

MTA Doktori Értekezés

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

Zsolnai Attila

(Ph.D.)

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

2019

“I do not know what I may appear to the world, but to myself I seem to have been only like a boy playing on the sea-shore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me”

Sir Isaac Newton

TARTALOMJEGYZÉK

<i>Előszó</i>	6
I. MANGALICA SERTÉSPOPULÁCIÓ VIZSGÁLATA MIKROSZATELLIT MARKEREKKEL	8
I.1 Összefoglalás	8
I.2 Bevezető	8
I.3 Anyag és módszer	10
I.4 Eredmények és megbeszélés	11
II. MANGALICA FAJTÁK GENETIKAI TÁVOLSÁGA, ELKÜLÖNÍTÉSÜK NUKLEOTID POLIMORFIZMUST MUTATÓ DNS MARKEREKKEL	18
II.1 Összefoglalás	18
II.2 Bevezetés	18
II.3 Anyag és módszer	18
II.3.1 Minták	19
II.3.2 Genotipizálás	19
II.3.3 Analízis	19
II.4 Eredmények	20
II.5 Következtetések	22
III. MANGALICAEREDET DETEKTÁLÁSA ÉLELMISZERTERMÉKEKBEN	24
III.1 Összefoglalás	24
III.2 Bevezetés	24
III.3 Anyag és módszer	25
III.3.1 Minták	26
III.3.2 DNS előkészítés	26
III.3.3 Primerek és sokszorosítás	27
III.4 Eredmények és megbeszélés	28
III.5 Következtetések	32

IV. FEKETE ÉS FEHÉR RACKA GENETIKAI KÜLÖNBÖZŐSÉG MÉRTÉKÉNEK FELMÉRÉSE DNS ANALÍZISSEL.....	34
IV.1 Összefoglalás	34
IV.2 Bevezetés.....	34
IV.3 Anyag és módszer	36
IV.4 Eredmények és következtetések	37
V. MAGYAR SZÜRKEMARHA TENYÉSZETEK KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA MIKROSZATELLIT MARKEREKKEL	41
V.1 Összefoglalás	41
V.2 Bevezetés.....	41
V.3 Anyag és módszer	43
V.3.1 Minták és mikroszatellitek	43
V.3.2 Adatok feldolgozása	43
V.4 Eredmények és megbeszélés	44
VI. SZÁRMAZÁSELLENŐRZÉS CÉLJÁBÓL KIFEJLESZTETT MULTIPLEX PCR SZARVASBAN.....	53
VI.1 Összefoglalás	53
VI.2 Bevezetés.....	53
VI.3 Anyag és módszer	54
VI.4 Eredmények és megbeszélés	57
VII. A SURLÓKÓR REZISZTENCIA KIMUTATÁSA	62
VII.1 Összefoglalás	62
VII.2 Bevezetés.....	62
VII.3 Anyag és módszer	65
VII.4 Eredmények és megbeszélés	66
VIII. A SURLÓKÓR-REZISZTENCIÁT BEFOLYÁSOLÓ PRION PROTEIN GENOTÍPUSOK ÉS NÉHÁNY NÖVEKEDÉSI TULAJDONSÁG KAPCSOLATA MAGYAR MERINÓ ÉS NÉMET MERINÓ KOSOKBAN.....	73
VIII.1 Összefoglalás	73

VIII.2	Bevezetés	73
VIII.3	Anyag és módszer	74
VIII.3.1	Állatok és adatok	74
VIII.3.2	PrP genotipizálás	74
VIII.3.3	Statisztikai analízis	75
VIII.4	Eredmények és értékelés	75
IX.	Irodalom	78
X.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	88
I-III	Mangalica vizsgálatok.....	88
IV	Racka, mikroszatellit vizsgálatok	88
V	Magyar szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok	88
VI	Szarvas, mikroszatellit	88
VII	Prion proteint kódoló gén genotipizálása	88
VIII	Merinó kosok vizsgálata termelési tulajdonság és prion protein genotípusok kapcsolata	88
XI.	Az új tudományos eredmények tagolásának megfeleltethető saját publikációk listája	89
XII.	Eredmények felhasználása	90
XIII.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	91

Előszó

A különféle populációk vizsgálata nem csupán a kutatók érdeklődését elégíti ki, de jelentős visszahatással bírhat a tenyésztőkre illetve piaci sikerükre nézve is. Az állattenyésztést gyakorlók számára nagyon fontos a “Miért hasznos nekem, ha az állataim mintáját vizsgálják?” kérdésre adandó válasz. Ha a tenyésztő erre használható választ kap, és az állatokon kapott eredményeket vissza is kapja, akkor nagy valószínűséggel a vizsgálatokból, kutatásokból előnye fog származni.

Az állattenyésztést szolgáló genetikai eljárások egyik célja, hogy olyan génváltozatokat (alléleket), inzerciókat, deléciókat, pontmutációkat tudjon megtalálni, és pontosan meghatározni - melyek gazdaságilag fontos értékmérő tulajdonságok vagy öröklött betegségek kialakulásáért, betegségekkel szembeni rezisztenciáért felelősek vagy azokkal közeli kapcsoltságban állnak - azért, hogy az allélok tenyésztési programokban lehessen felhasználni már a kérdéses tulajdonságok megjelenése előtt.

A következőkben kiválasztott vizsgálati alanyok (állatfajok) és eljárások reményeim, illetve ismereteim szerint hozzá tudtak járulni a magyar állattenyésztés molekuláris markerekkel bővített gyakorlatához, továbbá a jelenleg alakuló, tervezett és éppen futó projektekhez.

A mangalica, és racka esetében a mikroszatellit vizsgálatok felmerülő, eldöntendő kérdést igyekeztek tisztázni, míg a magyar szürkemarha (továbbiakban szürkemarha) esetében a kutatás olyan tenyészetet illetve tenyészetcsoportokat tárt fel, melyekre különböző okok miatt érdemes odafigyelni. A szarvas mikroszatellit markerekkel való vizsgálata azért jött létre, hogy a háziállatoknál már bevált szülői származásellenőrzést a szarvasnál is lehessen olyan egyszerű módon alkalmazni, mint háziállataink esetében.

A mangalica és a gímszarvas abban a „szerencsében” részesülhetett, hogy a legmodernebb eljárásokkal, köztük SNP-chippel végzett vizsgálattal azok genomja vizsgálhatóvá vált. Ezen mangalica vizsgálatok egy része szintén az értekezésben olvasható.

A merinó (magyar és német) populáció egyrészt a juhok fertőző, szivacsos agyvelőlagyulással szemben mutatott rezisztenciacsoportjainak SNP alapú kimutatására kifejlesztett genotipizálási eljárásunk miatt, másrészt az eljárás a termelési tulajdonság és rezisztens genotípus kapcsoltságának vizsgálata miatt került az értekezésbe, példaként arra, hogy populációfelmérés nem csak mikroszatellit készletekkel vagy SNP-chippel, hanem célzottan, egy-egy gén állapotának megismerésével is elvégezhető. A vizsgálat itt is tenyésztői szempontból fontos, eldöntendő kérdést tisztázott.

I. MANGALICA SERTÉSPOPULÁCIÓ VIZSGÁLATA MIKROSZATELLIT MARKEREKKEL

I.1 Összefoglalás

Különböző földrajzi helyekről, tenyészetekből gyűjtött őshonos magyar mangalica sertés fajták között vizsgáltuk a genetikai kapcsolatot tíz mikroszatellit marker (S0005, S0090, S0101, S0155, S0355, S0386, SW24, SW240, SW857, SW951) segítségével annak érdekében, hogy jellemezzük a mangalica populációt és tudományos alapot biztosíthassunk a további kutatásokhoz, illetve gyakorlatban alkalmazható tenyésztési célokhoz.

A munkahipotézisünket, miszerint a mangalica egyedek egyetlen fragmentálatlan populációt alkotnak, el tudtuk vetni. A genetikai markerek alapján becsült populációklaszter-érték három, amely a fajtatörténettel egybevágh. A becsült genetikai távolságok (D_s , D_a , F_{st}) a legkisebbek voltak a fecskehasú és szőke között, míg a vörös mutatta a legnagyobb genetikai távolságot a fecskehasúhoz és a szőkéhez viszonyítva. Kutatásunk eredménye bizonyítja a különböző populációk meglétét. Az eredményeket fel lehet használni egyedek különböző mangalica fajtákba való sorolásához (83-91 %-os megbízhatósággal), amennyiben az szükséges.

I.2 Bevezető

A mangalica sertés, melynek elődje valószínűsíthetően az avarok által tartott (a.d. 800-900) lápi sertés fajta volt az őse, a takarmányozási célra igénybe vehető gabonafeleslegék megjelenésével az 19. század első felében (1833) alakult ki Magyarországon. Kialakításában a bakonyi, a szalontai, az alföldi és a szerémi fajták, valamint a délvidékről származó sumadia sertés vettek részt (EGERSZEGI és mtsai, 2003, ENESEI DORNER, 1925). Mintegy 80 év alatt a mangalica az egész országban elterjedt és a kialakításában részt vevő primitív fajták nyomtalanul kihaltak.

Ebben az időben a mangalica még nem nevezhető fajtának, inkább az akkori értelemben vett modern zsírsertés típust jelentette. Több színváltozatban tenyésztették, az állomány döntő többsége szőke mangalica volt, de megtalálható a fekete, a fecskehasú, a vörös, a barnás-szürkés ordas és a vadas, vagy "baris" színváltozat is. Az „alaptípus” a szőke mangalica volt, amely az

állomány döntő többségét alkotta. A szalontai fajtával történt keresztezésből jött létre a vörös színű „újszalontai” fajta, amelyet jelenleg vörös mangalicának nevezünk (HANKÓ, 1940). A ma már ismeretlen szerémségi sertés keresztezésével alakult ki a maga korában robusztusságáról, nagy ellenálló képességéről híres fecskehasú mangalica. A többi színváltozat a három mangalicafajta, esetleg további más fajták keveréke volt. Ezeket később sem vonták törzskönyvezésbe és kiveszték.

Az első világháború után alakul meg a Mangalicatenyésztők Országos Egyesülete, amely megszervezte a fajta céltudatos nemesítését. A törzskönyvezett mangalicák száma az 1920-as években még csak 1-2000 volt, de 1943-ig 30 000-re növekedett. Egy 1940-es vásárnaptárban 66 szőke mangalica, 7 fecskehasú mangalica és 5 „szalontai jellegű veresszőrű mangalica” törzstenyészet hirdette eladásra tenyészállatait.

A háború után megszervezett Magyar Állattenyésztő Szervezetek Országos Szövetsége tevékenysége nyomán a tenyésztés még egyszer fellendül, majd az 1950-es évek végétől a fajta létszámának rohamos csökkenésével 1965-re átadja helyét a modern hússertés fajtáknak. Az állománycsökkenés olyan gyors volt, hogy pár évvel később 1973-ban a minisztérium a mangalica fajta védetté nyilvánításáról döntött, és 1974-től állami támogatással fenntartott génrezerv állományokban folyik tenyésztése. A második állománycsökkenés a mezőgazdasági szektor átszervezésével, 1990-ben történt. Szerencsére a mangalica újra felfedezésre került stressztűrése, betegségekkel szembeni ellenálló képessége, malacfelnevelő képessége és húsának íze miatt (MICKLICH és mtsai, 1999). Ma a piac folyamatosan növekedő mennyiségű mangalica termékre tart igényt.

A génmegőrzési munka során a legelterjedtebb szőke változathoz megfelelő törzskönyvezett alapanyag állt rendelkezésre, míg a fecskehasú és a vörös mangalica fajtát nagy nehézségek árán sikerült rekonstruálni. 2006-ban a magyarországi állományokban 2289 szőke, 450 fecskehasú és 603 vörös egyed tartottak nyilván. Más országokban, Svájcban, Németországban, Ausztriában, Romániában és a balkáni államokban is voltak mangalica egyedek a tenyésztésben (EGERSZEGI és mtsai, 2003).

A színváltozatokat a tenyésztők a törzskönyvezésben mindig is külön kezelték, és a hivatalos fajta-nyilvántartásban a szőke, a vörös, és a fecskehasú mangalica önálló fajtaként szerepel.

Akadnak azonban akik újra, meg újra felvetették, hogy valóban három önálló fajtáról van-e szó, vagy csak egyazon fajta különböző színváltozataival rendelkezünk. A kérdés tisztázása érdekében céloztuk meg a mangalica populáció felmérését a rendelkezésre álló tenyészetek tekintetében.

A genetikai kapcsolatok meghatározását -a sertés genomban is jelen lévő- mikroszatellit DNS markerek változatainak (alléljeinek) analízisével végeztük el, mely markertípust mások korábban sikerrel alkalmaztak szarvasmarha (HANDIWIRAWAN és mtsai, 2003; MAUDET és mtsai, 2002), juh és kecske (JANßEN és mtsai, 2004;), szamár (JORDANA és mtsai, 2001), ló (ABERLE és DISTL, 2004), valamint sertés (NECHTELBERGER és mtsai, 2001; SCHWARZ és mtsai, 2005) esetében.

I.3 Anyag és módszer

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 vércsövekbe gyűjtöttük. A mikroszatellit genotípusok analízisét két eltérő évből származó, eltérő egyedekből álló csoporton illetve az egész mintamennyiségen is elvégeztük, melyek azonos eredményre vezettek.

Mikroszatellit lókuszok 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 Automatikus Fragment Analyzer készülékkel határoztuk meg Genescan és Genotyper programok segítségével.

Az eredmények adatfeldolgozására és ellenőrzésére az alábbi programokat alkalmaztuk:

Microsatellite Toolkit (PARK, 2001) programot használtuk az adatok ellenőrzésére és formázására annak érdekében, hogy megfeleljen a Dispan (TATSUYA, 1993) bemeneti formátumának. Dispan a genetikai távolságok Dst és Da (NEI, 1972, 1978), illetve a filogenetikai fák kiszámításához, vizualizálásához alkalmaztuk. A Structure (FALUSH és mtsai, 2003), GeneClass (PIRY és mtsai, 2004) és GDA (Lewis és ZAYKIN, 2001) programokat az Fst számolásokhoz, SPSS-t diszkrimináció analízis és PCA elemzés céljára használtuk.

I.4 Eredmények és megbeszélés

A munkahipotézis tesztelésére diszkrimináció analízist végeztünk, ahol a független változók a lókuszok allélhosszai voltak. 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), az allélhosszak alkalmasak voltak a különbségtételre. A feltételezett három csoport átlagai szignifikánsan ($p \leq 0.000$) különböztek egymástól, vagyis több mint egy csoport létezik a mangalica populáción belül. A homogén fajtaként való munkahipotézis nem állja meg a helyét.

Az SPSS-el végzett csoportba sorolási valószínűség 83,5 % volt abban az esetben, amikor az előzetes valószínűségeket (minden egyednek azonos esélye van arra, hogy bármelyik csoportba tartozzon) azonosnak állítottuk be. Ez a magas érték azt mutatta, hogy a tenyésztők fenotípus alapon végzett szelekciós munkája jól működött.

A mintasokaságot tovább teszteltük a Structure programmal, amely az egyedeket azok allélfrekvenciái, előfordulási gyakoriságuk szerint sorolja be egy-egy populációba. Az iterációk számát, illetve a számítási időt csökkentendő, az előzetes populációinformációt belevettük a kiindulási állapotba (PRITCHARD és mtsai, 2000). Ezen beállítás esetén az adott populációba tartozás valószínűsége 92 % volt. Amennyiben az előzetes populációinformációt nem használtuk, ugyanakkora iterációszám mellett ezen érték 82 %-ra csökkent. Amikor a klaszterszámot (K) háromra állítottuk be, az eredmények grafikus ábrázolásában a duroc egyedek a háromszög közepén helyezkedtek el, egy negyedik csoportot formálva (I.1. ábra). K értékét négyre állítva a duroc egyedek a negyedik csoportba estek.

Amikor az előzetes populációinformációt szándékosan rosszul állítottuk be néhány állatnál (1-10 egyed egy-egy alkalommal), azok akkor is helyesen sorolódtak be a saját klaszterükbe. Néhány állat viszont fenotípusos bélyegeinek ellenére sem sorolódott be a saját csoportjába. Ezen állatokat érdemes lenne ellenőrizni, vajon a besorolás genotipizálási hiba, mintacsere, vagy tenyésztési okok miatt mutatták a másik csoportba való besorolást.

A korábban említett, Structure programmal számolt 82-94 % helyes besorolási értékekhez hasonló adatok jöttek ki (84-90%) közvetlen és kizárásos szimulációs tesztekkel akár genetikai távolságon, akár valószínűségi értékeken alapuló módszereket használtunk a GeneClass programban. Ezen eredmények azt mutatták, hogy a mangalicák három különböző klaszterbe esnek, melyek megbízhatóan elkülöníthetőek egymástól.

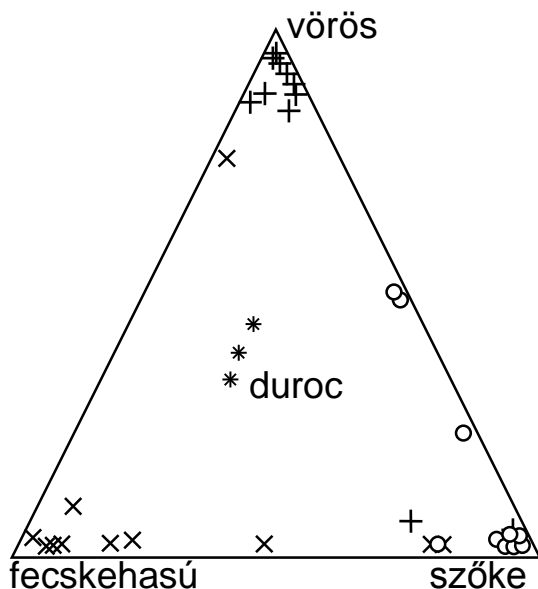
A genetikai távolság érték (pl. az F_{st} , amely 0,064-től 0,099-ig változott) azt mutatja, hogy a három fajta közepesen differenciálódott egymástól, és reflektálja a dokumentált fajtatörténetet, miszerint a szőke és fecskehasú fajta közelebb van egymáshoz ($F_{st}=0,064$), mint a vörös a szőkéhez ($F_{st}=0,094$), illetve a fecskehasúhoz ($F_{st}=0,099$) (I.1. táblázat).

A fecskehasú, vörös és szőke egyedek magas valószínűséggel sorolhatók be a saját csoportjukba. A legvalószínűbb klaszterszám (K) háromnak adódott. A K érték ugyanakkor emelkedett, ha a földrajzi információt is bevontuk a teljes mintamennyiség analízisébe (pl.: a legvalószínűbb K érték kilencnek adódott, ha három sertéstelep mindegyikéről három féle mangalica szerepelt a vizsgálatban).

A sertéstelepek hatásának nagyságát ellenőrizendő -principális komponens analízist (PCA) alkalmazva- kimutattuk, hogy a sertéstelep hatása nem befolyásolja a fent említett diszkrimináciavizsgálat eredményét (vagyis valóban három fő mangalica csoport létezik). Ugyanakkor a földrajzi információ K értékre kifejtett hatása maga után vonja a sertéstelepek tenyésztési közötti genetikai távolságok felvételének lehetőségét, ami a genetikai változatosság fenntartása és az egyedek származási helyének azonosítása szempontjából lehet fontos a sertéstelepek egymás közötti kereskedésében.

A három fajta közötti genetikai távolságok értékei szerint a fecskehasú és a szőke enyhén differenciált egymáshoz képest, míg a vörös közepesen differenciált fajtának tekinthető a másik kettővel szemben (I.1. táblázat).

Ezek az eredmények támogatják a tradicionális alapokon nyugvó szelektációs programot, illetve megerősítik azt a nézetet, miszerint a háromféle mangalica nem egyszerűen színváltozatot jelent, hanem genetikai markerek segítségével is meghatározható, egyértelműen különböző fajtának tekinthető.



I.1. ábra

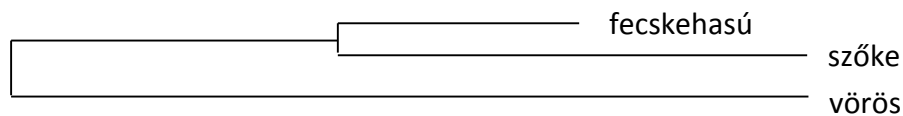
Structure programból származó grafikus output. A mangalica egyedek különböző klaszterekbe esnek, melyek a háromszög csúcsain helyezkednek el. Klaszterszám 3 volt, iterációk száma 125. Az x, +, o, * jelek a fecskehasú, vörös, szőke és duroc egyedeket jelölik.

	fecskehasú	szőke
szőke	0,1138 (0,0426) 0,0845 0,0641	- - -
vörös	0,2002 (0,0775) 0,1883 0,0994	0,1992 (0,0726) 0,1618 0,0945

I. 1. táblázat

Fecskehasú, szőke és vörös mangalica genetikai távolságai.

Az egy blokkban szereplő számok; az első sor a standard genetikai távolságot (Ds) és annak hibáját, a második sor a Da, a harmadik sor az Fst értéket mutatja.



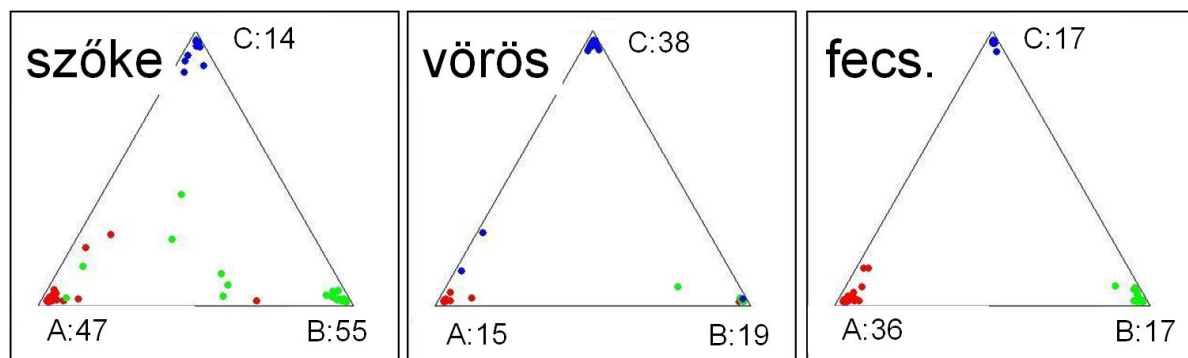
I.2. ábra

Mangalica fajták Da értéken alapuló filogenetikai ábrázolása.

A következtetésünk helyességének (miszerint a mangalica fajtát három csoportba tartozó egyedek sokasága jellemzi) tesztelésére a legvalószínűbb klaszterszámot utólagos valószínűségek alapján Structure programmal határoztuk meg (PRITCHARD és mtsai, 2000). Amikor a minták tenyészetinformáció nélkül kerültek tesztelésre, illetve egy földrajzi lokációhoz köthető három mangalica fajtát teszteltünk, a legvalószínűbb klaszterszám előző megfigyeléseinkkel összhangban háromnak adódott. Amikor az összes tenyészetet földrajzi információval láttuk el, annak hatása volt a legvalószínűbb klaszterszámra (pl.: bármely kiválasztott három farm esetében, ahol mindegyik helyen fenntartottak szőke, fecskehasú és vörös tenyészetet, az legvalószínűbb klaszterszám kilencnek adódott).

Mivel a földrajzi információ hatással volt a klaszterszámra, genotípusokon alapuló (allélhosszak az adott lókuszon) principális komponens analízissel ellenőriztük a hatás mértékét. Az első két komponens a variancia 46 illetve 33 %-át írta le. A sajátértékük 7,8 és 2,7 volt. A harmadik komponens (sajátértéke 1.8) a teljes variancia 7 %-áért volt felelős. A harmadik komponensben a földrajzi információ súlya 0,19 volt (I.2. táblázat). Ez a kis hatás (amely nem befolyásolta a diszkriminancia analízist) megmagyarázza a legvalószínűbb klaszterszámok emelkedését, amikor a földrajzi információ is része volt a klaszterképzésnek. Ennek folyamányaként a tenyészeteket fenntartó farmok viszonylatában a szőke, fecskehasú és vörös fajták finomsztruktúrája is megismerhető (I.3. ábra).

A farmok közötti viszonyok fajtán belüli meghatározása segítheti a tenyésztőket pl. a legalkalmasabb vérfrissítési forrás kiválasztásában.



I.3. ábra

Structure program segítségével meghatározott, szőke, vörös és fecskehasú mangalicafajtákon belüli egyedek tenyészetek között felmért genetikai hovatartozása. A, B és C tenyészetek földrajzilag elkülönülten elhelyezkedő farmokon vannak fenntartva.

	Komponens		
	1	2	3
FARM			0.193
SW24	0.550	0.504	
SW240	-0.163		
SW951	-0.299	0.196	
SW857	-0.128	-0.244	
S0155	0,568	0,133	0,692
S0386	0.743	0.273	
S0101	0.636	-0.763	
S0005	0,843	0,379	-0,307
S0090	0,686	0,606	
S0355	0,583	0,503	0,528

I. 2. táblázat

Mangalicapopuláció principális komponens analízisének eredménye.

A komponensekben szereplő alkotók (farm információ és mikroszatellit lókuszok) súlyai a 0,1 abszolútérték alatt nincsenek feltüntetve.

Az alkalmazott mikroszatellit markerek alkalmasak az egyedek magas valószínűségű (0,8-0,9) populációba sorolására. Egyedi allélok jelenléte segítheti az egyedek más módon történő besorolását. Az S0101-es lókuszon a 198-as (198 bázis hosszúságú fragment) allél hiányzik a fecskehasúban, a 218-as hiányzik a vörösben. Az SW240-es lókusz 108-as allélje hiányzik a fecskehasúban, az SW 857-es lókusz 143-as allélje hiányzik a szőkében. Megbízhatóbb egyedi allélmeghatározás akkor lehetne elérhető, ha az egész populáció egyedállományát alávetnénk a mikroszatellit analízisnek.

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.

A kutatást a Magyar Állattenyésztő Szervezetek Országos Szövetsége tette lehetővé.

II. MANGALICA FAJTÁK GENETIKAI TÁVOLSÁGA, ELKÜLÖNÍTÉSÜK NUKLEOTID POLIMORFIZMUST MUTATÓ DNS MARKEREKKEL.

II.1 Összefoglalás

Egyedenként 62 ezer molekuláris marker vizsgálatán keresztül kiválasztottunk néhány markert, mely képes a szőke, a fecskehasú és a vörös mangalica egyedeket 95%-os biztonsággal, az adott fajtához tartozóan elkülöníteni. A fajták genetikai távolsága ugyanezen markerekkel lett ellenőrizve, miszerint a fecskehasú és vörös mangalica fajták a leginkább eltérőek ($F_{st}=0,091$), míg a szőke és fecske mangalica fajták vannak a legközelebb egymáshoz ($F_{st}=0,062$). Az adatok megerősítik a korábban mikroszatellit markerek vizsgálatából levont következtetést, miszerint a mangalica fajták közepes mértékben térnek el egymástól.

II.2 Bevezetés

A mangalica fajtatörténete a 1.2 bekezdésben olvasható.

Korábban mikroszatellitekkel végeztünk Mangalicában vizsgálatokat (ZSOLNAI és mtsai, 2006). Az elemzést a sokkal nagyobb sűrűségben elhelyezkedő SNP (single/simple/szimpla/egyszerű nukleotid polimorfizmus) markerekkel is megismételtük, mely a korábbi vizsgálat 10 mikroszatellit markerével szemben 62 ezer SNP marker vizsgálatán alapult. Az ilyen nagyszámú genotípus vizsgálat hozzájárul egyes tulajdonságok genomi helyekhez való kötődésének igazolásához, viszonylag kisszámú egyed felhasználásával, populációgenetikai vizsgálatok pontosításához (KIJAS és mtsai, 2012; SOUZA és mtsai, 2010), szülői származási tesztek kialakításához (ZSOLNAI és mtsai, 2013).

Vizsgálatunk célja volt a fajták genetikai távolságának ellenőrzése SNP markerekkel, illetve olyan alternatív SNP készlet keresése, mely képes a három fajtát megkülönböztetni.

II.3 Anyag és módszer

II.3.1 Minták

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.

II.3.2 Genotipizálás

10 mikroszatellit lókusztipizálásával (S0005, S0090, S0101, S0155, S0355, S0386, SW24, SW240, SW857 és SW951 (NECHTELBERGER és mtsai, 2001) és a tenyésztői könyvek használatával azonosítottuk a mangalica egyedek fajtánkénti hovatarozását a rendelkezésünkre álló törzstenyészetekből származó mikroszatellit adatbankunkat (ZSOLNAI és mtsai, 2006) is igénybe véve.

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

II.3.3 Analízis

(i)

Populációk páronkénti összehasonlításához, genetikai távolságok kiszámolásához azon SNP-eket választottuk ki, melyek az összes állatban eredményt adtak, illetve a biallélos rendszerből az egyik alléljük frekvenciája legalább 0,05 volt. Minden kapcsoltsági egyenlőtlenségben lévő egységből csak egy lókuszt tartottunk meg (az ablak mérete 50 SNP, az a kapcsoltsági egyenlőtlenség határértéke 0,5 volt).

A szűrések után kapott SNP-k száma szőke-fecskehasú, szőke-vörös, fecskehasú-vörös, szőke-duroc és szőke-nagyfehér viszonylatban rendre 15297, 18208, 21057, 32273 és 33872 volt. Fst értékek számolására az Eigensoft programcsomagot használtuk (HONG és mtsai, 2012; PATTERSON és mtsai, 2006).

(ii)

Mangalica fajtákat megkülönböztető lókuszok keresését kétféle megközelítésben hajtottuk végre. Az egyik megközelítésben genotípus asszociációs, chi-négyzet módszert (ZSOLNAI és mtsai, 2013a), a másik megközelítésben az ún. lókuszonkénti, csoportok közötti (szőke vagy fecskehasú vagy vörös vs. összes többi rendelkezésre álló állat SNP genotípusai) genetikai távolságokat határoztuk meg, majd a legnagyobb genetikai távolságot mutató lókuszok közül válogattunk.

Genalex (PEAKALL és SMOUSE, 2006) programot használtuk az adatok formázásához. A Structure programot (FALUSH és mtsai, 2003) populációkhoz való tartozás meghatározásához használtuk.

II.4 Eredmények

Az SNP adatokat felhasználva a genetikai távolság értékeit (F_{st}) kiszámoltuk mindegyik populációpár (lásd analízis szekció, i.) esetében. Az eredmények erős korrelációt ($r^2 = 0,788$) mutattak a korábban mikroszatellit markerekkel meghatározott távolságokkal (II.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}

II. 1. táblázat

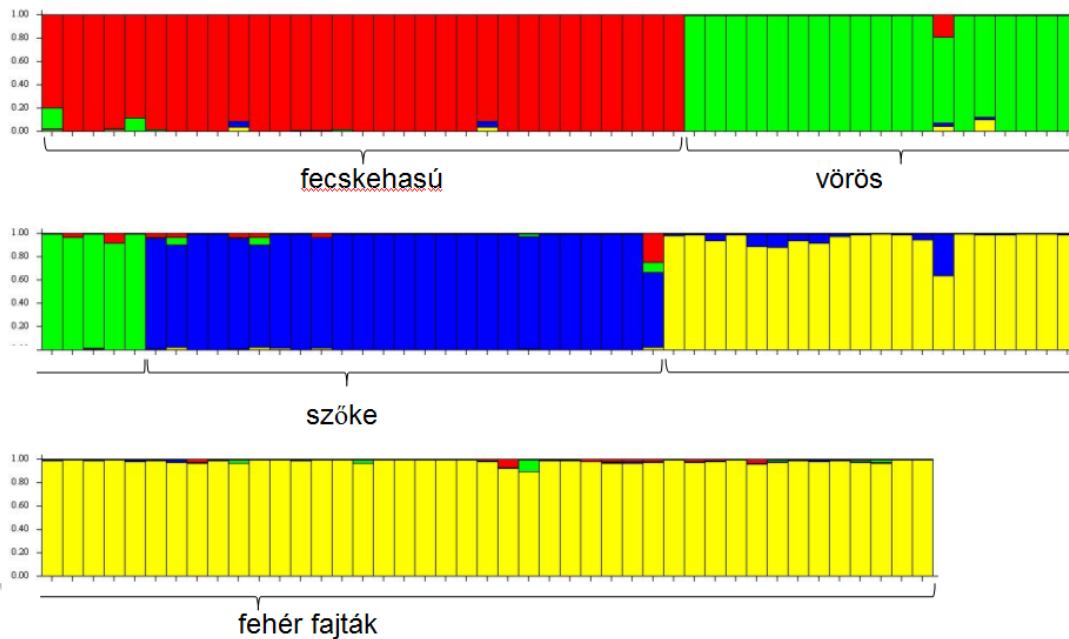
Mangalica fajták páronkénti genetikai távolság (F_{st}) értékei.

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

^{SNP} SNP markerekkel kapott értékek

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 (II.1. ábra). Az allélok megoszlási gyakorisága a különböző fajták esetén jelentős eltéréseket mutattak (II.2. táblázat). A besorolási értéket chi-négyzet módszerrel meghatározott más SNP lókuszok használatával is sikerült elérni (ZSOLNAI és mtsai, 2013).



II.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 lókusz 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 előfordulási gyakorisága			
		1.	2.	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

II. 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.

II.5 Következtetések

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

A megfigyelt Fst értékek megerősítik a mangalica tenyésztési történetét (EGERSZEGI és mtsai, 2003), mely szerint a szőke és a fecskehasú mangalica között várható a legerősebb genetikai kapcsolat, míg a vörös az előbbi két fajtától távolabb helyezkedik el. A leggyengébb kapcsolatot a vörös és fecskehasú fajta mutatta. Hasonló SNP alapú genetikai jellemzéssel meishan és keresztezett fehér sertéseken a közelmúltban történt vizsgálat (MATSUMOTO és mtsai, 2012), illetve Angliában előforduló sertésfajták között találtak különbséget tévő SNP készletet (WILKINSON és mtsai, 2012).

A közeli fajták szeparálását lehetővé tevő SNP készlet hasznosnak bizonyult (WANG és SHETE, 2011), s 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 oldalról is szükséges. WILKINSON és mtsai (2012) tizenhat rokon szarvasmarhafajta esetében 200 SNP-t használt azok megkülönböztetésére. FRKONJA és mtsai (2012) a szükséges SNP-k számát 48-ra csökkentette le, amikor két szarvasmarhafajta genetikai arányát határozta meg azok utódjaiban. Mi bemutattuk, hogy hat-kilenc 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 itt és máshol leírt, szelektált SNP-k 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 használt Spanyolországi sonka termékek ibériai sertéshányadát meghatározó, mikroszatellit markereken alapuló eljárásában.

A fenti eredmények alátámasztják, hogy a mikroszatellit genotipizálás sikeresen felváltható az SNP genotipizálással, az SNP chip 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.

A kutatást a Magyar Nemzeti Fejlesztési Hivatal támogatta (TECH_08-A3/2-2008-0405).

III. MANGALICAEREDET DETEKTÁLÁSA ÉLELMISZERTERMÉKEKBEN.

III.1 Összefoglalás

Gyors és megbízható élelmiszerdiagnosztikai rendszert fejlesztettünk ki mangalica eredetű termékek kimutatására. E minőségi vizsgálat rekombinázt polimeráz sokszorozításon alapszik, melyet bárhol - a laboratóriumon kívül is - végre lehet hajtani, amennyiben élelmiszertermékek mangalica alkotójának megléte kérdésessé válik. Az eljáráshoz hordozható termosztátra, homogenizátorra, pipettára és tesztcsíkra van szükség. A DNS sokszorozítás állandó hőmérsékleten történik. A DNS detektálás antitest reakción alapul. A detektálás alsó határa 1 kópia 1 µl reakciótérfogatban. A vizsgálat elvégezhető a fogyasztás vagy a vásárlás helyszínén, mangalicatermékek valódiságának ellenőrzésére nagyon rövid idő alatt (kb. 30 perc). A leírt megközelítést, amennyiben ismert a fajtaspecifikus szekvencia, alkalmazni lehet egyéb élelmiszerösszetevők detektálására is, mint pl. csirke, pulyka, ló vagy szarvasmarha.

III.2 Bevezetés

A mangalica fajtatörténete a I.2 bekezdésben olvasható. Az ott említett növekvő kereslet a mangalicahús magas minőségének köszönhető, melyet bizonyos nemzetek konyháiban kiemelten kezelnek. Mivel a mangalicahús lágysága és lédúsága egyenes arányban van annak intramuszkuláris zsírtartalmával és típusával (STRAADT és mtsai, 2013).

Korábban egy valós idejű PCR eljárást fejlesztettünk mangalica eredet meghatározására (Szántó-Egész és mtsai, 2013), mely specializált laboratóriumi eszközparkot igényel. A mintákat azok összegyűjtése után a laboratóriumba kell szállítani minőségi és mennyiségi meghatározás céljából. Amennyiben egy hústerméknél felmerül a gyanú, hogy annak eredete nem azonos annak feliratával, az emberek hajlamosak egyszerűen továbblépni, más terméket keresve. E viselkedés ellensúlyozása érdekében olyan minőségi tesztet fejlesztettünk ki, mely laboratóriumi környezet hiányában is elvégezhető.

Számos példát lehet sorolni hordozható, illetve kézi készülék előállítására tett erőfeszítésekről. Néhány esetben jövőbeli tervekről van szó, mint pl. a Q-POC

(<http://www.quantumdx.com/>) vagy a Geneasys (<http://www.geneasys.com/keylab.html>, 2015). Mások hordozható chipről, (KOO és mtsai, 2013), illetve egyszerű anyagokból készített hordozható eszközökről számoltak be (EL WAHED és mtsai, 2013; ROHRMAN és RICHARDS-KORTUM, 2012). Mi egy egyszerű termosztátot igénylő rekombinázt polimeráz amplifikációt (RPA) választottuk a fajta-specifikus tesztünkhöz. Az RPA állandó hőmérsékleten végzett DNS sokszorosítás. A reakció 38 °C-on körül megy végbe szátlelmozdító DNS polimeráz és egy-szálhoz kötődő rekombinázt (PIEPENBURG és mtsai, 2006) segítségével. A reagensek nem kívánnak hűtést a reakció véghezvitele előtt, azok liofilizált keveréke stabil marad több napig, szobahőmérsékleten. E reagensek halfajta azonosításban való felhasználására található példa a http://www.twistdx.co.uk/products/food_safety_id_kits/twistflow_red_snapper_kit címen.

Az RPA ezidáig leginkább patogén kimutatási tesztekben volt használatos, úgy mint *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, Ebola vírus (EULER és mtsai, 2013), *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, etc. (SAKAI és mtsai, 2014) illetve *HIV-1* (CRANNELL és mtsai, 2014), de léteznek példák új generációs szekvenáláshoz könyvtárkészítési eljárásról (OYOLA és mtsai, 2012), genom újrendeződési vizsgálatokról (HILL-CAWTHORNE és mtsai, 2014) vagy GMO, *Salmonella*, *Cronobacter* és *Fusarium* élelmiszerből történő kimutatására (SANTIAGO-FELIPE és mtsai, 2014). Az RPA „tábori” körülmények közötti alkalmazására példa a Hurghadán felállított, (Safa) szarvasmarhák tesztelésre használt karantén-állomás. (http://www.twistdx.co.uk/resources/news/screening_clinical_samples_from_cattle_at_quarantine_stations_in_hurghada_a, 2015).

Az RPA alkalmazások közül, a különféle próba-típusokkal működő TwistAmp®fpg, -exo és -nfo kitek közül (a próbatervezés részleteiért lásd: http://www.twistdx.co.uk/images/uploads/docs/QG_fpg_NF_Online_RevA.pdf, 2015), a TwistAmp®nfo kitet (TwistDx Ltd, UK) választottuk. A reakcióhoz hordozható termosztátot, a detektáláshoz igen/nem típusú választ adó tesztcsíkot alkalmaztunk (PIEPENBURG és mtsai, 2006; KERSTING és mtsai, 2014). A mintaelőkészítéshez minimális kezelési követelményeket terveztünk.

III.3 Anyag és módszer

III.3.1 Minták

A sertés, tyúk és pulyka izommintákat vágóhídon gyűjtöttük. A mangalica minták a korábbi gyűjteményünkből származtak (ZSOLNAI és mtsai, 2013). A vaddisznó és szarvasminták az ország különböző részein, szervezett vadászatokon lettek gyűjtöttük. A mangalica kolbászt és májkrémet megbízható termékelőállítótól szereztük be, illetve a NAIK-Élelmiszerkutató Intézetben (ÉKI) által készültek. A nem mangalica eredetű kolbász- és májkrémmintákat élelmiszerboltokban szereztük be illetve az ÉKI állította elő azokat. A növények mintáit szintén élelmiszerboltokban szereztük be.

III.3.2 DNS előkészítés

– Wizard® eljárás: DNS előkészítés Wizard® kittel (Promega, USA)

Kb. 300 mg húsmintát egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztünk, melyhez 860 µl puffert (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % SDS), 100 µl 5 M guanin-HCl-t és 40 µl 20 mg/ml proteináz-K oldatot adtunk, melyet 3 órán keresztül 55 °C-on tartottunk. Az elegyet 12400 fordulatszámon (AB2.14 rotor, Jouan BR4i centrifuga) 10 percig centrifugáltuk, majd az elegy felülúszójából 450 µl-t dolgoztunk fel a Wizard® DNS-tisztító kittel (Promega, USA). A tisztított DNS-t 100 µl TE pufferben oldottuk.

– DNAreleasy® (Nippon Genetics Europe, Germany) eljárás:

Kb. 100 mg mintát 0,5 ml-es PCR csőbe, 200 µl DNAreleasy® oldatba helyeztünk. A mintát rövid ideig homogenizátorral Tissue Grinder Mixy (Nippon Genetics Europe, Németország) homogenizáltuk. A mintaelőkészítés előírás szerinti hőmérsékleti profilja: 65 °C, 5 perc; 96 °C, 5 perc és 20 °C, 5 perc volt. A hőmérsékleti profilt Theater SlimThermal Cyler (Coyotebio, Kína) készülékkal biztosítottuk.

A sokszorosítandó DNS a felülúszóból vettük ki néhány perces természetes ülepedés után.

– Az inhomogén kolbász minták esetében

a homogenizáció desztillált víz jelenlétében, szobahőfokon végeztük. A homogenizáció ideje néhány perc volt, amíg a kolbász állaga püré-szerűvé vált. DNS sokszorosításra ezen elegy vizes fázisát használtuk, további tisztítási lépés nélkül.

– Májkrém esetében

a desztillált vizes hígítást csak enyhe intenzitású homogenizáció követte.

III.3.3 Primerek és sokszorosítás

primer1: biotin-GTT GGT TAT TAC AGT ACT GTA CAA TAA CAA AGG TCA A

primer2: AGC TTG TTT CAA ACA TGA AAA GTT CAC AAA GCA G

A próba szekvenciája FAM-GGATGATTC ATA GCA TAG GAA CAC TTA AGA TTG (THF)AA TTA CTG GGT CTT AAG G-C3spacer volt, ahol a THF tetrahydrofuránt jelöl. A C3spacer a próba növekedését hivatott meggátolni. Teljes genom információ a Sequence Read Archive adatbázis SRP039012 (Molnár et al., 2014) azonosítója alatt található.

A mangalica minőségi kimutatásához szükséges jel előállításához a TwistDx Ltd. (UK) cég RPA rendszerét, azon belül a TwistAmp[®] nfo primer-próba elrendezést választottuk. Ebben az elrendezésben az egyik primer 5' vége biotinnal van jelölve, míg a másik primer nem hordoz jelölést. A próba 3' vége védett a láncnövekedés ellen és az 5' vég FAM-mal jelölt. A próba THF alkotót is tartalmaz, melyet az Nfo enzim hasítani tud a próba komplementer DNS szálhoz való teljes kapcsolódása esetén (LEVIN és mtsai, 1988). Az Nfo enzim és a rekombinááz polimeráz liofilizált formában van jelen, melyet 50 µl reakcióterfogra hígítunk.

A sokszorosítás 39 °C-on 30 percig tartott. A reakcióban résztvevő alkotók koncentrációja, illetve térfogata a következők volt: a primerek koncentrációja egyenként 420 nM, a próba 120 nM, a puffer 29,5 µl, a Mg-acetát 14 mM, illetve a minta 1 µl. A mintát is tartalmazó reakcióelegyet TwirlA termosztátban tartottuk (TwistDx Ltd., UK).

Univerzális MileniaHybriDetect (MileniaBiotec, Németország) tesztcsíkot használtunk a sikeres RPA reakció detektálására (KERSTING és mtsai, 2014), ahol 5 µl reakcióelegyet kevertünk el 100 µl tesztcsík-pufferben. A tesztcsíkot ebbe az oldatba állítottuk. Maximum 3-5 perc eltelte után a tesztcsík felső felén megjelenő ellenőrző és alsó felén a reakció sikerességétől függően megjelenő sáv vizuálisan kiértékelhetővé válik (III.1. ábra). Az RPA reakciótermék biotinilált végét a tesztcsík felületéhez kötött biotin ligandum köti meg. A termék másik, 5' végén lévő FAM jelölést FAM antitest ismeri fel, amely antitesthez arany részecskék vannak kapcsolva. A tesztcsík diagnosztikai sávja csak akkor válik láthatóvá, ha a mangalicaspecifikus RPA termék jelen van. Primer dimerek nem adnak jelet, mert a FAM jelzés a próbán helyezkedik el.



III.1. ábra

MileniaHybridect tesztcsik kiértékelése.

1: pozitív minta, 2: negatív minta. A felső vízszintes sáv a tesztcsik reakciójának a kontrollja, az alsó sáv a mangalicaspecifikus szekvenciáról képződő RPA reakció termékének a jele.

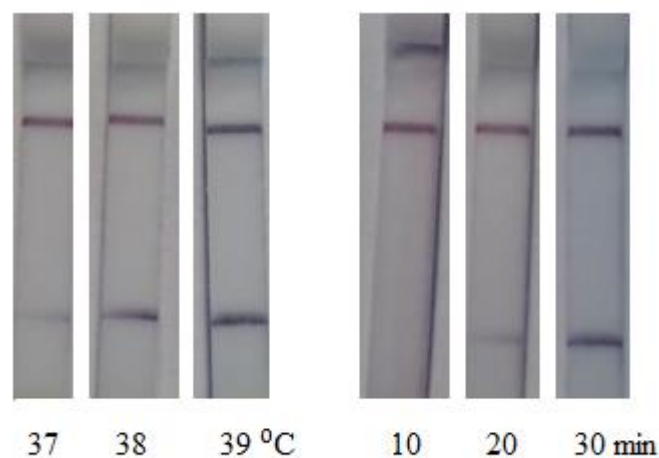
III.4 Eredmények és megbeszélés

Az Anyag és módszer szekcióban leírt összes DNS preparálási eljárás alkalmas volt izotermális sokszorosítás elvégzésére. Még az egyszerű homogenizálással és egyéb tisztítási lépés nélkül előkészített kolbász is elegendő DNS-t szolgáltatott az analízishez.

A reakció sikeres elvégzése céljából többféle primer és próba kombinációját teszteltük a gyártó (TwistDx Ltd., UK) javaslatai alapján. A specifikusságot a próba biztosította, mely csak akkor tudott kapcsolódni, ha célszekvencia jelen volt. A próba 3' végi védelme volt hivatott megállítani a nem specifikus termékek képződését. A próba növekedése pedig csak akkor történhetett meg, amikor az Nfo enzim a kapcsolódott próbát a THF pozícióban vágta.

A primerek GC tartalma az RPA reakcióhoz javasolt 40-60% határok között mozgott. A próba GC tartalma alacsonyabb volt a javasolt alsó határnál, de ez nem zavarta a reakció sikerességét. Az megfelelő primer-próba készlet megtalálása után a reakciót nagyon tiszta mangalica DNS-el (lásd a Wizard® eljárást) optimalizáltuk.

A sokszorosítás hőmérsékletét és az inkubáció idejét teszteltük (III.2. ábra). A tesztcsíkok jelintenzitásának vizuális értékelése alapján a legjobbnak 39 °C és 30 perc bizonyult. A reakciókomponensek koncentrációi megegyeztek a gyártó által javasolt értékekkel. A reakció tovább gyorsítható a Mg-ion koncentrációjának növelésével (TwistDx Ltd., UK). Amikor a Mg-ion koncentrációját a javasolt 14 mM-ról 15 mM-ra emeltük, a reakcióidő 10 percre csökkent. A reakcióidő más primer-próba és reakciórendszerrel tovább csökkenthető pl. a TwistAmp[®]exo kittel (TwistDx Ltd., UK).



III.2. ábra

Az RPA reakció hőmérsékletének és idejének a beállítása.

A reakció specifitását vizsgálva (III.1. táblázat) 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 tesztszekvenciával. A kifejlesztett teszt specifikus a mangalicákra, illetve a mangalica eredet a más fajtákkal létrehozott F1 hibridekben is kimutatható. Az F1 keresztezések tisztavérű mangalicágoz viszonyított 50%-os tesztszekvencia-tartalma könnyen kimutatható (III.2. táblázat).

faj, vagy élelmiszer megnevezése	faj vagy fajta megnevezése	mintaszám	pozitív minták száma
ember	-	8	0
sertés	szóke mangalica	45	45
	fecskehasú mangalica	36	36
	vörös mangalica	32	32
	mangalica x duroc	18	18
	duroc	45	0
	pietrain	45	0
	hampshire	48	0
	nagyfehér	42	0
	H39 x nagyfehér	36	0
	nagyfehér x lapály	32	0
	vaddisznó	25	0
egyéb állatok	ló	20	0
	csirke	13	0
	pulyka	4	0
	kacsa	10	0
	lúd	5	0
	szarvas	10	0
	szarvasmarha	37	0
növények	szója	10	0
	kukorica	10	0
	rizs	10	0
	bors	10	0
	fokhagyma	10	0
	kömény	10	0
	zeller	10	0
	csicseriborsó	10	0
	dió	10	0
	cukorrépa	10	0
	bab	10	0
	mák	10	0
	repce	10	0
	rozs	10	0
kolbász	mangalica	15	15
	nem-mangalica	15	0
májkrém	mangalica	15	15
	nem-mangalica	15	0

III.1. táblázat

A specifitás ellenőrzésében felhasznált minták és mennyiségük és teszteredményeik.

10 ng/μl koncentrációhoz viszonyított hígítás mértéke	kópiaszám 50 μl reakcióban	észlelés
1x	2900	pozitív
2x	1450	pozitív
4x	725	pozitív
8x	362	pozitív
16x	181	pozitív
32x	90	pozitív
40x	72	pozitív
50x	58	pozitív
58x	50	pozitív
64x	45	negatív

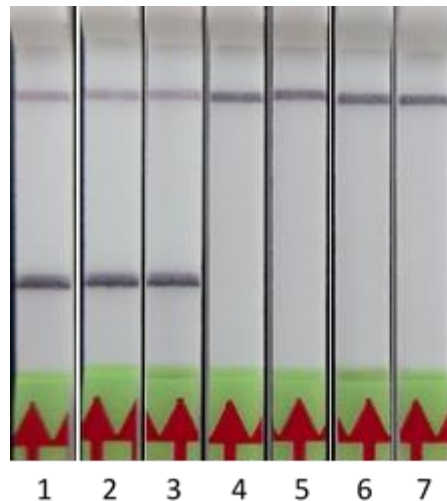
III.2. táblázat

Hígítási sorozat reakcióeredményei.

1 db célszekvencia 1 μl RPA reakcióban az 58x-os hígításnál valósult meg.

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 szeretnénk használni a reakcióban (pl. ha 1 μl mintatérfogat 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 (III.3. ábra). A reakció sikeres volt olyan komplex minták esetén, mint a kolbász (magas zsír- és fűszertartalom) vagy a májkrém (magas zsírtartalom).



III.3. ábra

Mangalica eredetű DNS 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 DNAreleasy® 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).

III.5 Következtetések

A mangalica teszt érzékeny és gyors módszer élelmiszerek mangalica alkotójának azonosítására kevés és kifejezetten alacsony áru eszközök használatával.

Azokban az esetekben ahol az élelmiszer már homogenizált, mint pl a májkrém, nincs szükség időigényes mintaelőkészítésre. Kolbász minták vizsgálatához rövid, a vizsgálatot megelőző homogenizáló lépést ajánlunk.

Amennyiben a mintát előkészítésnek kell alávetni, a DNAreleasy® (Nippon Genetics Europe, Németország) eljárást javasoljuk. Ez a DNS preparálási eljárás ugyan nem kíván centrifugálási vagy elválasztási lépéseket (ellentétben a Wizard® módszerrel), ugyanakkor különböző hőmérsékleti

szinteket elérő hordozható termosztátot igen (lásd Anyag és módszer szekció). 15 perces inkubálás után a minta alkalmas az RPA reakció elvégzésére.

A kutatást a Magyar Állam Vidékfejlesztési Minisztériuma (AHT szm: 334740) támogatta.

IV. FEKETE ÉS FEHÉR RACKA GENETIKAI KÜLÖNBÖZŐSÉG MÉRTÉKÉNEK FELMÉRÉSE DNS ANALÍZISSEL.

IV.1 Összefoglalás

A fekete és fehér racka genetikai távolságát határoztuk meg két, időben és térben eltolt mintavételi sokaságból 7, ill. 31 mikroszatellit lókuszt alkalmazásával. A kapott genetikai távolság a vizsgált rackacsoportok között 0,082, ill. 0,042 volt. Ezen értékek más csoportokhoz (cigája, cikta, magyar merinó) képest 0,045–0,100 között változtak. A fehér és fekete rackák kapcsolatát más fajták és azok egymás közti genetikai távolságaik viszonylatában értelmeztük.

IV.2 Bevezetés

A múlt században az állattenyésztésben bekövetkezett változások a mangalicához hasonlóan a magyar racka juhot sem kímélték. 1911-re a 7,7 millióra fogyatkozott juhállományunkból 15000 magyar juhot regisztráltak és a II. világháború után már csak 1450 állat maradt tenyésztésben (DUNKA, 2002). 1983-ban alakult meg a Magyar Rackajuhtenyésztő Egyesület, amely a fajta megmentését tűzte ki céljául 1200 anyajuhval (VERESS és mtsai, 2020). Sikerüket jelzi, hogy 2001-re a törzskönyvezett egyedek száma 3312, amelyből 814 fekete racka volt (OLÁH, 2002). Napjainkban 4500 fajtatiszta anyajuhot tartanak nyilván, amelynek 40%-a fekete racka (MJKSZ, 2013a).

A fajta részletes leírása a múlt század elejére tehető, a jelenleg érvényben lévő standard alapja pedig Dunka nevéhez fűződik (2002). A fajta hármasszoros hasznosítású (hús, tej és prém). Az utóbbi évtizedekben több kutatási téma foglalkozott testalakulásával, a gyapjú és a prém színöröklésével és minőségével, a tejtermelésével, valamint a rackabáránnyak hizlalásával és húsmínőségével (DUNKA, 1992, 2002; NAGY és mtsai, 2004, 2005; SARLÓS és mtsai, 2013). Az őshonos juhajták surlókórra való fogékonyságának osztályozása is megtörtént az elmúlt években (FÉSÜS és mtsai, 2004, 2008). A fekete racka szaporodásélettani jellegzetességeiről, a tüszőnövekedés és korai vemhesség ellenőrzéséről, valamint a kosok andrológiai, spermatológiai

jellemzőiről jelentek meg közlemények az utóbbi években (EGERSZEGI és mtsai, 2008, 2011, 2012; PIRY és mtsai, 2004).

A világon fellelhető színes juhok színváltozatainak tenyésztésében kétféle irányzat figyelhető meg. A shetland, izlandi, creole, karakul, soay, navajo churro, damara fajták színváltozatai nincsenek elkülönítve egymástól, míg a heidschnuke, bergshaf, szomáliai (perzsiai) fajtáknál a színváltozatokat elkülönülten tenyésztik (ENZLIN, 1996). Magyarországon 1926-ban a rackaállományt főként a síkföldinek, debreceninek vagy hortobágyinak nevezett juhok adták, a fejük színe szerint fehér, fekete, barna, gyapjuk alapján fehér, fekete vagy tarkatestű (KOVÁCS, 1926) névvel illették. Tíz évvel később, egy 1936-os összeírás szerint, Hajdú vármegyében 3620 rackajuhot tartottak nyilván (ebben benne voltak a keresztezett egyedek is), amelynek több mint a fele (2135) Debrecenben volt. A debreceni állomány 21 juhtartó gazda között oszlott meg, és egy kivételével mindegyikük fehér rackát (amelyek közül sok curkánnal vagy moldvaival kevert juh) tenyésztett. Teljesen tisztavérű, ősi racka juhoknak csak egy, 150 anyából álló, fekete nyáját mondtak (HANKÓ, 1937). HANKÓ (1941) szerint 1941-ben a fehér juhokból még könnyen összeszedhető volt 5-600 jó fajtajellelleggel bíró magyar juh törzstenyésztés céljára. A fekete esetében azonban már 1937-ben felhívta a figyelmet a génmegőrzés fontosságára, de felhívása „pusztában elhangzó szó volt csupán”. Az utolsó nagy fekete nyáj 1939 után szétaprózódott kisebb falkákra. Becslése szerint ekkor az egész Tiszántúlon jó, ha 300 ilyen juhot lehetett már csak találni. A fekete magyar juh fennmaradását ezek a kis falkák, ill. a fehér juhot tenyésztő gazdák által a nyájukban prémnyerés céljából tartott 1-2 fekete anya segítette. A II. Világháborút követően feltehetően több esetben keveredett a fehér és a fekete racka, de 1983-tól a MRJTE megalakulása óta a törzsanyák háremben, a közös nyájuk csoportosan szín szerint vannak párosítva (VERESS és mtsai, 2002). A racka kosoknál a törzskönyvi adatok alapján fehér esetében 14, fekete racka kosoknál 11 genealógiai vonal került kialakításra, amelyek közül 3 vegyes vonal (OLÁH, 2002). Ma 10 fehér és 9 fekete kos vonalat használnak a tenyésztők (MJKSZ, 2013b). Vizsgálatunk célja a laboratóriumunk által korábban gyűjtött és rendelkezésre álló fekete és fehér racka minták genetikai eltéréseinek mikroszatellit markerekkel való felmérése és annak számszerűsítése volt.

A genetikai információhoz való hozzáférés egyik módja a genetikai markerek, jelen esetben mikroszatellitok tipizálása, amelyet sikerrel alkalmaztak sertés (ZSOLNAI és mtsai, 2006), juh (GÁSPÁRDY és mtsai, 2013; KUSZA és mtsai, 2011) vagy ló (ACHMANN és mtsai, 2004, BÁN és mtsai, 2006) esetében is.

IV.3 Anyag és módszer

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 mikroszatellitot használtunk (HSC, INRA063, OarFCB11, MAF214, OarAE129, CSRD247, OarFCB304) 68 fehér és 7 fekete racka esetében. Ugyanezen évben 104 merinó, 76 német húsmerinó, 26 landschaf merinó, 5 suffolk, 42 Ile de France, 41 texel, 40 charollais, 33 lacaune, 43 awassi és 7 lacaune x német húsmerinó került a fent említett mikroszatellitokkal tipizálásra. A 2008-ban gyűjtött mintákon 31 mikroszatellit markert használtunk (BM1329, BM8125, DYMS1, HUI616, OARAE129, OARCP34, OARCP38, OARFCB128, OARHH47, OARVH72, MAF65, INRA63, OARFCB20, OARJMP58, OARJMP29, OAFCB193, BM1824, MAF70, MAF209, OAFCB304, SRCRSP9, ILSTS5, ILSTS11, ILSTS28, MAF214, SRCRSP5, SRCRSP1, MAF33, MCM140, OAFCB226, 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 fragmentanalizáló készüléken választottuk el. A mikroszatellitok hosszait GeneScan és Genotyper programokkal határoztuk meg.

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

Az adatfeldolgozáshoz használt programok; GeneClass (PIRY és mtsai, 2004) és Genalex (PEAKALL és SMOUSE, 2006) az egyedek populációkhoz való rendelésére, az utóbbit Fst páronkénti meghatározására is használtuk. SPSS (SPSS 15.0 for Windows software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programcsomagot diszkriminanciaanalízis céljából alkalmaztuk.

IV.4 Eredmények és következtetések

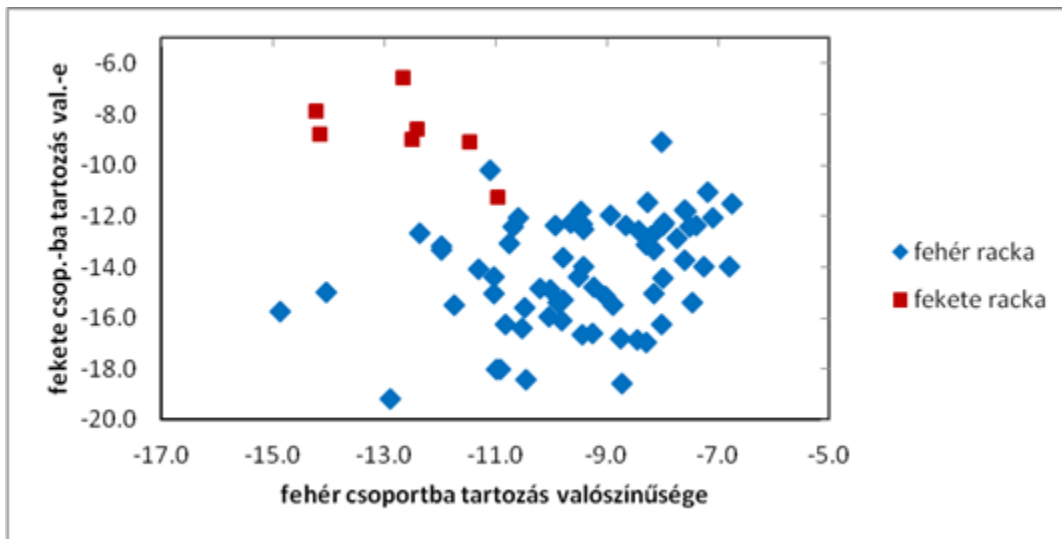
Kiindulási hipotézisként a két racka csoportot egyetlen homogén csoportként kezeltük. Elképzelésünk igazolására diszkriminanciaanalízist végeztünk, ahol független változóként az allélok hosszait használtuk. Mivel az első függvény a teljes variancia 100%-át írta le, és a fehér, ill. fekete csoportok átlagai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

A 2006-os kísérletben (7 DNS-markerrel) az egyedek csoportokba sorolása 92,0%-os volt. A besorolás 97,3%-ra javult, amikor a csoportba tartozás előzetes valószínűségét 0,91 és 0,09 értéknek vettük a csoportok mérete alapján.

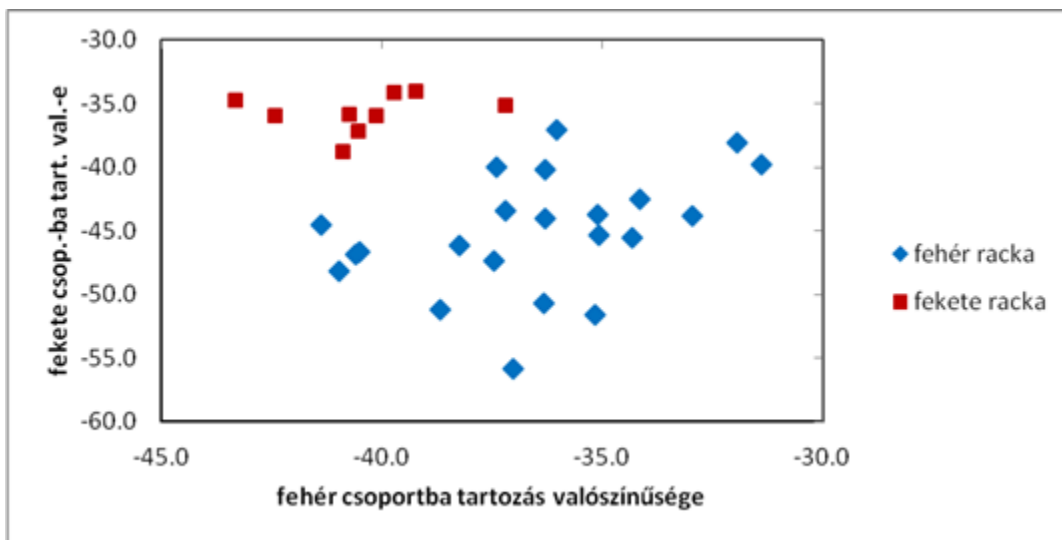
2008-ban (31 DNS-markerrel) kapott allélhosszakat használva a csoportokba sorolás 100%-os megbízhatóságú volt akár alkalmaztuk, akár nem a csoportméreten alapuló *a priori* súlyozást.

A GeneClass programmal a 2006-os és 2008-as adatokon ellenőrizve –frekvencia és genetikai távolsági értékeken, ill. szimulációs megközelítésekkel– a fehér és fekete állatok saját csoportjukba való besorolási valószínűsége 10–97% értékek között mozgott. A kicsi valószínűségi értékek esetében is minden egyes racka állatnál a saját csoportba való tartozás valószínűségi értéke volt a legnagyobb az összes többi fajtához, ill. a másik színváltozathoz viszonyítva. A saját csoportba való besorolás valószínűségét a grafikus ábrázolást lehetővé tevő Genalex programmal is ellenőriztük "leave-one-out" opció használatával, ahol az allélok frekvenciáinak becsléséből az éppen aktuális besorolandó egyed genotípus adatai nem vettek részt. A 2006-os és 2008-as mintakészlet mutatja a két színváltozat elkülönülését (IV.1.A,B ábra). A több, 31 DNS-marker használatával kapott ábrán (IV.1.B ábra) az elkülönülés mértéke jobban megfigyelhető, mely összhangban van a diszkriminanciaanalízis és a GeneClass program által kapott eredményekkel.

A.)



B.)



IV.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 varianciarány (Fst) értéke a két vizsgálati készletet tekintve különbözőnek adódott. Az első esetben (2006, 7 mikroszatellit) az Fst 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 évben mintázott populáció genetikai távolságai közül, véleményünk szerint, a második áll közelebb a valósághoz az alkalmazott ötször nagyobb markerszám miatt.

Korábban cigája juh populációk lettek összehasonlítva 8 mikroszatellit segítségével (GÁSPÁRDY és mtsai, 2004), amelyből 7 azonos volt e vizsgálatban a 2006-os mintákon alkalmazottakkal. Az eltérő helyekről származó cigája populációk között becsült Nei-féle genetikai távolság 0,2483 és 0,9014 között mozgott. A két racka színváltozat esetében a 2006-os mintákon kapott Nei-féle genetikai távolság 0,4723 volt, a 2008-as mintakészlet és 31 marker alkalmazásával ugyanezen érték 0,2039-et mutatott. A cigája populációknál levont következtetéshez hasonlóan a 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.

A különféle juhajták között a genetikai távolság – 0,042–0,179 (2006-os adatok) és 0,019–0,125 (PETER és mtsai, 2007) – kisebb, mint az a sertésajtáknál tapasztalható (0,062–0,27) (GARCIA és mtsai, 2006; ZSOLNAI és mtsai, 2006). A genetikai távolság (HARTL és CLARK, 1997)

kisebb értéke számos juh fajta esetén megfigyelhető. A merinó és az Ile de France közötti távolság 0,042 (7 marker, 2006-os minták), a merinó és a cigája közötti távolság értéke 0,048 (31 marker, 2008-as minták) volt. A görög orino és a lesvos fajták ($F_{st}=0,029$; 31 marker), a török turcana és az albán ruda fajták ($F_{st}=0,028$; 31 marker) (PETER és mtsai, 2007), a kínai hu és a rövid farkú han ($F_{st}=0,023$; 15 marker) (SUN és mtsai, 2010) hasonlóan kicsi differenciáltsággal jellemezhetőek egymáshoz képest.

Hasonló, a közepes genetikai differenciáltság mérőszámai közé (0,05 és 0,15) (HARTL és CLARK, 1997) eső értékeket mikroszatellitokkal korábban a három mangalicafajta esetében mértünk, amelyek 0,064; 0,095; 0,099 voltak a szőke-fecskéhasú, szőke-vörös és fecskéhasú-vörös viszonylatban. A mangalicáknak a többi fehér fajtához viszonyított távolsága 0,25–0,27 között volt (GARCIA és mtsai, 2006; ZSOLNAI és mtsai, 2013). Mangalica mikrosatellit témában lásd még ezen írás I. bekezdését.

A DNS-alapú genetikai háttérvizsgálataink, és azoknak más kutatási eredményekkel való összevetése alapján a fekete és a fehér rackacsoportok genetikailag differenciálódottnak tekinthetőek, 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.

V. MAGYAR SZÜRKEMARHA TENYÉSZETEK KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA

MIKROSZATELLIT MARKEREKKEL

V.1 Összefoglalás

2009-2011 közötti periódusban 3187 szürkemarha egyedet vizsgáltunk abból a célból, hogy a tenyészetek egymáshoz viszonyított genetikai helyzetét meghatározzuk. A tenyészetek megfigyelt heterozigóitási közepes érték felett voltak (0,60-0,80). Mind a kiszámolt páronkénti genetikai távolságok, mind a fajtatörténeti információk alapján a jelenleg magpopulációként nyilvántartott szürkemarha tenyészetek azonosíthatóak voltak. A populációanalízis felfedte, hogy a tenyészetek genetikai hátterük alapján elkülöníthetőek egymástól. Az esetek többségében (22 tenyészet) az F_{st} érték 0,003 és 0,005 között volt, amely alacsony differenciáltságot jelent. A fennmaradó 12 tenyészet esetében a központi helyzetű tenyészetekhez képest az F_{st} értékek 0,060 és 0,119 között mozogtak. Principális komponens analízis, hozzárendelési tesztek és a dendrogramok azt sugallják, hogy kettő főcsoport létezik a szürkemarha populáción belül. Structure programmal végzett analízis a legvalószínűbb klaszterszámként a hármas értéket adta ($K=3$).

Egyedi allélikus gazdagság, genetikai távolságok és F_{is} adatok alapján olyan tenyészeteket azonosítottunk, melyekre nagyobb figyelmet kellene fordítani a genetikai sodródás megakadályozása, illetve a genetikai sokszínűség megőrzése miatt. Az itt bemutatott genetikai információhalmaz alapját képezi azon állatok kijelölésére, melyeket teljes genoanalízisre lehet kiválasztani.

V.2 Bevezetés

Az első magyarszürke leírás egy 16. századi dokumentumban lelhető fel (MILHOFFER 1904 cit. BARTOSIEWICZ 1997). A fajta elterjedése a 16. századra, a török megszállás idejére tehető (BARTOSIEWICZ 1996, 1997). 1884-ben az ország 4,9 millió szarvasmarhájának 78 %-a, 1990-ben az akkori 6,9 millió egyed fele volt szürkemarhaként regisztrálva. (MATTESZ 1927, TORMAY 1901, cit. BARTOSIEWICZ 1997). 1925-ben 321000 szürkemarha volt a Magyarországon, 1962-re a

létszám kettőszáz tisztavérű tehénre és hat bikára csökkent, melyek Bodó Imre által kezdeményezett, illetve koordinált fajtamentési programban kerültek megőrzésre (BODÓ és *mtsai*, 1996). Mostanra a szürkemarhák száma növekedőben van, a tehenek száma 2011-ben hétezer volt (BODÓ 2011).

A fajta molekuláris genetikai összetétele alapján -a genetikai kapcsolatokat bemutató fákön- a podóliai szarvasmarha csoportban található meg, bár több szerző kétségbe vonja e csoporttagságot (MARÓTI-AGÓTS 2011, MANZONE 2011, FILIPPINI 2011). Mitokondriális DNS vizsgálatok azt mutatták, hogy az itáliai és magyar szürkemarha hasonlóságot mutat más európai fajtákkal, és a T1-es haplotípus -mely eredete afrikai- nem volt megfigyelhető a magyar szürkemarhák között (MARÓTI-AGÓTS 2011).

A 20. század elején, illetve 1971-ben néhány maremman bikát hoztak Magyarországra (BODÓ 2011). Az örökölhető 1;29-es kromoszóma transzlokáció ezek egyikével került az állományba. A rendellenesség (mely embrióelhalással kapcsolható össze) nem került bele a tisztavérű szürkemarha állományba és a nem szürkemarha állományokból e rendellenességet több mint 800 állat vizsgálatával szűrték ki. A hordozó állatok mindegyike vágásra került (KOVÁCS 1989).

MANATRINON és *mtsai* (2008) 60 szürkemarhát mikroszatellitekkel, illetve PARISSET és *mtsai* (2010) 63 szürkemarhát 91 SNP-vel vizsgált ahol többek között maremman egyedekkel is összehasonlították a szürkemarhát. Az eredmények megmutatták, hogy a nagyon hasonló kinézetű maremman szarvasmarhák nagyon jól elkülöníthetőek genetikai alapon a szürkemarhától.

A vizsgálatunk célja az volt, hogy tisztázza a szürkemarha tenyészetek genetikai viszonyát egymáshoz képest és rámutasson azon tenyészetekre, melyek számottevő eltéréssel bírnak a magpopulációtól. Az így nyert információ több dologra használható fel, pl.; az eltérő tenyészetek kiemelt figyelmet kaphatnak a tenyésztési célok módosítása érdekében. Másrészt a genetikai információ birtokában olyan állatok választhatók ki teljes genom kapcsoltsági vizsgálatokhoz és

szekvenáláshoz, melyek valóban a szürkemarha genomot képviselik. Hasonló megközelítésre példa, amely mikroszatellit vizsgálatokkal kezdődött, majd SNP vizsgálatokkal és genomszekvenálással és védjegyként funkcionáló szekvencia megtalálásával folytatódott a mangalica fajtában végzett munka (ZSOLNAI és mtsai, 2006, 2013, SZÁNTÓ-EGÉSZ és mtsai, 2013).

V.3 Anyag és módszer

V.3.1 Minták és mikroszatellitek

Az állományok kódjainak feloldását kutatási vagy tenyésztési célra való felhasználáshoz a Nemzeti Élelmiszerlán-biztonsági Hivatal (Genetikai labor, Budapest) adhatja meg. 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 ($n = 3187$, V.1. táblázat). Azon gazdaságok kerültek a vizsgálatba, melyeknek legalább 25 egyede lett genotipizálva. Olaszországból származó, referenciaként szereplő maremman 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>).

QIAamp DNA Mini Kitet (QIAGEN, US) használtunk vérből való DNS előkészítésére. DNS sokszorosítási körülmények a Bovine Genotypes Panel 1.1 (Finnzyme Diagnostics, Finnország) kézikönyvében leírtaknak feleltek meg. A sokszorosításhoz ABI 9700 (Applied Biosystems, USA) készüléket használtunk, az allélok fragmenthossz meghatározásához ABI 3100 Genetic Analyser-t (Applied Biosystems, USA) alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint.

V.3.2 Adatok feldolgozása

A Hardy Weinberg egyensúly és a populáció differenciálódás egzakt tesztjét Genepop 4.2.1 (ROUSSET 2008), FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET 1995) és Arlequine (EXCOFFIER és mtsai, 2005) programokkal számoltuk. A vizsgált lókuszokon null allélok jelenlétét Genepop and Micro-Checker

2.2.3. (Monte Carlo simulation (bootstrap módszer, VAN OOSTERHOUT és mtsai, 2004) szoftverekkel ellenőriztük. Ho, He, Fis, Fst, Nm mutatók meghatározására Genalex 6.5-öt használtunk (PEAKALL and SMOUSE 2006). Az adatokat FSTAT és Genepop használatával ellenőriztük. Allélikus gazdagság (AR) és egyedi allélikus gazdagság (ARp) értékeket HP-rare 1.0-val (KALINOWSKI 2005) határoztuk meg. Páronkénti Fst értékek (molekuláris varianciaanalízis függvény, permutációk száma 999) és Nei-féle genetikai távolság meghatározására Genalexet használtunk, az Fst mátrixot a Genalex principális koordináta analízisével vizsgáltuk. Nei féle genetikai távolságot (D_A) TFGA (MILLER 1997) és Poptree (TAKEZAKI és mtsai, 2010) szoftverekkel is ellenőriztük. A bootstrap értékek 1000 permutációs lépésből származtak.

Bayes-i algoritmust alkalmazó Structure programot használtunk a legvalószínűbb klaszterszám (K) meghatározására (burnin: 105, MCM steps: 105, ismétlésszám: 10, modell: admixture, allélfrekvenciák korrelációban vannak), illetve az egyedek adott csoportba való tartozási valószínűségének kiszámolására. K becslésére Evanno módszerét használtuk (EVANNO és mtsai, 2005), felhasználva a Structure program kimeneti adatait. Bayes-i sztochasztikus alapú megközelítéssel dolgozó BAPS 6.0 szoftvert (CORANDER és mtsai, 2003) is használtuk a legvalószínűbb K érték becslésére, illetve a szürkemarha egyedek marmman hányadának becslésére.

Az egyedek csoportokhoz való hozzárendelési tesztjét Genalex és GeneClass 2.0 (PIRY és mtsai, 2004) programokkal, bayesi (RANNALA és MOUNTAIN, 1997) és szimulációs algoritmusok (PAETKAU és mtsai, 2004) segítségével végeztük.

V.4 Eredmények és megbeszélés

A Hardy-Weinberg egyensúly p értékének egzakt becslését minden populáción és minden lókuszon elvégeztük. Az elvégzett 374 chi-négyzet teszt közül 72 mutatott szignifikáns eltérést a Hardy-Weinberg egyensúlytól 95 %-os megbízhatósági intervallumban. A heterozigóták többsége szignifikáns volt ($p \leq 0,05$) a G, I, J, N, P, R és AA-AK gulyákban, kivéve az AD és AI csordákat. Szignifikáns homozigóta többletet az A, C, L, Q and Z állományok mutatták. Az A-tól Z-ig (A-Z) tekintett gulyák Fis értékei kevéssel nulla érték alatt voltak, ellenben heterozigóta többlet (V.1. táblázat) volt megfigyelhető AA-AK populációkban. Ennek oka lehet az „outbreeding” vagy a

tervezett tenyésztési politika, amelyben a kevésbé rokon egyedeket választják ki reprodukciós céllal.

Az Fis értékek különbözőségének vizsgálatakor az AE, AH, AJ gulyák mutattak szignifikáns eltérést a többi állomány Fis 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 (HPRare szoftverrel számolva) csökkenő trendet mutat az A gulya irányától a Q populáció felé (V.1. táblázat), bár a Z és AI gulyáknak van a legnagyobb egyedi allélikus gazdagságuk (rendre; 0,39 és 0,32). AK és AB a nyolcadik és kilencedik pozícióban vannak a maguk 0,06 és 0,03 értékeivel. Allélikus gazdagságot illetően az A, B és F populációk hatos érték feletti. A legalacsonyabb allélikus gazdagságot az AA, AF, AG, AK, AH csordák mutatták (AR: 4,99-4,49).

tenyészet kódok	N	AR	ARp	Ho	He	Fis
A	120	6,87	0,25	0,68 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,035 ± 0,04
B	142	6,11	0,11	0,74 ± 0,03	0,73 ± 0,03	-0,017 ± 0,01
C	134	5,88	0,12	0,69 ± 0,03	0,69 ± 0,02	0,004 ± 0,02
D	145	5,85	0,07	0,71 ± 0,02	0,69 ± 0,02	-0,024 ± 0,02
E	123	5,46	0	0,70 ± 0,04	0,69 ± 0,03	-0,024 ± 0,02
F	153	6,01	0,02	0,70 ± 0,03	0,69 ± 0,03	-0,018 ± 0,01
G	97	5,98	0,11	0,75 ± 0,03	0,73 ± 0,03	-0,036 ± 0,02
H	149	5,83	0,02	0,71 ± 0,02	0,70 ± 0,02	-0,023 ± 0,01
I	131	5,82	0,02	0,73 ± 0,04	0,70 ± 0,03	-0,035 ± 0,01 *
J	53	5,79	0	0,71 ± 0,04	0,67 ± 0,04	-0,057 ± 0,02
K	117	5,74	0	0,70 ± 0,04	0,69 ± 0,04	-0,021 ± 0,01
L	118	5,59	0,01	0,68 ± 0,04	0,70 ± 0,02	0,020 ± 0,04
M	40	5,35	0	0,70 ± 0,03	0,67 ± 0,02	-0,050 ± 0,03
N	115	5,31	0,01	0,69 ± 0,06	0,65 ± 0,05	-0,053 ± 0,02
O	55	5,09	0	0,70 ± 0,04	0,68 ± 0,04	-0,032 ± 0,02
P	169	5,51	0	0,73 ± 0,02	0,70 ± 0,02	-0,048 ± 0,01 *
Q	123	5,77	0,01	0,66 ± 0,03	0,70 ± 0,02	0,054 ± 0,03
R	150	5,93	0,02	0,72 ± 0,03	0,69 ± 0,03	-0,034 ± 0,01
S	157	5,79	0	0,72 ± 0,03	0,71 ± 0,03	-0,009 ± 0,02
T	102	5,48	0	0,70 ± 0,03	0,68 ± 0,03	-0,032 ± 0,02
X	105	5,87	0,02	0,69 ± 0,03	0,69 ± 0,03	-0,002 ± 0,02
Y	61	5,65	0	0,73 ± 0,03	0,69 ± 0,02	-0,058 ± 0,01 *
Z	50	5,70	0,39	0,60 ± 0,06	0,64 ± 0,06	0,042 ± 0,05
AA	38	4,99	0	0,70 ± 0,03	0,66 ± 0,02	-0,067 ± 0,03
AB	158	5,40	0,03	0,71 ± 0,02	0,67 ± 0,03	-0,060 ± 0,02
AC	46	5,47	0	0,72 ± 0,03	0,64 ± 0,03	-0,133 ± 0,03 *
AD	35	5,49	0	0,69 ± 0,05	0,65 ± 0,04	-0,069 ± 0,04
AE	28	5,36	0	0,71 ± 0,05	0,61 ± 0,05	-0,181 ± 0,03
AF	29	4,96	0,02	0,63 ± 0,04	0,57 ± 0,03	-0,100 ± 0,04
AG	34	4,96	0	0,73 ± 0,04	0,67 ± 0,04	-0,096 ± 0,02 *
AH	55	4,49	0	0,80 ± 0,03	0,66 ± 0,02	-0,205 ± 0,02 *
AI	55	5,32	0,32	0,67 ± 0,05	0,64 ± 0,05	-0,048 ± 0,03
AJ	51	5,01	0	0,76 ± 0,04	0,66 ± 0,03	-0,147 ± 0,02 *
AK	49	4,69	0,06	0,70 ± 0,03	0,65 ± 0,02	-0,079 ± 0,03

V.1. táblázat

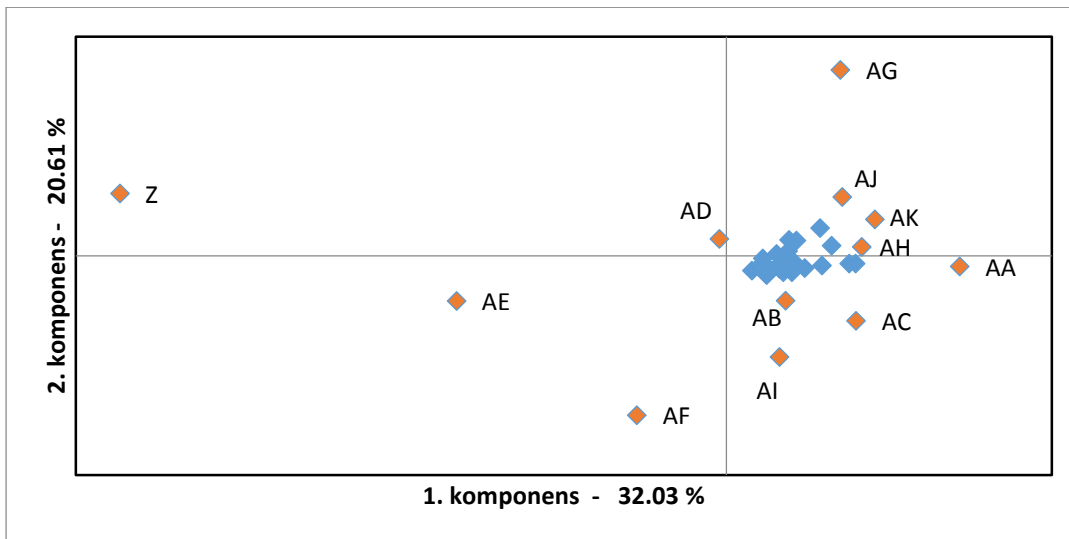
Diverzitási mérőszámok a szürkemarha populációban.

*: Fis – beltenyésztettség együttható nem különbözött szignifikánsan nullától bootstrap eljárás után (konfidencia intervallum = 0,95). n: vizsgált állatok száma; AR: allélikus gazdagság; ARp: egyedi allélikus gazdagság; Ho: megfigyelt átlagos heterozigóitás (átlag±standard hiba); He: várt átlagos heterozigóitás (átlag±standard hiba); Fis: beltenyésztettség koefficiens (átlag±standard hiba).

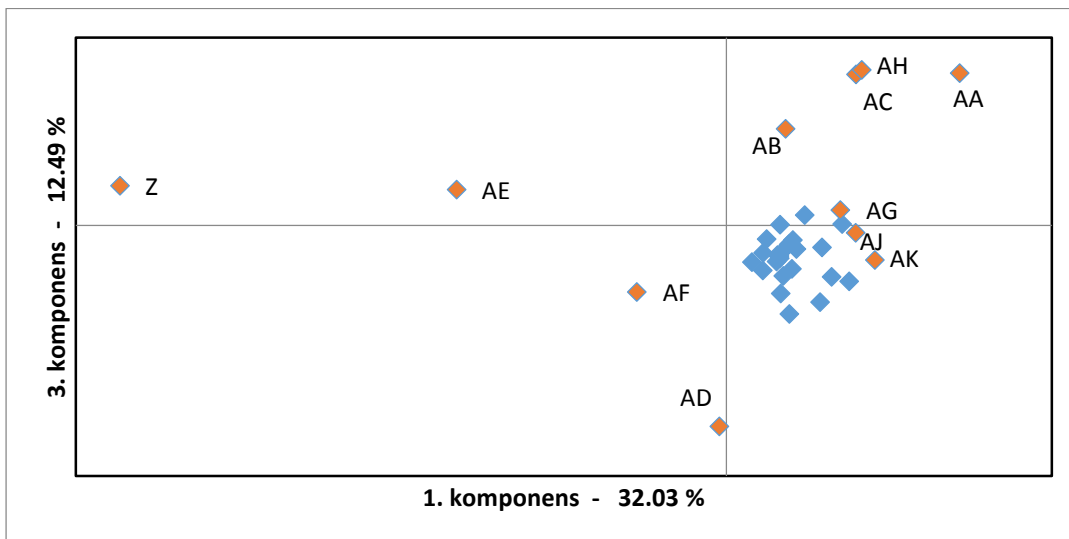
A páronkénti egzakt populáció eltérési teszt -FSTAT és Genpop szoftverekkel számolva- azt mutatta, hogy a négy populációpáron kívül (H vs. Q, X vs. Q, X vs. C és X vs.T) az összes gulyát genetikailag önálló egységként lehet tekinteni, melyek szignifikánsan ($p < 0.05$) különböznek egymástól. A fent említett párokban szereplő C, H, T, X és Q tenyészetek földrajzilag nagyon közel helyezkedtek el egymáshoz.

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 (V.1. ábra; A, B). 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. Egyedül az M-T pár esett ki ebből a határból $F_{st} = 0,061$ értékkel. A páronkénti F_{st} értékek - hasonlóan a gulyák kódjaihoz- archiválásra kerültek a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal genetikai laborjában. Az F_{st} a maremman (MI) és A-Y, illetve maremman 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 ($F_{st}(Z-A)=0,086$; $F_{st}(Z-B)=0,086$)

A.)



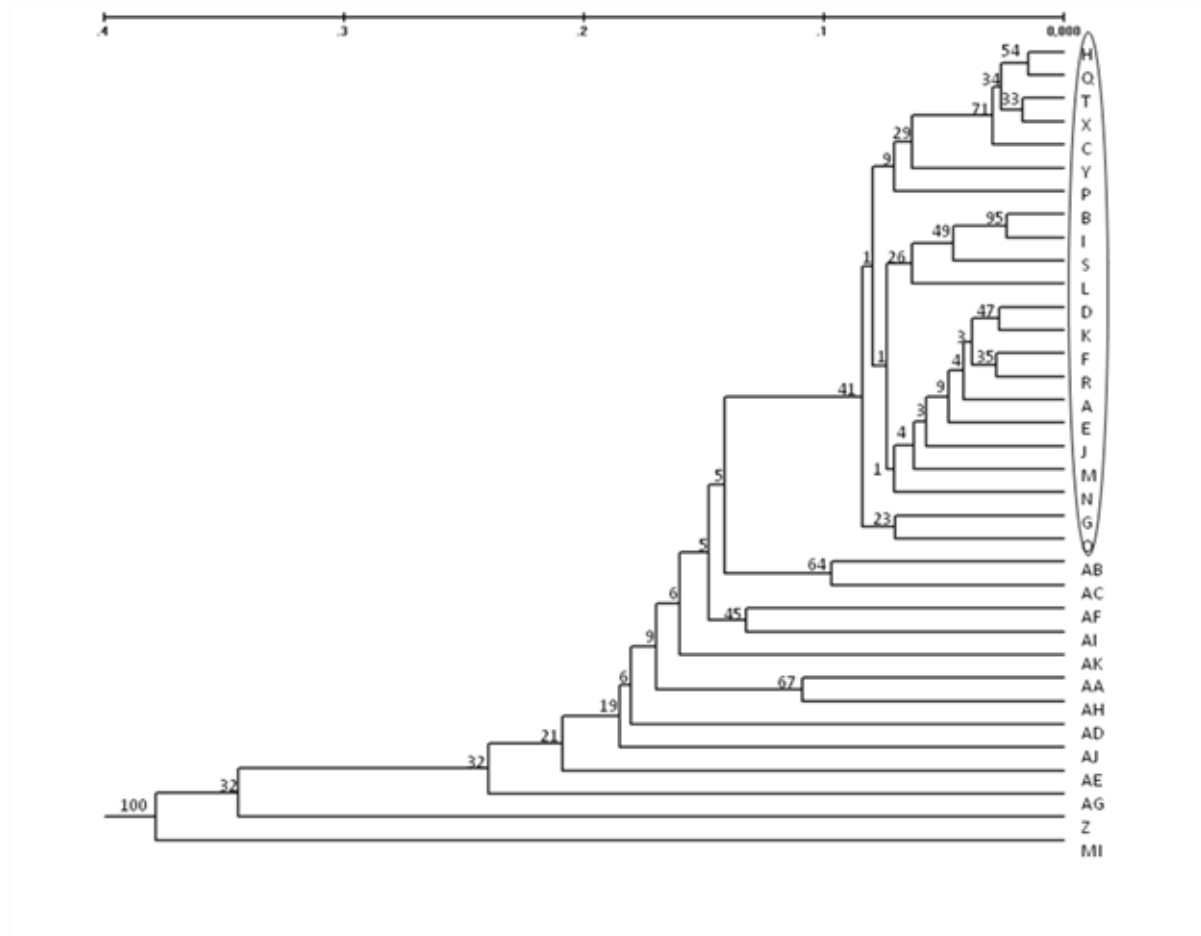
B.)



V.1. ábra

Becsült páronkénti F_{st} értékeken, Genalex modulval 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 varianciarányt jelzik.

A Nei-féle genetikai távolságokon alapuló dendrogramon (V.2. ábra) a szürkemarha tenyészetek kettő fő csoportot mutatnak. A bekarikázott csoportok egymástól mért genetikai távolságai alacsonyok, melyek genetikailag a legkevésbé eltérőek egymástól. Ezen szürkemarha populációk ugyanazok, amelyeket korábban principális komponens analízissel azonosítottunk (kék, nem jelölt tenyészetek az V.1. ábrán)



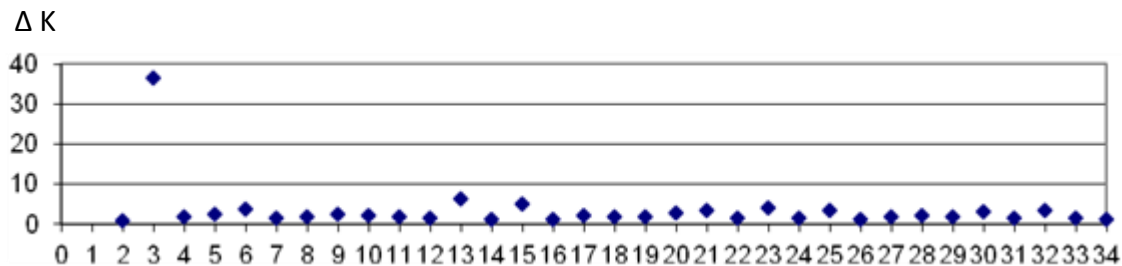
V.2. ábra

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

A genetikai csoportba rendelési vizsgálatoknál az állatok csupán 11-59 százaléka sorolódott az eredetileg hozzájuk rendelt csoportokba az A-Y-ig jelzésű gulyáknál, míg ugyanezen

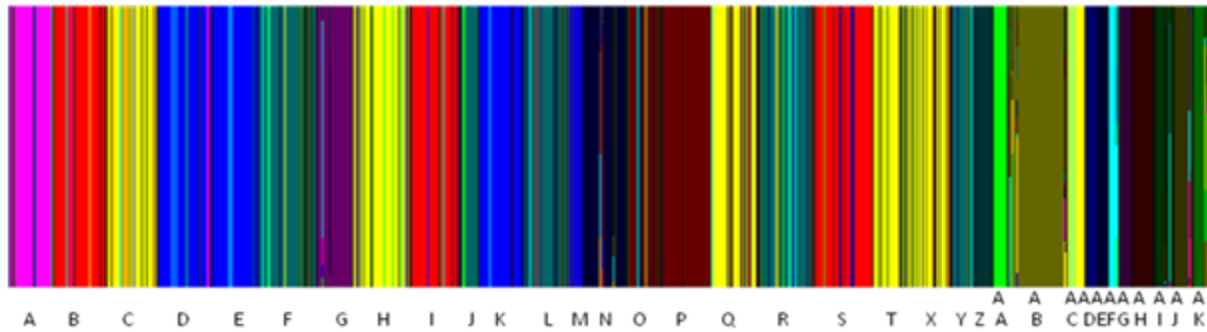
érték a többi populációnál (Z-AK) 69 és 100 % között mozgott, megerősítve az A-Y populációk közelebbi rokonságát egymáshoz a Z-AK csoport egymás közötti vagy a Z-AK csoport A-Y-hoz való rokonságához viszonyítva.

A Structure programmal meghatározott legvalószínűbb klaszterszám háromnak ($K_{\text{Evanno}}=3$, V.3. ábra) adódott a 34 szürkemarha populációt illetően. A K érték 14 volt, ha az eredmény meghatározásához a legalacsonyabb valószínűségi értéket vettük alapul ($\ln P(D) = -102716$, $K_{\text{lowest_p_prob}}=14$). A legvalószínűbb klaszterszámot az A-Y (22 populáció) és a Z-AK (12 populáció) esetében is elvégeztük. Az Evanno módszerrel nyert K érték három volt mindkét esetben. A $K_{\text{lowest_p_prob}}$ érték rendre nyolcnak és kilencnek adódott. A BAPS szoftver segítségével a K értékek rendre 18 (V.4. ábra), 9 és 9 értékeket vettek fel a 34 (A-AK), 22 (Z-AK) és 12 (A-Y) populációk esetében. A szürkemarha populációk története alapján ismert, hogy a mai állomány három gulya leszármazottjának tekinthető. A $K_{\text{Evanno}}=3$ érték egybevág a fajtatörténettel. A BAPS programmal feltárt csoportok a fajta finomabb szerkezetét mutatják (V.4. ábra).



V.3. ábra

34 szürkemarha tenyészet legvalószínűbb klaszterszámának meghatározása a Structure program $\ln P(D)$ értékein használt ΔK meghatározással (a független futtatások száma minden egyes K értéknél tíz volt). A legvalószínűbb klaszterszám három.



V.4. ábra

Szürkemarha populációk egyedeinek (függőleges vonalak) klaszterekbe sorolása a BAPS szoftver szerint. Azok a klaszterek, melyekhez több, mint egy tenyészet tartozik; B, I, S (piros), C, H, Q, T, X, AC (sárga), D, E, K, M (kék), O, P (barna) F, J, L, R, Y (zöld), N, AE (sötétkék)

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. AD, AJ, és AK tenyészetek esetében dokumentált események történtek, melyek az introgressziós feltevésünket támasztják alá ezen esetekben, így a megismert genetikai pozíciók nem meglepőek. A mintázási periódust követően az AK tenyészet megszüntetésre került. Az AG gulya jól ismert a megfelelően vezetett tenyésztési naplókról, tenyésztési gyakorlatról. A megismert genetikai pozíciója alapján a feltételezhetően akkumulálódó genetikai sodródás hatását látjuk.

A maremman fajta filogenetikai fán elfoglalt helye (V.2. ábra) alátámasztja, hogy annak kicsi vagy nincs detektálható hatása a mai szürkemarha populációban (KOVÁCS 1989). Ebben a vizsgálatban a szürkemarhák túlnyomó többsége soha nem sorolódott a maremman klaszterbe, amely egyezést mutat PARiset és mtsai (2010) eredményével, ahol a hasonlóság a két fajta között csak fenotípusosan volt fellelhető. Ugyanakkor a Genalex és GeneClass programok kettő, illetve öt egyed (0,06 ill. 0,16 %-a a vizsgált egyedszámnak) a maremman klaszterbe helyeztek. A Structure szoftver az osztályokba soroláskor hatvankilenc szürkemarhát (2,13%-a a vizsgált egyedszámnak) maremmanként azonosított 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 valószínűségekkkel. Pontosabb maremmanhányad meghatározásának 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.

A páronkénti mikroszatellit genotípusokból számolt Fst érték (0,123) az 52 maremman és a 2690 szürkemarha (A-Y, 23 tenyészet) között hasonló volt PARISET és mtsai (2010) által SNP markerhasználattal meghatározott értékhez (Fst = 0,124) 93 maremman és 63 szürkemarha között. Az Fis alacsony pozitív értéket mutatott (0,031) MANATRINON és mtsai (2008) munkájában, ahol 60 szürkemarha minta szerepelt. A PARISET és mtsai (2010) által beszámolt - 0,048-as Fis érték jó egyezést mutatott az általunk mikroszatellitekkel meghatározott (Fis = - 0,047) értékkel. E kicsi érték és a becsült génáramlás (a migráns állatok száma, Nm = 8,536) jól irányított tenyésztési programot bizonyít a szürkemarha populációban.

TAKÁCS és mtsai (2006) öt szürkemarha tenyészet Nei-féle genetikai távolságát határozta meg ugyanazon mikroszatellit készlettel, melyet e vizsgálat keretében is alkalmaztunk. Az öt populációból három (A, B és C) szintén szerepelt jelen vizsgálatunkban. Összehasonlítva a kiszámolt Nei genetikai távolságokat (D_A) enyhén eltérő értékeket figyeltünk meg. Az eltérések a 2006-os és a mi vizsgálataink között +0,019; -0,003 és -0,028 volt az A-B, A-C és B-C párok esetében. A különbségek valószínűleg a különböző mintavételi időben alkalmazott különböző tenyészállatok hatásának tulajdoníthatók.

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.

VI. SZÁRMAZÁSELLENŐRZÉS CÉLJÁBÓL KIFEJLESZTETT MULTIPLEX PCR SZARVASBAN

VI.1 Összefoglalás

Kilenc lókuszt két multiplex reakcióban (négy és öt lókuszt) alkalmaztunk minden egyes borjú legvalószínűbb anyatehenének meghatározására. A két multiplex készletet egyesítettük egy nyolc lókuszt sokszorosító reakcióba. A nyolc-plex reakció, illetve a kilenc lókuszt kizárési valószínűségei rendre 99,3 és 99,6 % voltak, mely lehetővé teszi a nyolc lókuszt vadfenntartásban való rutinszerű alkalmazását – abból a célból, hogy molekuláris genetikai információt használjanak származásellenőrzésre gímszarvasban. A nyolc-plex reakció lehetővé teszi, hogy egy mintát ne kelljen lókuszonként, egymást követő PCR-ekben többször kezelni. Az itt leírt kilenc lókuszt közül kettőt eddig csak szarvasmarhában használtak.

VI.2 Bevezetés

Molekuláris genetikai információt sikeresen gyűjtöttek különféle fajtákban például a mai szarvasmarha eredetének meghatározására (BEJA-PEREIRA és mtsai, 2006), szamarak és lovak genetikai diverzitásának meghatározására (JORDANA és mtsai, 2001; ABERLE és DISTL, 2004), illetve sertések klasszifikációjára (ZSOLNAI és mtsai, 2006).

Szarvasban átfogó kutatást folytattak mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lókusztok keresésére (SLATE és mtsai, 2002) és a tenyésztési hatékonyságot ellenőrizendő, a beltenyésztettség hatás megismerésére (SLATE és mtsai, 2002). Molekuláris adatok segítettek a gímszarvas genetikai egységének bizonyításában (FEULNER és mtsai, 2004), illetve kulcsfontosságú, agancsfejlődésben szerepet játszó gének keresésére használták azokat (MOLNÁR és mtsai, 2007), melyek a tenyésztők számára hasznos markerek megtalálásához vezethetnek el.

Az egyik nézőpontja a molekuláris markereknek azok alkalmazhatósága a szülői származásellenőrzésben, amelyet már rutinszerűen használnak szarvasmarhában és juhban (GLOWATZKI-MULLIS és mtsai, 1995; 2007) számos országban. Nyilvánvaló igény a vadfenntartási

szakemberek részéről, beleértve a szarvastenyésztőket is, hogy ismerjék az állataik felmenőit különösen akkor, ha fontos fenotípusos adatokat (agancstulajdonságok, testsúly, stb.) tartanak nyilván a tenyésztési könyveikben. Molekuláris genetikai megközelítéseket már alkalmaztak ezen feladat megvalósítására. BONNET és mtsai, (2002) tizenegy mikroszatellitet használt három multiplex reakcióban, HAANES és mtsai, (2005) 25 mikroszatellitet használt hat reakcióban szarvasok genotipizálására.

Az itt mintázott tenyészeteknél egyszerű tenyésztési sémát használnak, miszerint néhány hímet alkalmaznak tenyész bikaként. A tehenek vemhességét vizuálisan ellenőrzik, de az ellés után a borjú sorsát nem lehet könnyen követni megfigyeléssel, mert a borjú néha másik tejelő állatot választ vér szerinti szülője helyett.

A kutatásban azt céloztuk meg, hogy mind dám-, mind gímszarvasban alkalmazható markereket keressünk, melyek hatékonyak a szülői származásellenőrzésben és lehetőleg egy reakcióban működnek, ezáltal csökkentve a laboratóriumi munkaigényt és költséget.

VI.3 Anyag és módszer

2007 nyarán és őszén 119 gímszarvasmintát 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 antikoagulánst tartalmazó csövekbe gyűjtöttük, majd fagyasztva tároltuk azokat a DNS kivonásáig (ZSOLNAI és mtsai, 2003). Az izommintákat Eppendorf csövekben, 96 %-os alkoholban, szobahőmérsékleten tároltuk.

A használt mikroszatellitek:

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 végtérfogatban történt. Az első reakció paraméterei: 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0,66 U DyNAzyme polimeráz, a primerek koncentrációi rendre 0,30; 0,15; 1,00, illetve 1,00 mM (VI.1. táblázat). PCR körülmények a következők voltak: denaturációs lépés: 4 min., 94 °C; 30 ciklus 40 sec., 94 °C; 45 sec., 54 °C; 45 sec., 72 °C-on. A végső extenziós lépés: 10 min., 72 °C. A második reakció

paraméterei: 3,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0,66 U DyNAzyme polimeráz, a primerek koncentrációi rendre 0,20; 0,70; 1,20; 2,00, illetve 0,70 mM (VI.1. táblázat). PCR körülmények a következők voltak: denaturációs lépés 4 min., 94 °C, 2 ciklus 30 sec., 94 °C; 30 sec., 58 °C; 1 min., 72 °C-on; 3 ciklus 30 sec., 94 °C; 30 sec., 57 °C; 1 min., 72 °C-on; 3 ciklus 30 sec., 94 °C; 30 sec., 56 °C, 1 min., 72 °C-on; 11 ciklus 30 sec., 94 °C; 30 sec. 54 °C; 1 min., 72 °C-on; 16 ciklus 20 sec., 94 °C; 30 sec., 52 °C; 1 min., 72 °C-on; A végső extenziós lépés: 10 min., 72 °C.

A nyolc-plex reakció a korábban említett lókuszokat sokszorosítja az első és második primerkészletből, kivéve az OARCP26 lókuszt. A primerek koncentrációi megegyeznek a korábban leírtakkal. A MgCl₂ koncentráció 4,1 mM volt. A PCR ciklusok körülménye megegyezik a második készletnél alkalmazottakkal.

primer-készlet	lókus	jelölés	primer konc. (mM)	forrás	primerszekvenciák
Set1	BM4208	NED	0,15 0,15	Bishop és mtsai (1994)	TCAGTACACTGGCCACCATG CACTGCATGCTTTTCCAAAC
	NVHRT21	VIC	0,075 0,075	Røed és Midthjell (1998)	GCAGCGGAGAGGAACAAAAG GGGGAGGAGCAGGGAAATC
	RT1	PET	0,50 0,50	Wilson és mtsai (1997)	TGCCTTCTTTCATCCAACAA CATCTTCCCATCCTCTTTAC
	NVHRT73	6FAM	0,50 0,50	Røed és Midthjell (1998)	CTTGCCCATTTAGTGTTTTCT TGCCTGTCATTGAATAGGAG
Set2	CSSM066	VIC	0,10 0,10	Moore és mtsai (1994)	ACACAAATCCTTCTGCCAGCTGA AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG
	DIK082	6FAM	0,35 0,35	Hirano és mtsai (1996)	CCCACTCTGTCTCCAGTTTG TATCCTGAGAAAAGCTGCTAGA
	IDVGA59	6FAM	0,60 0,60	Mezzelani és mtsai (1995)	CAGTCCCTCAACCCTCTTTTC AACCCAAATATCCATCAATAG
	NVHRT48	PET	1,00 1,00	Røed és Midthjell (1998)	CGTGAATCTTAACCAGGTCT GGTCAGCTTCATTTAGAAC
	OarCP26	NED	0,35 0,35	Ede és mtsai (1995)	GGC CTA ACA GAA TTC AGA TGA TGT TGC GTCACCATACTGACGGCTGGTTCC

VI.1. táblázat

Az első és második sokszorosítási reakció primerei és koncentrációi.

A sokszorosított DNS fragmenteket ABI automatikus fragmentanalizálóval választottuk el. LIZ 600-at használtunk belső molekulaméret standardként.

A fragmenthosszakat Genescan és Genotyper programokkal határoztuk meg. A következő programokat alkalmaztuk adatfeldolgozásra és ellenőrzésre: a Microsatellite Toolkit-et (PARK, 2001) adatformázásra használtuk azon célból, hogy a GeneClass (PIRY és mtsai, 2004), WhichRun (BANKS és EICHERT, 2000), PAPA (DUCHESNE és mtsai, 2002) és CERVUS (MARSHALL és mtsai, 1998) programok bemeneti formátumait előállítsuk.

VI.4 Eredmények és megbeszélés

Összesen 41 mikroszatellit teszteltünk.

Közülük huszonkettőt szimplex PCR-ekben DyNAzyme és Taq-polimerázzal, különböző hőmérsékleti profillal ellenőriztük. A negyvenegy mikroszatellit lókuszt közül rendre nyolc és tizenegy lókuszt szülői származásellenőrzésre használtak juhban (a Nemzetközi Állatgenetikai Társaság -ISAG- által javasolt lókusztok) és szarvasmarhában (GLOWATZKI-MULLIS és mtsai, 1995). Ezeket szarvasmintákon is teszteltük.

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 terveztük meg, 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 % (VI.2. táblázat). Heterozigóta hiány a legtöbb lókuszt esetében megfigyelhető volt (VI.3. táblázat), de a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés csak egy lókuszt volt megfigyelhető a B farm esetében, az IDVGA59 lókusztnál.

	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
lókuszkok 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	0,08110	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

VI.2. táblázat.

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

Farm	Ho	He	Ho	He	allélok száma		mérethatárok (bp)		PIC		Fis	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
lókus												
NVHRT73	0,791	0,806	0,788	0,839	13	17	202-234	202-238	0,776	0,815	0,019	0,061
NVHRT21	0,500	0,799	0,596	0,854	13	10	142-193	142-168	0,767	0,827	0,376	0,304
BM4208	0,687	0,860	0,615	0,866	10	10	144-182	144-182	0,838	0,842	0,203	0,291
RT1	0,642	0,654	0,635	0,566	8	10	208-232	208-232	0,625	0,540	0,019	-0,122
DIK82	0,627	0,767	0,769	0,849	8	9	122-137	122-137	0,727	0,821	0,184	0,095
IDVGA59	0,806	0,766	0,962	0,846	12	11	254-275	254-274	0,728	0,822	-0,053	-0,139
CSSM66	0,657	0,756	0,750	0,760	8	10	161-187	161-187	0,718	0,716	0,132	0,013
CP26	0,851	0,837	0,846	0,811	10	11	125-162	123-162	0,809	0,778	-0,017	-0,044
NVHRT48	0,642	0,767	0,692	0,802	11	10	81-107	90-107	0,733	0,768	0,164	0,138

VI.3. táblázat

Megfigyelt és várt heterozigótások, allélok száma, allélok mérethatárai, PIC és Fis értékek a vizsgált lókuszokon és farmokon.

A PAPA, Whichrun, GeneClass és CERVUS programokat azon képességüket illetően hasonlítottuk össze, hogy képesek kiválasztani a legvalószínűbb anyatehenet az adott borjúhoz. A programok által kiválasztott szülők 93 %-ban ugyanazok az állatok voltak. Bár a genotípusok meghatározása egyértelmű volt és az ismételt sokszorosítási reakciók ugyanazon genotípusokat reprodukáltak, a különböző programok különböző állatokat javasoltak lehetséges anyaként a fennmaradó 7 %-ban. Az ellentmondásokat feloldandó, ezen állatok genotípusait vizuálisan ellenőriztük.

Mivel a legkényelmesebb módon a GeneClass és CERVUS programok eredményeit lehetett kiértékelni, elsősorban ezeket javasoljuk szülői származásellenőrzésre, amennyiben sok mintát kell összehasonlítani. Ezen túl a CERVUS képes genotipizálási hibák korrekciójára, megnövelve a sikeres szülői hozzárendelést (KALINOWSKI és mtsai, 2007). A CERVUS-t alkalmazzák törvényszéki esetek megoldására is (CASTAGNASSO és mtsai, 2007).

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 (VI.3. táblázat) és függetlenül a két készlettel, ugyanarra a célra használható.

A primereket jelölő fluoreszcens festékek színinformációjának újratervezése segíthet a 9-plex reakció kialakításában, amely az OARCP26 lókuszt is magába foglalhatja.

Ebben a vizsgálatban hét lókuszt azonos HAANES és mtsai (2005) által leírt lókuszekkel 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 lókuszt benne volt az elsőnek tesztelt primerhalmazban és alkalmasnak bizonyult multiplexálásra. A fennmaradó két lókuszt (DIK082, IDVGA59) más kutatók fejlesztették szarvasmarha fajtában (VI.1. táblázat).

Dámszarvas esetében (47 állat két farmról) a populáció homogénnek bizonyult, a beltenyésztettségi együttható (Fis) rendre 61 és 43 % volt. Ezekben a populációkban több mikroszatellit lókuszt lenne szükség a használható szülői származásellenőrzéshez.

A leírt mikroszatellit reakciók (különös tekintettel a nyolc-plex reakció) támogatni tudja a vadfenntartással kapcsolatos döntéseket, segít a költségek és ráfordított munka csökkentésében, 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 dogozó 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 beltenyésztettségi állapotát.

Az elvégzett munkát az OMFB-01317/2004 számú nemzeti pályázat támogatta.

VII. A SURLÓKÓR REZISZTENCIA KIMUTATÁSA

VII.1 Összefoglalás

A prion proteint kódoló gén 136, 154 és 171-es kodon variánsait kimutató módszert fejlesztettünk ki. A négy, aminosavvaltozásért felelős mutáció egyszerre, párhuzamosan kerül meghatározásra. A technika fluoreszcensen jelzett dideoxy nukleotidokkal végzett lánclezáró reakción alapszik. Az egy bázissal meghosszabbított primereket kapilláris elektroforézissel választjuk el egymástól. Az alábbiakban ezen technika validálását, illetve e technikával nyert genotípuseloszlásokat mutatjuk be néhány fajtán.

VII.2 Bevezetés

A surlókór (scrapie) a juhok és a kecskék halálos, neurodegeneratív betegségcsoportja (PRUSINER, 1995). Létrejöhet fertőzés eredményeként, de kialakulhat genetikai alapon is. A surlókórt szivacsos encephalopathiának vagy prion betegségnek is szoktak nevezni. A mintegy 250 éve ismert betegség Új-Zéland és Ausztrália kivételével (HUNTER, 2000) szinte minden országban előfordult, ahol juhot tenyésztenek. A surlókór az egészségügyi hivatalok fókuszába akkor került, amikor a szarvasmarha BSE betegsége és az ember Creutzfeldt-Jacob betegsége közötti kapcsolatot megállapították, illetve olyan polimorfizmusokat fedeztek fel juhban, melyek összefüggésben vannak a scrapie betegség kialakulásának valószínűségével (LAPLANCHE és mtsai, 1993).

A surlókór olyan betegség, melynek tünetei nagyon emlékeztetnek a szarvasmarha BSE tüneteire (DAVIS és mtsai, 1991), hasonlóan a macskafélék és a vad patás állatok TSE megbetegedéséhez (HUNTER, 2000; FATZER és VANDEVELE, 1998). Lappangási ideje nagyon hosszú (6-32 hónap). A jellegzetes klinikai tünetek lassan, fokozatosan alakulnak ki. A beteg állatok vakaróznak, testüket, különösen az ágyéktájékot és a farrészt, a falhoz, a kerítéshez dörzsölik. E viselkedés lassan alábbhagy, majd megfigyelhető a bizonytalan, hosszú lépésekkel tarkított, vágató jellegű mozgás. Az utolsó stádiumban a betegek lefeksznek, segítséggel is csak nehezen állíthatók lábra. Három-nyolc hétig tartó betegeskedés után a fertőzött állat elhullik. Az epidemiológiai modellnek megfelelően a surlókór fertőzésen átesett állomány 2-15 évig fertőzőnek tekintendő. Magyarországon utoljára 1964-ben dokumentálták e betegség megjelenését (ÁLDÁSSI és SÜVEGES, 1964).

A surlókór egy abnormális prion fehérje megjelenésével és akkumulálódásával jellemezhető, mely jelenleg a betegség egyetlen molekuláris markere (GROSCHUP és mtsai, 1997). A prion fehérje a legtöbb sejtben kifejeződő glükoprotein, amely a sejtmembránhoz kapcsolódik. Normál funkciója kevésbé ismert, szerepet játszhat a cirkadián ritmus és alvás szabályozásában egereknél (HUBER és mtsai, 1999).

Juh esetében van kapcsolat a betegség kialakulása és a vizsgálható prion kódoló DNS variánsok között (LAPLANCHE és mtsai, 1993; HUNTER és mtsai, 1997b; SMITS és mtsai, 2000). Számos variáció fellelhető a prion fehérjét kódoló szekvencián, melyek a következők; 112(M/T), 136(A/T/V), 137(M/T), 138(S/N), 141(L/F), 151(R/C), 154(R/H), 171(Q/R/H/K), 176(N/K) és 211(R/Q) (10, 11, 12). A prionfehérje aminosav variánsok közül a 136, 154 és 171-es pozícióban lévő alléljei befolyásolják a prionfertőzéssel szembeni rezisztencia alakulását. Bár az összes variációja nem fordul elő ezen alléloknak, a vad típus valószínűsíthetően A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁. Az allélváltozatok; a 136. helyen alanin (A, GTC)/valin (V, GCC), a 154. pozícióban arginin (R, CGT)/hisztidin (H, CAT), a 171. helyen arginin (R, CGG)/glutamin (Q, CAG)/ hisztidin (H, CAT) aminosavak illetve kodonok fordulnak elő (a zárójeles kifejezések első tagja az aminosav egybetűs, a második tag az aminosav DNS kódja). A 136-os, illetve 154-es kodon módosító hatással van a 171-es kodon egyértelmű hatására. Az RR₁₇₁ mindig a legkevésbé fogékony variáció, általában rezisztens a fertőzéssel szemben, és domináns a Q és H allélekkel szemben. A különböző genotípusok 5 csoportba sorolhatók. A valószínűsíthető normál (vad) allél (ARQ) mellett a leginkább előforduló variánsok az ARR, AHQ, ARH és VRQ típusok. Az ARK típus nagyon ritka, hatása nem ismert. Általában az ARR és AHQ haplotípussal bíró egyedek rezisztensek a betegséggel szemben, míg a VRQ típusú egyedek fogékonyak arra (SMITS és mtsai, 2000). Az aminosav különbségeket tükröző variánsok (allélek) molekuláris genetikai módszerrel azonosíthatók.

A betegséggel szembeni rezisztenciával kapcsolatba hozható lókuszek helyei, ahol nagybetűk az aminosavak egy karakteres rövidítései:

	V
136-os kodon	A
421 gagctgctgc agctggagca gtggtagggg gccttgggtgg ctacatgctg ggaagtgccca	
	H
154-es kodon	R
481 tgagcaggcc tcctatacat ttggcaatg actatgagga ccgttactat cgtgaaaaca	
	H
	Q
171-es kodon	R
541 tgtaccgtta cccaaccaa gtgtactaca gaccagtgga tcggtatagt aaccagaaca	

A surlókór feltűnésének veszélyét minimalizálандó, különféle stratégiákat lehet választani a szelekciós programokban. Elsősorban a kosok érdekesek a genetikai tesztre az anyákkal szemben, mert a kis számú kosnak van a legnagyobb hatása a tulajdonságokra. Másodsorban érdemes megfontolni, hogy a surlókórral szembeni ellenállásra való szelekcióval nem veszít-e a tenyésztő egyéb tulajdonságban. Hosszú távon a surlókór elleni szelekció tűnik hasznosabbnak. A szelekció végbevihető ARR/ARR kosok és anyák használatával, akár mesterséges megtermékenyítési módszerekkel magpopuláció kialakításával, vagy lépcsőzetes szelekcióval az alacsony ellenállóképességű állatok ellen. E leírt megközelítések különféle kombinációit használják Nagy-Britanniában, Hollandiában, Franciaországban és Németországban (DAWSON és mtsai, 1998; ERHARDT és mtsai, 2002)

A folyamatosan növekvő mennyiségű, tipizálандó állatok gyors és hatékony, megbízható genotipizálási eljárást követelnek. Az eddig ismert eljárások, melyek a prion proteint kódoló gén variánsainak tipizálását szolgálják; a sűrűség gradiens gélelektroforézis, DDGE (LAPLANCHE és mtsai, 1993); az allél-specifikus oligonukleotid hibridizáció kötött PCR termékekhez (HUNTER és mtsai, 1997a), dot-blot hibridizáció radioaktívan jelölt próbákhoz (ISHIGURO és mtsai, 1998), PCR-RFLP (LOCKLEY és mtsai, 2000; BELT és mtsai, 1995; YUSBASIAN-GURKAN és mtsai, 1999), szekvenálás (JUNGHANS és mtsai, 1998), TaqMan valós

idejű PCR (CAWTHRAW és mtsai, 2001), piroszekvenálás vagy szilárd fázisú mikroszekvenálás kolorimetriás detektálással (KOCZAN és mtsai, 2001).

A legalkalmasabb eljárások a polimeráz 5' nukleáz (TaqMan) aktivitását kihasználó PCR eljárás, piroszekvenálás vagy mikroszekvenálások voltak. A genotipizálási ár és munkaidő alacsony a TaqMan PCR, piroszekvenálás vagy kolorimetriás eljárásoknál, de speciális készülékek megvásárlását igénylik. Az automatizált szekvenálás azt a lehetőséget adja, hogy addig nem ismert mutációkat is észre lehet venni a genotipizálás után, amennyiben a mutáció belül van a szekvenált régióban. Azon laboratóriumok, melyek nem rendelkeznek speciális műszerekkel, nem tudják e módszerek előnyeit kihasználni, így nekik a PCR-RFLP, DGGE vagy hibridizációs technikák közül kell választani.

A mi lehetőségeink szerint rutin tipizálásra a PCR-RFLP vagy a szekvenálás (ABI 310 fragment analizáló készüléken) volt alkalmas. Egy másik lehetőségként a vizes fázisú mikroszekvenálási eljárás jöhetett szóba, melyet a céljainkhoz alakítottunk.

VII.3 Anyag és módszer

A genomiális DNS-t vérből izoláltuk; 50 µl vért háromszor mostuk 500 µl mosóoldatban (Tris-HCl 10 mM, pH=7,5, Na₂EDTA 1mM, pH=8,0) és minden mosás után centrifugáltuk 12000 fordulat/perc fordulatszámra, Eppendorf-csőben. Ezután 100 µl lízis oldatot (Tris 10 mM, pH 7.5, KCl 50 mM, Tween20 0.5%, Proteinase-K 0.6 µg/µl) adtunk a pellethez. Az oldatot rázás közben 56 °C-on tartottuk egy óra időtartamon keresztül. A proteináz K-t 10 perces, 95 °C-os inkubálással inaktiváltuk. Az így nyert lízis oldatot használtuk szubsztrátként az első reakcióban.

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.

Az első reakció 0,2-0,2 μM primert, 200 μM dNTP-t, 1,5 mM MgCl_2 -ot, 0,5 U DyNAzyme polimerázt (Finnzymes Oy, Espoo, Finnország) és 1 μl fentiekben leírt lízis oldatot tartalmazott 40 μl végtérfogatban (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100). A reakció hőmérsékleti profilja a következő volt: 94 °C 1 percig; 30 cikluson keresztül: 94 °C, 30 sec.; 58 °C, 30 sec.; 72 °C 30 sec. A 30. ciklus végén a mintákat 72 °C-on 5 percig inkubáltuk. A PCR reakciót követően a terméket High Pure PCR Purification Kittel (Roche, Mannheim, Németország) tisztítottuk. A tisztított terméket használtuk a SNaPshot mikroszekvenálási reakcióban (Applied Biosystems, Foster City, USA).

A második amplifikáció körülményei:

96 °C, 10 sec.; 50 °C, 10 sec.; 60 °C, 30 sec.; ciklusszám: 25. A mikroszekvenáló primerek (40-, 46-, 53-, 60-mer) koncentrációi rendre a következők voltak: 0,08; 0,30; 0,08; 0,50 μM .

A termékeket alkalikus foszfátáz kezelésnek alávetve (a nem beépült ddNTP-k elektroforetikus mobilitásának megváltoztatása érdekében) a 3' végen fluoreszcensen jelölt fragmenteket hosszait ABIPrism310 fragment analízátorral határoztuk meg. A genotípus hozzárendelés Genotyper programmal történt.

VII.4 Eredmények és megbeszélés

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 optimalizált teszt egyezett a szekvenálási eredményekkel. Más mintákat párhuzamosan PCR-RFLP módszerrel (YUSBASIAN-GURKAN és mtsai, 1999) vizsgáltunk (VII.1. táblázat). 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, mivel az egy fluoreszcens festékkel jelzett bázissal meghosszabbított primerek elektroforetikus vándorlási távolsága nem szükségszerűen felel meg a bázishossznak. A vándorlási távolságban megfigyelt variancia nem befolyásolta a genotipizálást.

rizikó csoport	genotípus	racka	cigája	texel	merinó
R1	ARR/ARR	2,60	4,50	13,00	18,40
R2	AHQ/AHQ	7,70			
	AHQ/ARR	12,80	4,50		5,30
R3	AHQ/ARH	12,80		1,40	
	AHQ/ARQ	17,90			
	ARR/ARH	2,60		17,40	
	ARR/ARQ	10,30	45,50	30,40	36,80
R4	ARH/ARH	2,60		2,90	
	ARQ/ARQ	10,30	45,50	4,30	34,20
	ARH/ARQ	15,40		13,00	
	ARR/VRQ			10,10	5,30
R5	ARH/VRQ	2,60		1,40	
	ARQ/VRQ	2,60		4,30	
	VRQ/VRQ			1,40	
	n=	39	22	69	38

VII.1. táblázat

Prion protein genotípusok eloszlása százalékos értékben kifejezve, különféle juhajtókban.

n: minták száma, R1: nagyon kicsi az esélye, hogy az egyed, vagy az F1 nemzedék surlókóros legyen, R2: alacsony a valószínűsége a surlókór kialakulásának mind az adott egyedben, mind az utódokban, R3: alacsony eséllyel alakul ki surlókór az adott egyedben, de néhány utód magasabb rizikócsoportba kerülhet a másik szülő genotípusától függően, R4: surlókór kialakulhat, az utódok nagyobb hányada kerülhet magas rizikó osztályú csoportba, R5: A legnagyobb esély arra, hogy surlókór kialakuljon. A 69 texel és 38 merinó PCR-RFLP tipizáláson is átesett. Az összes genotípus megegyezett a mikroszekvenálási adatokkal.

A mutációk a primerkötő helyeken nem valószínű, hogy befolyásolják a betapadást a következő okok miatt; i.) a 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 szálat is fel lehet használni a primertervezésnél.

Az itt vizsgált kodonok variációi a VII.2. táblázatban láthatóak (DRÖGEMÜLLER és mtsai, 2001).

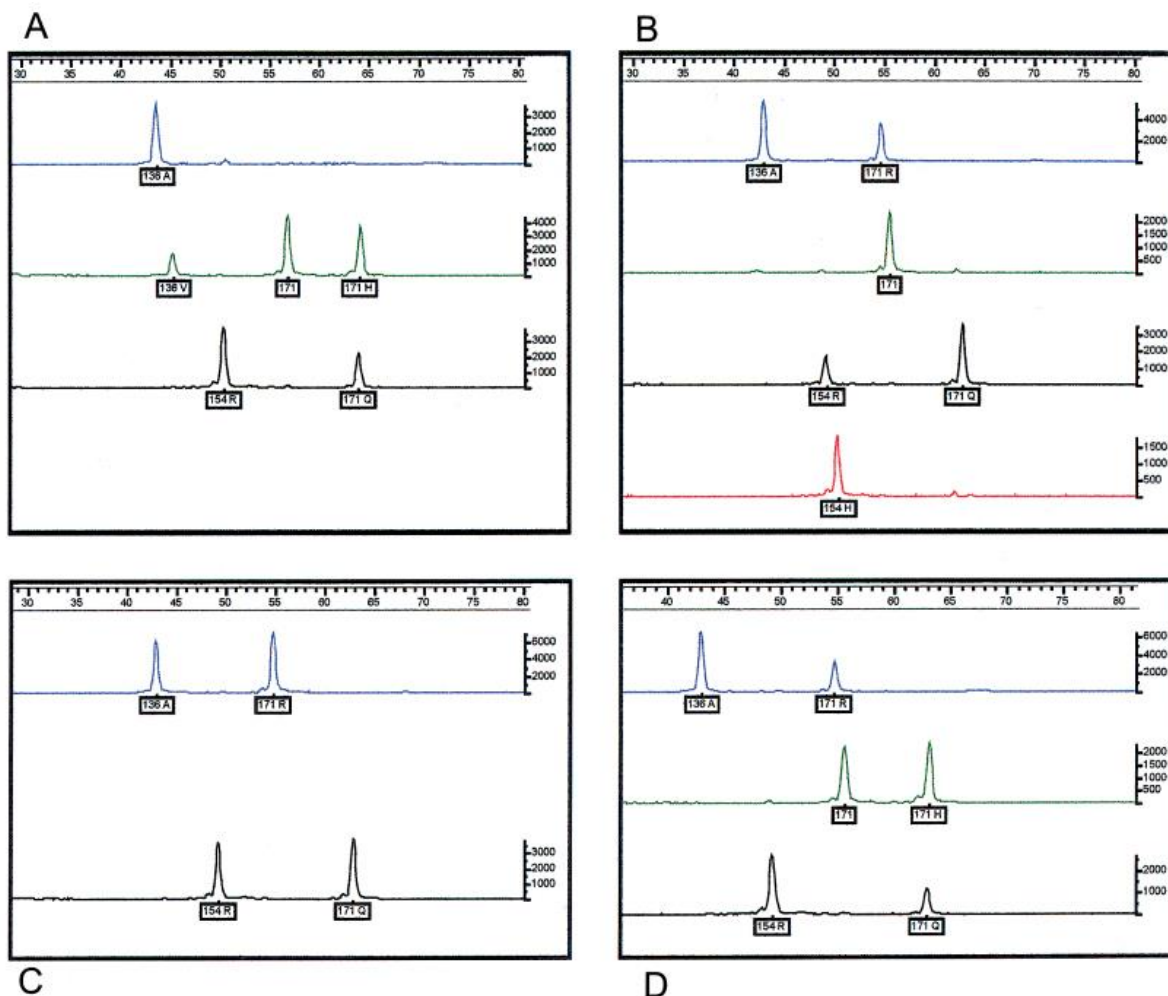
A ritka haplotípusok (T₁₃₆ and K₁₇₁) detektálása nem lehetséges a leírt primerkészlettel.

kodon	DNS	aminosav
136	GTC	V
	GCC	A
154	CGT	R
	CAT	H
171	<u>CAG</u>	Q
	CGG	R
	<u>CAI</u>	H

VII.2. táblázat

Juh prion protein gén polimorfizmusai a megadott kodonokon. A vastag, illetve az aláhúzott betűk jelölik a nukleotid polimorfizmusokat.

Néhány kiválasztott genotípus elektroforetikus mintázata és a mintázat kiértékelésének módja az VII.1. ábrán és a VII.3. táblázaton látható.



VII.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.

kodon száma (fragmenthossz szerinti érzékelési tartomány)								
136 (42-46)		154 (48-52)		171 (53-57) (60-64)				
Primer1	aminosav	Primer2	aminosav	Primer3	aminosav	Primer3 és	Primer4	aminosav
kék/zöld	A/V	kék/fekete	R/H	kék/zöld	R/Q vagy R/H	Kék	fekete	R/R
						kék/zöld	fekete	R/Q
						kék/zöld	zöld/fekete	R/H
						zöld	fekete	Q/Q
						zöld	zöld	H/H
						zöld	zöld/fekete	H/Q

VII.3. táblázat

A kiértékelés összefoglalása a kodonok száma, a fragmentek színe és hossza szerint.
A vastag számok a kodonok számát jelölik. A zárójelben a Genotyper programban beállított detekciós ablak intervalluma szerepel bázishosszban kifejezve. A vastag betűk az azonosított aminosavat adják meg. A jelzés, mint pl. a kék/zöld az jelenti, hogy két különböző színű csúcs volt megfigyelhető az analízis-ablakban. Ha egy szín van megadva pl. a kék, akkor csak egy csúcs volt az adott hosszintervallumban. A színek kombinációi adják meg a különbségtételt az (A/V)₁₃₆ (R/H)₁₅₄ (R/H/Q)₁₇₁ aminosavak között.

A 136-os kodon esetében ddG épül be a primer 3' végéhez ha a kodon GCC, így az adott fragmentum kék lesz, a leolvasott aminosav A-nak felel meg. Ha a kodon GTC, a beépülő jelölt dideoxy nukleotid ddA (a csúcs színe zöld), az aminosav V. a 154-e kodon esetében fekete csúcs figyelhető meg, amennyiben az R154H-r primer ddC-vel kerül kiegészítésre (a kodon CGT, az aminosav R). A csúcs akkor piros, ha a beépülő jelölt dideoxy nukleotid ddT (a kodon CAT, az aminosav H). A helyzet kicsit más a 171-es kodonon, ahol három különféle aminosav kódolódik, a mutációktól függően. Ezen szekvenciárszleten a CGG arginint kódol, így a beépülő jelölt dideoxy nukleotid ddG az R171-f primeren; a csúcs színe kék. E szín önmagában azt jelzi, hogy az aminosav ebben a pozícióban R. Ha a csúcs zöld (ddA kapcsolódik az R171-f primerhez), akkor a kodonok CAG, CAA illetve CAT, CAC –k lehetnének, melyek glutamint, illetve hisztidint kódolhatnak. A döntést a Q171H-r primer segíti, ahol a beépülő jelölt dideoxy nukleotid ddC (ekkor a kodon CAG, a csúcs színe fekete) és ddA (ekkor a kodon CAT, a csúcs színe zöld) lehet, melyek megfelelnek rendre a glutaminnak és hisztidinnak. Természetesen a fekete csúcs is megfigyelhető, ha a kodon CGG (R), de ebben az esetben a kék csúcs jelenléte ad felvilágosítást az aminosav milyenségéről (VII.1. táblázat, VII.1. ábra). Más szavakkal, ha a

kodon CGG az egyetlen lehetséges aminosav R. Ha A nukleotidot észlelünk a második pozíciónál, akkor az aminosav Q vagy H lehet, amely viszont a harmadik pozícióban lévő nukleotid meghatározását követeli. Itt érdemes megemlíteni, hogy mások (MATYAS és mtsai, 2002) egy színt vagy fluoreszcens molekulát használtak arra, hogy pontmutációkat szekvenciafüggő elektroforetikus mobilitás alapján határozzanak meg.

Ebben a vizsgálatban a mikroszekvenálási reakciók optimalizálása előtt szekvenálást használtunk a minták genotípus meghatározására, illetve PCR-RFLP reakciót az eredmények validálására (VII.2. táblázat). A PCR-RFLP-t összehasonlítva a mikroszekvenálással, az utóbbi kevesebb lépést kíván még akkor is, ha figyelembe vesszük az amplifikációk közötti és az elektroforézisek előtti mintakezeléseket. Az eljárásunk szűk keresztmetszete az ABIPrism 310 fragment analízáló, mert csak egy minta fragmentjeinek szeparálását teszi lehetővé egy időben. Az áteresztőképesség növelhető olyan eszköz használatával, amely több mintát tud párhuzamosan futtatni, analizálni.

A genotípusok öt csoportba (R1-R5) sorolhatóak az alacsony valószínűséggel kialakuló, illetve nagy valószínűséggel kialakuló surlókór esélye alapján (ISHIGURO és mtsai, 1998; DAWSON és mtsai, 1998; DISTL, 2000; HUTER és mtsai, 2000), amennyiben fertőzés történik. Magyarországon az utolsó ismert surlókór megbetegedést 1964-ben írták le (ÁLDÁSSY és SÜVEGES, 1964). Mivel a surlókór nincs jelen az országban (KLUGE és GLÁVITS, 1993; GLÁVITS és RÁTZ, 1996), ezért a hazai fajtákon nem lehet elvégezni a rezisztenciavizsgálatokat, így elfogadjuk azon eredményeket, melyeket már a bevezetés részben említettünk.

A különféle fajtákon bemutatott genotípus-eloszlás (VII.1. táblázat) meghatározását véletlenszerűen kiválasztott állatokon végeztük el. E kezdeti felmérés csupán azt mutatja, hogy sokféle genotípus található meg a vizsgált állatok között, és maga a vizsgálati eljárás alkalmas a további felhasználásra.

2002-ben 2003-ban a Magyar Juhtenyésztők Szövetségének segítségével az egész országban elkezdődött a vérminták gyűjtése. Célunk a merinó tenyészkosok, a racka, cigája, és 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 lókuszt vizsgálata is beépíthető az eljárásba, amennyiben több surlókór-rezisztenciával kapcsolt mutáció (HUNTER és mtsai, 2000) válik ismertté.

VIII. A SURLÓKÓR-REZISZTENCIÁT BEFOLYÁSOLÓ PRION PROTEIN GENOTÍPUSOK ÉS NÉHÁNY NÖVEKEDÉSI TULAJDONSÁG KAPCSOLATA MAGYAR MERINÓ ÉS NÉMET MERINÓ KOSOKBAN.

VIII.1 Összefoglalás

Juh esetében a surlókórra való fogékonyság kapcsolt a prion proteint (PrP) kódoló gén polimorfizmusával. Ebben a vizsgálatban növekedési tulajdonságok (báránycori súlygyarapodás, hízekonyság, testsúly az első és második évben) és PrP genotípusok (ARR/ARR, ARR/XXX és XXX/XXX, ahol XXX AHQ, ARQ, ARH vagy VRQ haplotípust jelent) kapcsolatát vizsgáltuk magyar merinó ($n = 286$) és német merinó ($n = 215$) kosokban. A magyar merinóban a vizsgált tulajdonságok és a PrP genotípusok között nem találtunk szignifikáns kapcsolatot. A német merinóban a báránycori súlygyarapodás kis mértékben, de szignifikánsan ($p \leq 0,05$) kapcsolva volt a prion protein genotípussal. A genotípus 9,6%-ban befolyásolta a súlygyarapodást.

VIII.2 Bevezetés

A surlókór halálos, fertőző, neurodegeneratív betegsége a juhok és a kecskének (PRUSINER 1991, DRÖGEMÜLLER és *mtsai*, 2001). Juhban a prion protein gén három kodonja által meghatározott aminosav változatok (136 (A->V), 154 (R->H), 171 (Q->R,H)) ötféle elrendezésben találhatóak meg (ARR, AHQ, ARQ, ARH and VRQ) és kapcsolatban vannak a surlókór rezisztenciával (WISNIEWSKA és *mtsai*, 2006).

Részletesebb leírás a surlókórról és a prion proteint kódoló gén változatairól a VII.2 fejezetben olvasható.

Európai Unió szabályozás szerint (no. 100/2003) minden országnak genotípus információ alapuló tenyésztési programot kell folytatnia az ARR allél előfordulási gyakoriságának növelése érdekében, hogy csökkentse azon allélok gyakoriságát, melyek kapcsoltak a betegség kialakulásának magasabb kockázatával. Ez a szelekciós munka bizonyos produkciós és/vagy reprodukciós tulajdonságok változását vonhatja maga után azzal, hogy erős szelekciós nyomásnak teszi ki a juh 13-as kromoszómájának azon régióját, ahol a PrP gén elhelyezkedik.

A prion protein genotípusok lehetséges hatását különböző minőségi és termelési tulajdonságokra számos esetben vizsgálták.

PROPOKOVÁ és mtsai (2002), de VRIES és mtsai (2004), GERNAND és mtsai (2005) és CASELLAS és mtsai (2007) vizsgálatokat végeztek néhány kiválasztott növekedési tulajdonságra nézve, de nem tudták bizonyítani a PrP genotípus hatását. BRANDSMA és mtsai (2004) kimutatták, hogy enyhe negatív, szignifikáns hatása volt a genotípusnak a 135. napi testsúlyra. Lehetséges genetikai veszteség-intervallumot is szimuláltak, feltételezve, hogy a szelekció ARR variáns elterjesztésével kezdődik (WING-YOUNG és mtsai, 2007).

Ezen vizsgálat a prion protein genotípusok produkciós tulajdonságokra (báránycori súlygyarapodás a 135. napig, hízekonyság a 150. naptól a 185-ig, testsúly az első és a második évben) való hatásának a becslésével foglalkozik magyar és német merinó fajtákban.

VIII.3 Anyag és módszer

VIII.3.1 Állatok és adatok

98 tenyészetből 501 kos -286 magyar merinó és 215 német merinó- vett részt a vizsgálatokban. 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.

Az első adathalmaz termelési adatokat tartalmazott, melyeket a Magyar Juhtenyésztők Szövetségének a törzskönyveiből kaptunk meg; a báránycori súlygyarapodás (g/nap) és a 40 napos hízekonysági vizsgálat (g/nap), az egy- és két éves testsúly. A második adathalmaz a prion protein gén genotípusait foglalta magába.

VIII.3.2 PrP genotipizálás

A genotipizálást mikroszekvenálással végeztük (ZSOLNAI és mtsai, 2003). Részletes leírásért lásd a VII. szekciót.

VIII.3.3 Statisztikai analízis

Egyváltozós varianciaanalízist SPSS 14.0 programcsomaggal végeztük ahol a becült marginális átlagokat használtuk a prion protein genotípusok és növekedési adatok lehetséges kapcsolatának vizsgálatára. A modell fix hatásként tartalmazta a prion protein genotípusokat, független változóként a növekedési adatokat (báránycori súlygyarapodás, hízékonyság, egy- és kétéves testsúlyok). A korrelációs és regressziós analíziseket szintén az SPSS szoftverrel végeztük.

VIII.4 Eredmények és értékelés

A preferált ARR/ARR genotípus közepes nagyságú gyakorisággal fordult elő mindkét fajtában (25 % körül a magyar merinóban, 20 % körül a német merinóban) (VIII.1. táblázat). 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 báránycsoporthoz tartozók kiemelkedőek voltak a növekedésben, illetve az egy- és kétéves testsúlyban (VIII.2. táblázat).

fajták	ARR/ARR	ARR/XXX	XXX/XXX
magyar merinó (n=286)	24,82 % (n=71)	55,59 % (n=159)	19,58 % (n=56)
német merinó (n=215)	20,00 % (n=43)	63,25 % (n=136)	16,74 % (n=36)

VIII.1. táblázat

Genotípus előfordulási gyakoriságok és a vizsgált állatok száma

tulajdonságok	ARR/ARR		ARR/XXX		XXX/XXX		összeg	
	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD
súlygyarapodás, g/nap	373,00	83,07	376,72	72,44	358,10	67,76	372,31	74,57
hízékonyság, g/nap	348,13	67,47	347,25	76,12	355,15	52,92	348,81	69,62
1 éves testsúly, kg	73,83	9,71	74,45	10,24	71,39	8,76	73,72	9,87
2 éves testsúly, kg	88,24	13,04	90,52	11,89	89,55	14,61	89,75	12,72

VIII. 2. táblázat

Magyar merinó növekedési adatainak leíró statisztikája

A hazai tenyésztésű német merinó kosoknál nem volt szignifikáns különbség a különböző genotípusoknál mért tulajdonságok értékeiben. Az import csoportban szignifikáns különbség volt megfigyelhető a bányók súlygyarapodásában 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 (VIII.3. táblázat).

A várt genotípus gyakoriságoktól csak a német merinó kosok mutattak eltérést. A csoportot kettéosztva -hazai és import állomány- és a vizsgálatot megismételve a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést csak a hazai tenyésztésű csoportban találtunk (VIII.4. táblázat). A megfigyelt és várt genotípusok gyakorisági értékei közötti különbség szignifikánsnak bizonyult. A Hardy-Weinberg egyensúlyhiányának oka lehet az egyszerre többféle tulajdonságot javítani 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

VIII.3. 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

VIII. 4. 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 testsúlygyarapodásban (VIII.3. 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.

IX. Irodalom

- ABERLE, K.S., DISTL, O. (2004) Domestication of the horse: results based on microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Archives für Tierzucht*, 47, 517-535.
- Achievement in Mangalitzá crossbreeding. In SAVE-DAGENE International Meeting of Mangalica Breeders in Budapest (2001)
- ACHMANN, R., CURIK, I. et al. (2004) Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics*, 35, 285–292.
- ÁLDÁSY, P., SÜVEGES, T. (1964) Incidence of scrapie in the domestic sheep population. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 19, 463-466.
- BÁN, B., BODÓ, I., JÓZSA, CS., MIHÓK, S. (2006) A Mezőhegyesen kitenyésztett lófajták vércsoport, biokémiai és DNS mikroszatellit vizsgálata, összehasonlításuk a hucul és angol telivér fajtákkal. In: MIHÓK S. (szerk.): Génmegőrzés, hagyományos háziállatfajták genetikai és gazdasági értékeinek tudományos feltárása. Debreceni Agrártudományi Centrum. Debrecen, 44–55.
- 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.
- BARTOSIEWICZ, L. (1996) Hungarian Grey Cattle: in Search of Origins. *Hungarian Agricultural Research*, 5, 13-20.
- BARTOSIEWICZ, L. (1997) The Hungarian Grey cattle: a traditional European breed. *Animal Genetic Resources Information*, 21, 49-60.
- BEJA-PEREIRA, A., CARAMELLI, D., LALUEZA-FOXE, C., VERNESI, C., FERRAND, N., CASOLI, A., GOYACHE, I.F., ROYO, L.J., CONTI, S., LARI, M., MARTINI, A., OURAGH, L., MAGID, A., ATASH, A., ZSOLNAI, A., BOSCATO, P., TRIANTAPHYLIDIS, C., PLOUMI, K., SINEO, L., MALLEGGNI F., TABERLET, P., ERHARDTS, G. (2006) The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 8113–8118.
- BELT, P. B., MUILEMAN, I. H., SCHREUDER, B. E., BOS-DE RUIJTER, J., GIELKENS, A. L, SMITS, M. A. (1995) Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 76, 509-17.
- BISHOP, M.D., KAPPES, S.M., KEELE, J.W., STONE, R.T., SUNDEN, S.L., HAWKINS, G.A., TOLDO, S.S., FRIES, R., GROSZ, M.D., YOO, J. (1994) A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136, 619–639.
- BODÓ, I., GERA, I., KOPPÁNY, G. (1996) The Hungarian Grey cattle breed. Association of the Hungarian Grey Cattle Breeders, Budapest, 128.
- BODÓ, I. (2011) Podolic cattle. Debrecen University ISBN 978-615-5183-01-0
- 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.
- BOSSERS A., BELT P.B.G.M., RAYMOND G.J., CAUGHEY B., DE VRIES R., SMITS M.A. (1997) Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep

- prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 13;94(10):4931-6.
- 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.
- CASELLAS, J., CAJA, G., BACH, R., FRANCINO, O., PIEDRAFITA, J. (2007) Association analyses between the prion protein locus and reproductive and lamb traits in Ripollesa sheep. *J Anim Sci* 85, 592-597.
- CASTAGNASSO, E.E., KIENAST, M.E., GARCÍA, P.P., GIOVAMBATTISTA, G. (2007) A case of multiple assignments (paternity/maternity) in an equine-out breeding system. *Journal of Forensic Science* 52, 889-890.
- CAWTHRAW, S., NADALES, E. P., MARTIN, T.C. (2001) PrP genotyping in sheep using the 5' nuclease (Taqman) PCR assay. *Research in Veterinary Science*, 70, Supplement a, 24, Print ISSN 0034-5288
- CORANDER, J., WALDMANN, P., SILLANPÄÄ, M.J. (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163, 367-374.
- CRANNELL, Z.A., ROHRMAN B., RICHARDS-KORTUM, R. (2014) Quantification of HIV-1 DNA Using Real-Time Recombinase Polymerase Amplification. *Analytical Chemistry*, 86, 5615–5619.
- DAVIS, A. J., JENNY A.L., MILLER. L.D. (1991) Diagnostic characteristics of bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Diagn Invest.*, 3, 266-271.
- DAWSON, M., HOINVILLE, L. J., HOSIE, B. D., HUNTER, N. (1998) Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet. Rec.* 142, 623-625.
- DE VRIES, F., BORCHERS, N., HAMANN, H., DRÖGEMÜLLER, C., REINECKE, S., LÜPPING, W., DISTL, O. (2004) Association between the prion protein genotype and performance traits of meat breeds of sheep. *Vet Record* 155, 140-143.
- DISTL, O. (2000) Genetic control of susceptibility for scrapie in sheep using molecular genetic tests. *Tierärztl. Umsch.* 55, 609-613.
- DRÖGEMÜLLER, C., LEEB, T., DISTL, O. (2001) Breeding for resistance to scrapie: Detection of polymorphism in the prion protein gene in German sheep breeds. *Arch Tierz* 44, 280-287.
- 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.
- DUNKA, B. (1992) A magyar racka. *Magyar juhászat. A Magyar Mezőgazdaság melléklete*, 8–9.
- DUNKA, B. (2002) Magyar juh (*Ovis aries strepsiceros hungaricus*) In: JÁVOR, A., MIHÓK, S. (szerk.): *Génmegőrzés: Kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről.* Debreceni Egyetem. Debrecen, 167–187.
- EDE, A.J., PIERSON, C.A., CRAWFORD, A.M. (1995) Ovine microsatellites at the OarCP9, OarCP16, OarCP20, OarCP21, OarCP23 and OarCP26 loci. *Animal Genetic* 25, 129–130.
- EGERSZEGI, I., RÁTKY, J., SOLTÍ, L., BRÜSSOW, K.-P. (2003) Mangalica - an indigenous swine breed from Hungary (Review). *Archives of Animal Breeding*, 46, 245-256.
- EGERSZEGI, I., MOLNÁR, A., SARLÓS, P., SOÓS, F., RÁTKY, J. (2008) A tüszőnövekedés és korai vemhesség ultrahangos vizsgálata fekete racka juhokban - előkísérlet *Animal Welfare, Etológia és Tartástechnológia*, 4, 311–318.

- EGERSZEGI, I., SARLÓS, P., MOLNÁR, A., CSEH, S., RÁTKY, J. (2011) Az évszak és az életkor hatása fekete racka kosok spermatermelésére. *Animal Welfare, Etológia és Tartástechnológia*, 7, 119–127.
- EGERSZEGI, I., SARLÓS, P., RÁTKY, J. (2012) Mellékhere eredetű sperma mélyhűtése hortobágyi racka kosoktól – a génmegőrzés egy lehetséges módja. *Magy. Állatorv. Lapja*, 134, 524–428.
- EL WAHED A.A., EL-DEEB A., EL-THOLOTH M., KADER H.A.E., AHMED A., HASSAN S., HOFFMANN B., HAAS B., SHALABY M.A., HUFERT F.T., WEIDMANN M. (2013) A Portable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0071642
- ENESEI DORNER, B. Swine breeding and fattening (A sertés tenyésztése és hizlalása) Bp. publisher; Atheneum Irodalmi és Nyomdai R. T. 81-84 (1925) 134-141.
- ENZLIN, G. J. Colour- and island sheep of the World. Ram Press, Haarlem. 1996.
- ERHARDT, G., BRANDT, H., BREYHAHN, R., FÜRST ZU SOLMS-HOHENSOMLS-LICH, P.R., GROENEVELD, E., GROSCHUP, M., LÜHKEN, G., NITTER, G., ROESSLER, H.-J. SCHULTECOERNE, H., THIEL, H. J. UND WEISS, E. (2002) Stellungnahme einer gemeinsamen Projektgruppe der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e. V. und der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. zur Genotypisierung von Schafen auf Scrapie Resistenz. *Züchtungskunde*, 74, 6-31, ISSN 0044-5401
- EULER M., WANG Y., HEIDENREICH D., PATEL P., STROHMEIER O., HAKENBERG S., NIEDRIG M., HUFERT F.T., WEIDMANN M. (2013) Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 1110-7.
- EVANNO, G., REGNAUT, S., GOUDET, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- 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.
- FAO: Molecular genetic characterisation of animal genetic resources. Food and Agriculture Organization Animal Production and Health Guidelines. Rome, 2011. 9. 11.
- FATZER, R., VANDELDELDE, M. (1998) Transmissible spongiform encephalopathies in animals. *Wien Med Wochenschr.*, 148, 78-85.
- FÉSÜS, L., ZSOLNAI, A., HOROGH, G. P., ANTON, I. (2004) A juhok surlókórja. 2. A priongenotípusok gyakorisága hazai őshonos juhállományainkban *Magy. Állatorv. Lapja*, 11, 670–675.
- FÉSÜS, L., ZSOLNAI, A., ANTON, I., SÁFÁR, L. (2008) Breeding for scrapie resistance in the Hungarian sheep population. Scrapie rezisztenciára való tenyésztés Magyarországon. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56, 173–180.
- FEULNER, P.G.D., BIELFELDT, W., ZACHOS, F.E., BRADVAROVIC, J., ECKERT, I., HARTL, G.B. (2004) Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer). *Heredity*, 93, 299-306.

- FILIPPINI, F. (2011) Probable origin and history of Podolic breeds in Italy. In: Bodó I. (Ed.): Podolic cattle. Debrecen University, 19-21.
- FRKONJA, A., GREGLER, 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.
- GÁSPÁRDY, A., ANTON, I., MEGYERNÉ, N. J., FÉSÜS, L., ESZES, F., KOMLÓSI, I. Hazai cigája állományok biokémiai és DNS polimorfizmusokra alapozott összehasonlító vizsgálata. Előadás. Agrártermelés - harmóniában a természettel, XXX. Óvári Tudományos Napok, PÁTE Mosonmagyaróvár, 2004 október 7., ISSN 0237-9902, 35.p
- GÁSPÁRDY, A., KUKOVICS, S., ANTON, I., ZSOLNAI, A., KOMLÓSI, I. (2013) Comparison of Tsigai sheep flocks according to microsatellite polymorphisms. *Magy. Állatorv. Lapja*, 11, 660-665.
- GERNAND, E., LENZ, H., MOOG, U., WASSMUTH, R. (2005) Association between prion-protein-haplotypes and yield traits of station and field tested sheep. *Arch Tierz* 48, 383-395. [in German]
- GLÁVITS R., RÁTZ F. (1996) A szarvasmarha, a juh és a macska szivacsos agyvelőbántalmára (BSE, scrapie, FSE) irányuló vizsgálatok a hazai diagnosztikai intézetekben. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 51, 529-531.
- GLOWATZKI-MULLIS, M.L., GAILLARD, C., WIGGER, G., FRIES, R. (1995) Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim Genetetics*, 26, 7-12.
- GLOWATZKI-MULLIS, M.L., MUNTWYLER, J., GAILLARD, C. (2007) Cost-effective parentage verification with 17-plex PCR for goats and 19-plex PCR for sheep. *Animal Genetics*, 38, 86-88.
- GOUDET, J. (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- GROSCHUP, M. H., HARMEYER, S., PFAFF E. (1997) Antigenic features of prion proteins of sheep and other mammalian species. *J Immunol Methods*. 207, 89-101.
- 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.
- HANDIWIRAWAN, E., NOOR, R. R., MULADNO; SCHÜLER, L. (2003) The Use of HEL9 and INRA035 Microsatellites as Specific Markers for Bali Cattle. *Archives of Animal Breeding*, 46, 503-512
- HANKÓ B. (1937) A magyar juh. *Állattenyésztők Lapja*. 21, 263–265.
- HANKÓ B. (1940) Ancient domestic animals of Hungary (Ősi magyar háziállataink). Debrecen Tiszántúli Mg-i Kamara.
- HANKÓ B. Az ősmagyar fekete juhnyáj. Debrecen Városi Ny. 1941. 31 p.
- HARTL, D.L., CLARK, A.G. (1997) *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, 118-119.
- HILL-CAWTHORNE G.A., HUDSON L.O., EL GHANY M.F., PIEPENBURG O., NAIR M., DODGSON A., FORREST M.S., CLARK T.G., PAIN A. (2014) Recombinations in Staphylococcal Cassette Chromosome mec Elements Compromise the Molecular Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 9, e101419. doi: 10.1371/journal.pone.0101419.

- HIRANO, T., NAKANE, S., MIZOSHITA, K., YAMAKUCHI, H., INOUE-MURAYAMA, M., WATANABE, T., BARENDSE, W., SUGIMOTO, Y. (1996) Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. *Animal Genetics*, 27, 365-368.
- 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.
- HUBER, R., DEBOER, T., TOBLER, I. (1999) Prion protein: a role in sleep regulation? *J. Sleep Res*, Suppl 1. 30-36.
- HUNTER, N., MOORE, L., HOSIE, B. D., DINGWALL, W. S., GREIG, A. (1997a) Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet. Rec.* 140, 59-63.
- HUNTER, N., GOLDMANN, W., FOSTER, J. D., CAIRNS, D., SMITH, G. (1997b) Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Vet. Rec.* 141, 137-40.
- 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.
- ISHIGURO, N., SHINAGAWA, M., ONOE, S., YAMANOUCHI, K., SAITO, T. (1998) Rapid analysis of allelic variants of the sheep PrP gene by oligonucleotide probes. *Microbiol. Immunol.* 42, 579-82.
- JANßEN, M., WEIMANN, CH., BRANDT, H., GAULY, M., ERHARDT, G. (2004) Parasitological parameters after artificial infections with *Haemonchus contortus* in Merinoland sheep and its association to genetic markers on chromosome 20. *Archives of Animal Breeding*, 47, 36-42.
- JORDANA, J., FOLCH, P., ARANGUREN, J.A. (2001) Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalanian donkey breed. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 118, 57-63.
- JUNGHANS, F., TEUFEL, B., BUSCHMANN, A., STENG, G., GROSCHUP, M. H. (1998) Genotyping of German sheep with respect to scrapie susceptibility. *Vet. Rec.* 143, 340-341.
- 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.
- KALINOWSKI, S.T., TAPER, M.L., MARSHALL, T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-11066.
- KERSTING S., RAUSCH V., BIER F.F., von NICKISCH-ROSENEGK M. (2014) Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malaria Journal*, 13, 99.
- 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.
- KLUGE, J.P., GLÁVITS, R. (1993) Hungary remains free of scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Veterinaria Hungarica*, 41, 325-328.
- KOCZAN, D., THIESEN H. G., 4th International Meeting on Single Nucleotid Polymorphism and Complex Genome Analysys, Stockholm, Sweden, 2001
- KOO C., MALAPI-WIGHT M., KIM H.S., CIFCI O.S., VAUGHN-DIAZ V.L., MA B., KIM S., ABDEL-RAZIQ H., ONG K., JO Y.K., GROSS D.C., SHIM W.B., HAN A. (2013) Development of a

- Real-Time Microchip PCR System for Portable Plant Disease Diagnosis. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.008270.
- KOVÁCS, A. (1989) Application of cytogenetics to cattle breeding improvement. In: Halnan C. R. E. (Ed.): *Cytogenetics of animals*. C.A.B. England, 221-234.
- KOVÁCSY, B. Juhtenyésztés. IV. kötet. In: KONKOLY THEGE S. (szerk.): *Magyarország állattenyésztése*. Pátria Irodalmi Vállalat és Nyomdai Részvénytársaság. Budapest, 1926. 30–32.
- KUSZA, SZ., IVANKOVIC, A., RAMLJAK, J., NAGY, I., JÁVOR, A., KUKOVICS, S. (2011) Genetic structure of Tsigai, Ruda, Pramenka and other local sheep in Southern and Eastern Europe. *Small Ruminant Research*, 99, 130–134.
- LAPLANCHE JL, CHATELAIN J, WESTAWAY D, THOMAS S, DUSSAUCY M, BRUGERE-PICOUX J, LAUNAY JM. (1993) PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*. Jan;15(1):30-7.
- LEVIN J.D., JOHNSON A.W., DEMPLE B. (1988) Homogeneous Escherichia coli endonuclease IV. Characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 8066–8071.
- LEWIS, P. O., ZAYKIN, D. (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- LOCKLEY, A. K., HOSIE, B. D., MOORE, L., HARLING, R., BARDSLEY, R.G. (2000) PCR-based detection of the polymorphism at codon 136 in the ovine prion protein gene. *Anim. Biotechnol.* 11, 69-73.
- MJKSz, MAGYAR JUH és KECSKETENYÉSZTŐ SZÖVETSÉG: 17. Időszaki Tájékoztató, 2013a. 94.
- MJKSz, MAGYAR JUH és KECSKETENYÉSZTŐ SZÖVETSÉG: Tizennegyedik kos- bakkatalógus. 2013b. 147.
- MANATRINON, S., FISCHERLEITNER, F., BAUMUNG, R. (2008) Genetic characterization among some Austrian and Hungarian cattle breeds *Archiv für Tierzucht*, 5, 426-437.
- MANZONE, M (2011) Improperly naming of an Italian breed. In: Bodó I. (Ed.): *Podolic cattle*. Debrecen University, 17-18.
- MARÓTI-AGÓTS, Á (2011) The origin of Podolic breeds and the name of the breed group. In: Bodó I. (Ed.): *Podolic cattle*. Debrecen University, 11-17.
- 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.
- MATSUMOTO, T., OKUMURA, N. et al. (2012) Population structure of pigs determined by single nucleotide polymorphisms observed in assembled expressed sequence tags. *Animal Science Journal*, 83, 14–22.
- MATTESZ, J. (1927) *A mezőhegyesi magyarfajta marha monográfiája* (The monography of Hungarian cattles in Mezőhegyes). Székely és Társa Könyvnyomdája, Sopron,
- MATYAS, G., GIUNTA, C., STEINMANN, B., HOSSLE, J.P., HELLWIG, R. (2002) Quantification of single nucleotide polymorphisms: a novel method that combines primer extension assay and capillary electrophoresis. *Hum. Mutat.* 19, 58-68.
- MAUDET, C., MILLER, C., BASSANO, B., BREITENMOSER-WÜRSTEN, C., GAUTHIER, D., OBEXER-RUFF, G., MICHALLET, J., TABERLET, P., LUIKART, G. (2002) Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife management: applications in Alpine Ibex (*Capra ibex* (*ibex*)). *Molecular Ecology*, 11, 421-436.

- MEZZELANI, A., ZHANG, Y., REDAELLI, L., CASTIGLIONI, B., LEONE, P., WILLIAMS, J.L., TOLDO, S.S., WIGGER, G., FRIES R., FERRETTI, L. (1995) Chromosomal localization and molecular characterization of 53 cosmid-derived bovine microsatellites. *Mammalian Genome*, 6, 629-635.
- MICKLICH, D., MATTHES, H.D. (1999) Outdoor keeping of sows of different breeds in a location of floodplain wood. *Archiv für Tierzucht*, 42, 161-173.
- MILHOFFER, S. (1904) Magyarország közgazdasága I. (Economy of Hungary I.) Franklin, Budapest, 31.
- 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.
- MOLNÁR J., NAGY T., STÉGER V., TÓTH G., MARINCS F. and BARTA E. (2014) Genome sequencing and analysis of Mangalica, a fatty local pig of Hungary. *BMC Genomics*, 15, 761.
- MOLNÁR, A., GYURJÁN, I., KORPOS, E., BORSY, A., STÉGER, V., BUZÁS, Z., KISS, I., ZOMBORSZKY, Z., PAPP, P., DEÁK, F., OROSZ, L. (2007) Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus*. *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 237-248.
- MOORE, S.S., BYRNE, K., BERGER, K.T., BARENDSE, W., MCCARTHY, F., WOMACK, J.E., HETZEL, D.J. (1994) Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome*, 5, 84-90.
- NAGY, L., DOMANOVSKY, Á., SZÉKELY, P. (2004) A magyar racka juh hizlalási-és vágási vizsgálata. *Acta Agraria Debreceniensis*, 13, 1–6.
- NAGY, L., KOMLÓSI, I. (2005) A magyar racka juh tejének beltartalmi változása a laktáció alatt. *Agrártudományi Közlemények. Különszám*, 16, 24–28.
- NECHTELBERGER, D., KALTWASSER, C., STUR, I., MEYER, JN., BREM, G., MUELLER, M., MUELLER, S. (2001) DNA microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. *Animal Biotechnology*, 12, 141-144.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106, 283-392.
- NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- OLÁH, J. (2002) A hortobágyi (magyar) rackajuh genealógiai vonalainak kialakítása. *Diplomadolgozat*, Debrecen. 46.
- OYOLA S.O., OTTO T.D., GU Y., MASLEN G., MANSKE M., CAMPINO S., TURNER D.J., MACINNIS B., KWIATKOWSKI D.P., SWERDLOW H.P., QUAIL M.A. (2012) Optimizing Illumina next-generation sequencing library preparation for extremely at-biased genomes. *BMC Genomics*, 13, 1.
- PAETKAU, D., SLADE, R., BURDEN, M., ESTOUP, A. (2004) Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13, 55-65.
- PARISET, L., MARIOTTI, M., NARDONE, A., SOYSAL, M.I., OZKAN, E., WILLIAMS, J.L., DUNNER, S., LEVEZIEL, H., MARÓTI-AGOÓTS, A., BODÓ, I., VALENTINI, A. (2010) Relationships between Podolic cattle breeds assessed by single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 127, 481-488.
- 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.
- PETER C., BRUFORD M. et al. (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Anim. Gen.*, 38, 37–44.
- PIEPENBURG O., WILLIAMS C.H., STEMPLE D.L., ARMES N.A. (2006) DNA Detection Using Recombination Proteins. *Plos Biology*, 4, e204. doi:10.1371/journal.pbio.0040204.
- 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.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- PRUSINER, S.B. (1991) Molecular biology of prion disease. *Science* 252, 1515-22.
- PRUSINER, S.B. (1995) The prion diseases. *Sci. Am.* 272, 48-57.
- 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.
- RITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- RØED, K.H., MIDTHJELL, L. (1998) Microsatellites in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids. *Molecular Ecology*, 7, 1773–1778.
- ROHRMAN B.A., RICHARDS-KORTUM R. (2012) A Paper and Plastic Device for Performing Recombinase Polymerase Amplification of HIV DNA. *Lab Chip*, 12, 3082–3088.
- ROUSSET, F. (2008) Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- SAKAI K., TRABASSO P., MORETTI M.L., MIKAMI Y., KAMEI K., GONOI T. (2014) Identification of Fungal Pathogens by Visible Microarray System in Combination with Isothermal Gene Amplification. *Mycopathologia*, doi:10.1007/s11046-014-9756-2
- SANTIAGO-FELIPE S., TORTAJADA-GENARO L.A., PUCHADES R., MAQUIEIRA A. (2014) Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis. *Analytica Chimica Acta*, 811, 81-87. doi: 10.1016/j.aca.2013.12.017.
- SARLÓS P., EGERSEZGI I., BALOGH O., MOLNÁR A., CSEH A., RÁTKY J. (2013) Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Rumin. Res.*, 111, 90–95.
- SCHWARZ, S., PRESUHN, U., KALM, E., REINSCH, N. (2005) Characterizing polymorphism and multiplex feasibility of 142 microsatellite markers from a commercial German Landrace line. *Archives of Animal Breeding*, 48, 490.
- SLATE, J., COLTMAN, D.W., GOODMAN, S.J., MACLEAN, I., PEMBERTON, J.M., WILLIAMS, J.L. (1998) Microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics*, 29, 307-318.
- SLATE, J., KRUIK, L.E.B., MARSHALL, C., PEMBERTON, J.M., CLUTTON-BROCK, T.H. (2000) Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 267, 1657-1662.

- SLATE, J., VISSCHER, P.M., MACGREGOR, S., STEVENS, D., TATE, M.L., PEMBERTON, J.M. A (2002) Genome Scan for Quantitative Trait Loci in a Wild Population of Red Deer (*Cervus elaphus*). *Genetics*, 162, 1863–1873.
- SMITS, M. A., BARILLET, F., HARDERS, F., BOSCHER, M. Y. et al., EAAP-51th Annual Meeting, The Hague 2000
- SOUZA, C.A., RAMAYO, Y. et al. Porcine Colonization of the Americas: a 60k SNP Story. Proceedings of the 9th World Conference of Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany. 1-6 August 2010.
- STRAADT I.K., AASLYNG M.D., BERTRAM H.C. (2013) Sensory and consumer evaluation of pork loins from crossbreeds between Danish Landrace, Yorkshire, Duroc, Iberian and Mangalitza. *Meat Science*, 95, 27-35.
- SUN, W., CHANG, H. et al. (2010) Analysis of geographic and pairwise genetic distances among sheep populations. *Biochemical Gen.*, 48, 376–384.
- SZÁNTÓ-EGÉSZ, R., UJHELYI, G., KOPPÁNYNÉ SZABÓ, E., JÁNOSI, A., MOHR, A., SIPOS, R., DALLMANN, K., MICSINAI, A., ZSOLNAI, A., EGERSEGI, I., ANTON, I., TÓTH, G., MOLNÁR, J., STÉGER, V., MARINCS, F., TÓTH, P., RÁTKY, J. (2013) Mangalica termékek kimutatására alkalmas real-time PCR módszer fejlesztése. *Élelmiszer Tudomány és Technológia*, 1, 12-17.
- TAKÁCS, E., MARÓTI-AGÓTS, Á, MOLNÁRNÉ GYURMÁN, A., GERA, I., BODÓ, I. (2006) jelentősebb tenyészetek összehasonlítása a vércsoportok, a vér polimorf rendszerei és a mikroszatellitek alapján (Comparison of important Hungarian Grey herds based on blood group, other and microsatellite polymorphism) In: Mihók S. (Ed.): Conservation. Debrecen University, 22-28.
- 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.
- TATSUYA, O., Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The Pennsylvania State University, 328 Mueller Laboratory, University Park, PA 16802, USA, Copyright 1993, <http://mep.bio.psu.edu/readme.html>
- TORMAY, B. (1901) A szarvasmarha és tenyésztése I-II. (The cattle and cattle breeding) Athenaeum Irodalmi és Nyomdai R.T. Budapest, 407.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W.F., WILLS, D.P.M., SHIPLEY, P. (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- VERESS, L., DUNKA B., OLÁH J. (2002) Ősi magyar juhaink megmentése. In: JÁVOR, A., MIHÓK, S. (szerk.): Génmegőrzés: Kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről. Debreceni Egyetem. Debrecen, 161–165.
- WANG, J., SHETE, S. (2011) A powerful hybrid approach to select top single-nucleotide polymorphisms for genome-wide association study. *BMC Genetics*, 12, 3.
- WILKINSON, S., WIENER, P. et al. (2011) Evaluation of approaches for identifying population informative markers from high density SNP Chips. *BMC Genetics*, 12, 45.
- WILKINSON, S, ARCHIBALD, A.L. et. al. (2012) Development of a genetic tool for product regulation in the diverse British pig breed market. *BMC Genomics*, 13, 580-592.
- WILSON, G.A., STROBECK, C., WU, L., COFFIN, J.W. (1997) Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. *Molecular Ecology*, 6, 697–699.

- 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, 711-29.
- WISNIEWSKA, E., LÜHKEN, G., MROCKOWSKI, S., ERHARDT, G. (2006) Prion protein (PrP) gene polymorphisms, and breeding for resistance to scrapie in Polish Merino sheep. *Arch Tierz* 49 SI, 365-371.
- YUZBASIAN-GURKAN, V., KREHBIEL, J. D., YUEYING, C., VENTA, P.J. (1999) Development and usefulness of new polymerase chain reaction-based tests for detection of different alleles at codons 136 and 171 of the ovine prion protein gene. *Am. J. Vet. Res.* 60, 884-887.
- ZSOLNAI, A., ANTON, I., KÜHN, C., FÉSÜS, 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.
- ZSOLNAI, A., RADNÓCZY, L., FÉSÜS, L., ANTON, I. (2006) Do Mangalica pigs of different colours really belong to different breeds? *Archiv Tierzucht*, 49, 477-483.
- ZSOLNAI, A., TÓTH, G., MOLNÁR, J., STÉGER, V, MARINCS, F., JÁNOSI, A., UJHELYI, G., KOPPÁNYNÉ SZABÓ, E., MOHR, A., ANTON, I., SZÁNTÓ-EGÉSZ, R., EGERSEGI, I., SIPOS, R., DALLMANN, K., TÓTH, P., MICSINAI, A., BRÜSSOW, K.P., RÁTKY, J. (2013) Looking for breed differentiating SNP loci and for a SNP set for parentage testing in Mangalica*. *Archiv Tierzucht*, 56, 200-207.

X. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az értekezésben a PhD fokozatszerzés óta eltelt tizennyolc évnyi kutatómunkám egy részét foglaltam össze, amelynek alanyai többségében hazai állatállományok voltak. Az új tudományos eredményeket az értekezésnek megfelelő elrendezésben foglaltam össze.

I-III Mangalica vizsgálatok

- A mangalica genetikai háttere alapján három csoportba sorolható. A három csoport megfelel a szőke, vörös és fecskehasú fajtáknak.
- A mikroszatellit eredményeket 9-10 évvel későbbi mangalica populáció egyedeit felhasználva, teljes genom vizsgálattal validáltuk.
- Hat SNP lókusszal alternatív megoldást kínáltunk a fajták mikroszatellitekkel történő azonosításának felváltására.
- Mangalicaspecifikus gyorsesztesztet fejlesztettünk.

IV Racka, mikroszatellit vizsgálatok

- Igazoltuk a fekete és fehér racka genetikai távolságának meglétét.
- A genetikai távolságokat más juh fajta-párok kontextusában is megvizsgáltuk.

V Magyar szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok

- A magyar szürkemarha állomány tenyészetekre lebontott genetikai struktúráját felmértük.
- Olyan tenyészeteket azonosítottunk, melyek különleges figyelmet érdemelnek diverzitás, génfenntartás szempontjából.

VI Szarvas, mikroszatellit

- Kettő, addig szarvasnál nem használt mikroszatellit alkalmaztunk származásellenőrzési célra.
- Egy 4-plex, egy 5-plex és egy 8-plex PCR csomagot hoztunk létre gímszarvas származásellenőrzéshez.

VII Prion proteint kódoló gén genotipizálása

- 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

- Német merinó kos állományban detektáltuk a surlókór rezisztens genotípusra való szelekció negatív hatását.

XI. Az új tudományos eredmények tagolásának megfeleltethető saját publikációk listája

- I. Zsolnai A, Radnóczy L, Fésüs L, Anton I Do Mangalica Pigs of Different Colours Really Belong to Different Breeds? ARCHIV FÜR TIERZUCHT-ARCHIVES OF ANIMAL BREEDING 49:(5) pp. 477-483. (2006)
- II. Zsolnai Attila, Szántó-Egész Réka, Anton István, Tóth Péter, Micsinai Adrienn, Rátky József. Mangalica fajták genetikai távolsága, elkülönítésük nukleotid polimorfizmust mutató DNS markerekkel. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 135:(5) pp. 303-307. (2013)
- III. Szántó-Egész R, Jánosi A, Mohr A, Szalai G, Koppányné Szabó E, Micsinai A, Sipos R, Rátky J, Anton I, Zsolnai A Breed-Specific Detection of Mangalica Meat in Food Products. FOOD ANALYTICAL METHODS 9:(4) pp. 889–894. (2015)
- IV. Zsolnai Attila, Anton István, Rátky József, Michael Bruford, Egerszegi István. Fekete és fehér racka genetikai különbözőségének mértékének felmérése DNS analízissel. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 136:(1) pp. 27-31. (2014)
- V. Attila Zsolnai, András Kovács, István Anton, József Rátky, Klaus-Peter Brüssow, Csilla Józsa, Beáta Bán, Alice Gyurmán. Comparison of different Hungarian Grey herds as based on microsatellite analysis. ANIMAL SCIENCE PAPERS AND REPORTS 32:(2) pp. 121-130. (2014)
- VI. Zsolnai A, Lehoczky I, Gyurmán A, Nagy J, Sugár L, Anton I, Horn P, Magyary I. Development of eight-plex microsatellite PCR for parentage control in deer. ARCHIV FÜR TIERZUCHT-ARCHIVES OF ANIMAL BREEDING 52:(2) pp. 143-149. (2009)
- VII. Zsolnai A, Anton I, Kuhn C, Fesus L. Detection of single-nucleotide polymorphisms coding for three ovine prion protein variants by primer extension assay and capillary electrophoresis. ELECTROPHORESIS 24: pp. 634-638. (2003)
- VIII. Barbara Nagy, István Anton, László Sáfár, László Fésüs, Zsolnai A. Association between PrP genotypes and selected growth traits of Hungarian Merino and German Mutton Merino rams. ARCHIV FÜR TIERZUCHT-ARCHIVES OF ANIMAL BREEDING 52: pp. 553-649. (2009)

A teljes publikációs tevékenység megtekinthető:

<https://m2.mtmt.hu/gui2/?type=authors&mode=browse&sel=10026679>

XII. Eredmények felhasználása

Az SNP-chip vizsgálatokat és teljesgenom szekvenciákat felhasználtuk romániai vörös mangalicapopulációk analízisében.

A mangalica-specifikus detektálást a Biomi kft. szolgáltatásként végzi. További, gyors vizsgálati rendszereket is fejlesztettünk mind minőségi, mind mennyiségi meghatározás könnyebbé tételére.

A racka mikroszatellit vizsgálatokon alapulva elvégeztük a fajta mélyebb analízisét (SNP-chip és teljes genom szekvenciák felhasználásával), elhelyezkedését meghatároztuk a világ többi juhajtái között. A racka vizsgálatokkal párhuzamosan a magyar merinó szintén átment ugyanezen vizsgálatokon, melynek során annak a merinó fajtához való viszonyát is tisztáztuk. A magyar merinó súlygyarapodását és gyapjú jellemzőivel kapcsoltságot mutató helyeket azonosítottuk.

A szürkemarha mikroszatellit vizsgálatok megalapozták több mint tizenötezer egyedben a maremman hatás vizsgálatának elvégzését. A tenyésztők felismerték a fajtatisztaság genetikai úton való ellenőrzésének lehetőségét; kevesebb, mint az egyedek fél százalékában lehetett detektálni maremman hatást.

A szürkemarha SNP-chip analízise felfedte a fajta rendkívüli, egyedi helyzetét a szarvasmarhák, illetve a primitív típusú marhák között, az analízis további következtetésekre is alapot ad, továbbá azonosítottunk tenyésztéssel kapcsolatos markereket.

Szarvas esetében a szülői származást lehetővé tevő mikroszatellit markerkészlet helyett egy olcsóbb SNP készletet dolgoztunk ki SNP-chip vizsgálatokon keresztül. Az SNP-chip vizsgálatokkal agancs minőséggel kapcsolt lókuszokat azonosítottunk.

A juhok prion genotípusainak vizsgálatát több éven keresztül (összesen kb. tízezer állat) folytattuk, segítve a célzott párosításokat.

XIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

A mangalica populáció mikroszatellitokkal való felmérését, melyekre alapozva további vizsgálatokat indíthattunk, kiemelkedő szerepet játszó kollégák Fésüs László, Koppány Gábor és Radnóczy László tették lehetővé.

A mangalica fajták SNP-lókusz 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 magyar szürkemarha tenyészetek vizsgálatának lehetőségét a Magyar Szürke Szarvasmarhát Tenyésztők Egyesületének és Péntek Istvánnak köszönhetem, aki a mikrosatellit genotípusokhoz való hozzáférést lehetővé tette. Az adatok kiértékelése után a NÉBIH és a tenyésztő szervezet képviselőivel, illetve Kovács Andrással folytatott beszélgetések ihlettel teli légköre felejthetetlen élményekkel gazdagított. A szürkemarha vizsgálatok itt nem ismertetett folytatásához a Magyar Szürke Szarvasmarhát Tenyésztők Egyesülete nyújtotta a segítséget.

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

A dolgozat elkészítésében nyújtott segítségért Szabó Andrásnak illetve Orbán Lászlónak mondok köszönetet. Az utóbbi esetben a vele végzett korábbi elektroforézises és zebradániós munkáimnak mai napig látom a pozitív hatásait.

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 apjuk szándéka szerint látókörnövelési célzattal előadott, kutatással összefüggő mondókait.

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