, 12 lapály, 12 hampshire és 14 duroc) egyed vérmintáját használtuk fel a Mangfood konzorcium vérbankjából. A DNS előkészítéséig a vérmintákat -20 °C-on tároltuk. Az előkészítés Genomic DNA Maxi Kit (Geneaid, Taiwan) segítségével történt a gyártó előírásai szerint.

A nagy áteresztőképességű genotipizálási munkát az Aros Applied Biotechnology AS (Aarhus, Denmark) cég végezte sertés SNP chip-en (Illumina, USA).

Mangalica, fajtaspecifikus gyorseszteszt

711 mintát, melyből 131 mangalica vagy mangalica x duroc F1 egyed volt, vágóhídon gyűjtöttük, illetve korábbi gyűjteményünkéből származtak (ZSOLNAI és mtsai, 2013). A vaddisznó és szarvasminták az ország különböző helyein, szervezett vadászatokon gyűjtöttük. A mangalica kolbászt és májkrémet megbízható termékelőállítótól szereztük be, illetve a NAIK-Élelmiszerkutató Intézet (ÉKI) állította elő. A nem mangalica eredetű kolbász és májkrém mintákat élelmiszerboltokban szereztük be illetve az ÉKI állította elő azokat. A növények mintáit élelmiszerboltokban vásároltuk.

A felhasznált szekvenciák:

primer1: biotin-GTTGGTTATTACAGTACTGTACAATAACAAAGGTCAA

primer2: AGCTTGTTTCAAACATGAAAAGTTCACAAAGCAG

A próba szekvenciája FAM-GGATGATTCATAGCATAGGAACACTTAAGATTG (THF)AATTACTGGGTCTTAAGG-C3spacer volt, ahol a THF tetrahydrofuránt jelöl.

2.2.3. Racka, mikroszatellit vizsgálatok

A minták gyűjtése két különböző évben, 2006-ban, ill. 2008-ban történt. A DNS előkészítéséig a vérmintákat –20 °C-on tároltuk.

A 2006-os mintákon 7 mikroszatellitet használtunk (HSC, INRA063, OarFCB11, MAF214, OarAE129, CSRD247, OarFCB304) 68 fehér és 7 fekete racka esetében. A 2008-ban gyűjtött mintákon 31 mikroszatellit markert használtunk (BM1329, BM8125, DYMS1, HUJ616, OARAE129, OARCP34, OARCP38, OARFCB128, OARHH47, OARVH72, MAF65, INRA63, OARFCB20, OARJMP58, OARJMP29, OAFCEB193, BM1824, MAF70, MAF209, OAFCEB304, SRCRSP9, ILSTS5, ILSTS11, ILSTS28, MAF214, SRCRSP5, SRCRSP1, MAF33, MCM140, OAFCEB226, MCM527) 22 fehér, 9 fekete racka, 31 cikta, 31 cigája és 31 merinó esetében. A két mikroszatellit készlet között három lókuszt (INRA63, MAF214, OarAE129) azonos volt.

A DNS sokszorosítást követően a fragmentumokat ABI 310-es, ill. ABI 3100-as automatizált fragment analízáló készüléken választottuk el. A mikroszatellitek hosszait GeneScan és Genotyper programokkal határoztuk meg.

A minták statisztikai analízisét mindkét mintavételi év és mikroszatellit készlet esetében külön-külön végeztük el.

2.2.4. Magyar szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok

A tenyészetek helyei a kiértékelést végző kutatók számára csak a statisztikai számolások elvégzése után váltak ismertté.

A vizsgálatba 2009 és 2011 között élő szürkemarha egyedek kerültek (n = 3187). Azon gazdaságok kerültek a vizsgálatba, melyeknek legalább 25 egyede lett genotipizálva. Olaszországból származó, referenciaként szereplő maremmán egyedek mintaszáma 52 volt.

Az állatok genotipizálását az ISAG (International Society of Animal Genetics) által rutin származásellenőrzésre javasolt 11 mikroszatellittel végeztük el (ISAG species panel 2003, <http://www.isag.us/comptest.asp?autotry=true&ULnotkn=true>).

A DNS sokszorosítási körülmények a Bovine Genotypes Panel 1.1 (Finnzyme Diagnostics, Finnország) kézikönyvében leírtaknak feleltek meg. A sokszorosításhoz használt eszköz ABI 9700 (Applied Biosystems, USA) készüléket, az allélok fragmenthossz meghatározásához ABI 3100 Genetic Analyser-t (Applied Biosystems, USA) alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint.

2.2.5. Szarvas, mikroszatellit

2007 nyarán és őszén 119 gímszarvas mintát gyűjtöttünk két szarvasfarmról származásellenőrzés céljára. Az A farmon 46 borjút, 25 anyatehenet és négy tehenet mintáztunk. B farmon 26 borjút, 29 anyatehenet és 3 tehenet vizsgáltunk. A két farmról összesen 47 dámszarvas is hozzáférhető volt. A vérmintákat EDTA antikoaguláns tartalmú csövekbe gyűjtöttük, majd fagyaszttva tároltuk azokat a DNS kivonásáig (ZSOLNAI és mtsai, 2003). Az izommintákat Eppendorf csövekben, 96 %-os alkoholban, szobahőmérsékleten tároltuk.

A használt mikroszatellit:

1. készlet: BM4208, NVHRT 21, RT 1, NVHRT 73; a 2. készlet: CSSM066, DIK082, IDVGA59, NVHRT48, OARCP26. A DNS sokszorosítás Hybrid Thermal Cycler készülékkel 10 µl végtérfigatban történt.

A nyolc-plex reakció a korábban említett lókuszokat sokszorosítja az első és második primerkészletből, kivéve az OARCP26 lókuszt. A PCR ciklusok körülménye megegyezik a második készletnél alkalmazottakkal.

2.2.6. Prion proteint kódoló gén genotipizálása

A primerek szekvenciái, melyeket a mutációkat hordozó prion gén 256 bp hosszúságú szakaszának sokszorosítására használtunk; CATTGCTCCACCACTCGCT és TTGGTGGCTACATGCTGGGAA (YUSBASIAN-GURKAN és mtsai, 1999).

A második amplifikációs lépéshez használt primerek nevei és szekvenciái:

A136V-r(40-mer): (A)19TGTATAAGAGGCCTGCTCATG,

R154H-r(46-mer): (T)24GGGGTAACGGTACATGTTTTCA,

R171-f(53-mer): (A)28CAAGTGTACTACAGACCAGTGGATC,

Q171H-r(60-mer): (A)35GCACAAAGTTGTTCTGGTTACTATA.

A termékek 3' végen fluoreszcensen jelölt fragmenteket hosszait ABIPrism310 fragment analízátorral határoztuk meg. A genotípus hozzárendelés Genotyper programmal történt.

2.2.7. Merinó kosok vizsgálata termelési tulajdonság és prion protein genotípusok kapcsolatára

98 tenyészetből 501 kos -286 magyar merinó és 215 német merinó- lett a vizsgálatokba bevonva. Német merinó esetében az import és a Magyarországon nevelt kosokat is felhasználtuk. Az analízisbe kosokat válogattunk, mert ez az ivar képes a kedvező növekedési tulajdonságokat gyorsan elterjeszteni a populációban, másrésről ebben az időben a magyar surlókór program a kosokra fókuszált. A vizsgálatban résztvevő kosok 1993 és 2005 között születtek.

A markerek meghatározására a 2.2 rész Prion proteint kódoló gén genotipizálása című részben leírt eljárást használtuk.

2.3. Adatfeldolgozás

Az eredmények adatfeldolgozására és ellenőrzésére az alábbi programokat alkalmaztuk:

2.3.1. Mikroszatellit vizsgálatok:

Arlequine (EXCOFFIER és mtsai, 2005), BAPS (CORANDER és mtsai, 2003), CERVUS (MARSHALL és mtsai, 1998), FSTAT (GOUDET 1995), Genalex (PEAKALL és SMOUSE, 2006), GeneClass (PIRY és mtsai, 2004), Genepop (ROUSSET 2008), HP-rare (KALINOWSKI 2005), Microsatellite Toolkit (PARK, 2001), PAPA (DUCHESNE és mtsai, 2002), Poptree (TAKEZAKI és mtsai, 2010), SPSS (SPSS 15.0 for Windows software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), Structure (FALUSH és mtsai, 2003), TFGPA (MILLER 1997), WhichRun (BANKS és EICHERT, 2000).

2.3.2. SNP-chip vizsgálatok:

Eigensoft programcsomag (HONG és mtsai, 2012; PATTERSON és mtsai, 2006), Genalex (PEAKALL és mtsai, 2006), Structure (FALUSH és mtsai, 2003).

2.3.3. Juhok surlókór-rezisztencia vizsgálata:

SPSS (SPSS 15.0 for Windows software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Eredmények és értékelésük

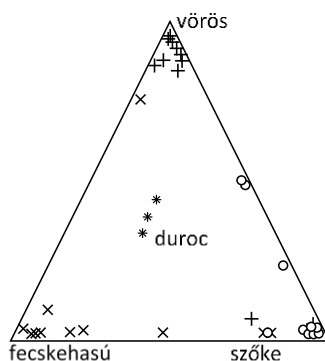
3.1. Mangalica, mikroszatellit vizsgálatok

Munkahipotézisünk (a mangalicapopuláció homogén, egyetlen csoportot alkot) tesztelésére diszkriminációanalízist végeztünk. Az első és második függvény a variancia 79,6 illetve 20,4 %-át írta le. A diszkriminancia értékek és a csoportok közötti korreláció erős volt (0,817 illetve 0,582). A feltételezett három csoport átlagai szignifikánsan ($p \leq 0,000$) különböztek egymástól, vagyis több mint egy csoport létezik a mangalicapopuláción belül; a homogén fajtaként való munkahipotézis elvetettük.

Az eredmények azt mutatták, hogy a mangalicák három különböző klaszterbe esnek, melyek megbízhatóan elkülöníthetők egymástól (3.1.1. ábra).

A meghatározott genetikai távolság érték (pl. az F_{st} , amely 0,064-től 0,099-ig változott) azt mutatja, hogy a három fajta közepesen differenciálódott egymástól, és reflektálja a dokumentált fajtatörténetet, miszerint a szőke és fecskehasú fajta közelebb van egymáshoz ($F_{st}=0,064$), mint a vörös a szőkéhez ($F_{st}=0,094$) illetve a fecskehasúhoz ($F_{st}=0,099$) (3.2.1. táblázat).

Az eredmények összhangban vannak a tenyésztők, illetve a tenyésztő szervezet által végzett hagyományos tenyésztési eljárással megvalósított eredménnyel, miszerint a három mangalicapopuláció nem csupán színváltozat, hanem a szőke, fecskehasú és vörös mangalica valóban elkülönülő fajtaként kezelhető.



3.1.1. ábra

Structure programból származó grafikus eredmény. A mangalica egyedek különböző klaszterekbe esnek, melyek a háromszög csúcsain helyezkednek el. Klaszterszám 3 volt, iterációk száma 125. Az x, +, o, * jelek a fecskehasú, vörös, szőke és duroc egyedeket jelölik.

3.2. Mangalica, SNP-chip vizsgálatok és fajtaspecifikus gyorseszteszt

Az SNP adatokat felhasználva a genetikai távolság értékeket (F_{st}) kiszámoltuk mindegyik populációpár esetében. Az eredmények erős korrelációt ($r^2 = 0,788$) mutattak a korábban mikroszatellit markerekkel meghatározott távolságokkal (3.2.1. táblázat).

Az SNP alapú genetikai távolságok a szőke mangalica-duroc (0,24) és szőke mangalica-nagyfehér viszonylatban (0,18) hasonló volt más kutatók által (GARCIA és mtsai, 2006), mikroszatellit alapon meghatározott értékeihez (0,27 és 0,21)

	fecskehasú	szőke
szőke	0,064 ^m /0,062 ^{SNP}	
vörös	0,099 ^m /0,091 ^{SNP}	0,095 ^m /0,075 ^{SNP}

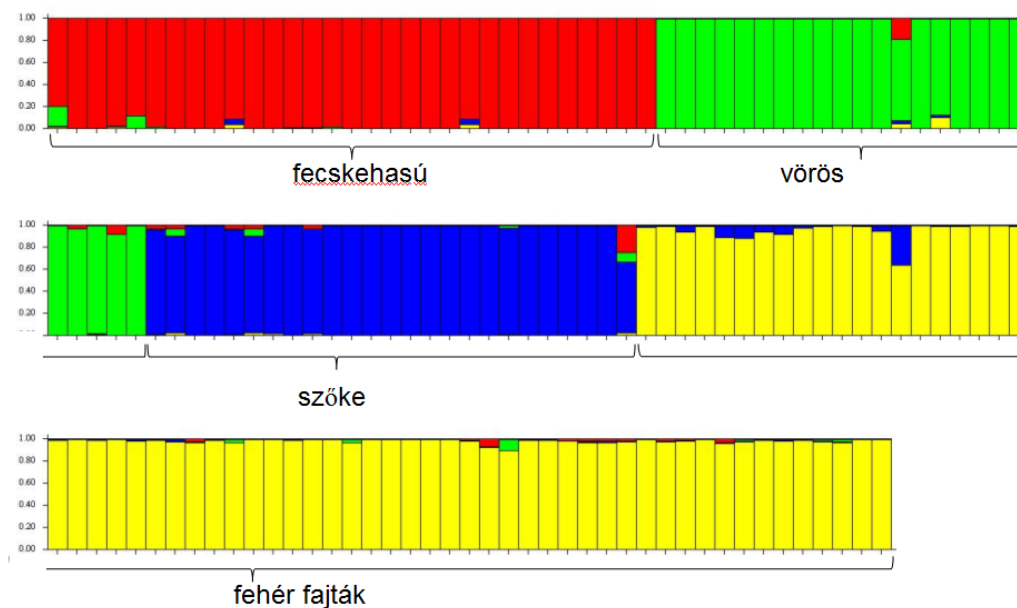
^m mikroszatellit markerekkel kapott értékek (ZSOLNAI és mtsai, 2006)

^{SNP} SNP markerekkel kapott értékek

3.2.1. táblázat

Mangalica fajták páronkénti genetikai távolság (F_{st}) értékei.

Mangalica fajtákat (nem egyedeket) megkülönböztető lókuszok keresésével hat darab nagy genetikai differenciáltsággal rendelkező lókuszt találtunk. Ezeket a lókuszokat Structure programmal teszteltük, a fajtaelválasztási képesség meghatározása céljából. A hat SNP képes volt az egyedek többségét nagy valószínűségi értékkel (95% felett) a megfelelő csoportjukba sorolni (3.2.1. ábra). Az allélok megoszlási gyakorisága a különböző fajták esetén jelentős eltéréseket mutatott (3.2.2. táblázat). A besorolási értéket chi-négyzet módszerrel meghatározott más SNP lókuszok használatával is sikerült elérni (ZSOLNAI és mtsai, 2013).



3.2.1. ábra

Mangalicák SNP markerekkel való azonosítása.

Mangalica és fehér sertések ($n = 23$ vörös, 24 szőke, 33 fecskehasú mangalica és 63 fehér sertés) csoportokba sorolása hat SNP lókuszt és Structure szoftver segítségével. Minden állatot egy oszlop jelképez, melynek szegmensei az egyed adott csoportba való tartozásának becsült értékét adják.

SNP neve	kromoszóma	allél 1.	allél 2.	1. allél előfordulási gyakorisága			
				szőke	fecskehasú	vörös	fehér
H3GA0053033	n.a.	A	G	0,98	0,95	0,12	0,29
ALGA0090577	16	A	G	0,96	0,65	0,11	0,57
ASGA0069071	15	C	A	0,76	1,00	0,16	0,65
MARC0041999	n.a.	C	A	0,19	0,91	0,52	0,59
DRGA0017577	n.a.	G	A	0,24	0,12	0,98	0,67
MARC0067293	2	G	A	0,76	0,08	0,41	0,65

3.2.2. táblázat

Mangalica fajtákat megkülönböztető hat SNP lókuszt, kromoszómális elhelyezkedésük és az 1-es allél előfordulási gyakorisága szőke, fecskehasú, vörös mangalica és fehér sertések esetében.

Az SNP alapú genetikai távolság meghatározás hasonló eredményeket hozott, mint a korábbi mikroszatellit (ZSOLNAI és mtsai, 2006) alapú megközelítés.

Mivel a teljes genom SNP tesztelése még mindig drága (80-100 euro/állat) a több tízezres markerkészlet néhány SNP-re való szűkítése technikai és gazdasági szempontból is indokolt. Bemutattuk, hogy hat db SNP, más-más eredményt adó szűrési eljárással kiválasztva, képes a mangalica fajtákat 95% feletti megbízhatósággal elkülöníteni, megjegyezve hogy ezen SNP-k a továbbiakban már nem alkalmasak a genetikai változatosság tanulmányozására, csak a fajták elkülönítésére. Az SNP genotípusok intenzitás értékei (HUANG és mtsai, 2010) alkalmasak mangalica eredet és mennyiség (százalékos arány) meghatározására a kereskedelemben kapható sertéstermékek esetén. GARCIA és mtsai (2006) hasonló megközelítést használtak spanyolországi sonka termékek ibériai sertéshányadát meghatározó, mikroszatellit markereken alapuló eljárásában.

A fenti eredmények alátámasztják, hogy a mikroszatellit genotipizálás sikeresen felváltható a SNP genotipizálással, az SNP chipek alkalmazása lehetővé teszi a mangalica fajták karakterizálását, és kiindulásul szolgálhat egyéb értékmérő, szelekciós vagy ellenőrző markerek megtalálásához. Az SNP markerek alkalmazásával a mikroszatellit alapú vizsgálatok költségének a fele-háromnegyede megtakarítható.

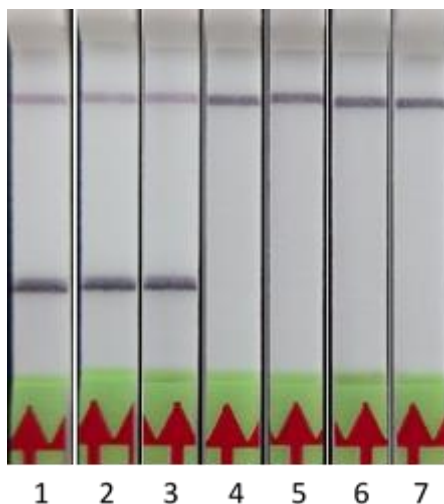
A vizsgálatok megerősítik továbbá a fajtamegmentés és fenntartás érdekében végzett szakmai munka magas színvonalát.

Fajtaspecifikus gyorsteszt:

A reakció specifikitását vizsgálva keresztreakciót egyetlen minta sem adott, csak és kizárólag a három mangalica fajta (ahol az összes származási vonal képviseltette magát) és a mangalica x duroc F1 mintái adtak pozitív reakciót. Az emberi, egyéb állati és növényi DNS minták nem adtak pozitív jelet. Az adatbázisok szekvenciakeresései sem mutattak megegyezést a mangalicaspecifikus tesztsekvenciával.

Az eljárás kimutatási határát hígítási sorral határoztuk meg, ahol a kiindulási minta koncentrációja 10 ng/μl volt. Ez a mennyiség 2900 kópia célszekvenciát jelent. Amennyiben az 1 kópia/μl koncentrációt szerenénk használni a reakcióban (pl. ha 1 μl mintatérfogart 50 kópiát tartalmaz, akkor azt 50 μl végtérfogatú RPA reakcióban alkalmazzuk), akkor 58x-os hígítást kell elérni. Az RPA reakció eredménye azt mutatja, hogy egy célszekvencia/kópia megbízhatóan detektálható.

Az, hogy ilyen alacsony mennyiségű DNS detektálható és az RPA reakció érzéketlen a reakciót zavaró körülményekre (KERSTING és mtsai, 2014), alkalmassá teszi a reakciót minimális előkészítésen átment minták vizsgálatára is (3.3.2 ábra). A reakció sikeres volt olyan komplex minták esetén, mint a kolbász (magas zsír- és fűszertartalom) vagy a májkrém (magas zsírtartalom).



3.3.2 ábra

Mangalica eredet kimutatása kolbászból és májkrémből

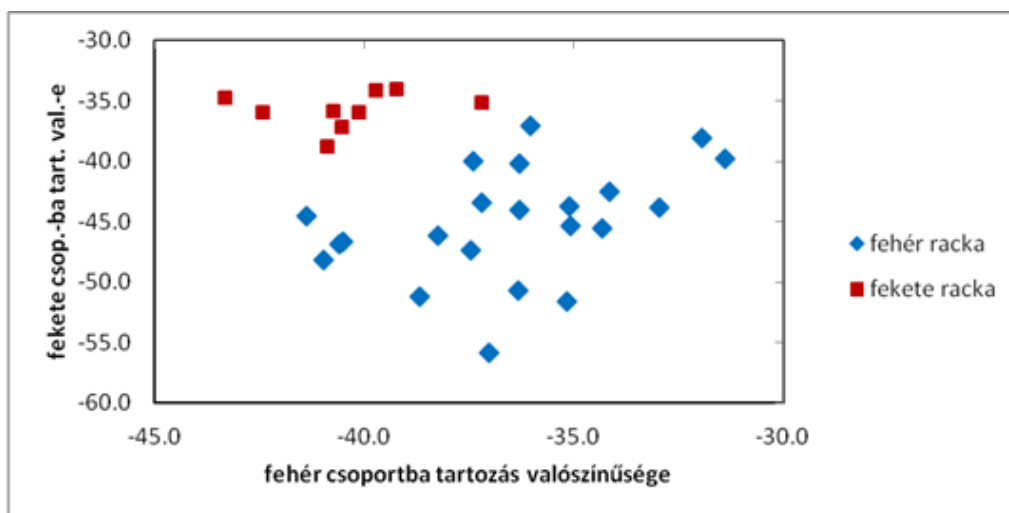
1: homogenizált mangalica kolbász; a homogenizált kolbászhoz desztillált vizet adtunk, a reakcióhoz a vizes fázist használtuk, centrifugálási lépést nem alkalmaztunk. 2: homogenizált mangalica kolbász; homogenizálás után DNAreleasey® kezelést alkalmaztunk, a reakcióhoz a vizes fázist használtuk, centrifugálási lépést nem alkalmaztunk. 3: mangalica májkrém; desztillált vizes homogenizálás, centrifugálás nélkül. 4: DNS minta nélküli reakció. 5: nem mangalica kolbász; előkészítés korábbi leírás szerint (1). 6: nem mangalica kolbász; előkészítés korábbi leírás szerint (2). 7: nem mangalica májkrém; előkészítés korábbi leírás szerint (3).

3.3. Racka, mikroszatellit vizsgálatok

Kiindulási hipotézisként a két racka csoportot egyetlen homogén csoportként kezeltük. Elképzelésünk igazolására diszkriminanciaanalízist végeztünk, ahol független változóként az allélok hosszait használtuk. Mivel az első függvény a teljes variancia 100%-át írta le, és a fehér, ill. fekete csoportok átlagai szignifikánsan eltértek egymástól ($p \leq 0,001$) a homogén csoport feltevését elvetettük.

A 2006-os kísérletben (7 DNS-markerrel) az egyedek csoportokba sorolása 97,3%-os volt. 2008-ban (31 DNS-markerrel) kapott allélhosszakokat használva a csoportokba sorolás 100%-os megbízhatóságú volt akár alkalmaztuk, akár nem a csoportméreten alapuló *a priori* súlyozást.

A 2006-os és 2008-as mintakészlet mutatja a két színváltozat elkülönülését. A több, 31 DNS-marker használatával kapott ábrán (3.3.1. ábra) látható az elkülönülés mértéke.



3.3.1. ábra.

Fekete és fehér rackák mikroszatellit markerekkel való csoportba sorolása.

Fehér és fekete racka egyedek csoportokba sorolása mikroszatellit lókuszok és Genalex program segítségével. Az ábrák tengelyein az adott populációba való tartozás valószínűségeinek logaritmus adatai láthatóak. A.) $n = 68$ fehér, 7 fekete racka, 7 mikroszatellit marker. B.) $n = 22$ fehér, 9 fekete racka, 31 mikroszatellit marker.

A becsült genetikai távolság, ill. csoportok közötti varianciarányad (F_{st}) értéke a két vizsgálati készletet tekintve különbözik. Az első esetben (2006, 7 mikroszatellit) az F_{st} érték 0,082, míg a második esetben (2008, 31 mikroszatellit) 0,042 volt.

A két vizsgálati elrendezésünk genetikai mérőszámai szerint a fekete és a fehér racka csoport genetikailag differenciálódottnak tekinthető, bár a második esetben a genetikai elkülönülés mértéke éppen a közepes eltérés alsó határa (0,05) alá került (HARTL és CLARK, 1997). Az eltérés egyrészt azzal magyarázható, hogy a 2006-os esetekben a fehér rackák három, a feketék két helyről, míg 2008-ban mindkét színváltozat egy helyről származott. Az utóbbi esetben az egy helyen, elkülönülten tartott két színváltozat genetikai távolság értéke kisebbnek adódott, ami támogatja azt a feltételezést, miszerint az azonos területen élő színváltozatok genetikailag hasonlóbbak egymáshoz, mint az egymástól földrajzilag messzebb élők. Az eltérés másik oka a fekete minták alacsony száma lehet, az alacsony alkalmazott markerszám esetében, 2006-ban. A két különböző év évben mintázott populáció genetikai távolságai közül, véleményünk szerint, a második áll közelebb a valósághoz az alkalmazott ötször nagyobb markerszám miatt.

Cigájában, és egyéb, pl. orino, lesvos, turcana, ruda, stb. között mért genetikai távolságokat összevetettük a rackában mért genetikai távolsággal. Racka esetében megállapítható, hogy a színváltozatok egymástól genetikai elkülönültséget mutatnak mind több tenyészetből származó, mind egy helyről származó fekete és fehér racka csoportok esetén függetlenül attól, hogy milyen mikroszatellit markerkészletet alkalmaztunk.

Hasonló, a közepes genetikai differenciáltság mérőszámai közé (0,05 és 0,15) (HARTL és CLARK, 1997) eső értékeket mikroszatellitekkel korábban a három mangalicafajta esetében mértünk

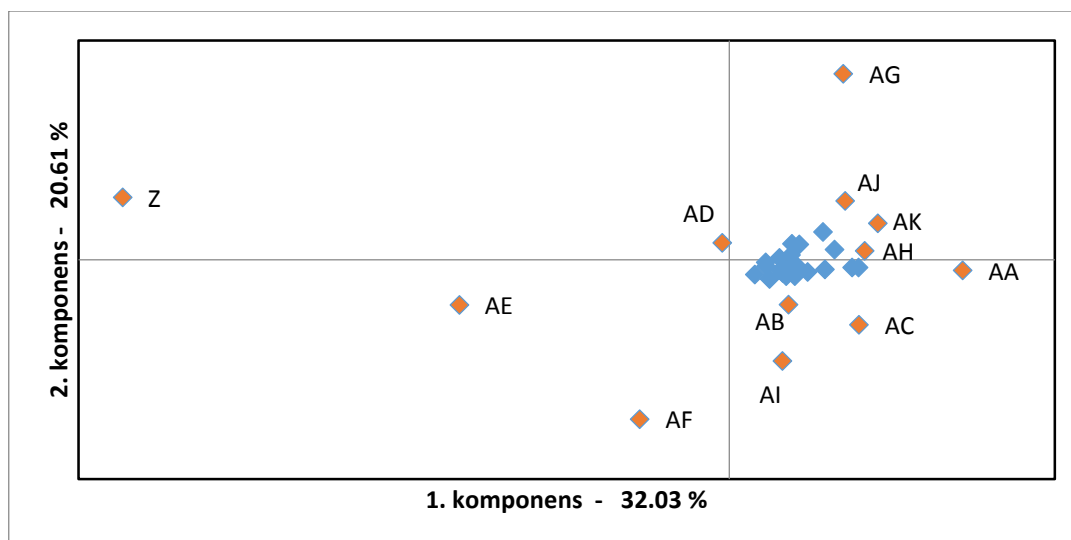
A DNS-alapú genetikai háttérvizsgálataink, és azoknak más kutatási eredményekkel való összevetése alapján a fekete és a fehér rackacsoportok genetikailag differenciálódottnak tekinthetők, ugyanakkor a fekete rackaminták kis száma miatt érdemesnek tartjuk a mikroszatellitokkal kapott adatok ellenőrzését nagyobb állatállományon. A teljes rackaállomány mintázását javasoljuk úgy, hogy tenyészetenként, a FAO ajánlásának megfelelően, 4–5 állatot vonnánk be a vizsgálatokba (FAO, 2011). A fekete és a fehér racka genetikai háttérének kiterjedtebb vizsgálatát korszerűbb, kereskedelembe hozzáférhető teljes genomot mintázó markerkészlettel (KIJAS és mtsai, 2012) lehetne megoldani.

3.4. Magyar szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok

Az F_{is} értékek különbözőségének vizsgálatakor az AE, AH, AJ gulyák mutattak szignifikáns eltérést a többi állomány F_{is} értékeitől. Egyedi allélokat tizenegy gulyában találtunk. A, C és AI populációk mindegyike négy egyedi allélt mutatott; B és Z mindegyike hat egyedi alléllal rendelkezett különböző lókuszokon. Ez alapján az A, B, C, Z és AI populációk fontosnak tekinthetők a genetikai diverzitás fenntartása szempontjából a teljes szürkemarha populációra nézve. A becsült egyedi allélikus gazdagság csökkenő trendet mutat az A gulya irányától a Q populáció felé, bár a Z és AI gulyáknak van a legnagyobb egyedi allélikus gazdagságuk (rendre; 0,39 és 0,32). Allélikus gazdagságot illetően az A, B és F populációk hatos érték felettiek. A legalacsonyabb allélikus gazdagságot az AA, AF, AG, AK, AH csordák mutatták (AR: 4,99-4,49).

A páronkénti egzakt populáció eltérési teszt azt mutatta, hogy a négy populációpáron kívül (H vs. Q, X vs. Q, X vs. C és X vs. T) az összes gulyát genetikailag önálló egységként lehet tekinteni, melyek szignifikánsan ($p < 0,05$) különböznek egymástól.

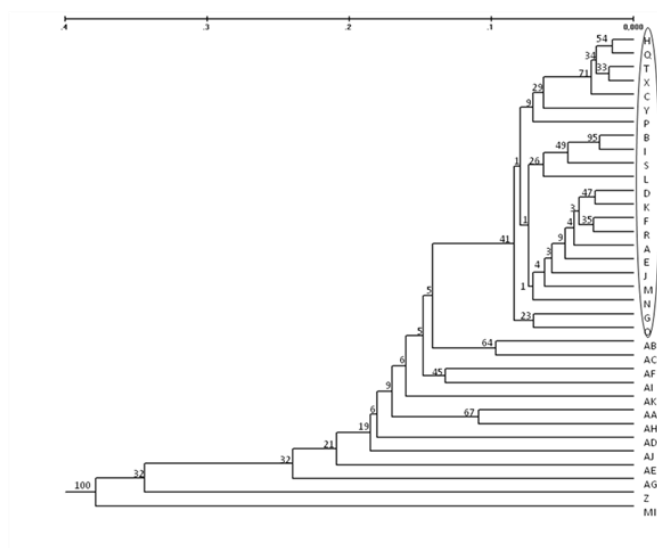
A becsült F_{st} értékeken ($p \leq 0,000$) elvégzett PCoA analízis tizenkettő állományt fedett fel (Z és AA-AK), melyek eltértek a szürkemarha gulyák többségétől (3.4.1. ábra). E tizenkét populáció páronkénti F_{st} értékei (0,060-0,119) a többi tenyészethez viszonyítva a közepes, 0,050-0,150 genetikai távolság (HARTL és CLARK 1997) határértékei közé estek. A fennmaradó huszonkettő tenyészet egymás között mért genetikai távolság értékei 0,003 és 0,05 között voltak. Az F_{st} a marenman (MI) és A-Y illetve marenman és Z-AK csoportok között 0,090 és 0,100 értékeket vettek fel, melyek közepes genetikai differenciálódást jelentenek. Az $F_{st(Z-MI)}$ volt a legmagasabb (0,169) érték, amely igen nagy genetikai differenciálódásnak felel meg, ugyanakkor a Z gulya az alapító populációk közül kettőhöz, az A és B populációkhoz volt a legközelebb ($F_{st(Z-A)}=0,086$; $F_{st(Z-B)}=0,086$).



3.4.1. ábra

Becsült páronkénti F_{st} értékeken, Genalex modullal elvégzett principális komponens analízis grafikus reprezentációja. A kék, nem címkézett csordák (A-Y) genetikai eltérése egymástól alacsony. A piros kóddal ellátott populációk közepes eltérést mutatnak az A-Y magpopulációtól. A százalékos értékek a komponens tengelyek mellett az adott komponens által magyarázott varianciarányadot jelzik.

A Nei-féle genetikai távolságokon alapuló dendrogramon (3.4.2. ábra) a szürkemarha tenyészetek kettő fő csoportot mutatnak. A bekarikázott tenyészetkódok azon gulyákat mutatják, melyek genetikailag a legkevésbé eltérőek egymástól. Ezen szürkemarha populációk ugyanazok, amelyeket korábban principális komponens analízissel azonosítottunk (kék, nem jelölt tenyészetek az 3.4.1. ábrán)



3.4.2. ábra

34 szürkemarha és egy maremman populáció Nei-féle genetikai távolságain alapuló dendrogramja. A bekarikázott csoportok egymástól mért genetikai távolságai alacsonyak, a csoportok differenciáltsága minimális. A bootstrap értékek az elágazásokon láthatók.

A szürkemarha fajtában észlelt tizenkettő, a magpopulációtól eltérő gulya létezése utalhat genetikai sodródási eseményekre, izolációra vagy esetleges introgresszióra más fajták felől. Izoláció valóban történt a Z gulya esetében, mely körülbelül 100 évig volt elzárva az állomány többi részétől.

Ebben a vizsgálatban a szürkemarhák túlnyomó többsége soha nem sorolódott a maremman klaszterbe, amely egyezést mutat PARISSET és mtsai (2010) eredményével, ahol a hasonlóság a két fajta között csak fenotípusosan volt fellelhető. Ugyanakkor a Genalex és GeneClass programok kettő illetve öt egyedet (0,06 ill. 0,16 %-a a vizsgált egyedszámnak) a maremman klaszterbe helyeztek. Structure által végrehajtott osztályokba soroláskor hatvankilenc szürkemarha (2,13%-a a vizsgált egyedszámnak) maremmanként azonosítódott 0,346 valószínűségi értékkel, miszerint maremman felmenőkkel rendelkezhetnek. A BAPS szoftver admixture opcióját használva, tíz szürkemarha egyed került bele a maremman klaszterbe ahol a csoportba tartozási együtthatójuk 0,50-0,67-ig változott 0,080-0,340 valószínűségekkel. Pontosabb maremmanhányad meghatározás céljából ezen állatokat érdemes lenne körültekintően kiválasztott, teljes genom átfésülésből (pl. Illumina Bovine genotipizáló chip adataiból) származó SNP lókuszokkal megvizsgálni hasonló módon, mint FRKONJA és mtsai (2012) demonstrálta svájci kettős hasznosítású szarvasmarha esetében.

Összefoglalva, tizenkettő szürkemarha gulyát azonosítottunk, amelyek állatai különös figyelemmel vonhatóak csak be egy teljesgenom átfésülésen alapuló populációgenetikai vizsgálatba, a félrevezető eredményeket elkerülendő. Azonosítottunk olyan tenyészeteket is, melyek fontosak az egész populáció genetikai sokszínűségének fenntartásában. Jelen vizsgálatok segítséget tudnak nyújtani a jövő kutatásaihoz, és hozzájárulhatnak a pénzügyi és tudományos erőforrások megfelelő csoportosításához (BOETTCHER és mtsai, 2010), a fajta hatékony fenntartásához.

3.5. Szarvas, mikroszatellit

Összesen 41 mikroszatellitet teszteltünk. Végül kilenc lókuszt választottunk ki a negyvenegy közül, amelyek megfelelő mintázatot adtak agaróz vagy kapilláris elektroforetikus elválasztás után mind a gím- mind a dámszarvas esetében.

A megfigyelt allélhosszak ismeretében a primerek fluoreszcens festékekkel történő jelöléseit úgy alakítottuk ki, hogy azok multiplexálása lehetséges legyen.

Gímszarvas esetében a kombinált szülői kizárási valószínűségek (CEP) az egyik szülőre vonatkoztatva a 4 és 5-plex esetében 92 illetve 95 % értékek voltak. A két reakció együttes CEP értéke 99,6 % (3.5.1. táblázat). Heterozigóta hiány a legtöbb lókusz esetében megfigyelhető volt, de a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés csak egy lókuszon volt megfigyelhető a B farm esetében, az IDVGA59 lókusznál.

	Farm A N=67	Farm B N=52	Farm A+B N=119	Farm A+B N=119	Farm A+B N=119	Farm A+B N=119
lókuszok száma	9	9	9	8	5	4
Ho átlag	0,6892	0,7392	0,7121	0,6950	0,7524	0,6618
He átlag	0,7790	0,7991	0,8017	0,7979	0,0811	0,7910
PIC átlag	0,7466	0,7699	0,7761	0,7738	0,7841	0,7694
Fis	0,156	0,153				
CnEP (első szülő)	0,0080	0,0038	0,0037	0,0071	0,04613	0,0777

3.5.1. táblázat.

Multiplex készletek jellemzése két farm állatain. (N: vizsgált állatok száma, Ho és He: a megfigyelt és várt heterozigóitások értékei, PIC: polimorfizmusok információtartalma, CnEP: kombinált nem-kizárási valószínűség)

A két PCR készlet alkalmas gímszarvasok származásellenőrzésére és alkalmas lehet más fajták, más farmokon való ellenőrzésére is. A két készletből összefésült nyolc-plex reakció 99,3 %-os kizárási valószínűséggel jellemezhető (3.5.1. táblázat) és függetlenül a két készlettől, ugyanarra a célra használható.

Ebben a vizsgálatban hét lókusz azonos HAANES és mtsai (2005) által leírt lókuszokkal a következő különbségekkel; i.) a BM4208, NVHRT48 és OarCP26 szimplex reakciókban, ii.) az NVRT73, CSSM066 és NVHRT21 duplex reakciókban, iii.) az RT1 lókuszt triplex reakcióban használták. Ez a hét lókusz benne volt az elsőnek tesztelt primerhalmazban és alkalmasnak bizonyult multiplexálásra. A fennmaradó két lókuszt (DIK082, IDVGA59) más kutatók fejlesztették szarvasmarha fajtában.

A leírt mikroszatellit reakciók (különös tekintettel a nyolc-plex reakcióra) támogatni tudja a vadfenntartással kapcsolatos döntéseket, segít a költségek és ráfordított munka minimalizálásában, minimalizálja a keresztszennyezés és mintafelcserélés lehetőségét. Mivel lehetséges, hogy a multiplex reakció működik más szarvasfajtákon is (BONNET és mtsai, 2002), a kifejlesztett reakció érdekes lehet az e területen dolgozó kollégák számára.

A feltárt genotípus adatok i.) alkalmazhatóak elveszett vagy elkóborolt állatok eredeti populációjához való rendeléséhez, ii.) nélkülözhetetlen alapját szolgáltathatja különféle gazdaságilag fontos tulajdonságok térképezéséhez, iii.) segíthet kiválasztani azon tenyészállatokat, melyek leginkább hozzájárulnak a gímszarvas diverzitásának fenntartásához, iv.) alapját képezheti olyan populációk kereséséhez, amelyek képesek csökkenteni a vizsgált dámszarvas populáció beltenyésztettség állapotát.

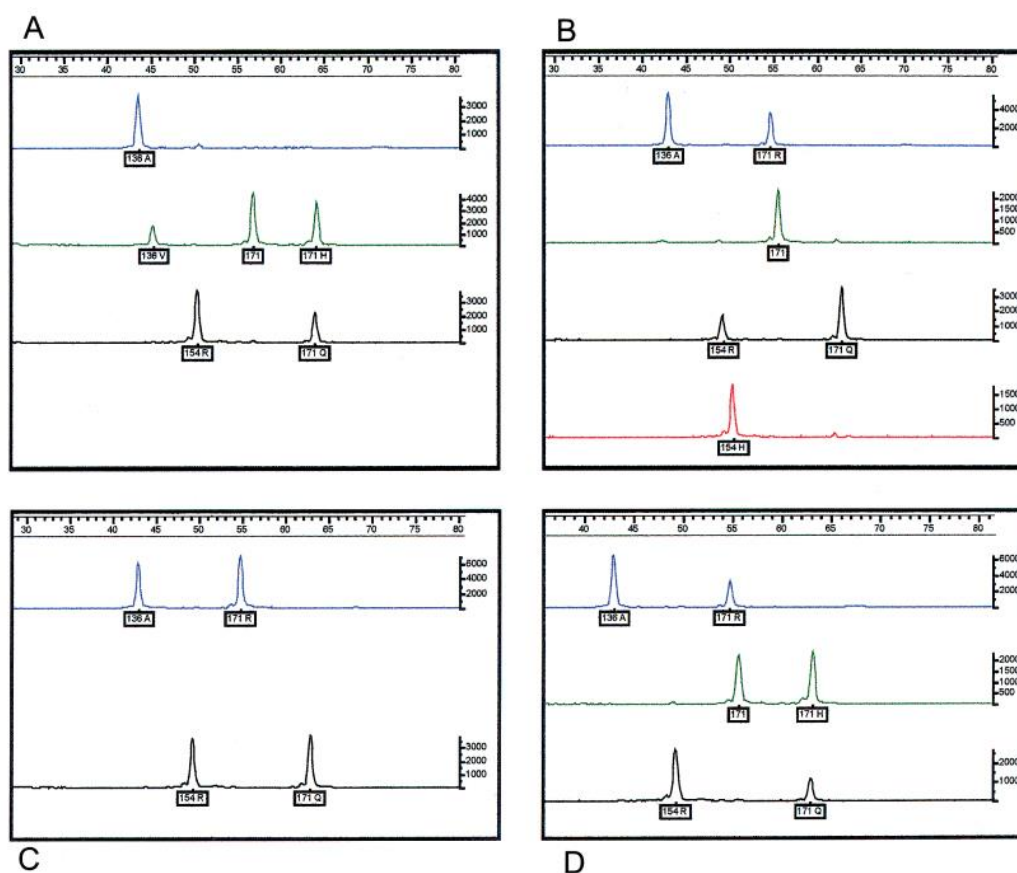
3.6. Prion proteint kódoló gén genotipizálása

Négy primert használtunk az alanin (A) és valin (V) (136. kodon), az arginin (R) és hisztidin (H) (154. kodon) illetve az arginin (R), glutamin (Q) és hisztidin (H) (171. kodon) megkülönböztetésére. A kontrollminták genotípusát szekvenálással állapítottuk meg. Az itt leírt teszt eredménye egyezett a szekvenálási eredményekkel. Más mintákat párhuzamosan PCR-RFLP módszerrel (YUSBASIAN-GURKAN és mtsai, 1999) vizsgáltunk. A kapott adatok egyeztek a mikroszekvenálási

eredményekkel. A mikroszekvenáló primereket a közvetlenül a mutációk mellé terveztük, a hosszukat poly-A illetve poly-T végekkel állítottuk be. A gyártó tanácsait követve a primerek közötti hosszkülönbség legalább hat-hét nukleotid volt.

A mutációk a primerkötő helyeken nem valószínű, hogy befolyásolják a betapadást a következő okok miatt; i.) az fent említett primerek olvadási hőmérséklete az 5' végek nélkül 62-64 °C, ii.) az amplifikált régió csak 266 bp; és iii.) a kapcsolódási esemény 50 °C-on játszódik le. Amennyiben a primerek tapadása mégsem történne meg, akkor az könnyen észrevehető az elektroforetikus csúcsok teljes eltűnésén keresztül. Az ilyen jelenség biztos elkerülése véget degenerált primereket lehet használni vagy/és a szemben lévő komplementer szálát is fel lehet használni a primertervezésnél.

Néhány kiválasztott genotípus elektroforetikus mintázata az 3.6.1. ábrán látható. A mintázat kiértékelése egyszerű algoritmussal automatizálható.



3.6.1. ábra

ARH/VRQ (A), ARR/AHQ (B), ARR/ARR (C), ARR/ARH (D) genotípusok elektroforetikus mintázata. A kodon száma és a hozzá tartozó aminosav egybetűs kódja az adott csúcs alatt látható. A 171-el jelölt zöld csúcs azt jelenti, hogy ezen csúcs melletti 171H és 171Q jelzésű csúcsok hivatottak eldönteni a genotípust. A: az aminosavak H és Q a 171-es pozícióban. B: a kék 171-es és kék 171R csúcsok alapján a genotípus további meghatározásába a következő csúcs, a 171Q is beleszámít. A genotípus ebben az esetben R/Q. C: a kék 171R jelenléte és a zöld 171-es hiánya az jelzi, hogy a genotípus R/R. A következő 171Q csúcs csak megerősíti az előbbi genotípust. D: A kék 171 R magában jelzi, hogy az egyik allél R. A további 171 és 171 H csúcsok arra utalnak, hogy a második allél H. A genotípus R/H. A 171 Q megerősíti a leolvasott R allél meglétét.

2002-ben 2003-ban a Magyar Juhtenyésztők Szövetségének segítségével az egész országban elkezdődött a vérminták gyűjtése. Akkori célunk a merinó tenyészkosok, a racka, cigája, cikta, illetve az angol tejelő állomány felmérése és rizikócsoportokba való besorolása volt.

A módszert azok számára ajánljuk, akiknek nagy mennyiségű mintát kell megvizsgálniuk és nincs lehetőségük 5' nukleáz kémiát vagy piroszekvenálást alkalmazni, de képesek fluoreszcensen jelzett fragmenteket analizálni. Több lókus vizsgálat is beépíthető az eljárásba, amennyiben több surlókór rezisztenciával kapcsolt mutáció (HUNTER és mtsai, 2000) válik ismertté.

3.7. Merinó kosok vizsgálata termelési tulajdonság és prion protein genotípusok kapcsolatára

A preferált ARR/ARR genotípus közepes nagyságú gyakorisággal fordult elő mindkét fajtában (25 % körül a magyar merinóban, 20 % körül a német merinóban). A magyar merinó növekedési átlagainak és standard deviációinak analízise nem mutatott szignifikáns különbséget a három genotípus között, ugyanakkor -általános tendenciaként megfigyelve- az ARR/XXX genotípussal rendelkező bárányok kiemelkedőek voltak a növekedésben illetve az egy- és kétéves testsúlyban.

A hazai tenyésztésű német merinó kosoknál nem volt szignifikáns különbség a különböző genotípusoknál mért tulajdonságok értékeiben. Az import csoport báránykori súlygyarapodásában szignifikáns különbség volt megfigyelhető a különböző genotípus osztályokat illetően. Az import csoportban a hízékonysági adatok nem voltak hozzáférhetőek, mert ezen adatokat az exportáló ország nem használja hús jellemzésre. Az ARR allélt nem hordozó juhok minden mérőszámában jobban teljesítettek (3.7.1. táblázat).

A várt genotípus gyakoriságoktól csak a német merinó kosok mutattak eltérést. A csoportot ketté osztva -hazai és import állomány- és a vizsgálatot megismételve a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést csak a hazai tenyésztésű csoportban találtunk (3.7.2. táblázat). A megfigyelt és várt genotípusok gyakorisági értékei közötti különbség szignifikánsnak bizonyult. A Hardy-Weinberg egyensúly hiányának oka lehet az egyszerre többféle tulajdonság javítását célzó szelekció.

Tulajdonság	ARR/ARR		ARR/XXX		XXX/XXX		összes	
	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD
súlygyarapodás, g/nap	360,90*	50,36	374,00*	65,60	422,24*	65,61	383,14	66,57
1 éves súly, kg	80,82	12,50	83,93	11,16	88,53	11,77	84,53	11,60
2 éves súly, kg	107,45	14,31	105,00	13,41	116,71	15,89	108,10	14,76

SD: standard deviáció, *: a szignifikáns kapcsolatot jelzi $p \leq 0,05$ szinten

3.7.1. táblázat

Az import német merinó növekedési tulajdonságainak leíró statisztikája

Fajta	állatok száma	ARR/ARR	ARR/XXX	XXX/XXX	χ^2
német merinó, import	73	15 (11)	21 (17)	36 (45)	4.077
német merinó, hazai tenyésztés	142	42 (32)	70 (91)	29 (19)	12.13

3.7.2. táblázat

A prion protein genotípusok megfigyelt és várt (a zárójelek között) értékei a német merinó kosokban.

A magyar merinó és a hazai tenyésztésű német merinó populációk nem mutattak szignifikáns kapcsolatot a prion protein genotípusok és a növekedési jellemzők között, kivéve az ARR haplotípust nem hordozó import német merinó csoportot, amely szignifikánsan jobban ($p \leq 0,05$) szerepelt a napi testsúly gyarapodásban (3.7.2. táblázat). Az interakció gyengének bizonyult (korrelációs koefficiens 0,291) és a genotípus a napi súlygyarapodás teljes varianciájának 9,6 százalékáért volt felelős.

A napi gyarapodás és az ARR haplotípus közötti negatív kapcsolat lehet a bizonyítéka annak a genetikai veszteségnek, melyet WING-YOUG és mtsai (2007) modelleztek surlókór rezisztenciára történő szelekciós feltételekkel. Ez megmagyarázhatja, amiért a hatás azok között az import állatok között volt fellelhető, amelyek kiindulási országában a surlókór rezisztenciára való szelekció korábban elkezdődött, mint Magyarországon.

Az eredmény összhangban van BRANDSMA és mtsai (2004) kutatásaival, ahol alacsony negatív hatást találtak az ARR allél és a 135 napos súly között.

Mivel az ARR haplotípus kimutatott hatása a napi súlygyarapodásra nagyon alacsony és a genetikai előrehaladás hosszú távon behozza lemaradását (WING-YOUG és mtsai, 2007), az átmeneti stagnálás vagy a genetikai előrehaladás átmeneti csökkenése az ár, amit a jövő surlókór rezisztens fajtáinak létrehozásáért fizetni kell.

4. Új tudományos eredmények

Az értekezésben a PhD fokozatszerzés óta eltelt tizennyolc évnyi kutatómunkám egy részét foglaltam össze, többségében hazai állatállományokra fókuszálva. A római számozás a doktori értekezés X. fejezetében feltüntetett besorolásnak felel meg.

- I-III Mangalica vizsgálatok** (lásd 2.2.1 és 2.2.2 fejezet)
- Igazoltuk, hogy a mangalica genetikai háttere alapján három csoportba sorolható. A három csoport megfelel a szőke, vörös és fecskehasú fajtáknak.
 - A mikroszatellit eredményeket teljes genom vizsgálattal validáltuk.
 - Hat SNP lókusszal alternatív megoldást kínáltunk a fajták mikroszatellitekkel történő azonosításának felváltására.
 - Laboratóriumi körülmények biztosítása nélkül használható gyorseszteret fejlesztettünk ki.
- IV Racka, mikroszatellit vizsgálatok** (lásd 2.2.3 fejezet)
- Igazoltuk a fekete és fehér racka genetikai differenciáltságát, melyet más juh fajta-párok kontextusában is megvizsgáltuk.
- V Magyar szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok** (lásd 2.2.4 fejezet)
- A magyar szürkemarha állomány tenyészetekre lebontott genetikai struktúráját felmértük.
 - Olyan tenyészeteket azonosítottunk, melyek különleges figyelmet érdemelnek diverzitás, génfenntartás szempontjából.
- VI Szarvas, mikroszatellit** (lásd 2.2.5 fejezet)
- Kettő, addig szarvasnál nem használt mikroszatellit alkalmaztunk származásellenőrzési célra.
 - Egy 4-plex, egy 5-plex illetve egy 8-plex PCR csomagot hoztunk létre gímszarvas származásellenőrzéshez.
- VII Prion proteint kódoló gén genotipizálása** (lásd 2.2.6 fejezet)
- Új vizsgálati eljárást hoztunk létre a surlókór rezisztenciával kapcsolt prion protein gén változatainak meghatározására.
- VIII Merinó kosok vizsgálata, termelési tulajdonság és prion protein genotípusok kapcsolata** (lásd 2.2.7 fejezet)
- Német merinó kos állományban igazoltuk a surlókór rezisztens genotípusra való szelekció negatív hatását.

5. Az új tudományos eredmények tagolásának megfeleltethető saját publikációk listája

- I. Zsolnai A., Radnóczy L., Fésüs L., Anton I. (2006) Do Mangalica Pigs of Different Colours Really Belong to Different Breeds? *Archiv für Tierzucht-Archives of Animal Breeding*, 49:(5), 477-483.
- II. Zsolnai A., Szántó-Egész R., Anton I., Tóth P., Micsinai A., Rátky J. (2013) Mangalica fajták genetikai távolsága, elkülönítésük nukleotid polimorfizmust mutató DNS markerekkel. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 135:(5), 303-307.
- III. Szántó-Egész R., Jánosi A., Mohr A., Szalai G., Koppányné Szabó E., Micsinai A., Sipos R., Rátky J., Anton I., Zsolnai A. (2015) Breed-Specific Detection of Mangalica Meat in Food Products. *Food Analytical Methods*, 9:(4), 889-894.
- IV. Zsolnai A., Anton I., Rátky J., Bruford M., Egerszegi I. (2014) Fekete és fehér racka genetikai különbözőségének mértékének felmérése DNS analízissel. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 136:(1), 27-31.
- V. Zsolnai A., Kovács A., Anton I., Rátky J., Brüssow K.P., Józsa Cs., Bán B., Gyurmán A. (2014) Comparison of different Hungarian Grey herds as based on microsatellite analysis. *Animal Science Papers and Reports*, 32:(2), 121-130.
- VI. Zsolnai A., Lehoczky I., Gyurmán A., Nagy J., Sugár L., Anton I., Horn P., Magyary I. (2009) Development of eight-plex microsatellite PCR for parentage control in deer. *Archiv für Tierzucht-Archives of Animal Breeding*, 52:(2), 143-149.
- VII. Zsolnai A., Anton I., Kuhn C., Fesus L. (2003) Detection of single-nucleotide polymorphisms coding for three ovine prion protein variants by primer extension assay and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24, 634-638.
- VIII. Barbara Nagy, István Anton, László Sáfár, László Fésüs, Zsolnai A. (2009) Association between PrP genotypes and selected growth traits of Hungarian Merino and German Mutton Merino rams. *Archiv für Tierzucht-Archives of Animal Breeding*, 52, 553-649.

6. Irodalomjegyzék

- BANKS, M.A., EICHERT, W. (2000) WHICHRUN (version 3.2): a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data. *Journal of Heredity*, 91, 87-89.
- BOETTCHER, P.J., TIXIER-BOICHARD, M., TORO, M.A., SIMIANER, H., EDING, H., GANDINI, G., JOOST, S., GARCIA, D., COLLI, L., AJMONE-MARSAN, P. and the GLOBALDIV CONSORTIUM (2010) Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41 (suppl. 1), 64–77.
- BONNET, A., THÉVENON, S., MAUDET, F., MAILLARD, J.C. (2002) Efficiency of semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 11 microsatellite markers for genetic studies of deer populations. *Anim Genet.* 33, 343-350.
- BRANDSMA, J.H., JANSS, L.L.G., VISSCHER, A.H. (2004) Association between PrP genotypes and litter size and 135 days weight in Texel sheep. *Livest Prod Sci* 85, 59-64.
- CORANDER, J., WALDMANN, P., SILLANPÄÄ, M.J. (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163, 367-374.
- DUCHESNE, P., GODBOUT, M.H., BERNATCHEZ, L. (2002) PAPA (package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Molecular Ecology Note* 2: 191-193.
- EXCOFFIER, I., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- FALUSH, D., STEPHENS, M., PRITCHARD, J.K. (2003) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
- FRKONJA, A., GREDLER, B., SCHNYDER, U., CURIK, I., SÖLKNER, J. (2012) Prediction of breed composition in an admixed cattle population. *Animal Genetics*, 43, 696-703.
- GARCIA, D., MARTINEZ, A. et al. (2006) Estimation of the genetic admixture composition of Iberian dry-cured ham samples using DNA multilocus genotypes. *Meat Science*, 72, 560–566.
- GOUDET, J. (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- HAANES, H., ROSEF, O., VEIBERG, V., RØED, K.H. (2005) Microsatellites with variation and heredity applicable to genetic studies of Norwegian red deer (*Cervus elaphus atlanticus*). *Animal Genetics*, 36, 454-455.
- HARTL, D. L., CLARK, A. G. *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA, USA; 1997.
- HONG, C.B., KIM, Y.J. et al. (2012) BioSMACK: a linux live CD for genome-wide association analyses. *BMB reports*, 45, 44-46.
- HUANG, W., KIRKPATRICK, B.W. et al. (2010) A genome-wide association study using selective DNA pooling identifies candidate markers for fertility in Holstein cattle. *Animal Genetics*, 41, 570–578.
- HUNTER, N., GOLDMANN, W., MARSHALL, E., O'NEILL, G. (2000) Sheep and goats: natural and experimental TSEs and factors influencing incidence of disease. *Arch. Virol. Suppl.* 16, 181-188. Review.

- KALINOWSKI, S.T. (2005) HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5, 187-189.
- KIJAS, J. W., LENSTRA, J. A. et al. (2012) Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS Biology*, 10, e1001258.
- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUIK, L.E.B., PEMBERTON, J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639-655.
- MILLER, M.P. (1997) Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Distributed by the author.
- PARK, S.D.E. (2001), Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [Ph.D. thesis] University of Dublin
- PATTERSON, N., PRICE, A.L., REICH, D. (2006) Population Structure and Eigenanalysis. *PloS Genetics*, 2. e190.
- PEAKALL, R., SMOUSE, P. E. (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- PIRY, S, ALAPETITE, A, CORNUET, J.-M., PAETKAU, D., BAUDOUIN, L., ESTOUP, A. (2004) GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95, 536-539.
- RANNALA, B., MOUNTAIN, J.L. (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 9197-9221.
- ROUSSET, F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- TAKEZAKI, N., NEI, M., TAMURA, K. (2010) POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 747-752.
- WING-YOUNG, N.M., LEWIS, R.M., BOULTON, K., VILLANUEVA, B. (2007) Predicting the consequences of selecting on PrP genotypes on PrP frequencies performance and inbreeding in commercial meat sheep populations. *Genet Sel Evol* 39, 711-729.

7. Köszönetnyilvánítás

A társszerzőim széles ismeretanyaga, valamint segítőkészsége óriási mértékben segítette az itt ismertetett (és az itt nem ismertetett) munkák megvalósulását.

A mangalicapopuláció mikroszatellitokkal való felmérését, melyekre alapozva további vizsgálatokat indíthattunk, kiemelkedő szerepet játszó kollégák Fésüs László, Koppány Gábor és Radnóczy László voltak.

A mangalica fajták SNP lókuszt vizsgálataiban kiemelkedő szerepet játszottak Micsinai Adrienn, Rátky József és Tóth Péter, akik részvétele sokat lendített a projekt megvalósulásában.

A fekete és fehér rackák összehasonlító vizsgálatait Egerszegi István inspirálta, és annak megvalósítását az ISAG nemzetközi összehasonlító tesztekben, illetve az ECONOGENE pályázatban való részvétel tette lehetővé.

A szürkemarha tenyészetek vizsgálatának lehetőségét Magyar Szürke Szarvasmarhát Tenyésztők Egyesületének és Péntek Istvánnak köszönhetem, aki a mikroszatellit genotípusokhoz való hozzáférést lehetővé tette. Az adatok kiértékelése után a NÉBIH és a tenyésztő szervezet képviselőivel, illetve Kovács Andrással folytatott beszélgetések inspiráló légköre felejthetetlen élménnyel gazdagított.

A prion protein genotípusok tesztjének kifejlesztése és alkalmazása (sem) jöhetett volna létre közvetlen munkatársaim -Fésüs László és Anton István- törődő közreműködése nélkül.

A dolgozat elkészítésében nyújtott segítségért Szabó Andrásnak illetve Orbán Lászlónak mondok köszönetet. Orbán Lászlóval végzett korábbi elektroforézis és zebradániós munkáimnak mai napig nagy hasznát veszem.

Köszönettel tartozom Kovács Melindának, Szendrő Zsoltnak, és a többi kaposvári/herceghalmi kollégának, akik kérdéseikkel, rábeszélésükkel motiváltak a dolgozat benyújtásában.

Feleségem Harczi Ildikó és szüleinek támogatása felbecsülhetetlen értéket képvisel. Köszönöm gyermekeimnek (Rita, Dániel, Lilla és Regő) azon pillanatait, amikor odafigyelve hallgatták -szándékom szerint látókörnövelési célzattal előadott-kutatással összefüggő eszmefuttatásaimat.

Végül köszönet Dömsödi Alexnek és szüleimnek, Zsolnai Jánosnak és Császár Máriának.