

Szent István Egyetem

MIKROSZATELLITEK ADAPTÁLÁSA ÉS IZOLÁLÁSA PULYKA ÉS LÚD ÁLLOMÁNYOK VIZSGÁLATÁHOZ

Doktori (PhD) értekezés

Kurjákné Korom Edit

Gödöllő

A doktori iskola megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola		
tudományága:	II. Állat-biotechnológia	
	Molekuláris genetika az állattenyésztésben témacsoport	
Vezetője:	DR. Mézes Miklós,	
	egyetemi tanár, az MTA levelező tagja	
	SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,	
	Állattudományi Alapok Intézet	
	Takarmányozástani Tanszék	
Témavezető:	Dr. Kovács Balázs	
	tudományos főmunkatárs PhD	
	SZIE Mezőgazdaság- és Körnvezettudományi Kar	
	Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet,	
	Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék	
	Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék	
Társ-témavezető:	Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék Dr. Varga László	
Társ-témavezető:	Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék Dr. Varga László tudományos munkatárs, PhD	
Társ-témavezető:	Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék Dr. Varga László tudományos munkatárs, PhD SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,	
Társ-témavezető:	Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék Dr. Varga László tudományos munkatárs, PhD SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet	

.....

.....

Dr. Kovács Balázs témavezető Dr. Varga László társ-témavezető

DR. Mézes Miklós doktori iskola vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

TA	RTALO	MJEGYZÉK	3
RÖ	VIDÍTÉ	SEK JEGYZÉKE	7
1.	BEVE	ZETÉS	9
2.	IROD	ALMI ÁTTEKINTÉS	13
,	2.1. Ар	ULYKA FAJ RÖVID BEMUTATÁSA ÉS GAZDASÁGI JELENTŐSÉGE	13
	2.1.1	A pulyka származásának áttekintése	13
	2.1.2	A pulyka rendszertani besorolása	13
	2.1.3	A pulyka magyarországi előfordulása	14
,	2.2. Al	ÚD FAJ RÖVID BEMUTATÁSA ÉS GAZDASÁGI JELENTŐSÉGE	15
	2.2.1	A lúd rendszertani besorolása	16
	2.2.2	A lúd magvarországi előfordulása	16
,	2.3. Gei	NETIKAI MARKEREK	18
	2.3.1	Fenotípusos markerek	18
	2.3.2	Fehérie markerek	19
	2.3.3	DNS markerek	19
	2.3.	3.1 Miniszatellit marker, VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)	.19
	2.3.	3.2 RFLP – Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polimorphism)	.20
	2.3.	3.3 PCR-RFLP –. Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction) – Restrikciós fragmenthossz	
		polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism)	.21
	2.3.	3.4 RAPD – Véletlenszerűen felszaporított DNS-polimorfizmus (Random Amplified Polimorphic DNA)	22
	2.3.	3.5 AFLP – Sokszorosított fragmenthossz polimorfizmus (Amplified Fragment Length Polymorphism).	.23
	2.3.	3.6 SNP – Egyetlen nukleotid polimorfizmus (Single Nucleotid Polymorphisms)	.24
	2.3.4	Mikroszatellitek	25
	2.3.	4.1 Mikroszatellitek jelentősége	.25
	2.3.	4.2 Mikroszatellitek kimutatása és felhasználási lehetőségei	.27
	2.3.5	Mikroszatellitek adaptálása más fajból	29
	2.3.	5.1 Mikroszatellit markerek a pulyka fajban	.30
	2.3.	5.2 Mikroszatellit markerek a lud tajban	.30
,	2.3.0	Of mikroszalellitek izolalasa, ismellődésekben austioli könyviar telrenőzása	25
	2.4. GE	NOMSZEK VENCIA MEGHA I AKOZAS	33 27
	2.5. POI		3/
-	2.6. GE	NETIKAI VARIBILITAS SZAMITASA	38
3.	ANYA	AG ÉS MÓDSZER	41
	3.1. Fei	.HASZNÁLT ANYAGOK	41
	3.2 Kís	ÉRLETBEN SZEREPLŐ ÁLLATOK	41
	3.2.1	Pulyka	41
	3.2.	1.1 Pulyka térképezési populáció	.42
	3.2.2	Lúd	44
	3.3 Mn	NTAGYŰJTÉS MÓDSZERE	44

3.4 DN	S IZOLÁLÁS, MINŐSÍTÉS ÉS TÁROLÁS	45
3.4.1	DNS izolálás sós-kicsapásos módszerrel – genotípus meghatározáshoz	45
3.4.2	DNS izolálás fenol-kloroformos módszerrel – könyvtár készítéshez	45
3.4.3	DNS minták minősítése és tárolása	46
3.5 AG	ARÓZ GÉLELEKTROFORÉZIS	46
3.6 TY	ÍK MIKROSZATELLITEK ADAPTÁCIÓJA PULYKA ÉS LÚD ÁLLOMÁNYOK VIZSGÁLATÁHOZ	47
3.6.1	Az adaptált mikroszatellitek kimutatásának optimalizálása	47
3.6.2	Mikroszatellitek kimutatása ABI PRISM 310 Genetic Analyzeren	48
3.6.3	Multiplex kimutatás az ABI PRISM 310 készüléken	49
3.7 A G	ENOTÍPUS ADATOK POPULÁCIÓGENETIKAI JELLEMZÉSE	49
3.8 ISM	ÉTLŐDÉSEKBEN DÚSÍTOTT KÖNYVTÁR LÉTREHOZÁSA	51
3.8.1	A DNS feldarabolása endonukleáz enzimekkel, és az adapter hozzákapcsolása	51
3.8.2	Ismétlődést tartalmazó DNS fragmetek dúsítása és könyvtárak készítése	
3.8.3	A könyvtárak szűrése	55
3.8.	3.1 Kolónia PCR	
3.8.	3.2 PIMA módszer	
3.8.4	Szekvencia meghatározás	56
3.8.5	Primer tervezés	56
3.8.6	Új mikroszatellitek és kimutatásuk optimalizálása	56
3.8.7	Polikrilamid gélelektroforézis	57
3.8.8	Az új mikroszatellitek elhelyezése a pulyka genetikai térképén	58
4. ERED)MÉNYEK	59
4.1 MI	(ROSZATELLITEK ΑΔΑΡΤΑΊ Α΄SA	59
411	Pulvka	59
4.1.2	I úd	
4.2 Mu	I TIPLEX MIKROSZATELLIT PCR-EK ÉS KIMUTATÁSI CSOPORTOK NAGY HATÉKONYSÁGÚ	
POPULÁCI	IÓANAI ÍZISHEZ	61
4.2.1	Pulvka	
4.2.2	Lúd	
4.3 A G	TÉNREZERV BRONZPLILYKA POPULÁCIÓ POPULÁCIÓGENETIKALVIZSGÁLATA.	
4.4 A G	ÉNREZERV FODROS TOLLÚ LÚDPOPULÁCIÓ GENETIKAI VIZSGÁLATA	
4.5 ÚJ1	MIKROSZATELLITEK IZOLÁLÁSA	72
4.5.1	Mikroszatellit izolálás optimalizálása	72
4.5.	1.1 Pulyka klónok szekvencia elemzése és mikroszatellitek fejlesztése	73
4.5.	1.2 Lúd klónok szekvencia elemzése és mikroszatellitek fejlesztése	73
4.6 Az	ÚJ PULYKA MIKROSZATELLITEK TÉRKÉPPOZÍCIÓJÁNAK MEGÁLLAPÍTÁSA	74
4.7 Az	ÚJ PULYKA MIKROSZATELLITEK TÉRKÉPPOZÍCIÓJÁNAK MEGÁLLAPÍTÁSA SZEKVENCIAADATO	K
FELHASZN	JÁLÁSÁVAL	75
5. KÖVI	ETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	70
5.1 MI	KROSZATELLIT ADAPTÁLÁS ÉS JELENTŐSÉGE	79
5.2 Por	PULÁCIÓGENETIKAI ANALÍZIS HATÉKONYSÁGÁNAK NÖVELÉSE	80

	5.3 Ősh	IONOS BAROMFIPOPULÁCIÓK GENETIKAI VIZSGÁLATA	81
	5.3.1	Génrezerv bronzpulyka állomány genetikai analízise	81
	5.3.2	Fodros tollú lúd állomány genetikai analízise	83
	5.4 Izoi	LÁLT ÚJ MIKROSZATELLITEK HASZNÁLHATÓSÁGA, LEHETSÉGES JÖVŐBELI ALKALMAZÁSUK ÉS AN	NAK
	JELENTŐSÍ	ÉGE	83
	5.4.1	Új pulyka és lúd mikroszatellitek	84
6.	ÚJ TU	IDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	85
7.	ÖSSZI	EFOGLALÁS	87
8.	SUMM	1MARY	89
9.	IRODA	ALOMJEGYZÉK	91
10.	MELL	LÉKLETEK	.113

DOI: 10.14751/SZIE.2014.046

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

(CA) _n	n-szer ismétlődő C és A nukleotidból álló motívum, C: citozin, A: adenin
(TG) _n	n-szer ismétlődő T és G nukleotidból álló motívum, T: timin, G: guanin
°C	Celsius fok
AFLP	sokszorosított fragmenthossz polimorfizmus (Amplified Fragment Length
	Polymorphism)
Amp	ampicillin
AP-PCR	tetszőlegesen inicializált PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain
	Reaction)
APS	ammónium-perszulfát (Ammonium-persulfate)
bp	bázispár
BSA	szarvasmarha szérumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CAPS	felszaporított szekvencia hasításából kialakuló polimorfizmus (Cleaved
	Amplified Polymorphic Sequences)
cM	centimorgan, a genetikai távolság alapegysége
DAF	DNS amplifikációs fingerprint (DNA Amplification Fingerprinting)
DEATC	Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav (DNA: Deoxyribonucleic acid)
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát (Deoxyribonucleotide triphosphate)
dsDNS	kettősszálú dezoxiuribonukleinsav
DW	desztillált víz (Distilled Water)
F	frizzled = fodros tollú
FAM	6-carboxyfluorescein
GMS	genomok közötti azonosságok kihasználása (Genomic Mismatch Scanning)
HEX	4,7,2',4',5',7-hexacloro-6-carboxyfluorescein
HGP	Human Genome Project
HáGK	Haszonállat Génmegőrzési Központ
kb	kilobázis
MAAP	többszörös, tetszés szerinti sokszorosítási minta (profil) (Multiple Arbitrary Amplification Profiling)
MAS	markerek segítségével végzett szelekció (Marker Assisted Selection)
min	minimum
MQ víz	Milli-Q víz
MS	mikroszatellit (Microsatellite)
NCBI	National Center for Biotechnology Information,
	(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
Overnight	egy éjszakán keresztül
Р	szülői egyedek
PCR	polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction)
PCR-RFLP	Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction) - Restrikciós
	fragmenthossz polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism)
PIMA	PCR alapú MS izolálási technika (PCR-based isolation of microsatellite
	arrays)
POP4	denaturáló elektroforézishez használat folyékony polimer
QTL	mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lókuszok (Quantitative Trait
	Locus)
RAPD	random amplifikált polimorf DNS (R andom Amplified P olimorphic D NA)

RAPD-DGGE	random amplifikált polimorf DNS elválasztása denaturáló gélelektroforézis
	technikával
RDA	genomok közötti különbségek felerősítése (Representational Difference
	Analysis)
RFLP	restrikciós fragmenthossz polimorfimus (Restriction Fragment Length
	P olimorphism)
SCoT	Start Kodont Célzott Polimorfizmus (Start codon targeted polymorphism)
SNP	egyetlen nukleotidos polimorfizmus (Single Nucleotid Polimorphism)
ssDNS	egyszálú dezoxiuribonukleinsav
SSCP	egyszálú DNS konformációs polimorfizmus (Single-Strand Conformation
	P olymorphism)
SSR	egyszerű szekvencia ismétlődés (Simple Sequence Repeat)
STR	rövid tandem ismétlődés (Short Tandem Repeat)
TAMRA	molekuláris méret standard, (GeneScan TM -500 TAMRA TM)
TEMED	N,N,N',N-tetrametil-etiléndiamin (N,N,N',N- Te tra m ethyl- E thylene d iamine)
TET	4,7,4',7'-tetrakloro-6-carboxyfluoreszcein
Tm	olvadási hőmérséklet (melting temperature)
VNTR	változó számú dinukleotid ismétlődése (Variable Number of Dinucleotide
	Repeats)
XL1 BLUE	XL1 BLUE kompetens sejt

1. BEVEZETÉS

A 2000-es FAO adatok szerint, hamarosan várhatóan drasztikusan nő a Föld népessége, azaz előreláthatólag meghaladja a 9-9,5 milliárd főt. Ezt az előrejelzést azóta többen is megerősítették, például egy 2010-ben a világélelmezésről tartott Európai Uniós konferencián (Eggen 2012).

A közeli jövőben várható élelmiszerhiány elkerülése érdekében az élelmiszer mennyiségét legalább a duplájára kellene növelni. Ezeket a törekvéseket hátráltatja, hogy mind a gabona- (0,5 %/év), mind az állati termék (pontosan nem ismert, de nagyobb, mint a gabonáé) előállítás növekedési üteme alatta marad a népesség növekedési ütemének (1,5 %/év). Mivel a Földön a termelésre alkalmas területek nagysága behatárolt, ezért nem elég csak a termesztési területek és az állományok méretének növelésén gondolkodni, hanem a termelés hatékonyságának javítását kell megoldani (Baile 2000). Az energianövények egyre erőteljesebb megjelenésük és elterjedésük által jelentős földterületet foglalnak el az élelmiszernövények kárára. Így ezek is jelentős befolyásoló tényezőnek tekintendők (Molnár 2004, Barkóczy et al. 2007).

Mindeközben külön figyelmet kell fordítani a termesztett növények és a tenyésztett állatok biodiverzitásának fenntartására, és a génmegőrzésre. A génmegőrzés általános célja a genetikai változatosság és az alkalmazkodóképesség fenntartása, mely tulajdonságok a fajok és populációk hosszú távú fennmaradásának lényeges feltételei.

Sajnos a klasszikus nemesítési eljárások elméleti és gyakorlati tartalékai nem minden esetben bizonyulnak kellően gyors eszköznek az imént felvázolt célok eléréséhez, tehát olyan módszerek kellenek, amelyekkel rövid időn belül jelentős eredményeket érhetünk el.

E módszerek tárházában szerepel a biotechnológia és a molekuláris genetika is, amelyek a 20-21. század leggyorsabban fejlődő tudományágai közé tartoznak. Ez látszik abból, hogy míg munkám kezdetekor a legújabb markerek közé tartozott a mikroszatellit marker, mint hatékony molekuláris eszköz, mára már a fajok genomi szekvenciájának meghatározása került előtérbe.

1990-ben kezdődött az emberi genom szekvenciájának meghatározása (Wingerson 1990), amelyben több nagy társulás is versenyzett: Celera (Myers 1999) és a Human Genome Project (HGP; Wills 1991). A program kezdetén még 15 évet jósoltak a teljes projekt hosszának. Az első kromoszóma szekvenciaadatok a Celera részéről 2000-re jelentek meg (Marshall 2000a, 2000b), majd 2001-ben bejelentették, hogy elkészültek a humán genom szekvencia meghatározásával (Venter et al. 2001). Az International Human Genome Sequencing Consortium ugyanabban az évben jelentette be, hogy ők is elkészítették a humán genom

bázissorendjének első változatát (Lander et al. 2001). Ők a 2004-es év során már az eukromatikus szekvenciaadatokat (International Human Genome Sequencing Consortium 2004), majd 2006-ban az első emberi személyes genom diploid szekvenciáját mutatták be (Gregory et al. 2006, Dhand 2006, Levy et al. 2007). A technika fejlődése felgyorsította a folyamatot, és ma már több, mint 73 emlős genomjának teljes szekvenciaadata ismert, ám ez a szám szinte napról napra növekszik (Ensembl Genome Browser - www.ensembl.org). Mindemellet a molekuláris markerek jelentősége továbbra sem csökken, mivel alkalmazásuk költsége lényegesen kisebb, és az eredmények értékelése is sokkal egyszerűbb és gyorsabb, mint a genomszekvenciáé. A genomszekvenálás lehetővé tette az SNP markerek genomméretű feltárását is. Mivel ezek a markerek a genomok teljes hosszában mindenütt megtalálhatók, és analízisükre nagy áteresztőképességű technológiákat fejlesztettek ki, ezek számítanak a teljes genomok vizsgálatára alkalmas legkorszerűbb markereknek. Mindezek ellenére a genomszekvenciával nem rendelkező fajok esetén, vagy a nem teljes genomra kiterjedő analíziseknél, populáció vizsgálatoknál (a több allélváltozat miatt) a legtöbbet alkalmazott molekuláris markereknek a mikroszatellit markerek számítanak.

A molekuláris kutatások egyik fontos iránya a termelési tulajdonságok genetikai hátterének DNS-szintű megismerése, pl. QTL-ek (Quantitative Trait Loci - mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókuszok) azonosítása és nyomon követése genetikai markerek segítségével. Ha rátaláltak a QTL-el megfelelően szorosan kapcsolt markerre, akkor a marker alkalmazható a MAS során (Marker Assisted Selection - markerek segítségével végzett szelekció) (Soller és Beckmann 1982, 1983). Ez nagy előrelépés, mert mielőtt még pontosan azonosítanák – a szekvenciaadatok segítségével –, hogy melyik gén felelős az adott tulajdonság kialakításáért, az már előtte bevonható a szelekcióba, akár mikroszatellitek, akár SNP markerek alkalamazásával. A kapott eredményeket az állattenyésztésben dolgozó szakemberek felhasználhatják az állattenyésztési és nemesítési munkáik során.

Fel kell hívjam a figyelmet a génrezerv állományok fontosságára, hiszen jelenünk modern állattenyésztése segítségükkel bármikor visszanyúlhat az "ősi" gének tartalékaihoz, mivel a különböző nemesítési módszerek alkalmazása a fajtákon belül a genetikai variabilitás csökkenéséhez vezet. Emellett az új fajták a kevésbé fejlett országok állattenyésztésében is egyre nagyobb teret hódítanak. Ennek az a következménye, hogy az őshonos, parlagi fajták fokozatosan visszaszorulnak, eltűnnek, pedig ezek kínálnak lehetőséget a genetikai változatosság megőrzéséhez, fenntartásához. Hazánkban jelenleg több ilyen őshonos állatfajta is létezik (pl. magyar szürke marha, racka juh, mangalica sertés, bronzpulyka, erdélyi kopasznyakú tyúk, magyar fodros tollú lúd stb.). Ezeknek a fajtáknak (populációknak) azonban a kultúrfajtákkal végzett nemesítés és a fajtaváltás miatt általában igen csekély a

létszáma. Nagyon fontos tehát, hogy tenyésztésük során az egyes populációgenetikai jellemzőket (beltenyésztettség, heterozigozitás/homozigozitás stb.) figyelemmel kísérjük, nehogy beltenyésztési leromlás lépjen fel, vagy esetleg egyes genetikai változatok kivesszenek a populációból. Igaz, hogy mindezeknek a gazdasági jelentősége most még nem érzékelhető, de az igényes kultúrfajták további nemesítéséhez a génállományukra szükség lehet (Hidas és Szalai 1998, Hidas et al. 2000, Hidas et al. 2002, Hidas 2002).

Napjainkban a korszerű, egészséges táplálkozás térhódításának hatására ezekben a körökben egyre nagyobb igény mutatkozik a baromfihús fogyasztására. Egyes baromfifajták esetében igen kedvező az arány az előállítás költsége és sebessége között. A baromfifajok húsa, köztük a pulykáé is, igen ízletes, ugyanakkor zsírszegény, aminek köszönhetően egyre növekvő népszerűségnek örvendenek. A háziszárnyasok előnye az egyéb tenyésztett állatfajokkal szemben (pl. szarvasmarha): a rövidebb generációs idő, az egyszerűbb, olcsóbb tarthatóság, (feltéve, ha az intenzív tartásmódot tekintjük) illetve, hogy a pulyka rövid idő alatt igen nagy mennyiségű termék (mellhús, combhús) előállítására képes (különösen a nagytestű hústermelő hibridek tekintetében).

Munkám kezdetekor a pulyka és lúd fajokban csak nagyon kevés alkalmazható genetikai marker volt ismert. Ezért célul tűztem ki, hogy markereket adaptáljak, illetve fejlesszek e fajok genetikai vizsgálatához, génmegőrzéséhez, nemesítésének elősegítéséhez. A munka a következő részcélokra bontható fel:

- A tyúk fajon már alkalmazott mikroszatellit markerek adaptálása a pulyka és lúd fajok vizsgálatához, majd a gyorsabb és pontosabb kimutatáshoz a fluoreszcens jelölésű primerekből csoportok kialakítása.
- A sikeresen adaptált mikroszatellit markerekkel egy génrezerv bronzpulyka és egy fodros tollú lúd populáció vizsgálata és jellemzése. Új mikroszatellit szekvenciák izolálása ismétlődésekben dúsított genomiális DNS könyvtárakból a pulyka és a lúd esetében.
- Az új, egyedi szekvenciákra primerek (láncindító szekvenciapárok) tervezése és használhatóságuk tesztelése, kimutatásuk optimalizálása.

DOI: 10.14751/SZIE.2014.046

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A pulyka faj rövid bemutatása és gazdasági jelentősége

2.1.1 A pulyka származásának áttekintése

A pulyka őse a vadpulyka (*Meleagris gallopavo*), amely Közép- és Észak-Amerika területén őshonos. Háziasítását már i.e. 1000 körül megkezdték a mexikói területeken élő indiánok a mexikói alfajtából (*Meleagris gallopavo mexicana*). Napjainkban is találkozhatunk az amerikai erdőségekben vadpulyka egyedekkel, ugyanis a fajt fenntartják, mivel kedvelt célpontja az amerikai vadászoknak, de ezek az állományok jelentősek génmegőrzési szempontból is. Jellemző rájuk a kisebb testméret, amely alkalmassá teszi őket a repülésre. A szabadon élő populációkra jellemző, hogy az éjjeleket csoportosan a fákon töltik (Sütő 1997).

Az Európai területekre csak az amerikai kontinens felfedezése után jutott el, bár vannak ennek ellentmondó bizonyítékok is. Különböző európai területeken végzett ásatásokon előkerült leletek azt bizonyítják, hogy már Amerika felfedezése előtt 1000 évvel eljuthatott Európába a pulyka; viking hajósok hozhatták magukkal nyugat-európai területekre, ahonnan azután az egész európai kontinensen, így Magyarországon is elterjedt (Szalay 2002, Mihók 2006).

2.1.2 A pulyka rendszertani besorolása

A pulyka rendszertani besorolása a következőképpen alakul:

Madarak osztálya –	Aves
Tyúkalakúak rendje –	Galliformes
Valódi tyúkfélék alrendje –	Galli
Fácánfélék családja –	Phasianidae
Pulykafélék alcsaládja –	Meleagridiane
	Meleagris nem
	(LINNAEUS, 1758)

Ezen belül a pulykának két ismert faját különböztetjük meg, ezek az 1.) Ocelot vagy pávaszemes pulyka (*Ariocharis ocellata / Meleagris ocellata*) és a 2.) pulyka (*Meleagris gallopavo*). Ez utóbbit a földrajzi előfordulás és a tollazat színbeli különbözősége alapján hat további alfajba soroljuk.

Alfajok:

- 1.) Meleagris gallopavo gallopavo (Mexikói pulyka); LINNE, 1758
- 2.) Meleagris galllopavo silvestris (Kelet-Amerikai pulyka); VIELLIOT, 1817
- 3.) Meleagris galllopavo intermedia (Rio Grande-i pulyka); SENNET, 1879
- 4.) Meleagris galllopavo mexicana (Gould-féle pulyka); GOULD, 1856
- 5.) Meleagris galllopavo oscelota (Floridai pulyka); SCOTT; 1890
- 6.) Meleagris galllopavo merriami (Merriam-i pulyka); NELSON, 1900

(Integrated Taxonomic Information System 2013).

Vadpulykák általános jellemzése:

Erőteljes felépítésű, nagy testtömegű tyúkalkatú madarak, melyek karcsú testformával és viszonylag magas csüddel rendelkeznek. Szegycsontjuk és kidomborodóbb, testük keskenyebb, mint a háziasított unokatestvéreké. Sok tekintetben nagyon hasonlítanak a parlagi bronzpulykához, kivéve azt, hogy lényegesen soványabb felépítésűek. Mellizomzatuk és combjuk nem olyan terjedelmes, mint amit a modern házi pulykától elvárunk és tapasztalunk. A vadpulyka húsának íze ugyanakkor jobb, és nyoma sincs a vadíznek (Sütő 1997).

2.1.3 A pulyka magyarországi előfordulása

Az előző fejezetben is említésre került, hogy a pulyka már az amerikai kontinens 1492-es felfedezése előtt eljuthatott Európába. A feltárásokon talált leletek szerint hazánkban a X–XII. századi, a szentesi és a tápéi temetőkből származó pecsétgyűrűkön már látható a pulykaábrázolás. Időrendben ezt a schleswigi dóm 1280 körül készített domborművén talált pulykaábrázolás követi, majd Svájcban egy 13. századbeli várrom feltárásakor előkerülő pulykacsont-maradványokról tesznek említést (Szalay 2002). Ezt követően hazánkban az 1590-es években készült feljegyzések már biztosan tanúskodnak a pulyka magyarországi jelenlétéről. Az 1870-es évekből már külföldre irányuló szállításáról is vannak írásos emlékek. A két világháború közötti időben a pulykatartás újabb pozitív lendületet vett az alföldi régiókban. A legnagyobb hányadban bronzpulykát tartottak a tenyésztők, emellett kisebb létszámban, de megtalálható volt a fehérpulyka és a rézpulyka is.

Ma Magyarországon őshonos fajtának számít a fehér magyar pulyka, a fekete magyar pulyka, a rézpulyka, más néven "bosnyák" pulyka; és itt kell megemlítenünk a bronzpulykát (1. ábra) amely hazánkban honosult fajtának tekinthető (Sütő 1997).



1. ábra. Bronzpulyka bak (Jenő). (A fotót Nagy Tibor készítette.)

2.2 A lúd faj rövid bemutatása és gazdasági jelentősége

A lúd háziasítása valószínűleg Délnyugat-Ázsiában az időszámításunk előtti 4. évezredben történt. Más források szerint Babilóniában kezdődött, és hosszabb időn keresztül párhuzamosan folyt több földrajzi körzetben. Írásos emlékek szerint az ókori Egyiptomban háziszárnyasként tenyésztették, és emellett Isis istennőnek szentelték, a libatojás az élet jelképe volt. A tartás mellett már ie. 2800 évvel a tenyésztéssel és hízlalással is foglalkoztak. A vallásos tisztelet a görögöknél is megfigyelhető, ahol Perszephoné szent állataként tisztelték. A ludat már ők is tenyésztették. A római császárság idejéből pontos leírásokkal rendelkezünk a tenyésztéséről, takarmányozásáról és hízlalásáról, ugyanis különösen kedvelt csemegének számított a hízott libamáj. Ezenfelül a ludat a kódexíráshoz szükséges írótollak miatt a legtöbb nép nagy tiszteletben tartotta.

Napjainkban is folyik itthon a lúdtartás különböző hasznosítási irányokkal. Ezek alapján különböztetünk meg: pecsenyelúd-nevelést, tolltermelő, húslúd előállító tartást, májtermelést célzó tömőalapanyag-előállítást.

2.2.1 A lúd rendszertani besorolása

Rendszertani besorolása a következőképpen alakul:

Madarak osztálya –	Aves
Lúdalakúak rendje –	Anseriformes
Récefélék családja –	Anatidae
Lúdformák alcsaládja –	Anseridae
Ludak nemzettsége –	Anser
Faj: Nyári lúd –	Anser anser
Alfaj: Házilúd –	Anser anser domesticus
	(LINNAEUS, 1758)

A házilúd fajtákat két nagy csoportba oszthatjuk:

1.) Az Európa nagy részén elterjedt fajták a nyári lúdtól (*Anser anser*) származnak, melyet a következő népies neveken is említik: tőkéslúd, szürkelúd, márciusi lúd. A háziasítás során a lúd teste nagyobb lett, felül és alul szélesebbé és lapítottabbá vált. Színe főleg fehér, de gyakoriak a szürke és a tarka tollú fajták és színváltozatok is. A nagyüzemi árutermelésben jelentős szerepet betöltő típusok mindegyike ebbe a csoportba tartozik.

2.) A másik csoportba tartozó távol-keleti és amerikai eredetű fajtáknak a Kínai hattyúlúd (Bütykös hattyúlúd) (*Anser cygnoides* vagy *Cygnopsis cygnoides*) az őse. A különböző eredetű háziasított ludak természetes úton is kereszteződnek, a fajhibrid termékeny. Kelet-Európában több fajtát is kialakítottak ezekből az állományokból. A faj sajátossága, hogy a hús mellett nagyon értékes egyéb termékek is előállíthatók vele, mint például a libamáj és a jó minőségű toll (Szalay 2002).

2.2.2 A lúd magyarországi előfordulása

Írásos emlékek alapján tudjuk, hogy hazánkban a 11-12. században már egyházi tizedet szedtek a libák után. A parlagi lúdféleségek állományaiból alakult ki az ún. magyar parlagi lúd, azaz a "magyar lúd". Ennek többfajta színváltozata (fehér, szürke és tarka) és tájfajtája (lévai, makói, kisalföldi, balatoni, szegedi, stb.) volt megtalálható az ország területén.

Az 1800-as évek elejére ezekből alakult ki a fodros tollú lúd. Még nem pontosan tisztázott, hogy mutációnak köszönhetően hazai parlagi állományok valamelyikéből jött létre, vagy kelet, illetve délkelet felől jutott el hozzánk. Ez utóbbira következtethetünk a népies

elnevezéseiből: török, asztraháni, szevasztopoli lúd. Az első tenyésztői adatok 1844-ből, Óbecse környéki tenyésztőtől származnak: "felnevelésük könnyebb, mint az emdenié, húsuk hófehér, porhanyós, hízás és tömhetőség tekintetében az első helyen állnak, májuk másfélszer nagyobb, mint bármely más lúdé, a toll és a pehely árából pedig az etetési költség fedezhető".

Emellett hazánkban előfordul még nagyobb számban a századforduló környékén (19-20. század), a parlagi állományok nemesítése céljából behozott emdeni lúd.

Jelenleg is van több fodros tollú lúd fajtafenntartó állomány az ország területén. Debrecenben Prof. Mihók Sándor, Tápiógyörgyén pedig Fehér Sándor irányítja egy-egy ilyen állomány tenyésztését. Ezek mellett 1998-ban erre az állományra alapozva a Haszonállat Génmegőrzési Központ (HáGK) is létrehozta a fodros tollú magyar lúd (2. ábra) gébankját Gödöllőn, Barta Ildikó és Szalay István vezetésével (Szalay 2002).



2. ábra. Fodros tollú magyar lúd. (A HáGK gödöllöi telepén készült a fotó.)

A fodros tollú magyar lúd küllemi leírása megegyezik a magyar lúd leírásával, attól csak tollszerkezetében különbözik.

A magyar lúd fodros tollú változata a Kárpát-medence egyik különlegessége. Látványos, testtől elálló tollazata miatt előszeretettel tenyésztették hazánk egyes vidékein. A tollak fodrozottsága egy gén (F = frizzled) által meghatározott, domináns tulajdonság, amely heterozigóta állapotban részleges dominanciát mutat. A fodros tollú magyar lúdnak – mint a magyar lúdnak általában – különböző (fehér, szürke és tarka) színváltozatai ismeretesek (Szalay 2002, Mihók 2006).

A fodros tollú magyar lúd 2004-től őshonosként regisztrált fajta (Szalay 2002).

2.3 Genetikai markerek

A genetikai markerek fogalma egy igen nehezen körülírható, kevéssé deffiniált, tág fogalom. Valójában bármi lehet genetikai marker, aminek segítségével a genomok, genomrészletek, gének, genetikai elemek nyomon követhetők a sejtekben, szövetekben, egyedekben, populációkban, vagy azok utódaiban.

Itt kell megemlítenem az ún. "ideális genetikai marker/ek" jellemzőit:

 polimorfak és sok (minél több, annál ideálisabb) alléllel rendelkeznek egy adott populációban,

- kodomináns öröklésmenetet követnek,

- a környezeti hatások jelentősen nem befolyásolják,

- az egyedfejlődési fázistól, fiziológiai állapottól legyenek függetlenek,

- könnyen, gyorsan és olcsón kimutathatók,
- könnyen izolálhatóak/fejleszthetőek egy faj vizsgálatához,

- viszonylag egyenlő eloszlásúak és gyakoriak a genomban,

- előnyös, ha belőlük minél többet sikerül kimutatni a genom bármely területén,

valamint ha pozíciójuk ismert a genomban (Hearne et al. 1992, Bruford és Wayne

1993, Kashi et al. 1997, Sunnucks 2000, Hajósné 1999).

Genetikai markerként felhasználhatók fenotípusos bélyegek, biokémiai polimorfizmusok, de ma leginkább a DNS polimorfizmusok vagy markerek vizsgálata az elterjedt, amiket számos területen felhasználhatunk, így a gyakorlati állattenyésztésben is.

Genetikai markereket használnak az egyes tulajdonságok öröklődésének nyomon követése mellett pl. populációk genetikai struktúrájának jellemzésénél, evolúciós, származásellenőrzési és rokonsági vizsgálatoknál, genetikai térképek készítésénél, vagy génmanipulációs eljárások során a génkonstrukciók nyomon követésére, illetve a környezetbe került szervezetek folyamatos megfigyelésére, stb. is (Hale et al. 1989).

2.3.1 Fenotípusos markerek

A legrégebbi genetikai markerek látható fenotípusos jegyek voltak (pl. szőrzet színe, szarvaltság vagy szarvatlanság stb.). Alkalmazásuk a gyakorlatban kevéssé terjedt el, de néhány eseben még ma is nagy sikerrel alkalmazzák, amire a legjobb példa talán az egyes tyúk fajták ivar meghatározására használt tollszínezet, vagy tollnövekedés gyorsasága (Fésüs et al. 2000).

Ezek a hagyományos markerek sem polimorfizmusuk tekintetében, sem számukban nem voltak elégségesek átfogó genetikai térképezés végrehajtására.

2.3.2 Fehérje markerek

Az 1930-as években kezdett kibontakozni az ún. immunogenetika és biokémiai genetika, melynek tárgya a vércsoportok, vérenzim polimorfizmusok vizsgálata, majd később a fehérvérsejt antigének és a hisztokompatibilitási komplex tulajdonságainak megismerése volt. Az 1950-60-as években jelentek meg az első olyan eredmények, melyek megpróbáltak párhuzamot vonni az egyes fehérjék változatai/izoformái és a különböző, számukra érdekes gazdasági tulajdonságok között. Az egyes fehérjék kimutatására specifikus rendszereket dolgoztak ki, amelyek nagy előnye, hogy könnyen adaptálhatók más fajok vizsgálatára is (Fésüs et al. 2000).

2.3.3 DNS markerek

A DNS polimorfizmusok/markerek vizsgálata jelenős előrelépést jelent a korábbi genetikai markerekhez viszonyítva. Számos változatuk létezik, és még ennél is több kimutatási eljárásuk ismert. Némelyikük jellemzői egészen megközelítik az "ideális genetikai marker" tulajdonságait, bár teljesen egyik sem teljesíti azt.

Az egyes markertípusok (pl. a mikroszatellitek, RAPD - random amplifikált polimorf DNS (Randomom Amplified Polymorphic DNA), RFLP - restrikciós fragmenthossz polimorfimus (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP - sokszorosított fragmenthossz polimorfizmus (Amplified Fragment Length Polymorphism), RDA - genomok közötti különbségek felerősítése (Representational Difference Analysis), GMS - genomok közötti azonosságok kihasználása (Genomic Mismatch Scanning), stb.) tulajdonságaiktól és a vizsgált mintától, egyedtől, populációtól, fajtól, stb. függően más és más esetekben lehetnek alkalmasak a különböző vizsgálatokra. Jelen dolgozatban, a terjedelemre való tekintettel csak a fontosabb DNS markertípusokat ismertetem röviden.

2.3.3.1 Miniszatellit marker, VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)

A miniszatellitek olyan 2-100 nukleotidból álló szekvenciacsoportok (klaszterek), melyek többször is ismétlődhetnek a genomban. Ezeknek a változó számú tandem ismétlődő szekvenciáknak a hossza elérheti a 0,5-30 kb-t is (Jeffreys et al. 1985a, 1985b, Jeffreys et al. 1986, Vergnaud és Denoeud 2000).

Az ismétlődések száma az adott fajra, egyedre jellemző. A VNTR-szekvenciák restrikciós endonukleázokkal végzett emésztése és Southern blottolása után kapott DNS ujjlenyomat az egyedre jellemző.

A technika előnyei:

A miniszatellit régiók nagyon variábilisak (változatosak). Kimutatásuk azonos az RFLP technikával.

A technika hátrányai:

A mai korszerűbb markerekehez képest kimutatásuk hosszadalmas, és jellemzően radioaktív technikát igényel, továbbá az eredményként kapott komplex mintázat kiértékelése bonyolult, emellett sok pontatlanságot hordozhat a nem szomszédos minták összehasonlításánál. Ma már nem használják.

Felhasználás:

Az 1980-1990-es években volt jelentőségük, akkor úgy vélték, hogy emberi genom kapcsoltsági analízisekhez megfelelő markerek (Nakamura et al. 1987). Ezen kívül különböző betegségek molekuláris térképezéséhez alkalmazták (Murray et al. 1999), és használták egyedazonosítási célokra (pl. apasági teszt) is a technikát.

2.3.3.2 *RFLP* – *Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polimorphism)*

A molekuláris vizsgálatokban már 1975-től elemezték a restrikciós endonukleázokkal kapott különböző DNS részleteket (fragmenteket) (Nathans és Smith, 1975), de molekuláris markerkénti felhasználásukról először Botstein és munkatársai írtak, 1980-ban. Első lépésként a vizsgált genomot restrikciós endonukleázzal emésztették, majd agaróz gélen választották el, ami egy összefüggő DNS sávot adott. Ehhez az összefüggő fragmentum tömeghez számukra érdekes bázissorrendű próbát hibridizáltak, és megkapták az egyedre jellemző DNS fragmentum mintázatot.

Az egyedek között megfigyelhető különbségeket a hasítási helyek hiánya, illetve megjelenése szolgáltatja, amelyet többféle genetikai különbség okozhat. Legvalószínűbb, hogy egy vagy néhány különbség van a hasítási helyen, illetve annak közelében a DNS-t felépítő bázisok sorrendjében; esetleg több bázisból álló motívum beépülése, illetve elvesztése is okozhatja a különbséget (Botstein et al. 1980, Williams et al. 1990, Zsolnai 2005).

A technika előnyei:

A DNS szekvenciájában jelen lévő különbségeket mutatja meg, és nemcsak a kódoló régióban. A különbségek a génexpressziótól nem függenek, és elméletileg mutációs eseményeket jeleznek.

A technika hátrányai:

Viszonylag nagy mennyiségű DNS-t igénylő módszer. Ez idő- és munkaigényes, ugyanakkor költséges módszer.

Felhasználás:

A technika alkalmazásával lehetőség nyílt fajtaazonosításra, rokonsági kapcsolatok megállapítására. Emellet a tulajdonságok térképezésekor és a markereken alapuló szelekcióban (Marker Assisted Selection, **MAS**) is fontos szerepet játszott a 2000-es évek előtt (Hajósné 1999). Napjainkban ezt a technikát már nem használják.

2.3.3.3 PCR-RFLP –. Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction) – Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Az 1980-as évek végére már megjelent az előbb ismertetett módszer továbbfejlesztett változata, a PCR-RFLP (Deng 1988, Bourquini et al. 1995). Ekkor a vizsgálni kívánt DNS szakaszt specifikus primereket alkalmazva egy PCR reakcióban felsokszorozzák. A reakcióban kapott terméket hasítják enzimmel. Így lehetőség nyílik a genom egy-egy pontján a restrikciós enzim hasítóhelyeinek egymástól független vizsgálatára.

A technika előnye:

Kisebb számú DNS szakaszt kell összehasonlítani az enzimes hasítás után, így könnyebben értékelhető. A fragmentek kodomináns öröklődésmenetet mutatnak. Az RFLPhez viszonyítva kisebbek a költségek és kevésbé munkaigényes a kimutatásuk.

A technika hátrányai:

Idő- és munkaigényes módszer.

Felhasználás:

A PCR-RFLP tesztet ma is alkalmazzák, pl. a szarvasmarhában a BLAD (**B**ovine Leukocyte Adhesion Deficiency) esetén, amikor a borjak védekezési képessége csökken a fertőzésekkel szemben (Zsolnai és Fésüs 1997). Szintén PCR-RFLP vizsgálatokkal szűrik a DUMPS-ot (Deficiency of Uridine-5'-Monophosphate Synthase), amikor a növekedési erély csökken, és mentális károsodás is kialakul (Schwenger et al. 1992a, 1992b). A sertések stresszérzékenységének megállapítására, ami elhullásokat okoz a nagyüzemi tartástechnológia alkalmazásakor, szintén PCR-RFLP tesztet alkalmaznak, amely segítségével lehetséges a

veszteségek csökkentése (Hughes et al. 1992, Brenig és Brem 1992). A lótenyésztésben, a versenylovak betegségeinek kiszűrésére alkalmazzák a következő PCR-RFLP teszteket: a quarter versenylovak hyperkalémiás periódikus bénulása HYPP (**Hy**percalemic **P**eriodic **P**aralysis) elnevezésű betegségére, és a súlyos fokú kombinált immunhiány SCID (**S**erve **C**ombined **i**mmunodeficiency **d**isease) megállapítására (Rudolph et al. 1992).

2.3.3.4 RAPD – Véletlenszerűen felszaporított DNS-polimorfizmus (Random Amplified Polimorphic DNA)

A RAPD PCR alapú technika, amikor egy véletlenszerűen megválasztott rövid, általában 10-12 bázisból álló primerrel (illetve módosított változatában 2 primerrel) sokszorosíthatóak a DNS szakaszok. A DNS fragmentumok mérete függ a primer kötőhelyek előfordulási távolságától (200-2000bp) (Williams et al. 1990).

A technika előnyei:

A technika előnye, hogy nem kell ismerni a vizsgált DNS szekvenciáját; kevés DNS minta elegendő a vizsgálathoz; legtöbbször nagyfokú polimorfizmust mutat.

A technika hátrányai:

Az ismételhetőség nagyban függ a körülményektől, pl. a vizsgált minta tisztaságától, az alkalmazott vegyszerektől és PCR készülék típusától. A polimeráz reakció után kimutatott fragmentek domináns öröklődésmenetet követnek, így a heterozigóta eredmény nem azonosítható.

Felhasználás:

Az 1990-es években, ezen technika alkalmazásával lehetőség nyílt fajtaazonosításra, a rokonság megállapítására. Fontos szerepet játszott a tulajdonságok térképezésében, és "DNS ujjlenyomatot" is készíthettek vele (Williams et al. 1990).

Az idő előrehaladtával többfajta változatot fejlesztettek ki belőle, a különbség a tervezett primerhosszokban és az alkalmazott primer bázisösszetételében van. Példaként álljon itt néhány technika és a hozzájuk tartozó irodalmi forrás: AP-PCR - tetszőleges primerrel készített PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), (Welsh és McCleland 1990, Welsh et al. 1991), DAF - DNS amplifikációs fingerprint (DNA Amplification Fingerprinting) (Bassam et al. 1991, Caetano-Anollés et al. 1991, 1992, Caetabo-Anollés és Bassam 1993), SCoT - startkodont célzó polimorfizmus (Start codon targeted polymorphism) (Collard és Mackill, 2009, Guo et al. 2012).

2.3.3.5 AFLP – Sokszorosított fragmenthossz polimorfizmus (Amplified Fragment Length Polymorphism)

A vizsgált genomot egyidejűleg két enzimmel emésztik, melyek közül az egyik gyakran, a másik ritkán hasító enzim. Az így keletkező DNS szakaszok (fragmentek) végeire rövid DNS szakasz (ún. adapter/ linker) szekvenciát ligálnak ("ragasztanak"), amelyre a kimutatáshoz használt, primereket (láncindító szekvencia) tervezik. A vizsgálni kívánt termékek elkészítése két lépésben történik. Először, az ún. pre-amplifikáció (elő-sokszorosítás) során, az adapter szekvencián 1 bázissal túlnyúló primert használnak; majd másodszorra, az ún. szelektív amplifikációban már 3' túlnyúló bázissal rendelkező primereket használnak, tovább szűkítve a végtermékek számát. A végtermékeket (a keletketző fragmentek száma 200 felett is lehet), amelyek 50 -500 bp nagyságú DNS fragmentumok, poliakrilamid gélen választják el. A detektálás módja függ attól, hogy az alkalmazott pimemerek, hogyan voltak jelölve (jelöletlen – ezüstfestés, izotópos jelölés - autoradiográfia, fluoreszcens jelzés detektálása).

Az azonosított fragmentek közötti méretbeli eltéréseket, a restrikciós (enzimes hasítási) helyek hiánya vagy megjelenése okozza (Vos et al. 1995, Mueller és Wolfenbarger 1999, Kiss 2005).

A technika előnyei:

A technika bármely fajra, előzetes információ nélkül alkalmazható. Nem szükséges különleges műszerezettség. Jól ismételhető eredmények kaphatóak. Az azonosított fragmentek közötti méretbeli eltéréseket, a restrikciós (enzimes hasítási) helyek hiánya vagy megjelenése okozza.

A technika hátrányai:

A kiindulási DNS-nek igen jó minőségűnek kell lennie a hasításra használt enzimek érzékenysége miatt. A mintázatok kimutatása és értékelése egyik jelölés esetén sem egyszerű legyen az az ezüstfestés, a radioaktív-, illetve a fluoreszcens jelölés. A DNS szakaszokról nem lehet eldönteni, hogy homo- vagy heterozigóta marker látható, vagyis domináns- recesszív öröklődés menetet követnek.

Felhasználás:

Genetikai térképek készítése, kapcsolt markerek keresése. Fajtavédelem. Genetikai különbözőségek vizsgálata a nemesítési alapanyagokban (Hajósné 1999).

2.3.3.6 SNP – Egyetlen nukleotid polimorfizmus (Single Nucleotid Polymorphisms)

Az SNP rövidítés egyetlen bázis megváltozásával létrejövő mutációt jelöl, bármely genomban igen gyakori, és jellemzően két allélel redelkezik (Vignal et al. 2002).

Az emberi genom esetében az előzetes cél a 300000 SNP marker fejlesztése volt, azonban az első a vizsgálatok végére számuk már elérte az 1,4 milliót (Thorisson és Stein 2003). Az ember Ensembl adatbázisa jelenleg csaknem 55 milló SNP-t (54965377 db; Ensembl Genome Browser adatbázis, Genome assembly: GRCh37, 2013.07.19) tartalmaz. Az SNP-k számát a tyúk esetében is több mint 2,8 millióra becsülik (Wallis et al. 2004, Wong et al. 2004, Cogburn et al. 2007, Muir et al. 2008, Groenen et al. 2009, Groenen et al.2011).

A genomon belüli előfordulási hely szerint az SNP-k több típusát különböztetik meg:

A nem kódoló régióban és a kódoló régióban bekövetkező mutációk, amik tovább csoportosíthatók a genombeli elhelyezkedés szerint. Ezek lehetnek: a néma mutációk (néma = szinonim, vagy neutrális (semleges)), vagyis azokat a pontmutációkat nevezik így, amelyek nem okoznak aminosav változást. Lehetnek aminosav változást okozó mutációk, melyekből szintén kétféle van: missense mutáció, azaz másértelmű mutáció, amely esetében az egyetlen báziscsere aminosav változást okoz; míg a nonsense mutáció olyan pontmutáció (báziscsere), amely egy aminosavat kódoló tripletből stop kódot képez.

Az SNP elemzésekhez ismerni kell az adott szekvenciarészletet több egyedből, esetleg több fajból. A vizsgálatkor a pontmutációval létrejött bázisváltozásokat azonosítják (Vignal et al. 2002). "Vonzó" polimorfizmus, mert gyakori az előfordulása a genomban (Li et al. 1999, Gu et al. 1998, Marth et al. 1999, Stoneking 2001, Chakravarti 2001, Sachidanandam et al. 2001, Jiang et al. 2011, Li 2013).

A mikroszatellitekkel összehasonlítva a kódoló szekvenciarészekben bekövetkezett SNP különbségek stabilabbak (lásd 2.3.4). Ott gyakrabban figyelhető meg az ismétlődések számában mutáció miatt bekövetkező változás.

Picoult-Newberg és munkatársai (1999) szerint 7-9 kétallélos SNP marker ugyanannyi genetikai információval rendelkezik, mint 3-4 több alléllal rendelkező mikroszatellit marker (Kruglyak 1997).

Az SNP-k esetén bekövetkező báziscsere kimutatásához használható technikák tárháza igen széles. Néhány példa erre: PCR-RFLP (Deng 1988, Bourquini et al. 1995, Williams et al. 1990), CASPS marker (Konieczny és Ausubel 1993, Michaels és Amasino 19998), SSCP (Suzuki et al. 1991, Dockhorn-Dworniczak et al.1991), CelI gél (Oleykowski et al 1998, Oleykowski et al 1999, Pimkim et al 2007, Jiang et al. 2013), mikrochip (Ferrari et al. 2003, Mardis 2008, Ansorge 2009), SNUPI (Litos et al. 2007).

Az technika előnyei:

Az SNP technika bármely fajra alkalmazható. Jól ismételhető eredményeket kapunk.

Az technika hátrányai:

Mivel általában 2 allélel rendelkező SNP markereket használnak, így azokból 2 – 3szor többre van szükség egy genetikai térkép elkészítéséhez, mint a több alléllal rendelkező mikroszatellitek esetében.

Felhasználás:

Egyre fontosabb a gyakorlati alkalmazása az SNP markereknek az állattenyésztésben. A hosszú életidejű szarvasmarhákat már életük korai szakaszában tudják tesztelni fontos genetikai betegségekre, illetve fontos értékmérő tulajdonságokra (termékenység, az utódoknál - a tejelő tehenek várható tejmennyisége). A tenyészbikák, kosok spermájának minősítésére, pontos beazonosíthatóságára (Hayes et al. 2013). Genetikai azonosságok és különbözőségek vizsgálatára, rokonsági kapcsolatok megállapítására (Heaton et al. 2002). A versenylovak származásának azonosítására és ellenőrzésére (Chowdhary és Raudsepp 2008, Petersen et al. 2013). További fontos gazdasági állatok, mint a juhok, a sertés, a baromfi bizonyos gazdaságilag jelentős genetikai értékmérő tulajdonságának előzetes vizsgálatára (Mohammadi et al. 2013, Knight et al. 2013, Zhang et al. 2013, Nonneman és Rohrer 2003, Ponsuksili et al. 2005, Aslam et al. 2010, Reed et al. 2006).

Genetikai térképek készítésére alkalmas markertípus (Wang et al. 1998, Picoult-Newberg et al. 1999). Használják még a fajtavédelmi feladatokban az őshonos, réghonosult állományok vizsgálatainál

2.3.4 Mikroszatellitek

A mikroszatellitek (STR: Short Tandem Repeat, SSR: Simple Sequence Repeat) felfedezése az 1970-es évekre tehető, de fontosságukra csak 1982-ben hívta fel a figyelmet Hamada a munkatársaival (a, b). Kutatócsoportja több száz poli TG vagy (TG)n (az n az ismétlődések számát jelenti) szekvencia kópiát talált a humán genom vizsgálatának eredményeképpen. Ezt 1984-ben mások is megerősítették (Tautz és Renz 1984). 1989-ben több fajon is igazolták, hogy a mikroszatellitek nagyfokú polimorfizmust mutatnak (Litt és Luty 1989, Weber és May 1989, Hearne et al. 1992).

2.3.4.1 Mikroszatellitek jelentősége

A mikroszatellitek közel állnak az "ideális genetikai marker" fogalmához. Viszonylag egyenletesen oszlanak el a genomban, a kódoló és a nem kódoló régióban egyaránt előfordulnak. Igen egyszerű, néhány bázispár hosszú szekvencia-ismétlődésekből álló (1-6 bp

pl.: GTC, CAG, TGGG) DNS-motívumok, amelyek az adott genom egyetlen pontjára jellemző szekvenciarészlet között helyezkednek el (Miesfeld et al. 1981, Hamada és Kakunaga 1982). Becslések szerint 10^4 - 10^5 bp-onként fordulnak elő, így az eukarióta genomban körülbelül 10^4 - 10^5 mikroszatellit található (ez fajonként eltérhet), kodominánsak, relatíve olcsón és gyorsan detektálhatók kis mennyiségű DNS-ből. Az eredmény pedig könnyen és jól értelmezhető (Hamada et al. 1984, Weber és May 1989, Kashi et al. 1997) (a mikroszatellit vázlatos rajza a (3. ábra).

A technika, mikroszatellitek alkalmazásának előnyei:

Az ismétlődések száma a néhánytól, a több tucatig terjedhet (0-40), míg a mikroszatellit teljes mérete (ismétlődő szekvencia+határoló szekvencia) 50 és 500 bp között változik (Armour et al. 1994). Polimorfizmusuk (allélváltozataik) az ismétlődések számának eltéréseiből adódik (3. ábra). Ez elsősorban a viszonylag gyakori másolási hibák, spontán mutációik következménye (pl. az átírás során 1-2 bp-nyi csúszás, esetleg inszerció vagy deléció) (Kashi et al. 1997).



3. ábra. A mikroszatellitek felépítése. Az ismétlődő szekvenciaelemek sárgával láthatók, míg a komplementer szálon kék jelölést kaptak; ehhez kapcsolódóan feketével a határoló szekvencia látható. A DNS szakasz feletti kis nyilak a mikroszatellit kimutatásához szükséges primerek kapcsolódási helyeit jelzik (Kashi et al 1997).

Ez a markertípus igen jó lehetőséget nyújt a géntérképezéshez, a nagy marker variabilitást (változatosságot) pedig igen jól lehet hasznosítani egyedi, illetve fajtaazonosításban, a populációk jellemzésében és genetikai összehasonlításokban (Varga et al. 2003, Szőke et al. 2004). Előnye más - az előzőekben ismertetett (pl. RAPD, AFLP, stb.) - módszerekkel szemben, hogy egy lókuszon a heterozigócia is detektálható (öröklődésük kodomináns), és több allél is előfordulhat.

Kimutatásuk és tipizálásuk az ismétlődéseket határoló, egyedi szekvenciák alapján történik. Ezek csak egyetlen helyen találhatók meg a genomban. Vizsgálatukkor a genom egyetlen pontját vizsgáljuk.

A technika, mikroszatellitek alkalmazásának hátrányai:

A mikroszatellitek többé-kevésbé fajspecifikusak, ill. csak kevés esetben használhatók a közel rokon fajok vizsgálatára.

A kimutatáshoz a határoló régiókra specifikus primerszekvenciákat kell tervezni, aminek előfeltétele természetesen, hogy ismerni kell a genom mikroszatelliteket tartalmazó fragmentjeinek szekvenciáját. Ezeket a szekvenciákat meg kell keresni a genomban vagy genomrészleteket tartalmazó klónokban (Beckmann és Soller 1990, Zietkiewicz et al. 1994, Wu et al. 1994).

A módszer további hátránya, hogy az allélek pontos beazonosítása, hosszának megállapítása nagy felbontású akrilamid gélelektroforézist, vagy kapilláris elektroforézist igényel, mivel egyes esetekben a különböző allélek csak 1-4 bázispárban térnek el egymástól.

2.3.4.2 Mikroszatellitek kimutatása és felhasználási lehetőségei

A mikroszatellit markerek kimutatásához általánosan használt módszer a polimeráz láncreakció (**P**olimerase **C**hain **R**eaction, PCR). A PCR technikát Mullis és Faloona 1987-ben publikálták. Azóta ez a mószer vált a molekuláris biológia legtöbbet használt technikájává. Segítségével egy vagy több DNS szekvencia közel exponenciálisan sokszorosítható egymást követő, szabályozott hőmérsékleteken végrehajtott reakciók ciklusain keresztül, ahol a kiválasztott DNS szekvenciájával megegyező másolatok képződnek.

A reakció komponensei a következők: a templát DNS, vagyis a sokszorosítani kívánt DNS-szekvencia; a primerek, azaz a láncindító rövid DNS szekvenciák, melyek a templát DNS 5' végeinek komplementerei; dNTP-k (a DNS lánc építőkövei); hőstabil Taq polimeráz enzim és egyéb kiegészítő reagensek (pl. BSA, MgCl₂ stb.).

A felsokszorozott DNS szakasz(ok) hosszának meghatározására több módszert is kidolgoztak. Korábban a legelterjedtebben alkalmazott technika erre a szekvencia meghatározásra is alkalmas denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis volt. Az elválasztáskor akrilamid és biszakrilamid megfelelő töménységű elegyéből öntött vékony vertikális (függőleges) gélre viszik fel a mintákat, és elektromos tér segítségével az eltérő hosszúságú fragmenteket elválasztják egymástól. Ennek végén vagy radioaktív előhívás következik (Litt és Luty 1989), vagy ezüstfestés alkalmazásával (Budowle et al. 1991, Varga et al. 1997) teszik láthatóvá a vizsgált termékeket.

Napjainkban az akrilamid gélelelektroforézis mellett igen elterjedt kimutatási módszer a fluoreszcens kapilláris gélelektroforézis (Landers et al. 1993, Karger et al. 1995). Ehhez automata fragmentanalizáló készülékeket használnak. Ezek alkalmazásával meg lehet állapítani egy adott DNS szakasz pontos hosszát vagy bázissorrendjét. A kapilláris

gélelektroforézis során az elválasztás egy 10-100 µm külső átmérőjű üveg kapillárisban történik, mely folyékony polimerrel van töltve (4. ábra).



4. ábra. A kapilláris elektroforézis (CE) vázlatos működési elve. A folyékony polimerrel töltött üvegkapillárisban vándorol a minta az egyik áramforrástól a másikig, majd egy megfelelő ponton lézerrel gerjesztik a primerhez kötött fluoreszcens festéket, és a vizsgált termék mennyiségének megfeleleően leadott emissziót mérik.

A fragmentek kimutatását a PCR reakcióban alkalmazott primerek fluoreszcens jelölése teszi lehetővé. A kimutatás során a fluoreszcens festéket lézerfény gerjeszti, mely ennek hatására eltérő hullámhosszú emissziókat bocsát ki. Ezeket az emissziós adatokat a számítógép a kapilláris egy adott pontján detektálja (4. ábra). A termékek hosszát és intenzitását egy standardhoz viszonyítva értékeli a készülék (Pritchard et al. 1995, Wang et al. 1996).

A fluoreszcens jelöléssel ellátott primerek és a kimutatásukhoz használt gépek, mint az automata kapilláris gélelektroforézist végző gépek, a '90-es évek elején jelentek meg. Ezek után jelentek meg az első olyan cikkek, amelyekben a költségek és az időráfordítás csökkentése érdekében több PCR reakciót összekevertek (azaz kimutatási szetteket hoztak létre) (Sullivan 1992). Egy másik lehetséges módszer az volt, hogy egyszerre sokszorosítottak (multiplex PCR), majd egyszerre mutattak ki több mikroszatellitet úgy, hogy egyik sem zavarta a másikat (Ziegle 1992) (5. ábra).



5. ábra. Mikroszatellit szettek kialakítása. Az ábrán három eltérő mikroszatellit egyidejű detektálásának eredménye látható a kapilláris gélelektroforézist követően. Narancsszínnel vannak jelölve a molekulasúly marker fragmentjeinek csúcsai, amik kialakítják a vizsgálati mérettartományt, és a továbbiakban ennek felhasználásával adható meg a mikroszatellit termékek mérete. A különböző fluoreszcens jelölésű (piros, kék, zöld) primerrel sokszorosított mikroszatellit allélek egymástól egyértelműen elkülöníthetők. A különböző színek eltérő hullámhosszon jól detektálhatóak. Így azonos időben több mikroszatellit mutatható ki.

2.3.5 Mikroszatellitek adaptálása más fajból

A mikroszatellit markerek előfordulási gyakorisága a genomban taxononként más és más. Néhány rendszertani csoport, mint például a madarak, genomjában különösen alacsony frekvenciával vannak jelen (Primmer et al. 1997), emiatt volt, aki kérdésesnek látta e markerek alkalmazhatóságát (Liu et al. 1996). A baromfi fajokon belül genetikai szempontból legtöbbet vizsgált faj a tyúk (*Gallus gallus*), illetve a pulyka (*Meleagris gallopavo*). A baromfi fajokon belül a tyúk tekinthető modellállatnak, s emiatt e fajról rendelkezünk a legtöbb genetikai információval. Több genetikai térkép, és azok összesítéseként létrehozott, úgynevezett "konszenzus térkép" is készült a faj genomjáról (Burt et al. 1995, Cheng et al. 1995, Smith et al. 1996, Smith et al. 1997, Crooijmans et al. 1996). Viszonylag hamar már, a 2000-es évre ismertté vált genomszekvenciájának "piszkozata", először Groenen publikálásában, majd őt követték Hillier és munkatársai (2004), Takashi és munkatársai 2004-ben, és Cogburn és munkatársai 2007-ben.

A tyúkot követően (illetve azzal egy időben, kisebb intenzitással) számos gazdasági vagy tudományos szempontból fontos madárfaj genetikai vizsgálatához kezdtek genetikai DNS markereket fejleszteni (Primmer et al. 1996), mivel a tyúk fajból származó genetikai információk és genetikai markerek közvetlenül nem, vagy csak kevés esetben voltak felhasználhatók más madárfaj esetében (Baratti et al. 2001, Kayang et al. 2000). A markerek adaptálása egy lehetséges megoldás, azonban az ilyen markerek száma és alkalmazhatósága

sok esetben alacsony hatékonyságú (Yue et al. 2010). Mindenesetre a tyúkból származó mikroszatellit markerek alkalmazására több példa is van különböző madár fajokon (Hanotte et al. 1997, Fields és Scribner 1997, Quing-Ping et al. 2009, Andres és Kapkowska 2011).

2.3.5.1 Mikroszatellit markerek a pulyka fajban

A pulyka genomjának vizsgálata a tyúkhoz viszonyítva később kezdődött, és kezdetben csak kevés marker állt rendelkezésre (Huang et al. 1999, Reed et al. 1999, Mock et al. 2002). Ezért érthető, hogy a molekuláris genomika fejlődésének köszönhetően az ezredfordulón e faj esetében is jelentős fejlesztések indultak világszerte, párhuzamosan a munkámmal (Reed et al. 2000b, Harry et al. 2003).

Ennek során több kapcsoltsági térképet is készítettek. Burt és munkatársai (2003) egy mikroszatellit alapú térképet hoztak létre, amely 74 markert tartalmazott 18 kapcsoltsági csoportba rendezve. Ugyanebben az évben Harry és munkatársai (2003) RFLP technikát alkalmazva készítettek egy másik kapcsoltsági térképet (ezen 113 marker volt megtalálható 22 kapcsoltsági csoportban). Knutson és munkatársai a 2004-es év folyamán újabb 154 db mikroszatellit markert izoláltak a pulykából. Ezt követően 2005-ben Reed és csoportja egy összehasonlító térképet készítettek a tyúk és a pulyka között. A pulyka genom e kapcsoltsági térképe 314 lókuszt tartalmazott 29 kapcsoltsági csoportba foglalva. A genetikai térkép fejlesztése ekkor sem állt meg, 2006-ban Chaves és munkatársai a tyúk genomiális marker adatokat használták fel újabb pulyka markerek fejlesztésére. 2007-ben pedig a korábbi térképek egyesítésével létrehozták a pulyka konszenzus genetikai térképét (Reed et al. 2007), amelyen az emlős térképekkel összehasonlítva még mindig kevés, mindössze 613 lókusz volt feltérképezve, és 41 kapcsoltsági csoportba sorolva. Végül publikálták a pulykagenom szekvenálásának első eredményeit is (Dalloul et al. 2010).

2.3.5.2 Mikroszatellit markerek a lúd fajban

Ez idáig az irodalomban mindössze 10, a házilúd fajból (*Anser anser L.*) izolált és jellemzett mikroszatellit lelhető fel, míg a GeneBank-ban további 15, nem vizsgált mikroszatellit szekvencia található (Weiß et al. 2008). Emellett további 26, az *Anser cygnoides* fajból származó mikroszatellitet alkalmaztak sikeresen házilúd állományok vizsgálatára (Tu et al. 2006, Li et al. 2007). Fontos megjegyezni, hogy e két fajon kívül a fajgazdag *Anser* genuszba csak a nagy lilik (*Anser albifrons L.*) fajból írtak le két használható mikroszatellit markert (Chathey et al. 1998, Fields és Scribner 1997). A távolabbi rokon fajok közül a kanadai lúdból (*Branta canadensis L.*) izolált mikroszatellit markereket is sikeresen

alkalmaztak a házilúd vizsgálatára (Baublys et al. 2006, Mylecraine et al. 2008, Liu et al. 2006, Tu et al. 2006, Li et al. 2007).

Ugyanakkor már az 1990-es évek végén vizsgálták a tyúk mikroszatellitek használhatóságát különböző vizimadarak összehasonlításában (Fields és Scribner 1997), és ez több esetben sikeres volt a házilúdnál is (Liu et al. 2006, Tu et al. 2006, Li et al. 2007, Quing-Ping et al. 2009, Andres és Kapkowska 2011). Emellett a lúd genetikai vizsgálatát, és az ahhoz szükséges genetikai markerek fejlesztését a vízi szárnyasok közül legfejlettebb genetikai térképpel (Huang et al. 2005, Huang et al. 2006, Huang et al. 2009, Christel et al. 2006, Hsiao et al. 2008, Su és Chen 2009, Skinner et al. 2009, Purwantini és Purwantini 2010) és genomszekvenciával is rendelkező kacsa (*Anas platyrhynchos*) is segítheti (Huang et al. 2005, Andres és Kapkowska 2011). Erre azonban már nem lesz szükség, ha elérhetővé válik a lúd (*Anser anser*) genomszekvenciája, és így közvetlenül feltáródnak a pozícionált lúd mikroszatellitek.

Kínai kutatók a 2011-es év folyamán bejelentették, hogy meghatározták a Zhedong-i fehér lúd genomszekvenciáját (Zhejiang Provincial Academy of Agricultural Sciences, Zhedong White Goose Institute in Xiangshan County of Zhejiang Province and Beijing Genomics Institute – BGI – http://www.genomics.cn/en/news/show_news?nid=98853 (tudományos közlemény a dolgozat elkészítéséig nem jelent meg róla). Reményeik szerint az ebből származó adatok segítséget nyújthatnak mind a baromfi, mind a madarak domesztikációjának tisztázásában. Ennek segítségével többet meg lehet majd tudni a lúdfaj gyors növekedésének genetikai hátteréről is. Ezt követően a 2012-es év folyamán SNP analízist végeztek a Barnacle lúd (*Branta leucopsis*) fajtán különböző viselkedési minták átfogóbb vizsgálatának céljából (Jonker et al. 2012).

2.3.6 Új mikroszatellitek izolálása, ismétlődésekben dúsított könyvtár létrehozása

A markerek hiánya az adaptálás mellett új markerek izolálásával szüntethető meg. Amint ezt korábban is említettem, a mikroszatellitek esetében ez meglehetősen költséges és munkaigényes folyamat. Számos stratégiát írtak le mikroszatellit tartalmú lókuszok izolálására.

Az egyik legegyszerűbb megközelítés az egyszerű hibridizációs izolálás. Ennek során kis genomi (300-700 bp) DNS fragmentumokat klónoznak, és radioaktívan jelölt oligonukleotid (az ismétlődésnek megfelelő szekvenciájú) próbákat alkalmaznak a mikroszatellit tartalmú klónok azonosításához. Alacsony hatékonysága miatt ezt a módszert csak a genomszinten viszonylag sok mikroszatellitet hordozó szervezeteknél célszerű alkalmazni (Glenn és Schable 2005). Az alacsony mikroszatellit gyakorisággal jellemezhető

taxonok esetében – ide sorolhatók pl. a madarak – nem alkalmazható hatékonyan, ezért alternatív stratégiákat dolgoztak ki. Ezek két további csoportra bonthatók aszerint, hogy genomi könyvtár jelenti-e a kiindulási alapot az izolálás során.

A szelektív hibridizációt alkalmazó stratégia szerint kis fragmentumokat (200-1000 bp) állítanak elő, majd ligálnak vektorba. A szükséges amplifikálás (sokszorosítás) után a DNS-t hibridizáltatják egy vagy több ismétlődést tartalmazó próbával, amelyet vagy nylon membránhoz kapcsolnak, vagy biotinnal jelölnek, így sztreptavidinnel borított mágnesezhető gyöngyökhöz köthető. A nem specifikusan kötődött fragmenteket mosással eltávolítják, majd a DNS-t leoldják, és PCR-el visszanyerik. Végül a DNS-t pl. TA-klónozással megfelelő vektorba klónozzák (Zane et al. 2002).

A primer hosszabbításon alapuló stratégiához (primer extension) kétféle módszert ismertetek:

1) Ostrander-féle módszer:

Ennél először egy elsődleges genomi könyvtárat hoznak létre a denaturált, egyszálú genomi DNS M13 fág vektorba helyezésével, majd a könyvtárból származó denaturált fragmenteket (ssDNS) olyan mutáns baktériumtörzsbe transzfektálják, amiből hiányzik a dUTPáz (duť) és az uracil-N-glikoziláz (ung). A fágot sokszorosító sejt a keletkező egyszálú DNS molekulákba timin helyett uracilt épít be. A DNS visszanyerését követően a cirkuláris molekulák átalakítását egyszálú DNS cirkuláris duplaszálú DNS-sé in vitro primerhosszabbítással, (CA)n vagy (TG)n oligonukleotidok és Tag DNS polimeráz felhasználásával végzik. Ezáltal szelektálnak a dinukleotid ismétlődést tartalmazó klónokra. Ezután a termékeket E. coli-ba (dut⁺, ung⁺) transzformálják. A cirkuláris ssDNS transzformációja kevésbé hatékony, mint a dsDNS-é, és az uracilt tartalmazó ssDNS degradálódik a nem mutáns baktérium (E. coli) sejtekben (urcil-N-glikoziláza által). Így ezzel a módszerrel duplaszálú CA-, illetve TG-ismétlődésekkel dúsított DNS könyvtárat kapunk (Zane et al. 2002, Ostrander et al. 1992) (7 ábra).

2) Paetkau-féle módszer:

A módszer alapjául az Ostrander által leírt technika szolgál, szintén M13 fág vektorral létrehozott könyvtárból indul ki. Az egyszálú DNS-hez 5' végén biotinilált, ismétlődés-specifikus primert hibridizáltatnak. Így Klenow-polimeráz enzim segítségével olyan duplaszálú, ismétlődő szekvenciát tartalmazó DNS jön létre, melynek egyik szála az eredeti, egyszálú DNS, másik szála az 5' végén biotinilált, primer-hosszabbított szál. A mikroszatellitet tartalmazó biotinilált DNS fragmentek ezután sztreptavidinnel borított mágnesezhető gyöngyökhöz köthetők, melyek felületéről a nem specifikusan kötődött, mikroszatellitet nem tartalmazó szakaszok mosással eltávolíthatók. Az ismétlődést tartalmazó

fragmentek a sztreptavidin és a biotin oldhatatlan kötése miatt denaturálással, egyszálú formában nyerhetők vissza, melyből primer-hosszabbítással kétszálú DNS-t állítanak elő. Az így létrehozott duplaszálú DNS fragmenteket kompetens sejtekbe klónozva mikroszatellitekkel dúsított könyvtárat kapnak. A szálhosszabbítás kétszeri megismétlése fokozza a mikroszatellit tartalmú klónok transzformációs hatékonyságát (Zane et al. 2002, Paetkau 1999) (6. ábra).

A **FIASCO** (Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats) eljárás gyorsabb és egyszerűbb, segítségével több, az eddigi módszereknél alkalmazott lépés elkerülhető (Zane et al. 2002). A módszert különböző állatfajokon – többek között madarakon is – tesztelték. Ennek során a DNS-t restrikciós enzimmel emésztették, és a fragmentekhez egy adaptort ligáltak. Az adaptor két fontos tulajdonsággal rendelkezett. Az egyik, hogy a ligálás után a fragmentek elveszítették a restrikciós enzim felismerő helyet, így egyidőben lehetségessé vált a ligálás és az emésztés. A másik, hogy az adaptor nem foszforilálódott, ezért önmagával nem ligálódott. Ezután a fragmeneteket adaptor specifikus primerek segítségével PCR reakcióban felszaporították, majd ismétlődés specifikus biotinilált próbával hibridizáltatták. A mágneses kihúzás segítségével elkülönített, mikroszatellit szekvenciát tartalmazó fragmentekkel, másodlagos, dúsított könyvtárat hoztak létre.

genomiális DNS (mikroszatelitekkel dúsított könyvtárak készítése) Ostrander-féle módszer Paetkau-féle módszer Mindkét módszer egy elsődleges genomi könyvtárből indul ki, melyet hagyományos módon készítenek M13 fág és pBluesscript fágmid Feldarabolás segítségével pl. enzimes emésztéssel PCR biotinnal jelölt ismétlődés Klónok LB táptalajra szélesztése, specifikus primerrel az M13 vektor dut- ung- mutációt hordoz Méretbeli osztályozás 300-700 bp DNS darabok Kihúzás sztreptavidinnel bevont mágneses gyönggyel Transzformálás Escherichia coli törzsbe, mely dut+ ung+, így az uracilt tartalmazó DNS szálat le tudja Mosási lépések bontani Vektor és inszert ligálása M 13 mp 18 (fág DNS) Primer hosszabbítás repeat specifikus pBluescript (fágmid) primerrel Másodlagos dúsított könyvtár Transzformálás Szélesztés, kolónia átvitel Transzformáció Másodlagos dúsított könyvtár Southem hibridizáció Szélesztés Pozitív klónok szekvenciájának meghatározása Lemosás Elsődleges könyvtár Primer tervezés,

Izolálási módszerek

"Tradícionális módszerek"

6. ábra. Mikroszatellit könyvtár létrehozása. Az ábrán többféle módszer lépései láthatóak, az ismétlődésekben dúsított szekvenciát tartalmazó könyvtár létrehozására. Baloldalról kezdődően: egy "hagyományos", hibridizációs dúsítási módszer, és két altarnatív módszer, ezek az Ostrander-féle, és a Paetkau-féle módszerek (Glenn és Schable 2005, Ostrander et al. 1992, Paetkau 1999).

marker optimalizálás

Alternatív módszerek



7. ábra. Dúsított mikroszatellit könyvtár létrehozása FIASCO módszerrel. (Hamilton et al. 1999, Glenn és Schable 2005).

2.4 Genomszekvencia meghatározás

Mint azt már a bevezésben is említettem, 1990-ben kezdődött az emberi genom szekvenciájának meghatározása, amelyen több nagy társulás párhuzamosan dolgozott (Wingerson 1990, Myers 1999, Wills 1991). A technika fejlődése felgyorsította a folyamatot, és ma már több mint 73 emlős, 49 metazoa, 26 növény, 41 gomba, 22 protiszta, és 9090 baktérium genomjának teljes szekvenciája érhető el szabadon (Ensembl - 2013. 11. 11.). Ennél azonban jóval több faj genomjának szekvenálása van folyamatban, és ez a szám szinte

napról napra növekszik (Ensembl Genome Browser - www.ensembl.org; Beijing Genomics Institute (BGI) - http://www.genomics.cn/en/navigation/show_navigation?nid=4205). A tervek szerint rövid időn belül több ezer faj genomjának szekvenálását fogják elvégezni (Haussler et al. 2009). A szekvenciaadatok megismerése és elemzése folyamatos.

A DNS felbecsülhetetlen eszköz, mert eltekintve az ikrektől, minden élőlény egyedi DNS szekvenciával rendelkezik. Az ismétlődés tartalmú DNS az állati genomban egyedenként különböző, így az egyedek azonosítására lehet használni. Csak néhány példa arra, mi válik lehetségessé a DNS technikák alkalmazásával: fajok, egyedek azonosítása, származás ellenőrzés, különböző organizmusok azonosítása a vízben, illetve az élelmiszerben.

2004-ben elkészült a tyúk (*Gallus gallus*) genomszekvencia meghatározása, ami akkor még 28 autoszómát és 2 ivari kromoszómát tartalmazott (Hillier et al. 2004). 2013-ra ez már 32 kromoszómát, 2 kapcsoltsági csoportot és 14,093 kromoszómához nem köthető szekvenciát tartalmaz. (Ensembl - 2013. 11. 26.). A további térképezés folytatódik, mert a tyúk genomja 38 autoszómából és 2 ivari (W, Z) kromoszómából áll (Chicken Genome Sequencing Consortium - Richard Wilson, PhD vezetésével).

2010-re elkészült a pulyka (*Meleagris gallopavo*) "piszkozat" genomszekvenciája (Dalloul et al. 2010), ami 30 auszómából és a 2 ivari (Z, W) kromoszómából áll, valamint 152,913 kontigból rakták össze. A genom végleges mérete 1.04Gb. Az elemzések során 4,125 kódoló gént, 756 rövid, nem kódoló gént, 125 pszeudogént és 17,377 gén transzkriptumot azonosítottak (Aslam et al. 2010, Aslam et al. 2012).

A zebrapintynek (*Taeniopygia guttata*), mint a madarak modell állatának, szintén elkészítették a genomszekvenciáját 2010-re (Warren et al. 2010). Az ezt követő időszakban az elemzések során 17,488 kódoló gént, 724 rövid, nem kódoló gént, 406 pszeudogént és 19,334 gén transzkriptumot azonosítottak eddig (Quesada et al. 2010) (www.ensembl.org).

A kacsa (*Anas platyrhynchos*) 1,2 Mb nagyságú genomszekvenciájának első változatát a kínaiak (BGI) készítették el a 2013-as év folyamán. Azonal megkezdték a szekvencia összehasonlításokat más fajokkal, illetve a lehetséges gének keresését, azonosítását (Huang et al. 2013).

A törpepapagáj (*Melopsittacus undulatus*) genomja 2,8Gb nagyságú, 70.862 kontigot tartalmaz 50-szeres lefedettség mellett. A szekvencia meghatározása folyamatban van, ezzel párhuzamosan a fehérjéket kódoló szekvenciákat hasonlítják a nemzetközi adatbázis adataihoz (www.ensembl.org).

Az élelmezésben fontos szerepet játszó emlősállatok, mint a szarvasmarha (Zimin et al. 2009), a juh (Kijas et al. 2012), a sertés (Rothschild et al. 2007, Groenen et al. 2012)
genomi szekvenciájának ismerete és elemzése segítheti a még ismertelen fajok megismerését, és ez a tudás felhasználható a termékelőállításban is.

A gemom szekvencikák ismerete és elemzése robbanásszerűen fejlődnik. A várható eredményeket, illetve azok alkalmazásának lehetőségét még sejteni, megjósolni sem lehet. Magas szintű műszerezettség és megfelelő vegyszerek szükségesek a szekvencia meghatározáshoz és az adatok kezeléséhez, felhasználásához megfelelő matematikai, informatikai és molekuláris genetikai tudással rendelkező szakemberek kellenek.

Az adatok felhasználásakor lehetőség nyílik a szekvenciaadatok összehasonlítására mind egyedek között egy fajon belül, mind fajok között. Az első esetben tulajdonságok, betegségek hátterének kutatása, a szervezet működésének, szabályozásának molekuláris szintű megismerése válik lehetővé. A második esetben a törzsfejlődés, a fajok közötti különbségek meglétének, kialakulásának tanulmányozására van lehetőség.

A gyakorlatban a származásellenőrzési munkákban, betegségek nyomon követésekor már napjainkban is alkalmazzák.

2.5 Populációgenetika

A populációt felfoghatjuk genotípusok, és ebből következően gamétaállományok keverékeként (Sváb 1971). A populációgenetikai analízisekben választ keresünk arra a kérdésre, hogy milyen a vizsgált szaporodási közösség genetikai összetétele. Eltér-e a Hardy-Weinberg egyensúlytól, alacsony vagy magas a genetikai diverzitás, milyen az allélek frekvenciája, milyenek az egyedek rokoni kapcsolatai, változik-e a populáció vagy sem?

A Hardy-Weinberg egyensúly estén ideális populációról beszélünk, ahol: 1.) a populáció végtelen nagy, és benne érvényesül a pánmixis, 2.) a szelekció nem működik, azaz az összes genotípus életképessége egyforma, 3.) a populációból nincs elvándorlás, illetve a populációba nincs bevándorlás, 4.) nem fordul elő mutáció, 5) a meiózis normális lefolyású (Stansfield 1997), és az egyes genotípusok aránya állandó az egymást követő generációkban. Ha ettől eltér, akkor az egyensúlyt megváltoztató mechanizmusok vizsgálata következik különböző statisztikai módszerekkel (Beer 2004).

Ezek a mechanizmusok lehetnek a szelekció, mutáció, genetikai sodródás és a migráció.

Természetes szelekció esetében a "nagyobb rátermettséget biztosító" genotípus öröklődik az utódokba, és terjed el a populációban. A kedvezőtlen allélt örökítő egyed kevésbé rátermett, és az az allél, amit ő hordoz, idővel eltűnik, mivel kevesebb utódot fog létrehozni az állományban.

A **mutáció** ritka esmény, 10⁻⁵-10⁻⁶ alkalommal fordul elő generációnként, így az allélgyakoriságot 1 generáció alatt nem változtatja meg, viszont az evolúció alapját képezi. A

37

bekövetkező mutáció létrehoz egy új allélt, ami a szelekció, illetve a sodródás segítségével elterjed a popúlációban, majd fixálódik.

A kis populációkban tapasztalható véletlenszerű allélingadozást nevezzük **genetikai sodródás**nak, amit okozhat a mintavételi hiba. Az alacsony egyedszámnak köszönhetően előfordulhat allélvesztés, amit egy új mutáció a későbbiekben pótolhat. A genetikai sodródás speciális formái az alapító hatás és a "palacknyak-hatás". Az előbbi esetében kis létszámú egyed kiválik a populációból, és új helyre vándorol. Itt alapít új populációt, amely valószínűleg nem hordozza az eredeti populáció genetikai változatosságát. Az utóbbi, azaz a "palacknyak-hatás" esetében, valamely külső hatásra (pl. jégkorszak, vulkánkitörés) jelentősen lecsökken a populáció mérete, és ezzel a genetikai változatossága. A különböző allélek eltűnésével eltűnnek a heterozigóta egyedek – azaz a polimorfizmus – az állományból, és a homozigóta allélek fixálódnak.

Migráción a ki- és bevándorló egyedek által közvetített genetikai információt értjük. Ez akár megakadályozhatja a populációk genetikai differenciálódását.

A nem véletlenszerű párosodásnak sok formája ismert, ezek közé tartozik a beltenyésztés. Ekkor kisméretű populációban kevés az ivarérett, szaporodásra képes egyedek száma, így rokon egyedek párosodnak. Okozhat fitneszcsökkenést, vagy negatív hatású allélek dúsulását, ami negatívan befolyásolhatja a populációt.

A populációk genetikai variabilitásával foglalkozó tanulmányok egyik legérdekesebb része a genetikai diverzitás (heterozigozitás). Milyen paraméterek tájékoztatnak minket a populációk struktúrájáról és történetéről akár evolúciós léptékben? Az adott állományban fellehető allélok mennyisége és milyensége.

Egy genetikai egyensúlyban lévő populációban véletlenszerű párosodás mellett, a populáció fele heterozigóta marad, a heterozigozitás maximálisan 0,5 értéket vehet fel (Rédei 1982). Ezzel ellentétes a beltenyésztés, ami jelentősen csökkenti a genetikai variabilitás szintjét, így alacsony heterozigozitás értékeket tapasztalhatunk. Amennyiben nagyfokú a beltenyésztettség, vagy hosszú időn keresztül nincs vérfrissítés, az hatással van a populációra (különösen, ha az alacsony egyedszámú).

2.6 Genetikai varibilitás számítása

A populációgenetikai vizsgálatokhoz molekuláris markerek is jól használhatóak (Sunnucks 2000). Az állomány genetikai varibilitás vizsgálatához szükség van genetikai markerekre, illetve azok alléljeinek meghatározására. Az adatok elemzésekor megállapíthatóak az állományra jellemző allélek és azok gyakorisága. Ezek alkalmazásával számíthatók ki azok a populációt jellemző adatok, amelyek közvetlenül felhasználhatók az

állattenyésztői nemesítő és állományfenntartó munkákban. A kiszámított és mért populációgenetikai mérőszámok – mint a várt heterozigozitás (H_e) és a kapott heterozigozitási (H_o) érték – segítségével folyamatosan ellenőrizhető a populáció variabilitásának változása. Az egyedi genotípus adatok ismeretében olyan célpárosítások alakíthatók ki, melyekkel elérhető a variabilitás fenntartása, illetve növelése.

A várt heterozigozitási (H_e) érték számításakor az allélfrekvenciák alapján egy feltételezett Hardy-Weinberg egyensúlyban lévő populáció esetén várható értéket kapjuk eredményül. A ténylegesen kapott heterozigozitási (H_o) érték pedig a vizsgált populációban lévő hetrozigóták arányát jelenti. A két érték viszonya alapján jellemezhető a vizsgált populáció genetikai egyensúlytól való eltérésének megléte, és annak mértéke. Egy populációra vonatkoztatva a beltenyésztettség fokáról ad jellemzést a fixációs index (F_{IS}). Számítása során a várt heterozigozitási értékből kivonják a kapott heterozigozitási értéket, majd ezt a számot elosztják a várt heterozigozitási értékkel. Ilyen esetben az értékek felvehetnek + és - értéket is. Az F_{IS} = pozitív értékek esetében kevesebb heterozigóta egyed van az állományban, mint az az egyensúly esetén várható volna, és ez a későbbiekben beltenyésztettséghez vezethet. Az F_{IS} = negatív érték ennek ellenkezőjére utal, azaz bizonyos fokú génbevándorlást jelez.

A polimorfizmust, változatosságot jellemző PIC érték (**P**olymorphism Information Content), amelyet Botstein és munkatársai (1980) dolgoztak ki, a marker információtartalmának meghatározására használható.

A genetikai markerek alléljainak felhasználásával kiszámítható az állomány egyedei közötti genetikai különbség, majd ebből vizuálisan is megjeleníthető dendogram készíthető.

DOI: 10.14751/SZIE.2014.046

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Felhasznált anyagok

Az alábbiakban ismertetett kísérletek során felhasznált vegyszerek a REANAL, SIGMA és SERVA cég termékei. Az alkalmazott enzimek a Promega, illetve a Fermentas cégektől származtak. Az ABI PRISM 310 Genetic Analyser gépet és az ezzel végzett kísérletekhez használt termékeket az Applied Biosystems (jelenleg Life Technologies Corporation) forgalmazza.

Az ismert és sokat alkalmazott molekuláris eljárásokat – mint enzimes emésztés, kompetens sejt (1.125 fejezet) készítés és ezek transzformálása (8.35 fejezet), baktériumkultúrák szaporítása – a Sambrook és munkatársai (1989) által leírt protokollok alapján alkalmaztam.

3.2 Kísérletben szereplő állatok

3.2.1 Pulyka

A kísérletben szereplő pulykaállományt a Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma (DE AGTC) Állattenyésztési Tanszékének kísérleti telepe tartja fenn. A telepen az 1980-as évektől kezdve foglalkoznak őshonos, illetve réghonosult baromfifajták fenntartásával. A bronzpulykából a telepen 11 vonalat tartanak fenn külön-külön röptetőkben. Egy-egy vonalat 3-4 bak és a hozzájuk tartozó tojók (3-4 tojó/bak) alkotnak.

A tojók a saját vonalukba kerülnek vissza ivaréréskor, a bakok pedig a következő vonalba (8. ábra).

A debreceni génrezerv bronzpulyka populáció 163 db egyede mellett még 6 db vadpulyka mintát volt lehetőségem vizsgálni. Ezen vadpulyka egyedek a '90-es években kerültek hazánkba vadászati céllal, a Nimród Vadásztársaság közvetítésével az USA-ból, ahol ez szintén egy vadászott faj.

A dúsított mikroszatellit könyvtár létrehozásához tíz, az ország több őstermelőjétől (ecsédi, püspökladányi, szegedi) gyűjtött bronzpulyka vérmintát használtam fel.



8. ábra. Bronzpulyka. (A DE AGTC Állattenyésztési Kísérleti Telepén készült a fotó.)

3.2.1.1 Pulyka térképezési populáció

A mikroszatellitek térképpozíciójának megállapítása a Minnesota-i Egyetemmel kötött együttműködés keretében történt. Az ehhez használt populáció keresztezési sémáját a 9. ábra mutatja. A mikroszatellit működésének optimalizálását követően az új mikroszatellitekkel vizsgáltam a szülői nemzedék (P0) genotípusát a rendelkezésünkre álló DNS mintákon. Ha a szülők közül legalább az egyik informatív marker genotípussal rendelkezett, akkor a markert a térképezési populáción is genotipizálták a Minnesota-i Egyetemen.

A térképezési állományt a következőképpen alakították ki: A 2000-es évek elején kereszteztek egy mellhústermelő képesség tekintetében kiváló vonalat egy szokatlanul magas utódszámot adó – azaz nagy szaporodóképességű – vonallal. Itt 16 tojóhoz egy pulykabak tartozott. Az F1 generációban 5 F1 bakhoz 12-12, nem rokon tojót párosítottak, így kapták meg az F2 állományt. Miután kizárták a problémás egyedeket (elhullások, nem fertilis egyedek), a legmagasabb F2 utódszámmal rendelkező családokat választották ki a térképezéshez. Négy F1 tojó (D1042, D1044, D1049, D1057) és 2 F1 bak pulyka (D7491, D3804) kombinált szaporodásából kapott 206 F2 utód alkotta a térképezési populáció négy családját (valamennyi egyed rokonsági kapcsolatban áll két nagyapával (P: C6013, C6014) a keresztezési kombinációk megválasztása következtében) (Reed et al. 2003a, b).



9. ábra. A Minnesota-i Egyetem pulyka térképezési populációjának felépítése. A P generáció szülői egyedeinek genotípusát vizsgáltam az új izolálású mikroszatellitek tesztelésekor (Reed et al. 2003a nyomán). A nagyszülői (P) és első utód (F1) nemzedék esetén a tojókat jelző körökben és a bakokat jelző négyzetekben a kiválasztott egyedek azonosító száma látható. Az F2 generáció esetén a családonkénti és ivaronkénti egyedszámok vannak feltüntetve. A különböző vonalak az egyes családok származásának, alapítóinak könnyebb követhetőségét szolgálják.

3.2.2 Lúd

Az adaptált mikroszatellitekkel végzett populációgenetikai vizsgálatok során (lásd később) a DE AGTC Állattenyésztési Tanszékének kísérleti telepén fenntartott génrezerv fodros tollú lúdpopuláció (10. ábra) 132 egyedétől származó vérmintákat használtam.



10. ábra. Fodros tollú lúd. (A HáGK gödöllöi telepén készült a fotó.)

A mikroszatellitek izolálása és jellemzése során összesen 10 db, hazai állományokból származó magyar lúdból (4 db) és Gourmaud hibridekből (6 db) vett mintákkal dolgoztam.

3.3 Mintagyűjtés módszere

A minták előállításához a kísérletekben szereplő valamennyi egyedtől azonos módon gyűjtöttem vért, a telepi állatorvos és az ott dolgozók segítségével. Ezzel egyidőben a pulykák és ludak egyedi jelzést (szárnykrotália) kaptak a későbbi pontos azonosítás érdekében. A mintákat alvadásgátlót (0,056 M trinátrium-citrát és 0,086 M NaCl) tartalmazó, egyedi jelzéssel ellátott Falcon-csövekbe gyűjtöttem. Egyedenként 5-15 ml vért vettem, és hűtve szállítottam a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontba, ahol a további feldolgozásig -20 °C-on tároltam a mintákat.

3.4 DNS izolálás, minősítés és tárolás

3.4.1 DNS izolálás sós-kicsapásos módszerrel – genotípus meghatározáshoz

A DNS preparálását a Miller és munkatársai által kifejlesztett sós-kicsapásos módszer egy módosított változatával végeztem (Miller et al. 1988).

Az izolálás során 30 µl vérhez 1200 µl A-puffert (0,01 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA (pH.7,5)) adtam. A mintákat 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, közben többször átforgattam, majd 3 percig centrifugáltam 13000/min fordulaton. Ezután a csapadékról a felülúszót leszívtam, majd a pellethez hozzámértem 300 µl A-puffert, és megismételtem a centrifugálást újabb 10 perces állás után. A felülúszó ismételt eltávolítása után a cső alján maradt üledékhez hozzámértem 450 µl NLS oldatot (0,1 M Tris, 0,065 M KCl, 0,065 M MgCl₂, 0,065 M NaCl, 0,025 M EDTA (pH. 7,5), deszt. H₂O) és 14 µl 20%-os SDS-t, majd alaposan felszuszpendáltam. Hozzáadtam 2 µl Proteinase K enzimet (Fermentas) (8 mg/ml), másfél órán át 55 °C-on rázatva inkubáltam, majd szobahőmérsékletre hűtöttem a mintákat. Az oldathoz 30 µl 7,5 M ammónium-acetátot és 300 µl 5 M NaCl-t adtam, majd összekevertem. Ezután 4 °C-ra hűtött centrifugában 30 percig 13000/min fordulaton centrifugáltam. Új Eppendorf csőbe 400 µl izopropanolt adagoltam, majd hozzámértem a felülúszót, és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, miközben többször óvatosan átforgattam. Ezután a kicsapott DNS-t 3 percig 13000/min fordulaton centrifugálással a cső aljára gyűjtöttem. A felülúszót óvatosan leszívtam a pelletről, 300 µl 70 %-os etanollal átmostam, és 3 percig 13000/min fordulaton centrifugáltam. A mintákat a felülúszó leszívása után 15 percig szárítottam steril fülke alatt. Szárítás után a pelletekre mértem 100 µl TE puffert (0,01 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA (pH. 7,5)), és 1 órán át 60 °C-os vízfürdőben inkubáltam, majd szobahőmérsékletűre hűtöttem, és a továbbiakban 4 °C-on tároltam őket.

3.4.2 DNS izolálás fenol-kloroformos módszerrel – könyvtár készítéshez

Egy éjszakás rázatás mellett 55 °C-on emésztettem a vérmintákat kétszeres térfogatú SET pufferben (10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,5% SDS. (pH. 7,8)), 1 µg/ml Proteinase K enzim (Fermentas) hozzáadásával. A szennyező fehérjék eltávolításához fenol-kloroformos módszert alkalmaztam (Blin és Stafford, 1976). A DNS-t kicsaptam -20 °C-ra hűtött etanollal, majd ezt követően a DNS mosását szobahőmérsékletű, 70%-os etanollal végeztem. A szárítást követően a nukleinsavat TE pufferben oldottam fel.

3.4.3 DNS minták minősítése és tárolása

A DNS tisztaságát és mennyiségét fotometriás eljárással mértem 280 és 260 nm hullámhosszon. Jó minősítést azok a minták kaptak, melyek minimum 0,05 μ g/ μ l töménységűek 1,8-2 tisztaság mellett (260/280 nm). A nem megfelelő minőségű mintákat újra tisztítottam.

A megfelelő minőségű mintákat (1,8-2,0 tisztaság, és 0,05 µg/µl-nél magasabb koncentráció) egységesen 0,05 µg/µl koncentrációra hígítottam, és a PCR reakciókban közvetlenül ezeket használtam. A továbbiakban mind a tömény, mind a hígított DNS mintákat +5 °C-on tároltam.

3.5 Agaróz gélelektroforézis

A mikroszatellit termékek detektálása agaróz gélelektroforézissel (1,5%-os, 0,5 μg/ml etídium-bromidot tartalmazó agarózgél (SeaKem LE Agarose - Cambrex)) történt. Ennek során az elválasztáshoz 1 x TBE puffert (10 x TBE puffer: Tris: 108,0 g/l, Bórsav: 55,0 g/l, 0,5 M EDTA (pH.8,0)): 40,0 ml/l) használtam.

A minták előkészítésekor a reakcióelegyhez 1/5 térfogatnyi TBE stop puffert (3 x TBE, 20 mM EDTA, 50% glicerol, 0,25% brómfenolkék) adtam. A fragmentek méretének pontosabb meghatározásához PstI enzimmel emésztett λ fág DNS-t használtam molekulasúly markernek (11. ábra).



11. ábra. A PstI enzimmel emésztett λ fág (Roche).

3.6 Tyúk mikroszatellitek adaptációja pulyka és lúd állományok vizsgálatához

3.6.1 Az adaptált mikroszatellitek kimutatásának optimalizálása

A pulyka mikroszatellit adaptáláshoz Reed és munkatársai 2000-es cikke alapján választottam ki 56 db fluoreszcensen jelölt tyúk mikroszatellitet. Ezeknek a mikroszatelliteknek a legfőbb jellemzőit a mellékletek 1. táblázata foglalja össze.

A kiválasztott mikroszatellitek optimális PCR amplifikációs körülményeire vonatkozó irodalmi adatok is igen eltérőek voltak. Ezért az általam használt PCR reakció ún. "touch down" PCR volt (Don et al. 1991), melyet arra dolgoztak ki, hogy eltérő feltapadási hőmérsékletű primerekkel amplifikáljanak DNS fragmenteket, és csökkentsék az áltermékek képződésének lehetőségét. A reakció magas feltapadási hőmérsékletről indult (65 °C, 63 °C ill. 61 °C), amelyet ciklusonkét meghatározott ütemben (0,7 °C ciklusonként) csökkentettem, hogy csak specifikus szekvenciákról történjen átírás. Ezzel csökkentve a "mispriming", azaz a hibás DNS szintézis lehetőségét.

A triplex reakciók kialakítása miatt szükség volt arra, hogy meghatározzam a "touch down" PCR-ek működésének ideális körülményeit. Ennek során optimalizáltam a hőmérsékleti körülményeket, keresve azt a tartományt, melyen a primerek optimálisan működnek. Ugyancsak vizsgáltam, hogy melyik az a primer és MgCl₂. koncentráció, amelynél a PCR reakcióban felsokszorozott DNS fragment a legnagyobb mennyiségben képződik.

A mikroszatellit kimutatás optimalizálását három "touch down" hőmérsékleti tartományon végeztem, ezek: 65-55 °C, 63-53 °C és 61-51 °C. Az általam használt mikroszatelliteknél végül a 61-51 °C és a 63-53 °C "touch down" PCR program bizonyult a legalkalmasabbnak. A primerek mennyiségét 200-300 nM, míg a Mg²⁺-ion koncentrációját 1,5-3 µM között változtattam, keresve az optimális értékeket.

PCR reakcióelegy (10 μl végtérfogatban): 50 ng DNS templát, 200-300 nM primer, 2 μg/ml BSA (Promega), 1,5-3 mM MgCl₂, 0,80 mM dNTP (Promega), 0,05 U/μl Taq polimeráz (Promega), 10x PCR Puffer (Promega), MQ vízzel kiegészítve 10 μl végső térfogatra.

A PCR-t PTC-200 (MJ Research) géppel végeztem. A **"touch down" reakció hőmérsékleti profilja a következő volt:** A 4 perces, amplifikációt megelőző denaturáció 95 °C-on. Ezt a 10-szer ismétlődő "touch down" ciklus követte: 30 másodperces denaturáció 95 °C-on, majd 30 másodperces 65 °C/63 °C/61 °C-ról induló, ciklusonként 0,7 °C-ot csökkenő feltapadási (annealing) hőmérséklet, végül 45 másodpercig tartó lánchosszabbítás következett 72 °C-on. Ezt a PCR 25 ciklusból álló második része követte, amelyben

47

változatlan feltapadási hőmérsékleten sokszorosítottam a fragmenteket, azaz: 30 másodperces denaturáció 95 °C-on, majd 30 másodperces 55/ 53/ 51 °C primer feltapadási hőmérséklet és 72 °C-os 45 másodpercig tartó lánchosszabbítás. A reakciót 5 perces, 72 °C-on történő végső lánchosszabbítás zárta.

3.6.2 Mikroszatellitek kimutatása ABI PRISM 310 Genetic Analyzeren

A mikroszatellt allélok bázispár pontosságú méretmeghatározását minden esetben fluoreszcens kapilláris gélelektroforézis (ABI PRISM 310 Genetikai Analizátor) segítségével végeztem. A kapilláris gélelektroforézis során az elválasztás egy 36 cm hosszú, 50 µm átmérőjű kapillárisban történik, mely folyékony polimerrel (POP4 – Performance Optimized Polymer) van töltve. A primerhez kötött fluoreszcens festéket (6-FAM, TET, HEX, TAMRA) lézerfény gerjeszti a kapilláris egy adott pontján, az ennek hatására bekövetkező, eltérő hullámhosszú emissziókat méri és elemzi a gép és a hozzá kapcsolt számítógép. Az emissziót egy féligáteresztő tükör rendszer szűri meg, így csak az 520-650 nm hullámhossz-tartományban történik az adatgyűjtés. A termékek hosszát és intenzitását egy standardhoz (GS500-TAMRA, Applied Biosystems) viszonyítva értékeli a készülék. Az elsődleges adatok további feldolgozása során Genotyper (12. ábra) és GeneMapper® Software v4.1 szoftvereket használtam, amelyek lehetővé teszik az egyedi adatok "félautomata" összehasonlító elemzését.



12. ábra. Egy FAM és egy TET fluoreszcens festékkel jelölt mikroszatellit futásképe. Az ábrán három, illetve négy egyed FAM festékkel jelölt ADL0292, és TET festékkel jelölt ADL0147 mikroszatellitek vizsgálatának kapilláris gélelektroforetikus képe látható, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-es elemzés után. Az ábrák felső részén látható skála a 120-137 bp, illetve a 210-232 bp mérettartományt jelöli. A főfragmentek mérete a csúcsok alatti kockákban látható. A vizsgálataim során az így kapott adtokból számítottam ki az állományt jellemző heterozigozitási értékeket.

3.6.3 Multiplex kimutatás az ABI PRISM 310 készüléken

Az ABI PRISM kapilláris gélelektroforézis berendezés ebben a vizsgálatban használt applikációja denaturáló körülmények között, körülbelül a 0-500 bp mérettartományban választotta el és mutatta ki a DNS fragmenteket. Ebbe a mérettartományba az összes mikroszatellit főterméke beleillett. A legrövidebb ~70-80 bp-os, míg a leghosszabb ~340-350 bp-os terméket eredményezett. Megoldható volt az, hogy egy elválasztás alatt több, azonos festékkel jelölt lókuszt is kimutassak akkor, ha azok méretben megfelelően elkülöníthetőek voltak. Így az elektroforézist úgy végeztem, hogy legalább 3-3 mikroszatellitet, eltérő színű jelöléssel amplifikáló multiplex reakciót összekevertem, és azokat együtt választottam el. A mikroszatellit szettek összeállításához a várható termék méretét irodalmi adatok alapján becsültem, majd az állomány által hordozott allélek méretét előzetes kísérletekben (véletlenszerűen választott 10 db egyeden) állapítottam meg. Ezzel a módszerrel egyszerre akár nyolc mikroszatellit lókuszt tudtam kimutatni (13. ábra). Ez jelentősen csökkentette a futtatási költségeket és az analízishez szükséges időt.





3.7 A genotípus adatok populációgenetikai jellemzése

A mikroszatellit elemzésből kapott genotípus adatokat táblázatokba összesítettem (mellékletek 7. és 12. táblázat), illetve ezekből számítottam ki az egyes populációkat jellemző mérőszámokat: a várt heterozigozitást (expected heterozygosity - H_e) és a valós heterozigozitást (observed heterozygosity - H_o) állományokra és lókuszokra is, hogy információt nyerjek azok heterogenitásáról. Vizsgáltam a populációban detektált allélek számát, az allélek frekvenciáját (p_i), a polimorfizmus információ tartalmat (PIC) és az egyedek közötti genetikai távolságot (D_A). Az adatok elemzését a Populations és a

Microsatellite Toolkit (Park 2001) nevű programok használatával készítettem el. A heterozigozitás értékek közötti eltérés szignifikancia szintjét Markov lánc módszerrel (Guo és Thompson, 1992) határoztam meg ARLEQUIN 3.5 program segítségével (Excoffier és Schneider 2005).

A számítógépes szoftver a heterozigozitás értékeket a következő Nei (1987) képletek alapján számolja:

Várt heterozigozitás (H_e) 1 lókuszra számítva.

$$H_e = I - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Várt heterozigozitás (H_e) több lókusz eredményét figyelembe véve:

$$H_{e} = I - \frac{1}{m} \sum_{l=1}^{m} \sum_{i=1}^{k} p_{i}^{2},$$

P_i: az allélek frekvenciája, m: a lókuszok száma, **k**: a lókuszon található allélek száma.

A fixációs index, ami a várt és a kapott heterozigozitási érték különbsége osztva a várt heterozigozitási értékkel:

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

A polimorfizmust, változatosságot jellemző PIC (**P**olymorphism Information Content) értéket Botstein és munkatársai (1980) alapján kidolgozott képlet alkalmazásával számítottam ki:

$$PIC = I - \left(\sum_{i=1}^{n} p_{i^{2}}\right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} 2p_{i}^{2} p_{j}^{2}$$

ahol pi az i-edik allél gyakorisága, pj pedig az i+1-edik allél gyakorisága

A genetikai távolságok (különbségek) számítását a Populations szoftver segítségével végeztem (Langella 2002, 2011).

Az egyedek közötti genetikai különbség (genetic dissimilarity) számításához Takezak és Nei (1996) ajánlása szerint a Nei és munkatársai (1983) által leírt D_A módszert használtam.

Az egyedek közötti genetikai különbség számításának képlete:

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_{j=1}^{r} \sum_{i=1}^{m_j} \sqrt{x_{ij} y_{ij}}$$

A dendogram szerkesztéséhez szükség volt a következő jellemzők ismeretére: a lókuszok frekvenciája (X_{ij} és Y_{ij}) a populációban, az allélek száma (m) az adott lókuszon (j) és a vizsgált lókuszok száma (r). Ezen értékek számítását Populations programmal végeztem (Langella 2011). Az adatok alapján a genotípus adatokat UMPGA programmal elemeztem, hogy az egyedi genetikai távolságok vizuálisan is megjeleníthetőek legyenek. A dendogramot a Treeview szoftver segítségével tettem láthatóvá (Nei et al. 1983, Page 1996).

3.8 Ismétlődésekben dúsított könyvtár létrehozása

3.8.1 A DNS feldarabolása endonukleáz enzimekkel, és az adapter hozzákapcsolása

A Glenn és Schable által (2005) leírt módon végeztem a mikroszatellit szekvenciákban dúsított könyvtár elkészítését (15. ábra). Három, heterogametikus ivari kromoszómával rendelkező pulyka (tojó) kevert genomi DNS mintáiból készítettem a könyvtárakat, amelyhez fenol-kloroformos módszert alkalmaztam (Blin és Stafford 1976). A két könyvtár létrehozásához a három egyed fenol-kloroformos módszerrel tisztított DNS-eiből 20-20-20 µg-ot kevertem össze, majd egyik esetben RsaI (Fermentas), míg a másik esetben HaeIII (Fermentas) enzimmel emésztettem 30 µg kevert DNS-t.

Az emésztéseket 25µl-es végtérfogatban végeztem.

 RsaI enzimes emésztés: 30 μg kevert DNS, az enzim működéséhez szükséges 1xB puffer (Fermentas), 2,5 μg BSA, 10 U RsaI (Fermentas).

2.) HaeIII enzimes emésztés: 30 μg kevert DNS, az enzim működéséhez szükséges 1xR puffer (Fermentas), 2,5 μg BSA, 10 U BsuRI (HaeIII) (Fermentas).

A mintákat egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltam, majd az enzimek működését hődenaturációval inaktiváltam, ez az RsaI esetében 65 °C-os, míg a BsuRI-nél (HaeIII) pedig 80 °C-os 20 perces inkubációt jelentett. Az emésztés hatékonyságát 1% agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, melynek eredményéül nem elkülönülő DNS darabok halmazát (smeart) kaptam, amelyben a DNS jelentős része az 500 bp körüli tartományba esett. Az elektroforézist követően a gélből kivágtam a 200-1000 bázis mérettartományú fragment halmazt, majd Sambrook és munkatársainak (1989) módszerével, vagy QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) nyertem vissza a DNS fragmenteket az agarózgélből. Ezek az

51

izolált fragmentek szolgáltak alapul a további lépéseknél.

A könyvtárkészítés következő lépéseként egy saját tervezésű adaptert ligáltam az izolált fragmentek végeihez (14. ábra).

A duplaszálú adapter elkészítéséhez a két, egymással homológ szekvenciájú oligonukleotidot azonos mennyiségben (20-20 μM) kevertem össze 100 mM-os NaCl oldatban. Ezt követően ezt a mixet PTC-200 (MJ Research) PCR gépben először 95 °C-ra melegítettem, majd lassan (1 °C/sec) szobahőmérsékletűre hűtöttem.

14. ábra. Összekapcsolódás után a kétszálú linker ábrája. A KBB1 Forw és Rev elnevezésű szekvenciák alkalmazásával létrehozott kétszálú linker.

Ezután ezt a duplaszálú linkert ligáltam az emésztett fragmentekhez. A ligálási reakcióhoz 0,7 μM duplaszálú linkert, 1x ligáz puffert (Fermentas), 800 U T4 DNS ligázt (Fermentas) és az emésztett DNS mixből 800 ng-nyit mértem össze, majd az elegyet egy éjszakán keresztül inkubáltam 16 °C-on.

A linker ligálás eredményességét egy a linker szekvenciára tapadó primer segítségével, PCR-el ellenőriztem. A PCR összetétele a következő volt: 1xPCR Puffer, 2 mM MgCl₂, 320 nM dNTP, 1 U Taq polimeráz (Promega), 250 nM primer, 25µl-es végtérfogatban. DNS templátként 0,5 µl ligátumot használtam. A PCR reakció hőmérsékleti profilja a következő volt: 95 °C, 1 perc elődenaturációt követően 41-szer ismétlődő ciklusban; 95 °C, 30 másodperces denaturáció, majd 30 másodperces 56 °C primer feltapadási hőmérséklet és 72 °C-os 150 másodpercig tartó lánchosszabbítás. A reakciót 5 perc, 72 °C végső lánchosszabítás zárta. A PCR reakció sikerességét 1% -os agaróz (SeaKem LE Agarose - Cambrex) gélelektroforézissel ellenőriztem, melynek eredményéül ismét smeart kaptam, amelyben a kapott termék jelentős része ismét az 500 bp körüli tartományra koncentrálódott.

3.8.2 Ismétlődést tartalmazó DNS fragmetek dúsítása és könyvtárak készítése

A linker-ligált fragmentek közül egy dúsítási folyamattal válogattam ki a mikroszatellit típusú ismétlődéseket tartalmazó fragmenteket Glenn és Schable (2005) protokoljának módosított változatával. Ehhez egy 0,2 ml-es reakciócsőbe (Axygen) összemértem 1xHyb oldatot (0,9 M NaCl, 0,09 M nátrium-citrát, 0,1% SDS (pH. 7.0)), 1μM

biotinnal jelölt (CA)₁₈-próbát, 10μg izolált fragmentet, amelynek a végére az előző lépésben linkert ligáltam, majd az elegyet desztillált vízzel kiegészítettem 50 μl-re.

Ezt követően a DNS-próba elegyet PCR készülékben (PTC-200; MJ Research) egy speciális PCR program használatával hibridizáltattam. Ennek a hőmérsékleti lépései a következőek voltak: 95 °C-os, 5 perces denaturációt követte egy gyors hűtés 70 °C-ra, viszont ezután csak 0,2 °C-ot csökkent a hőmérséklet 5 másodpercenként addig, amíg elérte az 50 °C-ot. Ezen a hőmérsékleten tartotta 10 percig, majd elkezdte lassan hűteni; 5 másodpercenként 0,5 °C-kal csökkentve a hőmérsékletet, amíg el nem érte a 40 °C-ot. Ezután gyorsan 15 °C-ra hűtötte.



15. ábra. A dúsított könyvtár létrehozásának lépései. A kevert DNS emzimes emésztését (RsaI ill. HaeIII) és az 500-1200 bázis mérttartományú fragmentek kiszűrését követően a fragmentekre adapterszekvenciákat ligáltam. Ezt követően biotinnal jelölt sztreptividines gyönggyel kiválasztottam az ismétlődést tartalmazó szekvenciákat, és PCR-t alkalmazva kétszálúvá akakítottam őket. Ezután pGEM T-Easy vektorba ligáltam, majd megállapítottam a szekvenciájukat.

A következő lépésben a biotinnal jelölt oligókat és a hozzájuk hibridizált DNS molekulákat sztreptavidinnel borított mágneses gyöngyök (MagneSphere, Promega) felületére kötöttem. Ehhez a gyöngyöket kétszer ismételt TE (10 mM Tris (pH 8), 2 mM EDTA) mosást követően, szintén kétszer mostam 1xHyb oldattal, és végül 150 µl 1xHyb oldatban szuszpendáltam.

Ebbe az oldatba mértem bele az elkészült DNS-próba elegyet, és vízszintes rázógépben, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltam. Ezt követően a szuszpenziót mágnes

mellé helyeztem, és a cső falához tapadó komplexszel (mágnesezhető gyöngy – biotinilált próba - linker ligált DNS fragment) dolgoztam tovább. A kialakult komplexet két alkalommal mosópuffer (Washing buffer1: 0,3 M NaCl, 0,03 M Na-citrát (pH 7.0), 0,1% SDS) oldattal mostam. Ezt követően újabb két alkalommal mostam a komplexet, ezúttal hígabb mosópufferrel (Washing buffer2: 0,15 M NaCl, 0.015 M nátrium-citrát (pH 7.0), 0,1% SDS). A mosások közben óvatos keveréssel homogén szuszpenziót hoztam létre, majd mágnessel különítettem el a komplexet. Az ismétlődést tartalmazó egyszálú fragmenteket ezt követően denaturálás (92 °C-on) közbeni desztillált vizes lemosással nyertem vissza.

Az egyszálú fragmenteket az adapterre tapadó primer segítségével kétszálúvá alakítottam. A PCR összetétele és a reakciókörülmények azonosak a linker ligálás eredményességét ellenőrző PCR-nél (lásd korábban) alkalmazottakkal. A dúsítás eredményességét 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A PCR alkalmazásával kétszálúvá alakított fragmenttömeget pGEM-T Easy (Promega) vektorba (16. ábra) ligáltam a gyártó cég javasolt protokollja szerint, majd XL1 BLUE (Agilent) kompetens *Escherichia coli* sejtekbe tanszformáltam a Sambrook és munkatársai (1989) - 15.14 fejezet- által kidolgozott protokoll szerint.



16. ábra. A pGEM-T Easy vektor képe és főbb jellemzői (Promega). Amp^r: ampicilin rezisztenciáért felelős gén; ori: nyitott leolvasási keret (replikációs origó); lacZ: β-galaktozidáz gén; M13F és M13R: szekvenáló primerek feltapadási helye.

Az itt leírt metódussal teljesen azonos módon végeztem a CA-ismétlődésekre dúsított lúd genomi könyvtárak létrehozását is.

3.8.3 A könyvtárak szűrése

- A könyvtárban található baktériumkolóniák nem mindegyike hordoz inszerttartalmú vektort. Ezek kiszűrésére kék-fehér szelekciót alkalmaztam, amelyet sok más vektorhoz hasonlóan, az általam használt pGEM-T Easy vektor is lehetővé tesz. A szelekcióhoz a sejteket szelektív LA táptalajra (400 ml LB táptalaj, 1% agar, 2g/l Ampicillin, 50g/l IPTG, 25g/l X-gal) szélesztettem. Az inszertet nem tartalmazó klónok kékre színeződtek (Sambrook et al., 1989. -16.37 fejezet-), míg az inszerttarlamú klónok olyan vektort hordoznak, amelyben a beépülés működésképtelenné teszi a lacZ gént, így a telep fehér marad.
- Az inszertet tartalmazó klónok közül további két PCR reakció (Kolónia és PIMA) segítségével szűrtem ki a túl kicsi inszertet tartalmazó és a CA-ismétlődő szekvenciát nem tartalmazó klónokat (Lunt et. al. 1999).

3.8.3.1 Kolónia PCR

A pGEM-T Easy plazmidról M13 forward, M13 reverse primerekkel induló kolónia PCR-rel a plazmidba épült inszert nagyságát ellenőriztem. A további vizsgálatokra azokat a telepeket választottam ki, amelyekről az 500-1200 bp tartományba eső fragment amplifikálódott.

Kolónia PCR reakcióelegy (25 µl végtérfogatban): templát-tesztelt kolónia bemosva, 500 nM primer (M13 forward és reverse), 1,5mM MgCl₂, 200-200 µM dNTP, 0,05 U/µl *Taq* DNS Polimeráz (Fermentas), 1x Taq puffer (Fermentas), steril MQ vízzel kiegészítve a végtérfogatra.

A kolónia PCR programja:

Az első részben 3 cikluson keresztül 95 °C-os 2 perces denaturálás után 45 °C-os 1 perces láncindítószekvencia (primer) feltapadás, végül 72 °C-os 75 másodperces lánchosszabbítás következett. Ezután jött a 41-szer ismétlődő második szakasz, ahol 95 °C-os 30 másodperces denaturálás után 45 °C-os 30 másodperces primer feltapadás jött, amit egy 72 °C-os 75 másodperces lánchosszabbítás követett. A reakciósort 72 °C-os 5 perces lánchosszabbítás zárta.

A kapott PCR termékek méretét 2%-os agaróz gélelektoforézissel (SeaKem LE Agarose - Cambrex) ellenőriztem.

3.8.3.2 PIMA módszer

Az 500-1200 bp hosszúságú inszertet tartalmazó kolóniák közül a CA-ismétlődést hordozók kiválogatására PIMA módszert használtam. Ennél az előző fejezetben szereplő M13

55

forward és M13 reverse primerek mellett még egy CA primert alkalmaztam, amelynek szekvenciája: (AC)₈DN. Ez a primer a fragmentben meglevő ismétlődésre tapad ki, így két fragmentet kaptam eredményül az ismétlődést tartalmazó klónokról. Az M13 F, R primerrel kapott terméknek (500-1200 bázis), valamint a CA primer, és valamelyik M13-as primer által sokszorozott kisebb terméknek (200-1000 bp) is meg kellett jelennie a reakcióban. A PIMA reakcióelegy összetétele a kolónia PCR elegynél leírt összetételű, kiegészítve 4% DMSO-val. A PCR program megegyezik a kolónia PCR programjával. A PCR termékek méretét szintén 2%-os agaróz gélelektoforézissel (SeaKem LE Agarose - Cambrex) ellenőriztem.

3.8.4 Szekvencia meghatározás

A két fragmentet adó klónok esetében meghatároztam az inszertek szekvenciáját. Ezt ABI310 Genetic Analyser gépen (Applied Biosystems), Big Dye Terminator 3.1 kit alkalmazásával végeztem, a gyártó ajánlásai szerint. Az így kiválogatott klónok esetén a mikroszatellit szekvencia melletti határoló régió mérete általában megfelelően hosszú a mikroszatellit analízisre alkalmas specifikus primerek tervezéséhez.

3.8.5 Primer tervezés

Az ABI PRISM 310 Genetic Analyserrel (Applied Biosystems) történő szekvencia meghatározás után, a megfelelő méretű mikroszatellitet tartalmazó fragmentekre Oligo Explorer programmal terveztem specifikus primereket. Erre csak akkor volt lehetőség, ha az ismétlődést határoló szekvenciarész elég hosszú volt, és ez lehetővé tette egy 18-25 bázis hosszúságú primer tervezését.

A primertervezés kiemelt szempontjai a következők voltak:

- az ismétlődések száma legyen több mint 6,

- a felsokszorozott fragment várható mérete 100-400 bp nagyságú legyen,

- a tervezett primer optimális működési hőmérséklete, az olvadás pontja 55-58 °C közé essen.

3.8.6 Új mikroszatellitek és kimutatásuk optimalizálása

Az új mikroszatellitek működését optimalizálni kell. Ennek első lépéseként Oligo Analyser program segítségével ellenőriztem a primerek optimális működési hőmérsékletét (Tm), és beállítottam a reakcióban használt MgCl₂ koncentrációt, majd a PCR hőmérsékleti profilját határoztam meg.

A PCR reakciókat Applied Biosystems 9700 típusú készülékkel végeztem el az alábbi kondíciók mellett:

56

1) PCR elegy összetétele: 1,5 mM MgCl₂ (Roche), 2 mM dNTP (Roche), 0,2 U Taqpolimeráz (Roche), 720 nM forward és reverz primer, 2000 ng BSA, 2 ng DNS.

2) PCR hőmérsékleti körülményei a következőek voltak: a 6 perces, amplifikációt megelőző denaturáció 94 °C-on. Ezt egy 10-szer ismétlődő, és ciklusonént csökkenő rész követte: 94 °C-on 30 másodperces denaturáció, majd 63-56 °C, illetve 60-53 °C 30 másodreces feltapadási (annealing) hőmérséklet, ami 30 másodperces, végül 45 másodpercig tartó lánchosszabbítás következett72 °C-on. Ezt a PCR 30 ciklusból álló második része követte, amelyben változatlan feltapadási hőmérsékleten sokszorosítottam a fragmenteket, azaz: 30 másodperces denaturáció 94 °C-on, majd 30 másodperces 56 °C vagy 53 °C-os primer feltapadási hőmérsékleten, és 72 °C-os 45 másodpercig tartó lánchosszabbítás követett. A reakciót 5 perces, 72 °C-on történő végső lánchosszabbítás zárta.

3.8.7 Polikrilamid gélelektroforézis

A mikroszatellit alléleket 6%-os denaturáló poliakrilamid gélen (50×38 cm, 0,4 mm vastagságú, a denaturáló ágens urea) "Sequi-Gen GT Sequencing Cell" (Biorad) PAGE (Poliakrilamid Gél Elektroforézis) készülék alkalmazásával választottam el, és ezüst-festéssel tettem láthatóvá (Varga et al. 1997), majd vizuálisan értékeltem az eredményt. Gélöntéshez a következő oldatokat használtam:

17,5 ml 40%-os akrilamid (38:2), 50,8g Urea, 55ml dH₂O, 12 ml 10xTBE, 726 μl APS (Serva), 110 μl 99%-os TEMED (Sigma).

Az elektroforézis után egy plexi keret segítségével végeztem az ezüst-festést, amelyet fotócsipesszel erősítettem az üveglapon lévő gélhez.

A gél festését több lépésben, többszöri mosással és különböző oldatok hozzáadásával végeztem. A mosó oldatok összetevői:

1.) 500 ml dH₂O,

2) 50ml metanol és 450ml dH₂O,

3.) 500 ml dH₂O és 7,7 ml 65% ccHNO₃

4.) 500 ml dH₂O

5.) 1 g AgNO₃ és 500ml dH₂O

6.) 500 ml dH₂O

Ezután következett a hívó oldat ($30g Na_2CO_3$, 300μ l 25 % formaldehid, 1000ml dH₂O), valamint 50ml 96%-os ecetsav és 450 ml dH₂O hozzáadása. Végül a festést rövid vizes mosással fejeztem be ($500 ml dH_2O$). A gélt óvatosan rajzlapra tettem, és celofánnal borítottam, végül szárítottam.

3.8.8 Az új mikroszatellitek elhelyezése a pulyka genetikai térképén

A markereket a Minnesotai Egyetem térképezési populációjának (University of Minnesota/Nicholas Turkey Breeding Farms, UMN/NTBF) P0 egyedein vizsgáltam (9. ábra). A szülői állományon (P0) polimorfnak talált, újonnan izolált mikroszatelliteket a minnesotai együttműködő partnerek genotipizálták a térképezési populáción, és a mikroszatelliteket a genetikai térképbe illesztették.

A polimorf alléleket amplifikáló új mikroszatellitek primer párjainak szekvenciaadatait feltöltöttem az NCBI adatbázisba.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Mikroszatellitek adaptálása

4.1.1 Pulyka

A vizsgálatokhoz előzetes irodalmi adatok alapján 56 mikroszatellit marker került kiválasztásra. A fragmentek amplifikálására touch-down PCR (61-53 °C, és 63-53 °C fokos hőmérsékleti tartományban) reakciókat alkalmaztam több MgCl₂ koncentráció mellett (2-; 2,5-; és 3 mM). 10 markert nem sikerült az alkalmazott kimutatási rendszerben adaptálni (ezek az alábbiak: ADL109, ADL114, ADL147, ADL166, ADL173, ADL240, ADL359, ADL367, LEI88, LEI99), azonban 46 esetében (82,1%) sikerült specifikus PCR terméket detektálni a vizsgált pulyka egyedeken, melyekből 20 mikroszatellit volt a vizsgálati tesztállományon polimorf (35,7%). A pulykagenomon működő mikroszatellitek optimalizálásának eredményét a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat. A pulyka vizsgálathoz kiválasztott fluoreszcens jelölésű tyúk mikroszatellitek. A táblázat fejlécében a mikroszatellitek elnevezését, majd a sokszorosításhoz használt primerhez kapcsolódó fluoreszcens jelölést, a megfelelő működéséhez szükséges primer koncentrációt, a MgCl₂ koncentrációt, a sokszorosításkor alkalmazott hőmérsékleti profilt, végül a teszt pulyka egyedek vizsgálata során eredményül kapott termékek méretit láthatjuk. Az alkalmazott PCR profil egy olyan 35 ciklusból álló "touch down" PCR-t jelöl, amely első 10 ciklusában a profilnak megfelelően lecsökken az anneling hőmérséklete.

Mikroszatellit azonosító	Fluoreszcens	Primer konc.	MgCl ₂	PCR profil	Pulyka eredmény
uzonosito	jeioles	(nM)	(mM)	(°C)	(b)p
MCW7	FAM	200	2	61-51	233
MCW18	FAM	200	2,5	63-53	200
MCW29	TET	200	2	61-51	149-167
MCW35	TET	200	3	63-53	216-218
MCW37	FAM	200	2	61-51	206-212
MCW68	HEX	200	3	63-53	158
MCW80	HEX	200	3	63-53	276-278
MCW83	HEX	200	2	63-53	75
MCW89	FAM	200	3	63-53	295
MCW102	TET	200	3	63-53	209
MCW115	HEX	250	2,5	61-51	244
MCW169	HEX	200	3	61-51	99
MCW178	TET	200	3	61-51	74

Mikroszatellit	Fluoreszcens	Primer konc.	MgCl ₂	PCR profil	Pulyka eredmény
azonosito	Jeloies	(nM)	(mM)	(°C)	(bp)
ADL106	TET	200	2,5	63-53	152-155
ADL118	FAM	200	2,5	63-53	121
ADL120	FAM	250	3	61-51	233
ADL134	FAM	250	3	61-51	121
ADL142	TET	200	3	63-53	99-111
ADL143	TET	200	2,5	63-53	141
ADL146	FAM	200	2	63-53	195-197
ADL149	TET	200	2,5	63-53	222-224
ADL150	HEX	200	2	61-51	138
ADL160	HEX	200	2,5	63-53	127
ADL180	HEX	200	2	61-51	146-159
ADL191	TET	200	3	61-51	138-140
ADL234	TET	200	3	63-53	131
ADL236	FAM	250	3	61-51	120
ADL254	FAM	200	2,5	63-53	90-104
ADL260	HEX	200	2,5	63-53	122
ADL266	HEX	200	2,5	63-53	96-104
ADL268	TET	200	2,5	63-53	92
ADL272	TET	200	2,5	63-53	160-166
ADL292	FAM	200	2,5	63-53	128-130
ADL293	TET	200	2,5	63-53	85-99
ADL300	FAM	200	2,5	63-53	145
ADL306	FAM	200	2	63-53	109-113
ADL310	HEX	200	2,5	63-53	123
ADL314	HEX	200	2,5	63-53	204
ADL353	FAM	200	3	63-53	142-150
ADL361	HEX	200	3	63-53	106-120
ADL366	TET	200	2,5	63-53	237
LEI43	TET	200	3	65-55	210-218
LEI91	TET	200	2	61-51	201
LEI120	FAM	200	3	61-51	272
LEI134	HEX	200	2	61-51	281
LEI161	HEX	200	3	61-51	72-75

2. táblázat folytatása. A pulyka vizsgálathoz kiválasztott fluoreszcens jelölésű tyúk mikroszatellitek.

4.1.2 Lúd

A lúd mikroszatellit adaptálás esetében 26 mikroszatellitet választottam ki irodalmi adatok alapján a rendelkezésére álló készletből. Ezek közül ugyancsak 10 marker esetén nem kaptam a fodros tollú lúdra jellemző mikroszatellit terméket az alkalmazott vizsgálati körülményekkel (ezek az alábbiak: ADL134, ADL234, ADL254, ADL260, ADL353, LEI91, LEI134, LEI136, MCW68, MCW0115).

A lúd teszt egyedek vizsgálatakor 16 esetében kaptam specifikus, azaz a fajra jellemző terméket (61%). Azonban csak 9 mikroszatellit bizonyult polimorfnak (34,6%). A fragmentek felsokszorozására ebben az esetben is a pulykán alkalmazott metodust és körülményeket használtam.

A lúd DNS-en használható tyúk mikroszatellitek működésének reakció körülményeit a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat. A lúd vizsgálatokhoz kiválasztott fluoreszcens jelölésű tyúk mikroszatellitek. A táblázat fejlécében a mikroszatellit elnevezését, majd a sokszorosításhoz használt primerhez kapcsolódó fluoreszcens jelölést, a megfelelő működéséhez szükséges primer koncentrációt, a MgCl₂ koncentrációt, a sokszorosításkor alkalmazott hőmérsékleti profilt, végül a lúd egyedek vizsgálata során eredményül kapott termékek méreteit láthatjuk.

Mikroszatellit	Fluoreszcens	Primer konc.	MgCl ₂ konc.	PCR profil	Lúd eredmény
azonosito	jeioies	(nM)	(mM)	(\mathbf{C})	(bp)
ADL106	TET	200	3	63-53	156
ADL142	TET	200	2,5	61-51	196-204
ADL149	TET	200	2,5	63-53	232
ADL150	HEX	250	3	61-51	126-144
ADL266	HEX	200	2,5	61-51	78
ADL272	TET	250	2,5	61-51	157-165
ADL292	FAM	200	2,5	61-51	87
ADL293	TET	200	2,5	61-51	99-108
ADL300	FAM	250	3	61-51	187
ADL306	FAM	250	3	61-51	106-120
ADL361	HEX	250	2,5	61-51	103-115
ADL366	TET	250	3	61-51	214-218
LEI120	FAM	200	3	61-51	270
MCW18	FAM	250	2,5	61-51	206-208
MCW80	HEX	250	3	61-51	206-238
MCW178	TET	200	3	61-51	58

4.2 Multiplex mikroszatellit PCR-ek és kimutatási csoportok nagy hatékonyságú populációanalízishez

4.2.1 Pulyka

A pulyka esetén az állományok egyedeinek vizsgálatához összesen 15 mikroszatellitből állítottam össze két kimutatási csoportot (4. és 5. táblázat). Az első csoportban 8, míg a másodikban 7 mikroszatellit együttes kimutatása vált lehetővé.

Az egyes kimutatási szettben 2db FAM, 3db TET és 3db HEX fluoreszcens festékkel jelölt mikroszatellit alléljainak kimutatását (4. táblázat), míg a második kimutatási szettben

2db FAM, 3db TET és 2db HEX fluoreszcens festékkel jelölt mikroszatellit alléljait követtem nyomon (5. táblázat) egyetlen kapilláris gélelektroforézissel. Mindkét szett esetén a mikroszatelliteket úgy válogattam össze, hogy az azonos festékkel jelölt markerek esetén a várható alléltartomány ne fedjen át.

A rendszer hatékonyságának növelése érdekében a mikroszatellit allélok amplifikációját megpróbáltam a lehető legkisebb számú multiplex PCR reakcióba rendezni. Ennek eredményeként a két kimutatási szett markerei három triplex, két duplex és két esetben egy markert tartalmazó reakcióban sokszorozhatók fel. A táblázatokban betűjelzéssel (A \rightarrow G) láttam el az azonos reakcióban sokszorosított mikroszatelliteket.

Az ezt követő populációvizsgálatok során, várakozásaimmal ellentétben, egy mikroszatellit - az MCW18 - esetén csak egy allélt találtam a vizsgált egyedekben, azaz a marker a populáción monomorf volt. Így ez a mikroszatellit marker, mint belső kontroll működött a kimutatás technikai ellenőrzéséhez.

Mikroszatellit elnevezés	Flureszcens jelölés	Termék mérettartomány (bp)	Multiplex PCR
ADL292	FAM	118-132	٨
MCW18	FAM	200	A
ADL293	TET	81-108	
ADL272	TET	160-168	В
ADL149	TET	222-228	
ADL266	HEX	81-104	
ADL150	HEX	121-138	С
MCW80	HEX	276-278	

4. táblázat. I. Mikroszatellit csoport. A táblázat tartalmazza a mikroszatellit primerek nevét, fluoreszcens jelölését és az alkalmazásukkal kapott termékek mérettartományát.

5. táblázat. II. Mikroszatellit csoport. A táblázat tartalmazza a mikroszatellit primerek nevét, fluoreszcens jelölését és az alkalmazásukkal kapott termékek mérettartományát.

Mikroszatellit elnevezés	Flureszcens jelölés	Termék mérettartomány (bp)	Multiplex PCR
MCW83	HEX	65-75	D
ADL146	FAM	193-197	D
ADL142	TET	99-111	
ADL361	HEX	106-120	Е
ADL353	FAM	142-156	
LEI43	TET	210-218	F
ADL191	TET	134-140	G

4.2.2 Lúd

A fodros tollú lúd populációvizsgálatához a 16 sikeresen adaptált tyúk mikroszatellitből azt az ötöt választottam ki, amelyeket egy kimutatási csoportba tudtam rendezni, azaz a kimutatási méretben átfedés nélkül eltértek egymástól a kapott termékek, és a fluoreszcens festékük sem zavarta egymást a kimutatásban. A kiválasztás során itt is az előzetes vizsgálatok eredménye alapján várható allélméreteket és a primereken lévő fluoreszcens jelöléseket vettem figyelembe. Így 5 mikroszatellitet sikerült ebbe a kimutatási csoportba választanom. A termékek amplifikálásához 3 PCR csoportot hoztam létre, melyek közül kettő duplex reakció, egyben pedig egy markert szaporítottam fel (a csoportokat természetesen ez esetben is a termékméret és a fluoreszcens jelölés figyelembe vételével alakítottam ki). Az alkalmazott mikroszatellitekkel kapott termék mérete és primer fluoreszcens jelölései a 6. táblázatban láthatók.

6. táblázat. Lúd vizsgálathoz kialakított mikroszatellit csoport. A táblázat tartalmazza a MS primerek nevét, fluoreszcens jelölését és az alkalmazásukkal kapott termékek bázisban megadott mérettartományát.

Mikroszatellit elnevezés	Flureszcens jelölés	Termék mérettartomány (bp)	Multiplex PCR
ADL0142	TET	196 - 204	٨
MCW0018	FAM	206 - 208	A
ADL0361	HEX	103 - 115	В
LEI0120	FAM	270	C
MCW0080	HEX	206 - 238	U

Ennél a kimutatási csoportnál is volt egy marker – a LEI0120 –, amely a populációvizsgálatok során csak egy alléllel rendelkezett a vizsgált nagyszámú egyedben, azaz a marker monomorfnak bizonyult. Ezáltal lehetőségem volt arra, hogy belső technikai markerként alkalmazzam a vizsgálatokban, a méretmeghatározás ellenőrzéséhez.

4.3 A génrezerv bronzpulyka populáció populációgenetikai vizsgálata

A két csoportba rendezett 15 mikroszatellittel megvizsgáltam a DE AGTC Állattenyésztési Tanszék kísérleti telepének teljes génrezerv bronzpulyka állományát, amely 163 egyedből ált, valamint a rendelkezésemre álló 6 vadpulyka egyedet.

A genotípuseredmények (melléklet, 7. táblázat) alapján populációgenetikai számításokat végeztem az állomány jellemzésére. Ennek során kiszámítottam az allélgyakoriságokat (8. táblázat).

Vizsgálataim során 1 mikroszatellit (mint azt az előző fejezetek egyikében leírtam) homozigótának bizonyult a vizsgált állományon, így mint belső kontrollt használtam a méret meghatározáskor.

Két mikroszatellit esetében 2 allélt azonosítottam. Az egyik az ADL150, ahol a főallél 168bp (98%), míg a másik allél 120 bp-nál (2%) jelent meg. A másik két alléllal rendelkező mikroszatellit az ADL361, aminél a főallél 120 bp (58%) volt, míg a másik allél 106 bp (42%). Itt közelített az arány az 1:1-hez.

10 mikroszatellit három alléllal rendelkezett, amelyek a következőképpen alakultak:

Az ADL272 esetében a főallél a 160 bp méretű, ami 77% gyakorisággal, míg a 168 bp-os 22% gyakorisággal volt jelen az állományban. Mindössze egy egyed esetében tudtam kimutatni a 164 bázis méretű allélt.

Az ADL149 mikroszatellit 224 bp-os (80%) allélja a főallél, a mellékallél a 222 bázispár (20%) méretű. Itt is található olyan mikroszatellit allél (228 bp), ami csak egyszer fordult elő az állományban.

Az ADL266 esetében is hasonló arányokat tapasztaltam, a főallél 96 bp (71%), míg a másik allél hossza 104 bp (27%). Ez esetben is találtam ritka allélt 84 bázispáros méretben, amiből kettőt tudtam azonosítani a felmért állományban.

Az MCW80 esetében jelentősen eltolódott az arány a főallél irányába, ami a 276 bp-os (95%), míg a másik két allél a 280 (4%) és a 278 bp méretű. Ez utóbbit ismételten csak 1 állat esetében sikerült kimutatnom.

Az ADL353 esetében a főallél a 142 bp-os (77%), míg a második leggyakoribb a 148 bp-os (20%) allél. A harmadik allélt öt esetben sikerült kimutatnom, ennek mérete 150 bp volt.

Az ADL146 mikroszatellit is három alléllal rendelkezett. Azonban ennél is jelentősen eltolódott az arány a főallél irányába, amelynek mérete 195 bp (97%), emellett a másik két allél (193 és 197 bp) mindössze 3 - szor, illetve 4 - szer fordult elő.

A LEI43 főallélja 97 bp (56%), a mellette megtalált allélok 103 (26%) és 107 bp méretűek (18%) voltak.

Az ADL191 főallélja a 138 bp-os allél (62%), ami mellett megtalálható volt egy 140 bp (34%) és egy 134 bp (4%) méretű allél is.

Az ADL142 mikroszatellit főalléljának a méret 218 bp volt (60%), ami mellett egy viszonylag gyakoribb 210 bp-os (39%) allél volt jelen és ennél a mikroszatellitnél is volt olyan allél (216 bp), amit csak egyszer találtam meg az állományban.

Az MCW83 esetében a főallél 75 bp (72%), ami mellett a 67 (21%) és a 65 bp-os (6%) allélok fordultak elő az állományban.

Mindössze két mikroszatellit esetében találtam 4 allélt, ezek az ADL292 és az ADL293 voltak.

Az ADL292 mikroszatellitnél a 118, 128, 130, 132 bázospár hosszú allélokat azonosítottam. Ezek közül a 128 bp méretű a főallél, amely a detektált allélok 96%-át adta, míg a 132-es a mellékallél alig több mint 3%-ban volt jelen. A 118 és a 130 bp hosszú allél csak 1-1 állat esetében fordult elő.

Az ADL293 mikroszatellitnél 81, 87, 99, 108 bp-os allélok voltak. A főallél a 99 bp, míg a mellék allél a 87 bp méretű volt. Az előbbi 98%-ban, az utóbbi mindössze 1%-ban fordult elő. A 81 bp és 108 bp allél esetében szintén csak az állomány 1-1 egyede hordozta az allélt.

A vadpulyka egyedek eredményének elemzéséhez is elkészítettem ezeket az összegzéseket (8. táblázat).

Ott négy mikroszatellit esetében csak homozigóta egyedeket sikerült kimutatnom, aminek oka lehet az alacsony egyedszám (6db). Esetleg a két fajta közti különbségre is utalhat. Itt kell kiemelni, hogy a LEI43 mikroszatellit 111 bázis méretű allélját, amely csak vadpulyka egyedekben fordult elő.

8. táblázat. A mikroszatellit allélok gyakorisága a bronzpulyka és vadpulyka

állományokban. A táblázat tartalmazza a mikroszatellitek elnevezését, a detektált allélok méretét, és azok százalékos gyakoriságát populációnként.

Mikroszatellit	Populáció			
allél (bp)	Bronz	Vad		
ADL292				
118	0,32			
128	96,18	100,00		
130	0,32			
132	3,18			
MCW18				
200	100,00	100,00		
ADL293				
81	0,35			
87	1,04	20,00		
99	98,26	80,00		
108	0,35			
ADL272				
160	77,60	70,00		
164	0,32			
168	22,08	30,00		
ADL149				
222	19,35	40,00		
224	80,32	60,00		
228	0,32			
ADL266				
84	0,67			
96	71,81	50,00		
104	27,52	50,00		
ADL150				
120	2,32	40,00		
138	97,68	60,00		
MCW80				
276	95,53	80,00		
278	0,41	20,00		
280	4,07			

Mikroszatellit	Populáció		
allél (bp)	Bronz	Vad	
ADL353			
142	77,63	60,00	
148	20,72	40,00	
150	1,64		
ADL146			
193	1,12		
195	97,39	100,00	
197	1,49		
LEI43			
99	55,92	58,33	
103	25,99		
107	18,09	8,33	
111		33,33	
ADL191			
134	3,99		
138	61,59		
140	34,42	100,00	
ADL142			
210	39,29	50,00	
216	0,32	20,00	
218	60,39	30,00	
MCW83			
65	5,88		
67	21,24	30,00	
75	72,88	70,00	
ADL361			
106	41,72	50,00	
120	58,28	50,00	

A genotípus eredmények alapján további populációgenetikai számításokat végeztem az állományok jellemzésére (9. és 10. táblázat). Kiszámítottam a markerenkénti várt- (H_e) és a tényleges heterozigozitási (H_o) értékeket, amelyek a bronzpulykák esetén igen tág határok között változtak. A legkisebb várt heterozigozitással (0,034) a négy allélos ADL293-as marker rendelkezett, míg a legkisebb tényleges heterozigozitást (0,037) a három allélos ADL149-es mikroszatellit mutatta. A legnagyobb H_e értéket (0,589) a LEI43-as marker, míg a legnagyobb tényleges heterozigozitást (0,834) a mindössze két allélos ADL361-es marker mutatta.

A vad pulyka csoport sokkal egyenletesebb várt heterozigozitási értékeket mutatott (0,3556 és 0,6889 között változott), bár 4 marker is monomorf volt ezeken az egyedeken. A H_o értéke ezzel szemben (0,2 és 1) a bronz pulykáéhoz hasonló széles tartományban mozgott.

A kiszámított P érték a Hardy-Weinberg egyensúly értékei között tapasztalható eltérés szignifikancia szintjeit mutatja. A szokásos hibahatárnak megfelelően, ha a P érték 5 %-nál kisebb, vagy egyenlő vele (P <=0,05), akkor a nullhipotézist (H₀) elvetjük, ha nem, akkor pedig elfogadjuk. Ha elvetjük, akkor mondhatjuk, hogy a mikroszatellitek esetében a kapott és

a várt heterozigozitási érték eltér a Hardy-Weinberg egyensúlyban meghatározottól. A bronz pulyka populációban négy mikroszatellit marker esetében fogadjuk el a nullhipotézist, ezek az ADL146, ADL191, ADL361 és az MCW83. A vadpulykák esetén azonban egyetlen marker esetén sem mutatkozott szignifikánsnak az eltérés.

9. táblázat. A bronzpulyka populáció heterozigozitás értékei és az allélek száma mikroszatellitenként. A táblázat tartalmazza a mikroszatellit markerekkel talált allélek számát, és az ezekből számított, H_e : várt és H_o : tényleges heterozigizitási értékeket, P: H_e és H_o eltérésének szignifikancia szintjét (monomorf markerek esetén nem számítható) és a PIC: a markerenkénti polimorf információs tartalmat. A szürke színnel kiemelt markerek esetén szignifikáns eltérés van a Hardy-Weinberg egyensúlyban.

Mikroszatellit azonosító	Allél (db)	Не	Но	Р	PIC
ADL149	3	0,318	0,329	0,8395	0,2690
ADL150	2	0,045	0,046	1,0000	0,4430
ADL266	3	0,41	0,389	0,7604	0,3304
ADL272	3	0,35	0,344	0,8750	0,2904
ADL292	4	0,074	0,076	1,0000	0,0721
ADL293	4	0,034	0,056	1,0000	0,0340
MCW18	1	0	0	-	-
MCW80	3	0,086	0,089	1,0000	0,0827
ADL142	3	0,483	0,519	0,483	0,3683
ADL146	3	0,051	0,037	0,0123	0,0505
ADL191	3	0,502	0,464	0,0003	0,4091
ADL353	3	0,355	0,336	0,7846	0,3020
ADL361	2	0,488	0,834	0,0000	0,3681
LEI43	4	0,589	0,638	0,0892	0,5199
MCW83	3	0,422	0,542	0,0000	0,3684

Kiszámítottam a heterozigozitást jellemző PIC értékek, azaz a polimorfizmusok információ tartalmát is. Ami a bronzpulykáknál 0,03 és 0,51 között, míg vadpulykák esetén egy kisebb tartományban 0,26 é 0,54 között változott markerenként.

A számított a bronzpulyka populáció összesített várt heterozigozitási értéke 0,28-nak adódott, míg az összesített tényleges heterozigozitási értéke 0,312 volt. A vadpulyka egyedek összesített, várt heterozigozitása 0,376, míg a tényleges heterozigozitásé 0,471 volt.

10. táblázat. A vadpulyka egyedek heterozigozitás értékei és az allélek száma mikroszatellitenként. A táblázat tartalmazza a mikroszatellit markerekkel talált allélek számát, az ezekből számított, H_e : várt és H_o : kapott heterozigozitási értékeket, P: H_e és H_o eltérésének szignifikancia szintjét (monomorf markerek esetén nem számítható) és a PIC: a markerenkénti polimorf információs tartalmat.

Mikroszatellit azonosító	Allél (db)	H _e	Ho	Р	PIC
ADL292	1	0	0	-	-
MCW18	1	0	0	-	-
ADL293	2	0,3556	0,4	1,000	0,2688
ADL272	2	0,4667	0,2	0,3333	0,3318
ADL149	2	0,5333	0,4	1,0000	0,3648
ADL266	2	0,5556	1	0,127	0,375
ADL150	2	0,5333	0,8	0,4286	0,3648
MCW80	2	0,3556	0,4	1,0000	0,2688
ADL353	2	0,5333	0,8	0,4286	0,3648
ADL146	1	0	0	-	-
LEI43	3	0,5909	0,667	0,6362	0,4598
ADL191	1	0	0	-	-
ADL142	3	0,6889	0,8	1,0000	0,5478
MCW83	2	0,4667	0,6	1,0000	0,3318
ADL361	2	0,5556	1	0,1270	0,375

A bronzpulyka esetében egy és négy között változik az azonosított allélok száma (9. táblázat). Az alacsony allél szám jelezheti a beltenyésztettség megnövekedett mértékét is. Ami a kevésbé kívánatos, előnyös allélok felszaporodását vonhatja magával az egyre magasabb fokú beltenyésztés, azaz rokon egyedek szaporodása révén. Ez elkerülhető lehet, ha a molekuláris felmérés eredményeinek felhasználásával alakítunk ki keresztezési csoportokat.

A vadpulykák esetében kevesebb allélt sikerült azonosítanom, aminek a legvalószínűbb oka a vizsgált populáció kis mérete lehet. Itt nem találtam egy mikroszatellitnél sem 4 allélt, míg a két alléllal rendelkező mikroszatellitből itt is 9 volt. Mindössze 2 mikroszatellit esetében találtam 3 allélt.

A várt és kapott heterozigozitási adatok felhasználásával kiszámítható a fixációs index (11. táblázat). Ez a populáción belül az egyedek közötti különbséget jellemzi, (Wright 1965). Elnevezésével ellentétben az ily módon számított F_{IS} érték a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés mértékét adja meg populáción belül. Pozitív értékek a heterozigóták hiányát

mutatják, a negatívak heterozigóta-többletet jeleznek. Teljes fixációt feltételezve, vagyis ha kizárólag homozigóták fordulnak elő, a populációban F_{IS} értéke 1 lenne.

Mikroszatellit azonosító	Bronzpulyka	Vadpulyka
ADL292	-0,035	-
MCW18	-0,023	-
ADL293	0,052	-0,125
ADL272	0,018	0,572
ADL149	-0,028	0,25
ADL266	-0,648	-0,8
ADL150	-	-0,501
MCW80	-0,035	-0,125
ADL353	-0,075	-0,501
ADL146	0,275	-
LEI43	0,076	-0,129
ADL191	0,054	-
ADL142	-0,71	-0,162
MCW83	-0,084	-0,286
ADL361	-0,285	-0,8

11. táblázat. A bronzpulyka és vadpulyka egyedek fixációs indexe

mikroszatellitenként. A táblázat tartalmazza az F_{IS} értékeket a bonz- és a vadpulyka állományon.

A populáció genetikai struktúrájának könnyebb, áttekinthetőbb értékelése céljából a rendelkezésemre álló bronz- és vadpulyka genotípus adatokból készítettem egy dendogramot is. Ennek eredménye a 17. ábra látható, ami a populáció egyedei közötti genetikai "hasonlóságot" jellemzi. Az ábrán a vadpulyka egyedeket pirossal jelöltem. Jól látható, hogy ezek nem különülnek el, hanem beleolvadnak a bronzpulyka állományba.

Ennek oka lehet, hogy a bronzpulyka még nem távolodott el olyan mértékben a vadpulykától, hogy több különböző allélt lehessen kimutatni e változatok között. Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a fenntartás során valamelyik állomány keveredett a másik állomány egyeivel.



17. ábra.

4.4 A génrezerv fodros tollú lúdpopuláció genetikai vizsgálata

A DE AGTC Állattenyésztési Tanszék kísérleti telepének fodros tollú lúd állományát az öt mikroszatellitből kialakított markercsoporttal vizsgáltam meg. A 132 egyed genotípus eredményei (melléklet 12. táblázata) alapján kiszámított várt (H_e) és tényleges heterozigozitást (H_a), valamint a PIC értékeket a 13. táblázatban foglaltam össze.

A populáció összesített várt heterozigozitási értéke H_e =0,289-nek adódott, míg az összesített tényleges heterozigozitási értéke H_o =0,317 volt.

13. táblázat. A fodros tollú lúd populáció heterozigozitási értékei és az allélek száma mikroszatellitenként. A táblázat tartalmazza a mikroszatellit markerekkel talált allélek számát, az ezekből számított, H_e : várt és H_o : kapott heterozigozitási értékeket, P: H_e és H_o eltérésének szignifikancia szintjeit (monomorf markerek esetén nem számítható), a PIC értéket: a markerenkénti polimorf információs tartalmat.

Mikroszatellit azonosító	Allél (db)	H _e	Ho	Р	PIC
ADL142	3	0,315	0,306	0,4817	0,291
ADL361	2	0,138	0,017	0,0001>	0,128
LEI120	1	0	0	-	0
MCW18	3	0,495	0,377	0,0115	0,379
MCW80	2	0,497	0,884	0,0001>	0,372

A populáció genetikai struktúrájának könnyebb, áttekinthetőbb értékelése céljából itt is készítettem dendogramot a genotípus adatok alapján. Ennek eredménye a 18. ábra denadogramján látható.

A dendogramon az egyedek kisebb- nagyobb csoportokban jelennek meg. Ezeken belül az egyedek között igen kicsi a genetikai eltérés, ami származhat az alkalmazott markerek kis számából. Nagy valószínűséggel az egyedek nagyobb mértékű elkülönítésére nyílna lehetőség, ha további mikroszatelliteket vonnánk be a vizsgálatokba. További lehetséges magyarázat, hogy az állomány kialakításakor kevés számú alapító egyedet használtak és a több generációs fenntartás során nem valósult meg a pánmixis.



18. ábra. Az őshonos debreceni fodros tollú lúd állomány dendogramja. A fodros tollú lúd egyedek 5 mikroszatellittel készített vizsgálatakor kapott eredmények ábrázolása dendogramként.

4.5 Új mikroszatellitek izolálása

4.5.1 Mikroszatellit izolálás optimalizálása

Sikeresen hoztam létre mikroszatellit izoláláshoz pulyka és lúd CA-ismétlődéssel dúsított parciális genomi könyvtárakat. A pulyka esetén HaeIII és RsaI restrikciós enzimekkel emésztett genomiális DNS-ből készült több könyvtár. A lúd esetében mindössze egy könyvtár készült, amelynek létrehozásához RsaI enzimet használtam.

A könyvtárat egy, az ismétlődő szekvenciára specifikus primeren alapuló PCR módszerrel szűrtem. Az inszert méretének megállapításához kezdetben minden klónt két
PCR-reakcióval teszteltem. Az egyik reakcióban egy, a transzformáló vektorra specifikus primer párral szaporítottam fel a klónozott fragmenteket, míg a másik reakcióban egy harmadik, az ismétlődésre specifikus primert is használtam. Ez alkalmas volt a klónok ismétlődő szekvenciatartalmának kimutatására, és a határoló szekvenciák méretének becslésére. Mivel a tesztek első felében kiderült, hogy az esetek 95%-ban tartalmaztak ismétlődést a klónok, így a második PCR-es szűrést elhagytam.

A pulyka könyvtárakból összesen 167 db, míg a lúd könyvtárból 32 db CAismétlődést tartalmazó klónt szűrtem ki.

4.5.1.1 Pulyka klónok szekvencia elemzése és mikroszatellitek fejlesztése

A pulyka könyvtárból kiszűrt 167 CA-ismétlődést tartalmazó klón szekvenciáját meghatároztam. Ezek közül 136 (81%) tartalmazott valóban mikroszatellit típusú ismétlődést, azonban csak 109 (65%) szekvencia volt primer tervezésre alkalmas. Az ismétlődést tartalmazó szekvenciákat egymással összevetve 68 (40%) egyedi, egymással nem azonos szekvenciát találtam. Az eredményeket génbanki adatokkal összehasonlítva megállapítottam, hogy a 68-ból 7 mutat egyezést korábban már leírt pulyka mikroszatellit szekvenciákkal.

A maradék 61 db újonnan izolált mikroszatellit szekvencia kimutatásához terveztem primereket. Jellemzésükre a rendelkezésünkre álló DNS mintákból válogatott "nagy polimorfizmust" mutató egyedeket használtam. A függelékben található 14. táblázat foglalja össze az újonnan izolált mikroszatellitek fő jellemzőit (elnevezésüket, a kimutatáshoz használt primerek szekvenciáit és hosszát, az ismétlődő motívum típusát, az adatbázisba bevitt szekvencia azonosító kódját és az amplifikációs termék hosszát).

4.5.1.2 Lúd klónok szekvencia elemzése és mikroszatellitek fejlesztése

Az ismétlődésekre dúsított lúd genomi könyvtárból 32 klónt választottam ki a szűrővizsgálatok eredményeként. Ezek szekvenciáját meghatároztam. A vizsgált klónok mindegyike tartalmazott ismétlődő szekvenciát.

A szekvenciák összehasonlító elemzése után 11 (34%) egyedi szekvenciát azonosítottam. Ezeket a szekvenciaadatokat összevetettem az NCBI adatbázisban fellelhető szekvenciaadatokkal, hogy kiderítsem, az adott mikroszatellit szekvencia mutat-e hasonlóságot, illetve azonosságot valamely más fajból származó szekvenciával. Az egyik szekvencia esetében nagymértékű hasonlóságot találtam egy, a kínai hattyúlúdból (*Anser cygnoides*), egy, a tőkés récéből (*Anas platyrynchos*) és egy, a pompás fényseregélyből (*Lamprotornis superbus*) izolált mikroszatellit szekvenciával. Ezek a szekvenciák egymással is nagyfokú hasonlóságot mutatnak, egymás ortológjai. Mivel azonban a szekvenciát eddig az

általam vizsgált fajból még nem írta le senki, ez is újnak tekinthető a lúd vonatkozásában.

Ezek közül kettő ún. szatellitszerű szekvencia volt, így ezek a további vizsgálatokra nem voltak alkalmasak, mert csaknem teljes hosszukban ismétlődést hordoztak.

A fennmaradó 9 szekvenciából 4 esetén vagy a határoló szekvenciák valamelyike nem volt megfelelő minőségű, vagy a hosszúság nem volt elegendő a kimutatáskor alkalmazott primerek tervezéséhez. Így a kilenc ún. valódi mikroszatellit szekvenciából mindössze 5 bizonyult primer tervezésre alkalmasnak. Az új lúd mikroszatellitek legfőbb adatait a 15. táblázat foglalja össze.

15. táblázat. Az új lúd mikroszatellitek alapadatai. A táblázatban a markerek neve után a kimutatásukhoz használt primerek szekvenciája, hossza, a feltapadási hőmérséklet és az alkalmazásukkal kapott termék hossza látható.

Mikroszatellit	Primer szekvencia	Primer hossz	Feltapadási hőmérséklet	Termékhossz	
elnevezes		(bp)	(°C)	(bp)	
ANS_1	GTCTTTTCTGCTCCACCACA	20	55,6	114	
	CATTCTTCCTGGCTCTGCTA	20	55,5		
ANS_2	AGCAGAGCGGCTAAGTATG	19	53,3	124	
	ATTGCCTTTCAGTGGAGTTAC	21	53,8		
ANS_3	ACACAAACAGCCTTCAGTCC	20	54,6	04	
	CCAAATCCCATGAACCTGA	19	55,9	94	
ANS_4	CGTCCCCACGTCATCCT	17	56,1	04	
	CCGCCCTCCTTACCTCTG	18	57,7	94	
ANS_5	CCTTCACCGCTGCTATCAA	19	56,9	192	
	ATGAGATCCAGGACCACAGG	20	56,6	182	

4.6 Az új pulyka mikroszatellitek térképpozíciójának megállapítása

Az új mikroszatellitek térképpozíciójának megállapítására nemzetközi együttműködés keretében nyílt lehetőség. A minnesotai UMN/NTBF térképezési populáció P0 egyedein vizsgáltam, hogy az új mikroszatellitek közül melyek mutatnak polimorfizmust. Ezáltal kaptam választ arra, hogy egy adott, újonnan izolált marker pozíciója meghatározható-e a pulyka genetikai térképén. A vizsgált 61 mikroszatellitből 18 bizonyult polimorfnak. Ezeknek a szekvenciája elhelyezésre került a génbankban (14. táblázat). Az alkalmas mikroszatellit markerek primerszekvencia adatait az együttműködő rendelkezésére bocsátottam. Az F2 generáció vizsgálatával az együttműködő 11 mikroszatellitet sikeresen térképezett mind az általuk készített pulyka, mind a tyúk összehasonlító genetikai térképére. (A markerek térkép pozícióját mutatja a 16. táblázat és a függelékben található 19/a. ábra).

16. táblázat. Az új izolálású mikroszatellitek a pulykából. A táblázatban a markerek neve után a génbanki azonosító, a markerek alkalmazásával kapott allélok száma a vizsgált állományon, a legközelebbi kapcsolt lókusz, a mikroszatellit LOD értéke, a pulyka kapcsoltsági csoport (ahová térképezték) látható. Az utolsó oszlopban találjuk a tyúk genomon végzett összehasonlító vizsgálatok eredményeit.

Marker neve	GenBank azonosító szám	Allélok száma az UMN/NTBF térképezési populációban	Legközelebbi kapcsolt lókusz	LOD érték	Pulyka kapcsoltsági csoport	Tyúk homológ
MGP010	DQ526388	2	MNT LEI070	11.74	M3	2q
MGP012	DQ497633	2	MNT 149	3.54	M11	4p
MGP018	DQ497634	3	RHT 031	27.60	M2	3
MGP022	DQ526381	4	RHT 078	40.08	M8	6
MGP031	DQ526391	2	LEI 043	4.21	M2	3
MGP035	DQ526382	2	MNT 388	14.82	M2	3
MGP040	DQ526383	2	RHT 138	33.71	M1	1
MGP043	DQ526392	2	RHT 044	22.21	M19	13
MGP046	DQ526385	2	MNT 174	12.34	M1	1
MGP047	DQ526393	2	ADL 184	13.87	UN	18
MGP049	DQ526386	2	MNT 217	20.70	M2	3

A táblázatban látható a LOD érték megmutatja, hogy mekkora annak a valószínűsége, hogy a vizsgált helyen található a mikroszatellit. Ez egy logaritmikus számítási móddal megadott érték. Ha LOD = 2, a logaritmikus skála miatt $10^2 = 100$, ami azt jelenti, hogy 100-szor nagyobb annak a valószínűsége, hogy a mikroszatellit az adott pozícióban található, mint annak a valószínűsége, hogy nem ott található.

4.7 Az új pulyka mikroszatellitek térképpozíciójának megállapítása szekvenciaadatok felhasználásával

Az eltelt években elkészült a pulyka szekvencia alapú géntérképe, vagyis genom szekvenálása. Az Ensemble genom szekvencia adatbázis használatával összehasonlítottam az izolált mikroszatellitek szekvenciáit a génbanki adatokkal (17. táblázat), hogy ilyen módon is meghatározzam az azonosított markerek térkép pozícióját.

A szürkével jelölt mikroszatelliteket térképezték a kromoszómára a minnesotai UMN/NTBF térképezési populáció egyedein.

17. táblázat. A szekvencia-adatbázisban megtalálható új izolálású

mikroszatellitek a pulykából. A táblázatban a markerek neve után a pulykakromoszóma száma következik. Ezt a szekvencia jellemzői követik: a kromoszóma szekvencia kezdő- és végpontja, a szekvencia bázisban megadott hossza. Az "adatbázisban nem található" felirat azokban a sorokban látható, amely szekvenciák a meglévő adatbázisban nem találhatók meg. A "nincs kromoszóma" felirat ott olvasható, ahol az adott szekvencia az adatbázisban megtalálható, csak még nincs kromoszómához rendelve.

Milznogzatallit	Kromoszóma elnevezése	Szekvencia			
elnevezése		Kezdőpont	Végpont	Hossz (bp)	
MGP001	Chr 10	3349029	3349117	89	
MGP002	Chr 7	17237169	17237366	199	
MGP003	Chr 1	52508806	52508947	143	
MGP004	Chr 17	4347490	4347606	117	
MGP005	Chr 10	24967888	24968008	121	
MGP006	Chr 25	2332069	2332187	119	
MGP007	az	adatbázisban 1	nem található		
MGP008	az	adatbázisban 1	nem található		
MGP009	Chr 25	2331800	2331920	117	
MGP010	Chr 3	86646700	86646801	104	
MGP011	Chr 9	2042311	2042548	138	
MGP012	Chr 13	14190314	14190510	85	
MGP013	Chr 15	16496025	16496143	119	
MGP014	Chr 9	575493	575614	122	
MGP015	Chr 4	12160710	12160823	114	
MGP016	Chr 2	83525477	83525639	163	
MGP017	Chr 22	2982628	2982747	120	
MGP018	Chr 2	225402433	22540362	117	
MGP019	Chr 1	104275248	104275427	180	
MGP020	ninc	ics kromoszóma			
MGP021	Chr 9	575443	575576	125	
MGP022	Chr 8	28671609	28671738	130	
MGP023	Chr 5	33415555	33415698	144	
MGP024	Chr 5	18624031	18624200	170	
MGP025	Chr 2	22540225	22540299	75	
MGP026	Chr 5	26898836	26898944	109	
MGP027	Chr 1	202735753	202735846	94	
MGP028	Chr 6	50965180	50965249	70	
MGP029	Chr 3	38213482	38213536	55	
MGP030	az adatbázisban nem található				

17. táblázat folytatása. A szekvencia-adatbázisban megtalálható új izolálású mikroszatellitek a pulykából. A táblázatban a markerek neve után a pulykakromoszóma száma következik. Ezt a szekvencia jellemzői követik: a kromoszóma szekvencia kezdő- és végpontja, a szekvencia bázisban megadott hossza. Az "adatbázisban nem található" felirat azokban a sorokban látható, amely szekvenciák a meglévő adatbázisban nem találhatók meg. A "nincs kromoszóma" felirat ott olvasható, ahol az adott szekvencia az adatbázisban megtalálható, csak még nincs kromoszómához rendelve.

Mikroszatellit	Kromoszóma	Szekvencia		
elnevezése	elnevezése	Kezdőpont	Végpont	Hossz (bp)
MGP031	Chr 15	7916075	7916197	124
MGP032	Chr 5	28529797	28529926	130
MGP033	Chr 9	4815544	4815651	108
MGP034	Chr 1	79028387	79028455	70
MGP035	Chr 2	6739460	6739535	76
MGP036	Chr 1	161155976	161156155	180
MGP037	Chr 6	39877658	39877781	124
MGP038	Chr 6	32252658	32252789	132
MGP039	Chr 5	28360945	28360995	51
MGP040	Chr 1	34946623	34946742	120
MGP041	Chr 3	14788867	14788950	84
MGP042	Chr 6	24963840	24963996	157
MGP043	Chr 15	14905690	14905806	117
MGP044	Chr 25	3043446	3043523	78
MGP045	Chr 1	134215778	134215870	93
MGP046	Chr 1	77107459	77107562	104
MGP047	Chr 20	5131144	5131301	158
MGP048	Chr 1	54545993	54546086	95
MGP049	Chr 2	78849087	78849131	45
MGP050	Chr 12	276425	276610	186
MGP051	nincs krou	moszómára illesztve 94		
MGP052	Chr 2	39047190	39047363	174
MGP053	Chr 1	59101030	59101180	151
MGP054	Chr 13	11513767	11513928	164
MGP055	Chr 7	12822518	12822660	143
MGP056	Chr 8	10516498	10516627	130
MGP057	Chr 5	1492010	1492134	125
MGP058	Chr 3	43167360	43167445	88
MGP059	az	az adatbázisban nem található		
MGP060	Chr 22	5609364	5609580	218
MGP061	Chr 26	4294896	4295023	128

DOI: 10.14751/SZIE.2014.046

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 Mikroszatellit adaptálás és jelentősége

A mikroszatellitek adaptálása egy fontos eszköz olyan fajok vizsgálatához, amelyek nem rendelkeznek elegendő genetikai markerrel (Andres és Kapkowska 2011, Quing-Ping et al. 2009). Munkám kezdetekor ez igaz volt a pulyka (*Meleagris gallopavo*) és a lúd (*Anser anser*) esetén is. A baromfifajok közül a legfejlettebb genetikai térképpel, és legtöbb genetikai markerrel a tyúk (*Gallus gallus*) rendelkezik (Groenen et al. 2000, Hillier et al. 2004, Takashi et al. 2004, Cogburn et al. 2007), így adott volt a lehetőség, hogy a baromfifajok vizsgálatához tyúk mikroszatelliteket próbáljak alkalmazni. A legtöbb esetben ezek közvetlenül nem, vagy csak kevés esetben voltak felhasználhatók más madárfajnál (Baratti et al. 2001, Kayang et al. 2000). Ezért szükséges a markerek kimutatási körülményeinek optimalizálása, azonban az adaptálható markerek száma és alkalmazhatósága sok esetben nem kielégítő (Yue et al. 2010).

Vizsgálataim során két faj, a pulyka és a lúd vizsgálatához adaptáltam sikeresen tyúk mikroszatelliteket. A pulyka esetén a vizsgált markerek több mint 80%-a adott specifikus fragmentet (2. táblázat), lúdnál (3.táblázat) ez alig volt több, mint 60%. Ez a tendencia megfelel az irodalmi adatoknak, miszerint a rendszertani távolság növekedésével csökken az adaptálható mikroszatellitek aránya (Andres és Kapkowska 2011, Quing-Ping et al. 2009). Az azonban érdekes, hogy mindkét populációban az eredetileg vizsgált markereknek megközelítőleg 35%-a volt polimorf, azaz populációgenetikai vizsgálatokra alkalmas (2. és 3. táblázat).

További érdekesség, hogy a mindhárom fajban működő mikroszatellitek allél mérettartománya nagyon hasonló (18. táblázat), jelentősebb genetikai távolság esetén sincs fajspecifikus eltérés.

18. táblázat. A tyúk, a bronzpulyka és a fodros tollú lúd egyedek mikroszatellitenként nyert termékeinek bázishossz összehasonlítása. A táblázat tartalmazza a mikroszatellit markerek nevét, és a használatukkal kapott alléleredményeket. A "-" jelzés esetében az adott mikroszatellitnek nincs vizsgálati eredménye. A *jelzéssel ellátott termékméretek esetében a kutatócsoportunk egy korábbi állományvizsgálati adataiból származó eredmények láthatóak (Szabó 2004).

Mikroszatellit	Alléltaromány	Alléltaromány	Alléltaromány	
		ритукаран		
ADL0106	156	152-155	151, 155	
ADL0134	-	121	105-122	
ADL0142	201-203	209-217	227-231	
ADL0149	232	222-224	219, 227 *	
ADL0150	126-144	138	159, 163 *	
ADL0234	-	131	157-162	
ADL0254	-	90-104	161, 165 *	
ADL0260	-	122	109-141	
ADL0266	78	95-103	114, 122 *	
ADL0272	-	159-166	168, 170 *	
ADL0292	-	128-130	126, 128 *	
ADL0293	-	85-99	105-113	
ADL0300	-	145	146-158	
ADL0306	106-120	109-113	111-132	
ADL0353	-	143-151	158 *	
ADL0361	116	100-120	126 *	
ADL0366	214-218	237	227 *	
LEI0091	-	201-201	253-257	
LEI0120	269	272	280-307	
LEI0134	-	281	288-315	
MCW0018	206-208	200	225-233	
MCW0068	-	158	169-191	
MCW0080	237	276-293	268-278	
MCW0115	-	244	241-247	
MCW0178	58	74	72-88	

5.2 Populációgenetikai analízis hatékonyságának növelése

Az adaptált mikroszatellitekből sikeresen alakítottam ki összesen három vizsgálati csoportot. A pulyka populációk vizsgálatára alkalmas két csoportban összesen 15 mikroszatellit található, amelyeket 5 multiplex és két esetben 1 mikroszatellitet tartalmazó PCR reakcióban lehet felsokszorozni (5. ábra és 13. ábra). Az első vizsgálati csoportban 81 és

278 bp között, három eltérő fluoreszcens festékkel jelölve, maximum 16 db DNS fragment (amennyiben valamennyi mikroszatellit heterozigóta) elválasztása válik lehetővé. A második pulykavizsgálatra alkalmas csoportban, egy alacsonyabb mérettartományban (65-218 bp között) maximum 14 allél választható el. A harmadik vizsgálati csoport lúd állományok vizsgálatára alkalmas, és csak 5 mikroszatellitet tartalmaz a 103 bp-tól a 238 bp-ig terjedő tartományban.

A későbbi populációgenetikai vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a kialakított csoportok jól alkalmazhatóak a populációvizsgálatok során, azonban az is látható, hogy a csoportok további fejlesztésére is van lehetőség. A pulyka és a lúd esetén is a kialakított csoportok tartalmaznak egy-egy olyan mikroszatellitet, amely a vizsgált populációkban monomorfnak bizonyult. Ezek cseréje esetleg indokolt, ha más populációkban is kevés alléllal rendelkeznek. Én ezeket a mikroszatelliteket belső markerként alkalmaztam a kapilláris gélelektroforézisek során, ugyanis a méretük állandó, így segítségükkel nyomon követhettem a gép működését.

Emellett az egy elválasztás során vizsgálható mikroszatellitek száma elméletben tovább is növelhető, akár 10-15 is lehet (Ajzenberg et al. 2010).

5.3 Őshonos baromfipopulációk genetikai vizsgálata

5.3.1 Génrezerv bronzpulyka állomány genetikai analízise

A csoportokba rendezett 15 mikroszatellittel (4. és 5. táblázat) megvizsgáltam a DE AGTC Állattenyésztési Tanszék kísérleti telepének bronzpulyka populációját, valamint a rendelkezésemre álló 6 vadpulyka egyedet. A későbbiekben a vadpulyka egyedeket – a rendelkezésre álló alacsony létszám ellenére – elkülönítve vizsgáltam, így nem tekinthetők egy populáció reprezentatív mintájának.

Vizsgáltam az allélok számát (9. és 10. táblázat) és az egyes allélok gyakoriságát (8. táblázat). Megállapítható, hogy az allélszám mind a 15 mikroszatellit esetén alacsony (1-4), alacsonyabb a pulyka fajra jellemző allélszámnál (Reed et al. 2003a, Reed et al. 2003b, Latch et al. 2002). Ez az alacsony allélszám jele lehet a beltenyésztésnek, és az abból fakadó folyamatos leromlásnak. (Pecsenye 2006). Emellett mindegyik marker esetén van egy olyan allél, amely sokkal gyakoribb, mint a többi. Ez az allél egy marker kivételével (LEI43) a detektált haplotípusok több mint 60%-ában van jelen. A vizsgált minták alacsony számának köszönhetően a vadpulyka csoport mintáiban sokkal kevesebb allélt találtunk, azonban a LEI43-as marker 111bp-os allélja csak vadpulyka egyedekben volt jelent.

A genotípus adatokból meghatároztam az állományok várt (H_e) és tényleges (H_o) heterozigozitását (9. és 10. táblázat). Jól látható, hogy a várt heterozigozitási értékek csak

kevéssé térnek el a kapott heterozigozitási értékektől. Statisztikailag négy mikroszatellit esetén (ADL146, ADL191, ADL361 és az MCW83) igazolható az eltérés (P<0,05). A bronzpulyka populáció összesített várt heterozigozitási értékénél tapasztalt eltérés (H_e=0,28, H_o=0,312) szintén nem volt szignifikáns.

A vadpulyka heterozigozitási eredménye is nagyon hasonló képet mutat, és itt nem mutatkozott szignifikáns eltérés egyetlen marker esetében sem.

Ezekből az értékekből (H_e , H_o) számítható a fixációs index, ami a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést jellemzi. A bronzpulyka esetében az egyik mikroszatellit, az ADL150 homozigóta volt. Az ADL293, az ADL272, az ADL146, a LEI43 és az ADL191 esetében a pozitív érték a heterozigóták hiányát jelzi. A többi (ADL293, ADL266, MCW80, ADL353, ADL142, MCW83, ADL361) mikroszatellit negatív értékkel rendelkezett, azoknál a populációban heterozigóta-többletet volt megfigyelhető. Vadpulykánál négy (ADL292, MCW18, ADL146, ADL191) mikroszatellitnél nem értelmezhető a F₁₅ érték számítása, mert homozigóta genotípusúak voltak az adott mikroszatelliteken. Az ADL272 és az ADL149 estében kaptam pozitív értéket, ami a heterozigóták hiányát jelzi. A többi mikroszatellitnél a fixációs index negatív előjelű, ami itt is heterozigóta-többletet jelöl. Bronzpulyka esetében az ADL146, ADL150, ADL292, ADL293, MCW0080 markereknél kapott PIC érték <0,25, azaz ezek a mikroszatellitek az enyhén, illetve alig informatív kategóriába tartoznak. Hét mikroszatellit (ADL142, ADL149, ADL191, ADL266, ADL353, ADL361 és az MCW83) tartozott a mérsékelten informatív mikroszatellitek kategóriájába. Ezeknél a PIC érték 0,25 és 0,5 közötti tartományba esik. A nagymértékben informatív markerek csoportjába – ahol a PIC érték nagyobb, mint 0,5 – mindössze egyetlen mikroszatellit, a LEI43 tartozott. Az MCW18 esetében a PIC=0, ami azt jelenti, hogy ez egy egy alléllal rendelkező, monomorf mikroszatellit, azaz a markerre homozigóta.

A vadpulyka esetében is kiszámítottam a PIC értékeket, és 4 mikroszatellit esetében kaptam nullát, azaz homozigóta eredményt (ADL146, ADL191, ADL292, MCW18). Az ADL142-n kívül - amely nagymértékben informatív - a többi marker a mérsékelten informatív csoporthoz (0,5> PIC >0,25) tartozott.

Az általam vizsgált egyedek közötti genetikai hasonlóságot/különbséget, a köztük lévő kapcsolatot a könnyebb áttekinthetőség érdekében dendogramon is ábrázoltam (17. ábra).

A dendogramon megfigyelhető több nagyobb csoport, amelyek között kisebb a genetikai távolság. Ennek oka lehet a ketreces tartás is. Bár évente új ketrecbe kerülnek a bakok (rotálnak), hogy ne csökkenjen az állomány genetikai variabilitása. A pirossal ábrázolt vadpulyka egyedek elszórtan helyezkednek el a vizsgált bronzpulyka populációba vegyülve (amelyeket kékkel jelöltem), azaz nem alkotnak külön szigetet, nem csoportosulnak egy

elkülönülő részpopulációba. Bár erre a jelenleg elérhető adatok és információk alapján nem adható egyértelmű magyarázat (nem pontosan ismert a vadpulyka egyedek származása), egy lehetséges oka lehet mégis, hogy a vadpulyka egyedek valójában bronzpulykával keveredett állományból származnak.

5.3.2 Fodros tollú lúd állomány genetikai analízise

Ennél a populációnál a vizsgálatokat mindössze 5 mikroszatellittel végezetem, és bár több marker bevonására lenne szükség az állomány genetikai hátterének kielégítő elemzéséhez, az általam gyűjtött adatok alapján lehetséges egy előzetes felmérés. A fodros tollú lúd állomány esetében is meglehetősen alacsony (egyik marker esetén sem több mint három) allélszám volt fellelhető a populációban. Itt is megfigyelhető, hogy egy-egy allél a többit jóval meghaladó mértékben volt jelen a populáció egyedeiben. A kapott genotípuseredmények felhasználásával kiszámoltam a vizsgált állomány várt (H_e) és tényleges heterozigozitási (H_o) értékeit, amelyek a 13. táblázatban láthatóak.

A tényleges vizsgálatokban három mikroszatellit (ADL142, ADL361 és MCW18) szignifikáns mértékben alacsonyabb heterozigozitási értékeket mutatott, mint azt a várt heterozigozitási értékek alapján gondoltam volna, egy mikroszatellit pedig homozigótának bizonyult (LEI120). Egy esetben viszont (MCW80) szignifikáns mértékben magasabb heterozigozitási értéket kaptam. A populáció összesített heterozigozitási értéke (0,0191) szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a várt heterozigozitásnál (0,3169).

A homozigóta LEI120 esetében a PIC érték nulla volt. Egy mikroszatellit marker PIC értéke esett az alig informatív kategóriába (<0,25), ez az ADL361-es mikroszatellit marker volt. A másik három marker (ADL142, MCW18 és a MCW80) a mérsékelten informatív mikroszatellitek közé volt sorolható, mivel a kapott PIC értékek a 0,25 és a 0,5 közé estek.

Ennél a populációnál is elkészítettem egy dendogrammot, az egyedek közötti genetikai hasonlóságok könnyebb áttekinthetősége érdekében (18. ábra). Az ábráról leolvasható, hogy igen gyakoriak az egymással nagyon hasonló genotípusú egyedek. Mindezek az adatok az állomány beltenyésztettségére utalnak. Emellett előfordulhat az is, hogy a nagyobb szaporodási eréllyel bíró egyedek több utóddal járultak hozzá a vizsgált generációhoz, mivel az állományt szabad tartásban, természetes pároztatással tartották fenn.

5.4 Izolált új mikroszatellitek használhatósága, lehetséges jövőbeli alkalmazásuk és annak jelentősége

Munkám során sikeresen állítottam fel, illetve adaptáltam egy mikroszatellit izolálási módszert, amellyel bármely faj DNS-éből lehetséges nagy hatékonysággal,

ismétlődéstartalmú klónok izolálása. Ezek jelentős része a szekvencia ismeretében, kimutatási primerek tervezésével új mikroszatellitekké alakítható. A kialakított rendszert két faj, a pulyka és a lúd esetén is sikeresen alkalmaztam.

5.4.1 Új pulyka és lúd mikroszatellitek

A pulyka fajból összesen 61, a lúd fajból 5 új mikroszatellit markert fejlesztettem ki (függelék 14., dolgozat 15. táblázata). Ezek a markerek alkalmasak állományok genetikai variabilitásának vizsgálatára, illetve gazdaságilag fontos értékmérő tulajdonságok genetikai hátterének felderítésére. Lúdból 5 mikroszatellit szekvenciát izoláltam, melyeket összehasonlítottam a nemzetközi adatbázisban addig leírtakkal.

Tizenegy új izolálású pulyka mikroszatellit marker genetikai térképpozícióját együttműködő partnerünk – Kent M. Reed és csoportja – állapította meg (függelék 19/a. ábra), majd helyezte el ezeket a térképezési populációjuk segítségével (9. ábra) mind a pulyka konszenzus genetikai térképén, mind a tyúk összehasonlító genetikai térképén (Reed et al. 2005). Ehhez a munkához egy előzetes szűrést kellet végeznem a térképezésre használt állomány bizonyos egyedeinek DNS-én annak eldöntésére, hogy polimorf genotípust mutatnak-e az új izolálású mikroszatellitek, azaz alkalmasak-e a genetikai térképezésre az általuk használt állományon.

Az 2010-re elkészült pulyka genomszekvenciához hasonlítottam az új izolálású mikroszatellitek szekvencia adatait. A 61 db új izolálású mikroszatellitből hatot nem találtam meg az adatbázisban illetve nem lehetett őket kromoszómához rendelni. A többi esetében megkaptam a markerek pontos pozícióját. Ezek között szerepel az együttműködő által térképezett 11db mikroszatellit is. Ezek közül három esetében azonban más eredményt hozott a szekvencia összehasonlítás és a térképezés. Ezek az MGP012, az MGP031 és az MGP43. A genom összeillesztés szerint az MGP012 mikroszatellit a 13. kromoszómán, az MGP031 és az MGP43 pedig a 15. kromoszómán helyezkedik el, miközben az együttműködő az MGP012 elnevezésű mikroszatellitet a 11. kromoszómához, az MGP31-es markert a 2. kromoszómához, az MGP043-as markert a 19. kromoszómára térképezte. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a szekvenálás utáni szekvencia, illetve a genomillesztések még nem tökéletesek, folyamatosan szerkesztik, fejlesztik őket és az ismétlődés tartalmú szekvenciák esetén ez különösen nehéz feladat. Annak eldöntésére, hogy a két térképezési metódus közül melyik jelzi pontosan e markerek pozícióját további vizsgálatok elvégzése szükséges.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Sikeresen adaptáltam 46 db tyúk mikroszatellitet a pulyka faj vizsgálatához. A mikroszatellit allélok méretét is figyelembe véve, az adaptált mikroszatellitekből a hatékonyabb és költségtakarékosabb vizsgálatokhoz két kimutatási csoportot hoztam létre. Az egy kimutatási csoportban általam egyszerre vizsgált mikroszatellitek száma elérte a nyolcat.
- Tizenöt sikeresen adaptált mikroszatellit markerrel vizsgáltam a debreceni bronzpulyka populáció genetikai variabilitását, kiegészítve a vadpulyka egyedekkel. A kapott eredményeket értékeltem, és a tenyésztő rendelkezésére bocsátottam a további tenyésztői munka elősegítéséhez.
- 3. Új pulyka mikroszatellit könyvtárak létrehozását követően 167 dinukleotid ismétlődést tartalmazó DNS szakaszt szűrtem ki, amelyből 109 volt alkalmas primer tervezésre, és 68 volt egyedi szekvenciájú. Az ezt követő génbanki adatbázis vizsgálatokkal kiszűrtem a korábban mások által már leírt szekvenciákat. Végül 61 db új izolálású egyedi szekvenciát azonosítottam, amelyek kimutatásához specifikus primer párokat terveztem.
- Sikeresen adaptáltam 16 mikroszatellit primer párt lúdra, a különböző populációk genetikai jellemzéséhez. Ezek közül 5 mikroszatellitet sikeresen egy kimutatási csoportba rendeztem.
- 5. Öt mikroszatellitet tartalmazó kimutatási csoporttal felmértem a DE AGTC teljes fodros tollú lúd állományának genetikai variabilitását. Az eredményeket értékeltem, és a tenyésztő rendelkezésére bocsátottam a további tenyésztői munka elősegítéséhez.
- Sikeresen hoztam létre egy lúd mikroszatellitekben dúsított könyvtárat, és 32 klón vizsgálata során 11 egyedi mikroszatellit típusú szekvenciát határoztam meg, amelyek közül – specifikus primerek tervezésével – 5 új mikroszatellitet fejlesztettem ki.

DOI: 10.14751/SZIE.2014.046

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyakorlati állattenyésztésben, -nemesítésben és fajtafenntartásban is egyre nagyobb szerephez jutnak a korszerű molekuláris módszerek, amelyek különösen hatékony eszköznek bizonyulnak a génrezerv állományok esetében.

A dolgozat elején megfogalmazott céljaimat is ennek megfelelően tűztem ki. A munkám során két fontos magyar génrezerv állomány, bronzpulyka (163 db bronzpulyka és 6 db vadpulyka) és fodros tollú lúd (132 db) populációk genetikai variabilitását mértem fel mikroszatellit markerekkel. Az alkalmazott technikák első lépése a rendelkezésemre álló vérmintákból történő DNS izolálás volt. Ezek után a kiválasztott tyúk mikroszatellit markereket (56 db) adaptáltam a pulyka vizsgálatokhoz, majd a már működő markereket a fluoreszcens jelölésnek megfelelően két kimutatási csoportba rendeztem, és így végeztem a genotípus meghatározást. Eredményeimet táblázatos és grafikus formában is a nemesítők rendelkezésére bocsátottam. Ezen felül kiszámítottam az állomány genetikai variabilitását jellemző néhány adatot (H_o, H_e, F_{IS}, PIC). Segítségükkel a további párosítási munkáknál figyelmet fordíthattak a genetikai variabilitás csökkenésének elkerülésére.

További célkitűzésem új pulyka mikroszatellitek izolálása volt. Ehhez először létrehoztam egy új, CA-dinukleotid ismétlődésekben dúsított mikroszatellit könyvtárat, amelyből Glenn és Schable (2005) módszere alapján 136 db mikroszatellitet tartalmazó szekvenciát nyertem vissza. Ezeket a szekvenciákat összevetettem a nemzetközi adatbázisokban található adatokkal, majd a 61 db, újnak bizonyulóra primert terveztem, és végül ezeknek a megfelelően működő új mikroszatelliteknek a kimutatását optimalizáltam. Miután a szekvencia adtok a pulykánál is hozzáférhetőek lettek, BLAST segítségével megkerestem őket.

A pulyka mikroszatellit adaptálási tapasztalataimat alkalmaztam egy másik faj esetében, amikor a cél egy fodros tollú lúd állomány genetikai variabilitásának felmérése volt. Ezt követően erre a fajra is létrehoztam egy dúsított mikroszatellit könyvtárat, amelyből sikeresen visszanyertem a mikroszatellitet tartalmazó klónokat. Ezek közül specifikus primerek segítségével öt új mikroszatellit markert fejlesztettem ki.

DOI: 10.14751/SZIE.2014.046

8. SUMMMARY

In the practice cross breeding and species preservation there has been an important role of the application of the modern molecular methods which have been proved to be very effective means in the case of gene bank stock species.

At the beginning of the dissertation the research aims were defined in consideration of the above mentioned ideas. In my research I investigated the variability of two important Hungarian gene bank stocks, the bronze turkey and the curly feathered Hungarian goose (163 bronz turkeys and 6 wild turkeys), by microsatellite markers. The first step of the applied techniques was the DNA isolation taken from the blood samples. I adapted the selected chicken microsatellite markers (56 pieces) for the turkey investigations, then I arranged the operating markers – in accordance with the fluorescent markers – into two traceable groups, and finally, I defined the genotype. My research results were arranged into tables and graphs, and then I provided them for the breeders. With these results they could pay more attention to avoid the decrease of gene variability in crossing and mating.

My further research aim was to isolate new turkey microsatellites. To do so, first I established a new microsatellite library enriched in CA-dinocleotid repetitions, and from this, I gained 136 sequences containing microsatellites. For this research step I applied the method of Glenn and Schable (2005). I compared these sequences with the available data of the international database, then I planned 61 seemingly new primers, then I optimatized the demonstration of the operating new microsatellites.

I applied my experiences, gained from the turkey microsatellite isolation, in the case of different species. Here my aim was to explore the gene variability of a goose stock. I also established a new enriched microsatellite library for this species, and I successfully gained clones containing microsatellites. In the end, I also planned primers for these five sequences to explore and demonstrate microsatellites.

DOI: 10.14751/SZIE.2014.046

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Ajzenberg D., Collinet F., Mercier A., Vignoles P. & Dardé1 M.-L. (2010): Genotyping of Toxoplasma gondii Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay. *Journal of clinical microbiology*, 48(12): 4641-4645. p.
- Andres K., Kapkowska E. (2011): Applicability of anatid and galliform microsatellite markers to the genetic diversity studies of domestic geese (Anser anser domesticus) through the genotyping of the endangered zatorska breed. BioMedCentral Research notes, 4: 65. p.
- Ansorge W. J. (2009): Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25(4): 195-203. p.
- Armour J. A., Neumann R., Gobert S., Jeffreys A. J. (1994): Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, 3(4): 599-65. p.
- Aslam M. L., Bastiaansen J. W., Crooijmans R. P., Vereijken A., Megens H. J., Groenen M. A. (2010): A SNP based linkage map of the turkey genome reveals multiple intrachromosomal rearrangements between the turkey and chicken genomes. BioMedCentral Genomics, 11: 647. p.
- Aslam M. L., Bastiaansen J. W., Elferink M. G., Megens H. J., Crooijmans R. P., Blomberg le A., Fleischer R. C., Van Tassell C. P., Sonstegard T. S., Schroeder S. G., Groenen M. A., Long J. A. (2012): Whole genome SNP discovery and analysis of genetic diversity in Turkey (*Meleagris gallopavo*). *Biomed Central Genomics*, 13:391. p.
- Baile C. A. (2000): Commercialization of biotechnology in agriculture. Abstract of the American Dairy Science Association conference, American Society of Animal Science, July 24-28, Baltimore, Maryland. 20.
- Baratti M., Alberti A., Groenen M., Veeneddal T. & Fugheri F. D. (2001): Polymorphic microsatellites developed by cross-species amplifications in common pheasant breeds. *Animal genetics*, 32: 222-225. p.
- Bassam B. J, Caetano-Anollés G., Gresshoff P. M. (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 196(1): 80-83. p.
- Barkóczy Zs., Ivelics R., Marosvölgyi B. (2007): Energetikai faültetvények I. Bioenergetika. Szekszárd. *Bioenergetikai szaklap*, 2(3).
- Baublys V., Paulauskas A., Sruoga A. (2006): Application of microsatellite DNA primers for the analysis of the genetic variability of Lithuanian native goose breeds. *Biologija*, 1: 14-17. p.
- Beckmann J. S. & Soller M. (1990): Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology (NY)*, 8: 930-932. p.

- Beer Zs. (2004): Szoomatikus és Y kromoszómán lokalizálódó STR markerek populációgenetikai vizsgálata. Szeged: Szegedi Tudomány Egyetem, Természet Tudományi Kar, PhD dolgozat. 24-30. p.
- Blin N., Stafford D.W. (1976): A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 3: 2303–2308. p.
- Bourquini J. C., Otten L., Walter B. (1995): PCR-RFLP analysis of Vitis, Ampelopsis and Parthenocissus and its application to the identification of rootstocks. *Vitis*, 34 (2): 103-108. p.
- Botstein D., White R. L, Scolinck M. & Davis R. W. (1980): Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. American journal of human genetetics, 32: 314-331. p.
- Brenig B., Brem G. (1992): Molecular cloning and analysis of the procine "halotane" gene. *Archive für Tierzucht*, 35: 129-135. p.
- Bruford M. W., Wayne R. K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current opinion in genetics and development*, 3: 939-943. p.
- Budowle B., Chakraborty R., Giusti A. M., Eisenberg A. J., Allen R. C. (1991): Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *American journal of human genetics*, 48: 137.-144. p.
- Burt D. W., Bumstead N., Bitgood J. J., Ponce deLeon F. A. & Crittenden L. B. (1995): Chicken genome mapping: a new era in avian genetics. *Trends in genetics*, 11: 190–194. p.
- Burt D. W., Morrice D. R., Sewalmen A., Smith J., Paton I. R., Smith E. J., Bently J., Hocking P. M. (2003): Preliminary linkage map of Turkey (Meleagris gallopavo) based on microsatellite markers. *Animal genetics*, 34: 399-409. p.
- Caetano-Anollés G., Bassam B. J, Gresshoff P. M. (1991): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology (Nature Publishing Company)*, 9(6): 553-557. p.
- Caetano-Anollés G., Bassam B. J., Gresshoff P. M. (1992): Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Molecular & general genetics*, 235(2-3): 157-165. p.
- Caetano-Anollés G. & Bassam B. J. (1993): DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Applied biochemistry and biotechnology*, 42(2-3): 189-200. p.
- Cathey J. C., DeWoody J. A. & Smith L. M. (1998): Microsatellite markers in Canada geese (Branta canadensis). *The journal of heredity*, 89: 173–175. p.
- Chakravarti A. (2001): Single nucleotide polymorphisms...to a future of genetic medicine. *Nature*, 409: 822-823. p.
- Chaves L. D., Knutson T. P., Krueth S. B., Reed K. M. (2006): Using the chicken genome sequence in the development and mapping of genetic markers in the turkey (Meleagris gallopavo). *Animal genetics*, 37(2): 130-138. p.

- Cheng H. H., Levin I., Vallejo R. L., Khatib H., Dodgson J. B., Crittenden L. B. és Hillel J. (1995): Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Science*, 74: 1855–1874. p.
- Chowdhary B. P., Raudsepp T. (2008): The horse genome derby: racing from map to whole genome sequence. *Chromosome Research*, (1): 109-127. p.
- Christel M. E., Katia F., Carine G., Gaëlle C., Florence V. & Alain V. (2006): Microsatellite dna markers for duck (Anas platyrhynchos and Cairina moschata). 2006 Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan, November 7-10.
- Cogburn L. A., Porter T. E., Duclos M. J., Simon J., Burgess S. C., Zhu J. J., Cheng H. H., Dodgson J. B., Burnside J. (2007): Functional genomics of the chicken--a model organism. *Poultry science*, 86(10): 2059-2094. p.
- Collard B. C. Y. & Mackill D. J. (2009): Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants Plant. *Molecular biology reports*, 27: 86–93. p.
- Crooijmans, R. P., van Oers P. A., Strijk J. A., van der Poel J. J., Groenen M. A. (1996): Preliminary linkage map of the chicken (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellite markers: 77 new markers mapped. *Poultry science*. 75(6): 746-754. p.
- Dalloul R. A., Long J. A., Zimin A. V., Aslam L., Beal K., Blomberg Le A., Bouffard P., Burt D. W., Crasta O., Crooijmans R. P., Cooper K., Coulombe R. A., De S., Delany M. E., Dodgson J. B., Dong J. J., Evans C., Frederickson K. M., Flicek P., Florea L., Folkerts O., Groenen M. A., Harkins T. T., Herrero J., Hoffmann S., Megens H. J., Jiang A., de Jong P., Kaiser P., Kim H., Kim K. W., Kim S., Langenberger D., Lee M. K., Lee T., Mane S., Marcais G., Marz M., McElroy A. P., Modise T., Nefedov M., Notredame C., Paton I. R., Payne W. S., Pertea G., Prickett D., Puiu D., Qioa D., Raineri E., Ruffier M., Salzberg S. L., Schatz M. C., Scheuring C., Schmidt C. J., Schroeder S., Searle S. M., Smith E. J., Smith J., Sonstegard T. S., Stadler P. F., Tafer H., Tu Z. J., Van Tassell C. P., Vilella A. J., Williams K. P., Yorke J. A., Zhang L., Zhang H. B., Zhang X., Zhang Y., Reed K. M. (2010): Multi-platform next-generation sequencing of the domestic turkey (Meleagris gallopavo): genome assembly and analysis. *PLoS biology*, 8(9): 1-21. p.
- Deng G. (1988): A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer. *Nucleic acids research*, 16(13): 6231. p.
- Dhand R (2006): The 'finished' landscape. Nature, Editorial.
- Dockhorn-Dworniczak B., Dworniczak B, Brömmelkamp L., Bülles J., Horst J., Böcker W. W. (1991): Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. *Nucleic Acids Researc*, 19(9): 2500. p.

- Don R. H., Wainwright B. J., Baker K. & Mattick S. J. (1991): "Toucsdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic asids research*, 19(14): 4008. p.
- Eggen A. (2012): The development and application of genomic selection as a new breeding paradigm. *Animal frontiers*, 2: 10-15. p.
- Excoffier L. G. Laval, & S. Schneider (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50. p.
- Ferrari M., Stenirri S., Bonini P., Cremonesi L. (2003): Molecular diagnostics by microelectronic microchips. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 41(4): 462-467. p.
- Fésüs L., Komlósi I., Varga L., Zsolnai A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az álattenyésztésben. Budapest: AGRIMFORM Kiadó és Nyomda Kft. 110-172. p.
- Fields R. L., Scribner K. T. (1997): Isolation and characterization of novel waterfowl microsatellite loci: cross-species comparisons and research applications. *Molecular ecology*, 6: 199-202. p.
- Glenn C. T., Schable N. A. (2005): Isolating Micrasatelliete DNA Loci. *Methods in enzymology*, 395: 202-222. p.
- Gregory S. G., Barlow K. F., McLay K. E., Kaul R., Swarbreck D., Dunham A., Scott C. E., Howe K. L., Woodfine K., Spencer C. C., Jones M. C., Gillson C., Searle S., Zhou Y., Kokocinski F., McDonald L., Evans R., Phillips K., Atkinson A., Cooper R., Jones C., Hall R. E., Andrews T. D., Lloyd C., Ainscough R., Almeida J. P., Ambrose K. D., Anderson F., Andrew R. W., Ashwell R. I., Aubin K., Babbage A. K., Bagguley C. L., Bailey J., Beasley H., Bethel G., Bird C. P., Bray-Allen S., Brown J. Y., Brown A. J., Buckley D., Burton J., Bye J., Carder C., Chapman J. C., Clark S. Y., Clarke G., Clee C., Cobley V., Collier R. E., Corby N., Coville G. J., Davies J., Deadman R., Dunn M., Earthrowl M., Ellington A. G., Errington H., Frankish A., Frankland J., French L., Garner P., Garnett J., Gay L., Ghori M. R., Gibson R., Gilby L. M., Gillett W., Glithero R. J., Grafham D. V., Griffiths C., Griffiths-Jones S., Grocock R., Hammond S., Harrison E. S., Hart E., Haugen E., Heath P. D., Holmes S., Holt K., Howden P. J., Hunt A. R., Hunt S. E., Hunter G., Isherwood J., James R., Johnson C., Johnson D., Joy A., Kay M., Kershaw J. K., Kibukawa M., Kimberley A. M., King A., Knights A. J., Lad H., Laird G., Lawlor S., Leongamornlert D. A., Lloyd D. M., Loveland J., Lovell J., Lush M. J., Lyne R., Martin S., Mashreghi-Mohammadi M., Matthews L., Matthews N. S., McLaren S., Milne S., Mistry S., Moore M. J., Nickerson T., O'Dell C. N., Oliver K., Palmeiri A., Palmer S. A., Parker A., Patel D., Pearce A. V., Peck A. I., Pelan S., Phelps K., Phillimore B. J., Plumb R., Rajan J., Raymond C., Rouse G., Saenphimmachak C., Sehra H. K., Sheridan E., Shownkeen R., Sims S., Skuce C. D., Smith M., Steward C., Subramanian S., Sycamore N. (2006):

The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*, 441(7091): 315-321. p.

- Groenen M. A. M., Cheng H. H., Bumstead N., Benkel B. F., Briles W. E., Burke T., Burt D. W., Crittenden L. B., Dogson J., Hillel J., Lamont S., De Leon A. P., Soller M., Takahashi H., Vignal A. (2000): A consensus linkage map of the chicken genome. *Genom research*, 10: 137-147. p.
- Groenen M. A., Wahlberg P., Foglio M., Cheng H. H., Megens H. J., Crooijmans R. P., Besnier F., Lathrop M., Muir W. M., Wong G. K., Gut I., Andersson L. (2009): A high-density SNP-based linkage map of the chicken genome reveals sequence features correlated with recombination rate. *Genome research*, 19(3): 510-519. p.
- Groenen M. A. M., Megens H.-J., Zare Y., Warren W. C., Hillier LaD. W., Crooijmans R. P. M. A., Vereijken A., Okimoto R., Muir W. M. & Cheng H. H. (2011): The development and characterization of a 60K SNP chip for chicken. *BioMedCentral Genomics*, 12: 274. p.
- Groenen M. A., Archibald A. L., Uenishi H., Tuggle C. K., Takeuchi Y., Rothschild M. F., Rogel-Gaillard C., Park C., Milan D., Megens H. J., Li S., Larkin D. M., Kim H., Frantz L. A., Caccamo M., Ahn H., Aken B. L., Anselmo A., Anthon C., Auvil L., Badaoui B., Beattie C. W , Bendixen C., Berman D., Blecha F., Blomberg J., Bolund L., Bosse M., Botti S., Bujie Z., Bystrom M., Capitanu B., Carvalho-Silva D., Chardon P., Chen C., Cheng R., Choi S. H., Chow W., Clark R. C., Clee C., Crooijmans R. P., Dawson H. D., Dehais P., De Sapio F., Dibbits B., Drou N., Du Z. Q., Eversole K., Fadista J., Fairley S., Faraut T., Faulkner G. J., Fowler K. E., Fredholm M., Fritz E., Gilbert J. G., Giuffra E., Gorodkin J., Griffin D. K., Harrow J. L., Hayward A., Howe K., Hu Z. L., Humphray S. J., Hunt T., Hornshøj H., Jeon J. T., Jern P., Jones M., Jurka J., Kanamori H., Kapetanovic R., Kim J., Kim J. H., Kim K. W., Kim T. H., Larson G., Lee K., Lee K. T., Leggett R., Lewin H. A., Li Y., Liu W., Loveland J. E., Lu Y., Lunney J. K., Ma J., Madsen O., Mann K., Matthews L., McLaren S., Morozumi T., Murtaugh M. P., Narayan J., Nguyen D. T., Ni P., Oh S. J., Onteru S., Panitz F., Park E. W., Park H. S., Pascal G., Paudel Y., Perez-Enciso M., Ramirez-Gonzalez R., Reecy J. M., Rodriguez-Zas S., Rohrer G. A., Rund L., Sang Y., Schachtschneider K., Schraiber J. G., Schwartz J., Scobie L., Scott C., Searle S., Servin B., Southey B. R., Sperber G., Stadler P., Sweedler J. V., Tafer H., Thomsen B., Wali R., Wang J., Wang J., White S., Xu X., Yerle M., Zhang G., Zhang J., Zhang J., Zhao S., Rogers J., Churcher C., Schook L. B. (2012): Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. Nature, 491(7424): 393-398. p.
- Gu Z., Hillier L., Kwok P. Y. (1998): Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace. *Humann mutation*, 12(4): 221-225. p.
- Guo, D. L., Zhang, J. Y., Liu C. H. (2012): Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoTanalyses. *Molecular biology reports*, 39(5): 5307-5313. p.

- Guo S. W. & Thompson E. A. (1992): Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372. p.
- Hajósné Novák M. (szerk.) (1999): Genetikai variabilitás növényekben. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 49-55. p.
- Hale W. G., Margham J. P., Saunders V. A. (1989): Biológiai értelmező szótár. *PANEM-McGRAW-HILL Kft. Budapest.* 243. p.
- Hamada H. & Kakunaga T. (1982): Potential Z-DNA forming forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature*, 298: 396-398. p.
- Hamada H., Petrino M. G., Kakunaga T. (1982a): Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(19): 5901-5905. p.
- Hamada H., Petrino M. G., Kakunaga T. (1982b): A novel repeated element with Z-DNAforming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(21): 6465-6469. p.
- Hamada, H., Petrino M. G., Kakunaga T., Seidman M. & Stollar B. D. (1984): Characterization of genomic Poly(dTdG) * Poly(dC-dA) sequences; structure, organization, and conformation. *Molecular and cellular Biology*, 4: 2610-2621.
 p.
- Hamilton M. B., Pincus E. L., Di-Fiore A., Fleischer R. C. (1999): Universal linker and ligation procedures for construction genomicDNA libraries enriched for microsatellites. *Boitechniques*, 27: 500-507. p.
- Hanotte O., Pugh A., Maücher C., Dawson D., Burke T. (1997): Nine novel chicken microsatellite loci and their utility in other Galliformes. *Animal genetics*, 28(4): 311-313. p.
- Harry D.E., Zaitlin D., Marini P. J., Reed K. M. (2003): A first-generation map of the turkey genome. *Genome*, 46(5): 914-924. p.
- Haussler D., O'Brien S. J., Ryder O. A., Barker F. K., Clamp M., Crawford A. J., Hanner R., Hanotte O., Johnson W. E., McGuire J. A., Miller W., Murphy R. W., Murphy W. J., Sheldon F. H., Sinervo B, Venkatesh B., Wiley E. O., Allendorf F. W., Amato G., Baker C. S., Bauer A., Beja-Pereira A., Bermingham E., Bernardi G., Bonvicino C. R., Brenner S., Burke T., Cracraft J., Diekhans M., Edwards S., Ericson P. G., Estes J., Fjelsda J., Flesness N., Gamble T., Gaubert P., Graphodatsky A. S., Marshall Graves J. A., Green E. D., Green R. E., Hackett S., Hebert P., Helgen K. M., Joseph L., Kessing B., Kingsley D. M., Lewin H. A., Luikart G., Martelli P., Moreira M. A., Nguyen N., Ortí G., Pike B. L., Rawson D. M., Schuster S. C., Seuánez H. N., Shaffer H. B., Springer M. S., Stuart J.M., Sumner J., Teeling E., Vrijenhoek R. C., Ward R. D., Warren W. C., Wayne R., Williams T. M., Wolfe N. D., Zhang Y. P. (2009): Genome 10K Community of Scientists Collaborators (68). *The Journal of Heredity*, 100(6): 659-674. p.

- Hayes B. J., Lewin H. A., Goddard M. E. (2013): The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends in genetics*, 29(4): 206-214. p.
- Hearne C. M., Ghosh S., Todd J. A. (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in genetics*, 8: 288-293. p.
- Heaton M. P., Harhay G. P., Bennett G. L., Stone R. T., Grosse W. M., Casas E., Keele J.W., Smith T.P., Chitko-McKown C. G., Laegreid W. W. (2002): Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian genome*, 13(5): 272-281. p.
- Hidas A., Szalai I. (1998): Identification of RAPD markers in fowl stocks maintained in a gene conservation programme. Proc. 1st Poultry Genetics Symposium, 6-8. October, Mariensee, (Germany) 118. p.
- Hidas A., Szalay I., Koppány G., Sófalvy F. (2000): RAPD marker analyis of domestic fowl stocks maintained in a Hungarian gene conservation programme. *Proc. XXI. World's Poultry Congress, 20.-25. August, Montreal (Canada)* P.8. 3.
- Hidas A., Koppány G., Mihók S., Edviné M. E., Szalay I. (2002): DNS polimorfizmusok (RAPD) vizsgálata pulyka génbanki állományokban. In.: INNOVÁCIÓ A TUDOMÁNY ÉS A GYAKORLAT EGYSÉGE AZ EZREDFORDULÓ AGRÁRIUMÁBAN (Szerk.: Jávor A. &Magyar K.) Debrecen, 35-41. p.
- Hidas A. (2002): DNS markerek vizsgálata a baromfiállományok génmegőrzésében. In: GÉNMEGŐRZÉS; KUTATÁSI EREDMÉNYEK RÉGI HÁZIÁLLATFAJTÁK ÉRTÉKEIRŐL. (Szerk: Jávor A. és Mihók S.) Debrecen: Debreceni Agrártudományi Egyetem Kiadványa. 207-213. p.
- Hillier LaD. W., Miller W., Birney E., Warren W., Hardison R. C., Ponting C. P., Bork P., Burt D. W, Groenen M. A. M., Delany M. E., Dodgson J. B., Chinwalla A. T., Cliften P. F., Clifton S. W., Delehaunty K. D., Fronick C., Fulton R. S., Graves T. A., Kremitzki C., Layman D., Magrini V., McPherson J. D., Miner T. L., Minx P., Nash W. E., Nhan M. N., Nelson J. O., Oddy L. G., Pohl C. S., Randall-Maher J., Smith S. M., Wallis J. W., Yang S.-P., Romanov1 M. N., Rondelli C. M., Paton B., Smith J., Morrice D., Daniels L., Tempest H. G., Robertson L., Masabanda J. S., Griffin D. K., Vignal A., Fillon V., Jacobbson L., Kerje S., Andersson L., Crooijmans R. P. M., Aerts J., van der Poel J. J., Ellegren H., Caldwell R. B., Hubbard S. J., Grafham D. V., Kierzek A. M, McLaren S. R., Overton I. M., Arakawa H., Beattie K. J., Bezzubov Y., Boardman P. E., Bonfield J. K., Croning M. D. R., Davies R. M., Francis M. D., Humphray S. J., Scott C. E., Taylor R. G., Tickle C., Brown W. R. A., Rogers J., Buerstedde J.-M., Wilson S. A., Stubbs L., Ovcharenko I., Gordon L., Lucas S., Miller M. M., Inoko H., Shiina T., Kaufman J., Salomonsen J., Skjoedt K., Wong G. K.-S., Wang J., Liu B., Wang J., Yu J., Yang H., Nefedov M., Koriabine M., deJong P. J., Goodstadt L., Webber C., Dickens N. J., Letunic I., Suyama M., Torrents D., von Mering C., Zdobnov E. M., Makova K., Nekrutenko A., Elnitski L., Eswara P., King D. C., Yang S., Tyekucheva S., Radakrishnan A., Harris R. S., Chiaromonte F., Taylor J., He J., Rijnkels

M., Griffiths-Jones S., Ureta-Vidal A., Hoffman M. M., Severin J., Searle S.
M. J, Law A. S., Speed D., Waddington D., Cheng Z., Tuzun E., Eichler E., Bao Z., Flicek P., Shteynberg D. D., Brent M. R., Bye J. M., Huckle E. J., Chatterji S., Dewey C., Pachter L., Kouranov A., Mourelatos Z., Hatzigeorgiou A. G., Paterson A. H., Ivarie R., Brandstrom1 M., Axelsson E., Backstrom N., Berlin S., Webster M. T., Pourquie O., Reymond A., Ucla C., Antonarakis S. E., Long M., Emerson J. J., Betra' n E., Dupanloup I., Kaessmann H., Hinrichs A. S., Bejerano G., Furey T. S., Harte R. A., Raney B., Siepel A., Kent W. J., Haussler D., Eyras E., Castelo R., Abril J. F., Castellano S., Camara F., Parra G., Guigo R., Bourque G., Tesler G., Pevzner P. A., Smit A., Fulton L. A., Mardis E. R.& Wilson R. K. (2004): Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. International Chicken Polymorphism Map Consortium. *Nature*, 432(7018): 695-716. p.

- Hsiao M. C., Liu H. C., Hsu Y. C., Hu Y. H., Li S. H. & Lee S. R. (2008): Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in Tsaiya Duck. Asian-Australasian journal of animal sciences, 21(5): 624 – 627. p.
- Huang C.-W., Cheng Y.-S., Rouvier R., Yang K.-T., Wu C.-P., Huang H.-L. és Huang M.-C. (2009): Duck (Anas platyrhynchos) linkage mapping by AFLP fingerprinting. *Genetics selection evolution*, 41: 28. p.
- Huang H. B., Song Y. Q., Hsei M., Zahorchak R., Chiu J., Teuscher C. és Smith E. J. (1999): Development and characterization of genetic mapping resources for the turkey (Meleagris gallopavo) *Journal of heredity*, 90(1): 240-242. p.
- Huang Y., Tu J., Cheng X., Tang B., Hu X., Liu Z., Feng J., Lou Y., Lin L., Zhao Y., Li N. (2005): Characterization of novel 35 microsatellite DNA markers from the duck (Anas platyrhynchos) genome and cross-amplification in other birds *Genetics selection evolution*, 37: 455-472. p.
- Huang Y., Zhao Y., Haley C. S., Hu S., Hao J., Wu C., Li N. (2006): A Genetic and cytogenetic map for the duck (Anas platyrhynchos). *Genetics*, 173: 287-296. p.
- Huang Y., Li Y., Burt D. W., Chen H., Zhang Y., Qian W., Kim H., Gan S., Zhao Y., Li J., Yi K., Feng H., Zhu P., Li B., Liu Q., Fairley S., Magor K. E., Du Z., Hu X.-, Goodman L., Tafer H., Vignal A., Lee T., Kim K. W., Sheng Z., An Y., Searle S., Herrero J., Groenen M. A., Crooijmans R. P., Faraut T., Cai Q., Webster R. G., Aldridge J. R., Warren W. C., Bartschat S., Kehr S., Marz M., Stadler P. F., Smith J., Kraus R. H., Zhao Y., Ren L., Fei J., Morisson M., Kaiser P., Griffin D. K., Rao M., Pitel F., Wang J., Li N. (2013): The duck genome and transcriptome provide insight into an avian influenza virus reservoir species. *Nature genetics*, 45(7): 776-783. p.
- Hughes I. P., Moran C., Nicholas F. W. (1992): PCR genotyping of the ryanodine receptor gene for a putative causal mutation for malignant hyperthermia in Australian pigs. *Journal of animal breeding and genetics*, 109: 465 - 476. p.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011): 931-945. p.

- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L. (1985a): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006): 67-73. p.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L. (1985b): Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023): 76-79. p.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., Weatherall D. J. & Ponder B. A. J. (1986): DNA "fingerprints" and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *American journal of human genetics*, 39: 11-24. p.
- Jiang G.-Q. & Yao X.-F. & Liu C.-M. (2013): A simple CELI endonuclease-based protocol for genotyping both SNPs and InDels. *Plant molecular biology reporter*, 31(6): 1325-1335. p.
- Jiang J., Jiang L., Zhou B., Fu W., Liu J. F., Zhang Q. (2011): Snat: a SNP annotation tool for bovine by integrating various sources of genomic information. *Biomed Central Genomics Genetics*, 12:85. p. (doi: 10.1186/1471-2156-12-85.)
- Jonker R. M., Zhang Q., Van Hooft P., Loonen M. J. J. E., Van der Jeugd H. P., Crooijmans R. P. M. A., Groenen M. A. M., Prins H. H. T., Kraus R. H. S. (2012): The Development of a Genome Wide SNP Set for the Barnacle Goose Branta leucopsis. *PLos ONE*, 7(7): 1-8. p.
- Karger B. L., Chu Y. H., & Foret F. (1995): Capillary electrophoresis of proteins and nucleic acids. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 24: 579–610. p.
- Kashi Y., King D., Soller M. (1997): Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in genetics*, 13(2): 74-78. p.
- Kayang B. B., Inoure-Murayama M., Nomura A., Kimura K., Takahashi H., Mizutani M. & Ito S. (2000): Fifty microsatellite markers for japanese quail. *The Journal of heredity*, 91 (6): 502-505. p.
- Kijas J. W., Lenstra J. A., Hayes B., Boitard S., Porto Neto L. R., San Cristobal M., Servin B., McCulloch R., Whan V., Gietzen K., Paiva S., Barendse W., Ciani E., Raadsma H., McEwan J., Dalrymple B., International Sheep Genomics Consortium Members (2012): Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Biology*, 10(2):e1001258. p.
- Kiss E. (2005) Molekuláris növénynemesítés. szerkesztette: Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (2005): Mezőgazdasági biotechnológia. Budapest: Agroinform Kiadó és Nyomda Kft.. 194-210. p.
- Knight M. I., Daetwyler H. D., Hayes B. J., Hayden M. J., Ball A. J., Pethick D. W., McDonagh M. B. (2013): An independent validation association study of carcass quality, shear force, intramuscular fat percentage and omega-3 polyunsaturated fatty acid content with gene markers in Australian lamb. *Meat Science*, közlés folyamatban.

- Knutson T. P., Chaves L. D., Hall M. K., Reed K. M. (2004): One hundred fifty-four genetic markers for the turkey (Meleagris gallopavo). *Genome*, 47(6): 1015-1028. p.
- Konieczny A., Ausubel F. M. (1993): A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 4(2): 403-410. p.
- Kruglyak L. (1997): The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature genetics*, 17(1): 21-24. p.
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J., Mesirov J. P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J. C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R. H., Wilson R. K., Hillier L. W., McPherson J. D., Marra M. A., Mardis E. R., Fulton L. A., Chinwalla A. T., Pepin K. H., Gish W. R., Chissoe S. L., Wendl M. C., Delehaunty K. D., Miner T. L., Delehaunty A., Kramer J. B., Cook L. L., Fulton R. S., Johnson D. L., Minx P. J., Clifton S. W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J. F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R. A., Muzny D. M., Scherer S. E., Bouck J. B., Sodergren E. J., Worley K. C., Rives C. M., Gorrell J. H., Metzker M. L., Naylor S. L., Kucherlapati R. S., Nelson D. L., Weinstock G. M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D. R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H. M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R. W., Federspiel N. A., Abola A, P., Proctor M. J., Myers R. M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D. R., Olson M. V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G. A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B. A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W. R., de la Bastide M., Dedhia N., Blöcker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J. A., Bateman A., Batzoglou S., Birney E., Bork P., Brown D. G., Burge C. B., Cerutti L., Chen H. C., Church D., Clamp M., Copley R. R., Doerks T., Eddy S. R., Eichler E. E., Furey T. S., Galagan J., Gilbert J. G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L. S., Jones T. A., Kasif S., Kaspryzk A., Kennedy S., Kent W. J., Kitts P., Koonin E. V.,

Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T. M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J. V., Mulder N., Pollara V. J., Ponting C. P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A. F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y. I., Wolfe K. H., Yang S. P., Yeh R. F., Collins F., Guyer M. S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K. A., Patrinos A., Morgan M. J., de Jong P., Catanese J. J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y. J.; **International Human Genome Sequencing Consortium** (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822): 860-921. p.

- Landers P. J., Oda R. P., Spelsberg T. C., Nolan J. A, & Ulfelder K .J. (1993): Capillary Electrophoresis: A powerful microanalytical technique for biologically active molecules. *BioTechniques*, 14: 98–111. p.
- Langella, O. (2002). Populations 1.2.32. Logiciel de génétique des populations. [cited 5 June 2011]. Available from Internet: http://www.bioinformatics.org/project/?group_id=84.
- Langella, O. (2011): Populations: Gene frequencies Downloads [Online]. Website last modified on February 13, 2011 (accessed on November 1, 2011). Available at http://www.bioinformatics.org/project/filelist.php?group_id=84
- Latch E. K, Smith E. J., Rhodes Jr O. E. (2002): Isolation and characterization of microsatellite loci in wild and domestic turkeys (Meleagris gallopavo). *Molecular Ecology Notes*, 2(2):176 - 178. p.
- Levy S., Sutton G., N. P. C., Feuk L., Halpern A. L., Walenz B. P., Axelrod N., Huang J., Kirkness E. F., Denisov G., Lin Y., MacDonald J. R., Pang A. W., Shago M., Stockwell T. B., Tsiamouri A., Bafna V., Bansal V., Kravitz S. A., Busam D. A., Beeson K. Y., McIntosh T. C., Remington K. A., Abril J. F., Gill J., Borman J., Rogers Y. H., Frazier M. E., Scherer S. W., Strausberg R. L., Venter J. C. (2007): The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS biology*, 5(10): e254. p.
- Li H.-F., Chem K.-W., Yang N., Song W.-T. & Tang Q..-P. (2007): Evaluation of genetic diversity of Chinese native geese revealed by microsatellite markers. *World's Poultry Science Journal*, 63(03): 381-390. p.
- Li H. (2013): Systems genetics in "-omics" era: current and future development. *Theory in bioscences*, 132(1): 1-16. p.
- Li J., Butler J. M, Tan Y., Lin H., Royer S., Ohler L., Shaler T. A., Hunter J. M., Pollart D. J., Monforte J. A., Becker C. H. (1999): Single nucleotide polymorphism determination using primer extension and time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis*, 20(6):1258-1265. p.
- Litos I. K., Ioannou P. C., Christopoulos T. K., Traeger-Synodinos J., Kanavakis E. (2007): Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by primer extension reaction in a dry-reagent dipstick format. *Analytical chemistry*, 79(2): 395-402 p.

- Litt M. & Luty J. A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44: 397-401. p.
- Liu S., Li P., Song Y., Li S. Z., Wei C. B., Yang H. M. (2006): Analysis of genetic variations in different goose breeds using microsatellite markers. *Yi Chuan*, **28**: 1389-1395. p.
- Liu Z., Crooijmans R. P. M. A., van der Poel J. J. & Groenen M. A M. (1996): Use of chicken microsatellite markers in turkey: a pessimistic view. *Animal genetics*, 27: 191-193. p.
- Lunt H. D., Hutchinson W. F. & Carvalho G. R. (1999): An efficient method for PCRbased isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular ecology*, 8: 891-893.
- Mardis E. R. (2008): Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9: 387-402. p.
- Marshall E. (2000a): Genome sequencing. Talks of public-private deal end in acrimony. *Science*, 287(5459): 1723-1725. p.
- Marshall E. (2000b): Human genome. Storm erupts over terms for publishing Celera's sequence. *Science*, 290(5499): 2042-2043. p.
- Marth G. T., Korf I., Yandell M. D., Yeh R. T., Gu Z., Zakeri H., Stitziel N. O., Hillier L., Kwok P. Y., Gish W. R. (1999): A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nature genetics*, 23(4): 452-456. p.
- Michaels S. D., Amasino R. M. (1998): A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 14(3): 381-385. p.
- Miesfeld R., Krystal M., Arnheim N. (1981): A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes. *Nucleic Acids Research*, 9(22): 5931-5947. p.
- Mihók S. (Szerk.) (2006): Tyúk, gyöngytyúk, pulyka, kacsa, pézsmaréce, lúd. Gazdasági állataink Fajtatan. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 107-194. p.
- Miller S. A., Dykes D. D., Polensky H. F. (1988): A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic acids research*, 16(3): 1215. p.
- Mock K. E., Theimer T. C., Rhodes O. E. Jr., Greenberg D. L., Keim. P. (2002): Genetic variation across the historical range of the wild turkey (*Meleagris gallopavo*). *Molecular ecology*, 11(4): 643-657. p.
- Mohammadi H., Shahrebabak M. M., Sadeghi M. (2013): Association between single nucleotide polymorphism in the ovine DGAT1 gene and carcass traits in two Iranian sheep breeds. *Animal Biotechnology*, 24(3): 159-167. p.
- Molnár T. (2004): A biomassza energetikai hasznosítása. Lélegzet, 14(11). p.

- Mueller U. G. & Wolfenbarger L. L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in ecology & revolution*, 14(10): 389-394. p.
- Muir W. M., Wong G. K., Zhang Y., Wang J., Groenen M.A., Crooijmans R. P., Megens H. J., Zhang H., Okimoto R., Vereijken A., Jungerius A., Albers G. A., Lawley C. T, Delany M. E., MacEachern S., Cheng H. H. (2008): Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 105(45): 17312-17317. p.
- Mullis K. B., Faloona F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods enzymology*, 155: 335-350. p.
- Murray J., Buard J., Neil D. L., Yeramian E., Tamaki K., Hollies C. & Jeffreys A. J. (1999): Comparative sequence analysis of human minisatellites showing meiotic repeat instability. *Genome research*, 9(2): 130–136. p.
- Myers G. (1999): A dataset generator for whole genome shotgun sequencing. *Proceedings Internationl Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 202-210. p.
- Mylecraine K. A., H. L. Gibbs, Anderson C. S., Shieldcastle M. C. (2008): Using 2 Genetic Markers to Discriminate Among Canada Goose Populations in Ohio. *Journal of wildlife management*, 72(5): 1220–1230.
- Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff, Mark K. E., White R. (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235(4796): 1616-1622. p.
- Nathans D. & Smith H. O. (1975): Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annual review of biochemistry*, 44: 273-293. p.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. Home Page. National Institutes of Health (NIH). 9000 Rockville Pike. Bethesda, Maryland 20892 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- Nei M, Tajima F., Tateno Y. (1983): Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153 –170. p.
- Nei M. (1987): "Molecular Evolutionary Genetics", New York, NY, USA: Columbia University Press. 208-327. p.
- Nonneman D. J., Rohrer G. A. (2003): Comparative mapping of a region on chromosome 10 containing QTL for reproduction in swine. *Animal genetics*, 34(1): 42-46. p.
- Oleykowski C. A., Bronson Mullins C. R., Godwin A. K., Yeung A. T. (1998): Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 26(20): 4597-4602. p.
- Oleykowski C.A., Bronson Mullins C.R., Chang D.W., Yeung A.T. (1999): Incision at nucleotide insertions/deletions and base pair mismatches by the SP nuclease of spinach. *Biochemistry*, 38(7): 2200-2205. p.

- Ostrander A., Jong P. M., Rine J., Duyk G. (1992): construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences, *Genetics*, 89: 3419-3423. p.
- Paetkau D. (1999): Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. *Biotechniques*, 26: 690-697. p.
- Page R. D.M. (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Cabios application note*, 12(4): 357-358. p.
- Park S. D. E. (2001): Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection University of Dublin. PhD thesis.
- Pecsenye K. (2006): Populációgenetika. Nagykovácsi. Pars Kft.164-170. p.
- Petersen J. L., Mickelson J. R., Cothran E. G., Andersson L. S., Axelsson J., Bailey E., Bannasch D., Binns M. M., Borges A. S., Brama P., da Câmara Machado A., Distl O., Felicetti M., Fox-Clipsham L., Graves K. T., Guérin G., Haase B., Hasegawa T., Hemmann K., Hill E. W., Leeb T., Lindgren G., Lohi H., Lopes M. S., McGivney B. A., Mikko S., Orr N., Penedo M. C., Piercy R. J., Raekallio M., Rieder S., Røed K. H., Silvestrelli M., Swinburne J., Tozaki T., Vaudin M., M. Wade C., McCue M. E. (2013): Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. *PLoS one*, 8(1): e54997. p.
- Picoult-Newberg L., Ideker T. E., Pohl M. G., Taylor S. L., Donaldson M. A., Nickerson D. A., Boyce-Jacino M. (1999): Mining SNPs from EST databases. *Genome research*, 9(2): 167-174. p.
- Pimkim M., Caretti E., Canutescu A., Yeung J.B., Cohn H., Chen Y., Oleykowski C., Bellacosa A., Yeung A.T. (2007): Recombinant nucleases CELI from celery and SP I from spinach for mutation detection. *BioMedCentral Biotechnology*, 1: 7–29. p.
- Ponsuksili S., Chomdej S., Murani E., Bläser U., Schreinemachers H. J., Schellander K., Wimmers K. (2005): SNP detection and genetic mapping of porcine genes encoding enzymes in hepatic metabolic pathways and evaluation of linkage with carcass traits. *Animal Genetics*, 36(6): 477-483. p.
- Primmer, C. R., Moller A. P., Ellegren H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular ecology*, 3: 365-378. p.
- Primmer C. R., Raudsepp T., Chowdhary B. P., Moller A. P., Ellegren H. (1997): Low frequency of microsatellite in Avian genom. *Genome research*, 7: 471-482. p.
- Pritchard L. E., Kawaguchi Y., Reed P. W., Copeman J. B., Davies J. L., Barnett A. H., Bain S. C. & Todd J. A. (1995): Analysis of the CD3 gene region and type 1 diabetes: Application of fluorescence-based technology to linkage disequilibrium mapping. Human molecular genetics, 4: 197–202. p.
- Purwantini I. & Purwantini D. (2010): An estimation of genetic variation in Indonesian local duck using microsatellite marker. *Asian journal of poultry science*, 4(4): 198-204. p.

- Quesada V., Velasco G., Puente X. S., Warren W. C., Lopez-Otin C. (2010): Comparative genomic analysis of the zebra finch degradome provides new insights into evolution of proteases in birds and mammals. *BioMedCentral Genomics*, 11: 220. p.
- Quing-Ping T., Shaung-Jie Z., Jun G., Kuan-Wei C., Huo-Lin L. & Jian-Dong S. (2009): Microsatellite DNA typing for assessment of genetic variability in Taihu goose: a major breed of China. *Journal of animal and veterinary advances*, 8(11): 2153-2157. p.
- Reed K. M., Mendoza K. M., Beattie C.W. (1999): Utility of chicken-specific microsatellite primers for mapping the turkey genome. *Animal biotechnology*, 10(3): 137-141. p.
- Reed K. M., Mendoza K. M. & Beattie C. W. (2000): Comparative analysis of microsatellite loci in chicken and turkey. *Genome*, 43: 796-802. p.
- Reed K. M., Roberts M. C., Murtaugh J., Beattie C. W., Alexander L. J. (2000b): Eight new dinucleotide microsatellite loci in tuekey (Meleagris gallopavo). *Animal* genetics, 31: 140. p.
- Reed K. M., Chaves L. D., Garbe H. R., Da Y., Harry D. E. (2003a): Allelic variation and genetic linkage of avian microsatellites in a new turkey population for genetic mapping. *Cytogenetic and genome research*, 102(1-4): 331-339. p.
- Reed K. M., Chaves L. D., Hall M. K., Knutson T. P., Rowe J. A., Torgerson A. J. (2003b) Microsatellite loci for genetic mapping in the turkey (Meleagris gallopavo). *Animal biotechnology* 14(2): 119-131. p.
- Reed K. M., Chaves L. D., Hall M. K., Kuntson T. P., Harry D. E. (2005): A comparative genetic map of the turkey genome. *Cytogenetic and genome research*, 111: 118-127. p.
- Reed K. M., Hall M. K., Chaves L. D., Knutson T. P. (2006): Single nucleotide polymorphisms for integrative mapping in the Turkey (Meleagris gallopavo). *Animal biotechnology*, 17(1): 73-80. p.
- Reed K. M., Chaves L. D., Mendoza K. M. (2007): An integrated and comparative genetic map of the turkey genome. *Cytogenetic and genome research*, 119: 113–126 p.
- Rédei P. Gy. (1987): Genetika. Mezőgazda Kiadó Gondolat. Budapest. 632-654. p.
- Rothschild M. F., Hu Z. L., Jiang Z. (2007): Advances in QTL mapping in pigs. *International journal biological sciences*, 3(3):192-197. p.
- Rudolph J. A., Spier S. J., Byrns G., Rojas C. V., Bernoco D., Hoffman E. P. (1992): Hyperkalemic periodic paralysis in horses. *Nature genetics*, 2: 144-147. p.
- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S. C., Kakol J. M., Stein L. D., Marth G, Sherry S., Mullikin J. C., Mortimore B. J., Willey D. L., Hunt S. E., Cole C. G., Coggill P. C., Rice C. M., Ning Z., Rogers J., Bentley D. R., Kwok P.-Y., Mardis E. R., Yeh R. T., Schultz B., Cook L., Davenport R., Dante M., Fulton L., Hillier L. D., Waterston R. H., McPherson J. D., Gilman B., Schaffner S., Van EttenW. J., Reich D., Higgins J., Daly M. J., Blumenstiel B., Baldwin J.,

Stange-Thomann N., Zody M. C., Linton L., Lander E. S. & Altshuler D. (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409: 928-933. p.

- Sambrook J., Frits E. F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning. Cold Spring Harbor, NY, USA: CSH Laboratory Press. 16.37. p.
- Schwenger B., Schöber S., Simon D. (1992a): Deficiency of uridine monophosphate synthase in cattle: A direct PCR test for carrier detection. *Animal Genetics*, 23(1): 57-58. p.
- Schwenger B., Schöber S., Simon D. (1992b): A Taq polymorphism at the bovine locus for uridine monophosphate synthase (UMPS). *Animal genetics*, 23: 82. p.
- Skinner B. M., Robertson L. B., Tempest H. G., Langley E. J., Ioannou D., Fowler K. E., Crooijmans R. P., Hall A. D., Griffin D. K., Völker M. (2009): Comparative genomics in chicken and Pekin duck using FISH mapping and microarray analysis. *BioMedCentral Genomics*, 10: 357. p.
- Smith E. J., Cheng H. H & Vallejo R. L. (1996): Mapping functional chicken genes: an alternative approach. *Poultry Science*, 75: 642–647. p.
- Smith E. J., Lyons L. A., Cheng H. H., Suchyta S. P. (1997): Comparative mapping of the chicken genome using the East Lansing reference population. *Poultry Science*, 76(5): 743-747. p.
- Soller M. & Beckmann S. (1982): Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement. Proceedings of the 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, *Madrid, Spain*, Vol. 6, pp. 396–404. p.
- Soller M. & Beckmann J. S. (1983): Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical Applied Genetics*, 67: 25–33. p.
- Stansfield W. D. (1997): Genetika. Budapest: Panem-McGraw-Hill Kiadó. 265-383. p.
- Stoneking M. (2001): Single nucleotide polymorphisms From the evolutionary past... *Nature*, 409: 421-422. p.
- Su Y. & Chen G. H. (2009): DNA microsatellite analysis of genetic diversity among Chinese indigenous laying-type ducks (Anas platyrhynchos). *Czech journal of animal science*, 3: 128–135. p.
- Sullivan K. M., Pope S., Gill P. & Robertson J. M. (1992): Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products. *PCR methods and applications*, 2: 34-40. p.
- Sunnucks P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends in ecology and evolution*, 15(5): 199-203. p.
- Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K. (1991): Allele-specific polymerase chain reaction: a method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. *Analytical biochemistry*, 192(1): 82-84. p.

- Sütő Z. (1997): A pulyka. A Gazda Kiadó és a Mezőgazda Kiadó közös kiadványa, 13.-42. p.
- Sváb J. (1971): A populációgenetika alapjai.Budapest: Mezőgazda Kiadó. 16. p.
- Szabó Gy. (2004): Az ivarérés idejét meghatározó QTL-ek genetikai térképezése tyúkban. Gödöllő: Szent István Egyetem, Doktori értekezés. 12-45. p.
- Szalay I. (2002) Régi magyar baromfifajták. Old Hungarian Poultry. Budapesr: Mezőgazda Kiadó. 14-18., 39-45., 74-77., 84-87. p.
- Szőke Sz., Komlósi I., Korom E., Márton I., Mihók S. (2004): A statistical analysis of population variability in Bronze Turkey considering gene conservation. Archiv für Tierzucht, 47(4): 377-385. p.
- Takashi H., Tsudzuki M., Sasaki O., Niikura J., Inoue-Murayama M., Minezawa M. (2004): A chicken linkage map based on microsatellite markers genotyped on a Japanese Large Game and White Leghorn cross. *Animal genetics*, 36: 463-467. p.
- Takezaki N., Nei M. (1996): Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389–399. p.
- Tautz D., Renz M. (1984): Simple sequences are ubiquitos repetitive components of eukaryote genomes. *Nucleic asids research*, 12: 4127-4138. p.
- Thorisson G. A. & Stein L. D. (2003): The SNP Consortium website: past present and future. *Nucleic acids research*, 31(1): 124-127. p.
- Tu Y. J., Chen K. W., Zhang S. J., Tang Q. P., Gao Y. S., Yang N. (2006): Genetic diversity of 14 indigenous grey goose breeds in China based on microsatellite markers. Asian-Australasian journal of sciences, 19(1): 1-6. p.
- Varga L., Szabó G., Darvasi A., Müller G., Sass M., Soller M. (1997): Inheritance and mapping of Compact (Cmpt) a new mutation causing hypermuscularity in mice. *Genetics*, 147(2): 755-764. p.
- Varga L., Müller G., Szabó Gy., Pinke O, Korom E., Kovács B., Patthy, L. & Soller M. (2003) Mapping modifiers affecting muscularity of the myostatin mutant (MstnCmpt-dl1Abc) Compact mouse. *Genetics*, 165: 257-267. p.
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P., Ballew R. M., Huson D. H., Wortman J. R., Zhang Q., Kodira C. D., Zheng X. H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P. D., Zhang J., Gabor Miklos G. L., Nelson C., Broder S., Clark A. G., Nadeau J., McKusick V. A., Zinder N., Levine A. J., Roberts R. J., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Di Francesco V., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A. E., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman T. J., Higgins M. E., Ji R. R., Ke Z., Ketchum K.

A., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov G. V., Milshina N., Moore H. M., Naik A. K., Narayan V. A., Neelam B., Nusskern D., Rusch D. B., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Wang Z., Wang A., Wang X., Wang J., Wei M., Wides R., Xiao C., Yan C., Yao A., Ye J., Zhan M., Zhang W., Zhang H., Zhao Q., Zheng L., Zhong F., Zhong W., Zhu S., Zhao S., Gilbert D., Baumhueter S., Spier G., Carter C., Cravchik A., Woodage T., Ali F., An H., Awe A., Baldwin D., Baden H., Barnstead M., Barrow I., Beeson K., Busam D., Carver A., Center A., Cheng M. L., Curry L., Danaher S., Davenport L., Desilets R., Dietz S., Dodson K., Doup L., Ferriera S., Garg N., Gluecksmann A., Hart B., Haynes J., Haynes C., Heiner C., Hladun S., Hostin D., Houck J., Howland T., Ibegwam C., Johnson J., Kalush F., Kline L., Koduru S., Love A., Mann F., May D., McCawley S., McIntosh T., McMullen I., Moy M., Moy L., Murphy B., Nelson K., Pfannkoch C., Pratts E., Puri V., Qureshi H., Reardon M., Rodriguez R., Rogers Y. H., Romblad D., Ruhfel B., Scott R., Sitter C., Smallwood M., Stewart E., Strong R., Suh E., Thomas R., Tint N. N., Tse S., Vech C., Wang G., Wetter J., Williams S., Williams M., Windsor S., Winn-Deen E., Wolfe K., Zaveri J., Zaveri K., Abril J. F., Guigó R., Campbell M. J., Sjolander K. V., Karlak B., Kejariwal A., Mi H., Lazareva B., Hatton T., Narechania A., Diemer K., Muruganujan A., Guo N., Sato S., Bafna V., Istrail S., Lippert R., Schwartz R., Walenz B., Yooseph S., Allen D., Basu A., Baxendale J., Blick L., Caminha M., Carnes-Stine J., Caulk P., Chiang Y. H., Coyne M., Dahlke C., Mays A., Dombroski M., Donnelly M., Ely D., Esparham S., Fosler C., Gire H., Glanowski S., Glasser K., Glodek A., Gorokhov M., Graham K., Gropman B., Harris M., Heil J., Henderson S., Hoover J., Jennings D., Jordan C., Jordan J., Kasha J., Kagan L., Kraft C., Levitsky A., Lewis M., Liu X., Lopez J., Ma D., Majoros W., McDaniel J., Murphy S., Newman M., Nguyen T., Nguyen N., Nodell M., Pan S., Peck J., Peterson M., Rowe W., Sanders R., Scott J., Simpson M., Smith T., Sprague A., Stockwell T., Turner R., Venter E., Wang M., Wen M., Wu D., Wu M., Xia A., Zandieh A., Zhu X. (2001): The sequence of the human genome. Science, 291(5507): 1304-1351. p. (Helyesbítés: 2001. Science, 292(5523): 1838. p.)

- Vergnaud G. & Denoeud F. (2000): Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome research*, 10: 899-907. p.
- Vignal A., Milan D., Sancristobal M., Eggen A. (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics selection evolution*, 34: 275-305. p.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M, van de Lee T., Hornes M. Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. és Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21): 4407-4414. p.
- Wallis J. W., Aerts J., Groenen M. A. M., Crooijmans R, P. M. A., Layman D., Graves T. A., Scheer D. E., Kremitzki C., Fedele M. J., Mudd N. K., Cardenas M., Higginbotham J., Carter J., McGrane R., Gaige T., Mead K., Walker J., Albracht D., Davito1 J., Yang S.-P., Leong S., Chinwalla A., Sekhon M., Wylie K., Dodgson J., Romanov M. N., Cheng H., de Jong P. J., Osoegawa K.,
Nefedov M.,. Zhang H, McPherson J. D., Krzywinski M., Schein J., Hillier LaD., Mardis E. R., Wilson R. K. és Warren W.C. (2004): A physical map of the chicken genome. *Nature*, 432: 761-764. p.

- Wang Y., Wallin J. M., Ju J., Sensabaugh G. F., & Mathies R. A. (1996): High-resolution capillary array electrophoretic sizing of multiplexed short tandem repeat loci using energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis*, 17: 1485–1490. p.
- Wang D. G., Fan J.-B., Siao C.-J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglou T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Morris M. S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T. J., Lipshutz R., Chee M. & Lander E. S. (1998): Large-scale identification mapping and genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the human genome. *Science*, 280(5366): 1077-1082. p
- Warren W. C., Clayton D. F., Ellegren H.-, Arnold A. P., Hillier L. W., Künstner A., Searle S., White S.-, Vilella A.J., Fairley S., Heger A., Kong L., Ponting C. P., Jarvis E. D., Mello C. V., Minx P., Lovell P., Velho T. A., Ferris M., Balakrishnan C. N., Sinha S., Blatti C., London S. E., Li Y., Lin Y.C., George J., Sweedler J., Southey B., Gunaratne P., Watson M., Nam K., Backström N., Smeds L., Nabholz B., Itoh Y., Whitney O., Pfenning A. R., Howard J., Völker M., Skinner B. M., Griffin D. K., Ye L., McLaren W. M., Flicek P., Quesada V., Velasco G., Lopez-Otin C., Puente X. S., Olender T., Lancet D., Smit A.F., Hubley R., Konkel M. K., Walker J. A., Batzer M. A., Gu W., Pollock D. D., Chen L., Cheng Z., Eichler E. E., Stapley J., Slate J., Ekblom R., Birkhead T., Burke T., Burt D., Scharff C., Adam I., Richard H., Sultan M., Soldatov A., Lehrach H., Edwards S. V., Yang S. P., Li X., Graves T., Fulton L., Nelson J., Chinwalla A., Hou S., Mardis E. R., Wilson R. K. (2010): The genome of a songbird. *Nature*, 464(7289): 757-762. p.
- Weber J. L., May P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American journal of human* genetics, 44(3): 388-396. p.
- Weiß B. M., Poggemann K., Olek K., Foerster K., Hirschenhauser K. (2008): Isolation and characterization of microsatellite marker loci in the greylag goose (Anser anser). *Molecilar Ecology Research*, 8: 1411-1413. p.
- Welsh J. & McClelland M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24): 7213-7218. p.
- Welsh J., Petersen C., McClelland M. (1991): Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic acids research*, 19(2): 303-306. p.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski' A. J. & Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22): 6531-6535. p.

- Wills C. (1991): Exons, introns, and talking genes: the science behind the Human Genome Project. New York: BasicBooks. 368. p.
- Wingerson L. (1990): Mapping our genes : the Genome Project and the future of medicine. *New York, Dutton*, c. 338. p.
- Wong G. K-S., Liu B., Wang J., Y. Zhang, Yang X., Z. Zhang, Q. Meng, J. Zhou, D. Li, J. Zhang, P. Ni1 S. Li, L. Ran, H. Li, J. Zhang, R. Li, S. Li, H. Zheng, W. Lin, G. Li, X. Wang, W. Zhao, J. Li, C. Ye, M. Dai, J. Ruan, Y. Zhou, Y. Li, X. He, Y. Zhang, J. Wang, X. Huang, W. Tong, J. Chen, J. Ye, C.Chen, N. Wei, G. Li, L. Dong, F. Lan, Y. Sun, Z. Zhang, Z. Yang, Yu Y., Huang Y., He D., Xi Y., Wei D., Qi Q., Li W., Shi J., Wang M., Xie F., Wang J., Zhang X., Wang P., Zhao Y., Li N., Yang N., Dong W., Hu S., Zeng C., Zheng W., Hao B., Hillier LaD. W., Yang S.-P., Warren W. C., Wilson R. K. Brandström M., Ellegren H., Crooijmans R. P.M.A., van der Poel J. J., Bovenhuis H., Groenen M. A. M., Ovcharenko I., Gordon L., Stubbs L., Lucas S., Glavina T., Aerts A., Kaiser P., Rothwell L., Young J. R., Rogers S., Brian A. Walker, van Hateren A., Kaufman J., Bumstead N., Lamont S. J., Zhou H., Hocking P. M., D. Morrice, de Koning D.-J., Law A., Bartley N., Burt D. W., Hunt H., Cheng H. H., Gunnarsson U., Wahlberg P., Andersson L., Kindlund E., Tammi M. T., Andersson B., Webber C., Ponting C. P., Overton I. M., Boardman P. E., Haizhou Tang, Hubbard S. J., Wilson S. A., Yu J., Wang J., Yang H. M. (2004): A genetic variation map for chicken with 2.8 million single nucleotide polymorphisms. International Chicken Polymorphism Map Consortium. Nature, 432(7018): 717-722. p.
- Wright S. (1965): The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395–420. p.
- Wu K. S., Jones R., Danneberger L., Scolnik P. A. (1994): Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic acids research*, 22: 445-451. p.
- Yue G. H., Kovacs B., Orban L. (2010) A New Problem with Cross-Species Amplification of Microsatellites: Generation of Non-Homologous Products, *Zoological Research*, 31(2): 131-140. p.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11: 1-16. p.
- Zhang L., Liu J., Zhao F., Ren H., Xu L., Lu J., Zhang S., Zhang X., Wei C., Lu G., Zheng Y. Du L.(2013): Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep. *PLoS One*, 8(6) :e66569
- Ziegle J.S., Su Y., Corcoran K.P., Nie L., Mayrand P.E., Hoff L.B., McBride L.J., Kronick M.N. & Diehl S.R. (1992): Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics*, 14: 1026-1031. p.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-83. p.

- Zimin A. V., Delcher A. L., Florea L., Kelley D. R., Schatz M. C., Puiu D., Hanrahan F., Pertea G., Van Tassell C. P., Sonstegard T. S., Marçais G., Roberts M., Subramanian P., Yorke J. A., Salzberg S. L. (2009): A whole-genome assembly of the domestic cow, Bos taurus. *Genome biology*, 10(4): R42. p.
- Zsolnai A., Fésüs L. (1997): Enhancement of PCR-RFLP typing of BLAD. *Biotechniques*, 23: 380-382. p.
- Zsolnai A. (2005) Molekuláris genetikai módszerek. (Szerkesztette: Heszky L., Fésüs L., Hornok L.: Mezőgazdasági biotechnológia.) Budapest: Agroinform Kiadó és Nyomda Kft. 241-263. p.

Hivatkozott internetes irodalom- és adatbázis jegyzék

Integrated Taxonomic Information System 2013 http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=176136 Beijing Genomics Institute (BGI)- http://www.genomics.cn/en/news/show_news?nid=98853 http://www.genomics.cn/en/news/show_news?nid=98853 http://www.ncbi.nlm.nih.gov ensemble adatbázis http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Annotation#assembly

10. MELLÉKLETEK

1. táblázat. A vizsgálatokhoz kiválasztott mikroszatellitek jellemzése. A táblázat tartalmazza a mikroszatellitek azonosítóját, az ismétlődő motívum leírását, a kimutatásukhoz használt primer párok szekvenciáit, az adott primerek fluoreszcens jelölését. Ezt az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban megtalálható jellemzők követik: a primerek használatával sokszorosítható ismétlődő motívumok génbanki azonosítója, illetve a várható termékek hossza (bázispárban megadva). Az utolsó oszlopban az adott primer párok irodalmi hivatkozása látható.

A tyúk a mikroszatellitet tartalmazó szekvenciát izolálták: 1) Cheng H. H. - irodalomban nem publikált; 2) Contact:. Cheng H. H. és de Leon A. P., - irodalomban nem publikált. 3) Gibbs et al. 1997, 4) Hanotte et al. 1997, 5) MCW007 primer pár: Crooijmans, R. P. M. A. és Groenen, M. A. M. - irodalomban nem publikált, 6) Crooijmans et al. 1996, 7) Crooijmans et al.1997.

Mikroszatellit azonosító	Ism. mot.	Primer A szekvencia (Forward)	Primer B szekvencia (Reverse)	Fluoreszcens festék	GeneBank azonosító szám	Méret (bp)	Irod. hiv.
ADL106	(TG)9	CATTCTCTGATTCTGCCTTT	AACTCCTGGTGTGCTACAAA	TET	G01550	150	1
ADL109	(CA)16	ATCTCCATAACTTCTGCTGC	AAAAATAAAATATCTCCCAG	TET	G01554	216	1
ADL114	(CAA)8	GGCTCATAACTACCTTTTTT	GCTCTACATTCCTTCAGTCA	FAM	G01726	185	1
ADL118	(CA)10A10	GATCACTCTTAGATGCCACA	AGAGAGGGGTTACAAGGCTG	FAM	G01729	163	1
ADL120	(TG)9	GCATTCCAACTCCCCTTTGG	ACCAGATATAACAGTCCTCT	FAM	G01731	153	1
ADL134	(CA)17	TTCCATAAGCCATCAATCAG	TTTTCCTCTCCCTCCATTTT	FAM	G01754	130	1
ADL142	(AC)11	CAGCCAATAGGGATAAAAGC	CTGTAGATGCCAAGGAGTGC	TET	G01567	231	1
ADL143	(TG)10(TA)5	CCTGTCTCTGGTCTTTATCC	AGTTTACTTCCTTTTCTTGC	TET	G01568	168	1
ADL146	(TG)16	GACCTGCATTGTCAGTGACC	TGCTTCCTACCCATTCTCCT	FAM	G01571	164	1
ADL147	(TG)9	CTGGTGAATGAGAAGCGATG	GCTGCGGCAATAAACTCCCT	HEX	G01572	211	1
ADL149	(CA)11	ATAGCATACACCCAGCCACC	GAATAAGAATGTTNCCCTGC	TET	G01574	227	1
ADL150	(GT)13	ATGCCAAGCATTACAGAAGC	CCTGCAGCACCTTTATCTCT	HEX	G01575	160	1
ADL160	(GT)11	TGGCAGAAATAAGGCAGTGC	ATTCATCGCTGGCATCTTGC	HEX	G01584	126	1
ADL166	(TG)15	TGCCAGCCCGTAATCATAGG	AAGCACCACGACCCAATCTA	HEX	G01588	135	1
ADL173	(TG)24	GCACAAGATGTTGAGCCACA	GCCTTCCCGTAAGTTTTTCA	HEX	G01595	152	1
ADL180	(TG)15	ACCAGAGCATCTACTGAAGA	AAACCTGGAAATGAAAGCAT	HEX	G01602	136	1
ADL191	(CA)12	AAAGGAAAGCCTATGTGAAT	AAAGCACCAAGCGAGATACA	TET	G01612	142	1

1. táblázat folytatása. A vizsgálatokhoz kiválasztott mikroszatellitek jellemzése. A táblázat tartalmazza a mikroszatellitek azonosítóját, az ismétlődő motívum leírását, a kimutatásukhoz használt primer párok szekvenciáit, az adott primerek fluoreszcens jelölését. Ezt az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban megtalálható jellemzők követik: a primerek használatával sokszorosítható ismétlődő motívumok génbanki azonosítója, illetve a várható termékek hossza (bázispárban megadva). Az utolsó oszlopban az adott primer párok irodalmi hivatkozása látható.

Mikroszatellit azonosító	Ism. mot.	Primer A szekvencia (Forward)	Primer B szekvencia (Reverse)	Fluoreszcens festék	GeneBank azonosító szám	Méret (bp)	Irod. hiv.
ADL234	(TG)10	CCCTGGGGCTCCCTCAGCAC	CTGGACGCGTGAAAAAGTTC	TET	G01654	164	1
ADL236	(CA)14	CTGGTTGTCAGTTGAAGGAC	ATAAGGTGGTGAGCAGCACT	FAM	G01656	132	1
ADL240	(CA)17	ACCTGGGAGATTGGATTCAA	CGTCCCGTCCTGANTGTTTG	HEX	G01660	130	1
ADL254	(TG)13	CAGCGTGGAAGCAATAAATG	CACTCATCCCACAACCACTG	FAM	G01674	133	1
ADL260	(CA)19	ATCAGCCCATCCCAGTATCG	GGAGCTGTCATCCACTCTTG	HEX	G01680	129	2
ADL266	(TG)15	GTGGCATTCAGGCAGAGCAG	AATGCATTGCAGGATGTATG	HEX	G01686	113	1
ADL268	(GT)12	CTCCACCCCTCTCAGAACTA	CAACTTCCCATCTACCTACT	TET	G01688	110	1
ADL272	(TG)11	TATGGTAAGGTGAGCAAACC	GGGAAAGCTATGAAAGATTT	TET	G01692	168	1
ADL292	(CA)12	CCAAATCAGGCAAAACTTCT	AAATGGCCTAAGGATGAGGA	FAM	G01710	127	1
ADL293	(CA)15	GTAATCTAGAAACCCCATCT	ACATACCGCAGTCTTTGTTC	TET	G01711	120	1
ADL300	(TG)19	TTTCCATGCAAGGNTAGGTG	CTGAAGGCATTCTCAAGGAG	FAM	G01715	172	1
ADL306	(TG)11	GTTACTGTATCTTGGCTCAT	TCAGTTTGACTTTCCTTCAT	FAM	G01721	127	1
ADL310	(GT)14	GTCTCTGGATCTCCTCTTCG	TGCACACTTCCCACTACAGG	HEX	G16079	145	1
ADL314	(GT)11	CCCCATAATTCTTTCAGTGC	CATCCAATGCAGACAGGACA	HEX	G16083	181	1
ADL353	(AC)22	AAATAAAGGTGTTGGCAGTT	CCCTGAAGTTGTGCTACCAC	FAM	G29061	158	2
ADL359	(GT)21	GGCAGCCAATCTGTCTTATT	TTGATTTTGGTCAGTGCTTT	HEX	G29066	220	2
ADL361	(CA)13	AGGGGCCTCACTATTTTCCT	GTAAACGGGGGGGGGGATTCAG	HEX	G29068	126	2
ADL366	(AC)17	AGCTCCTTGTACCCCTTTGC	CACCATTTGCCTCACCAACT	TET	G29072	227	2
ADL367	(AC)18	TGAAAAGTAAACAGGGAAAA	GACTGCAACAGCATTTGAGT	TET	G29073	114	2
LEI43	(CCAT)10	GGCCATTAGGACCCGGTTGG	CCTCCAAACCTCTGAGAAAGC	TET	X78623	93	3
LEI88	(CA)24	TGATTCACTTGATGGTCGAGG	GATCTAATGTGGAATGCCTGA	HEX	X82816	272	3

1. táblázat folytatása. A vizsgálatokhoz kiválasztott mikroszatellitek jellemzése. A táblázat tartalmazza a mikroszatellitek azonosítóját, az ismétlődő motívum leírását, a kimutatásukhoz használt primer párok szekvenciáit, az adott primerek fluoreszcens jelölését. Ezt az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban megtalálható jellemzők követik: a primerek használatával sokszorosítható ismétlődő motívumok génbanki azonosítója, illetve a várható termékek hossza (bázispárban megadva). Az utolsó oszlopban az adott primer párok irodalmi hivatkozása látható.

Mikroszatellit azonosító	Ism. mot.	Primer A szekvencia (Forward)	Primer B szekvencia (Reverse)	Fluoreszcens festék	GeneBank azonosító szám	Méret (bp)	Irod. hiv.
LEI91	(CA)23	TTCCCAAAACTCTTAAGTTGGAGG	AAGTGTGTGTGTAGACCTTCCAGGC	TET	X83244	163	3
LEI99	(AC)12	GATCTGGCAGAACAGAAACAG	ATATTTCACACCTGACCTGCG	FAM	X83237	121	3
LEI120	(CA)21	GCAAACAAACCTGCCACATCTG	AGAATGAAAAGGCTGTTCCCCA	FAM	X85511	338	3
LEI121	(AC)32(AT)4	TTGACGTCCTGGATAGATTAC	ATTATCCAGAACTAACATCAAC	FAM	X85536	383	3
LEI134	(CA)16	ATTCAAGCCCTGACTCAGCAGA	TTCCTGCACGTCCAGCTGTC	HEX	X82858	292	3
LEI161	(CA)13	TCACAATAACGTGGTAATTGAAGC	GTGAATTCAGCCTTTTCAAGCT	HEX	X85524	148	3
LEI163	(CA)25	ACTTGGGCATACTCTTGTTGC	CTGCAGGTACCGTGAGATGTG	FAM	X85527	190	3
LEI319	(CA)12	CTGGGGATAGGGAGGTGTTT	GTGTATGGCTATGCAGATTGC	FAM	X83981	99	4
MCW7	(TG)7	AGCAAAGAAGTGTTCTCTGTTCAT	ACCCTGCAAACTGGAAGGGTCTCA	FAM	G54469	310	5
MCW18	(TG)19	GGAATTTGAACACCTGAGATTTCC	CACTATGTTTATGGCAAACTCCTG	FAM	L40067	222	6
MCW29	(TG)30	CATGCAATTCAGGACCGTGCA	GTGGACACCCATTTGTACCCTATG	TET	L43634	167	6
MCW35	(CA)12	CAGAAACATTTGGACTTGGCTT	TTGCTTCATTTCTAGTCTCCAGTT	TET	L40059	242	6
MCW37	(CA)8	ACCGGTGCCATCAATTACCTATTA	GAAAGCTCACATGACACTGCGAAA	FAM	L43676	147	6
MCW68	(CA)9	CCTCACTGTGTAGTGTGGTAGTCA	GAGAAGCTTGAACCTACCAGTCTT	HEX	L43683	166	6
MCW80	(GT)10	GAAATGGTACAGTGCAGTTGG	CCGTGCATTCTTAATTGACAG	HEX	L40045	280	6
MCW83	(AC)11	TACATTTCAGAAGGAATGTTGC	GCCTTTCACCCATCTTACTGT	HEX	G31946	90	7
MCW89	(CA)9	CAAAACATGCCTTCAGAGCAAC	AAGCAGGAGAGAAGCTGCAGT	FAM	G31950	276	7
MCW102	(CA)13	AACACAGAACTGTTGGAATGG	TGTTAAAACCAAAATCTATCAGG	TET	L40073	224	6
MCW115	(CA)18	ATACCAACATCTGCCTCTGAC	GCAGTGTGTCTGACTAGCTCT	HEX	L40076	239	6
MCW169	(CA)23	GATCCCACTTGTTAAGAAGTG	CCTGACCTTACTGAGCTTGGA	HEX	L43667	92	6
MCW178	(TG)12	ACTGGAATTTTAGGGCAACAG	AACTGTTAGCTAATATGACCTG	TET	L43668	91	6

7. táblázat. A bronzpulyka mikroszatellitekel végzett vizsgálatok eredményeként kapott genotípusok. Az első oszlopban a bronz- (T) és a vadpulyka (V) egyedek azonosítóját tüntettem fel; míg a második oszlopban az egyedek neme látható. Ebben az oszlopban M (male): bak, F (female): tojó. Az első sor további oszlopai a vizsgálatban alkalmazott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek lenevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek lenevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazat mág a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazat mág a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazat mág a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazat mág a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazat mág a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazat mág a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazat mág a többi sorban az egyedek adott mikroszatellitek elnevezését tartalmazat mág a többi sorban az egyedek adott mikroszátellitek elnevezését tartalmazat mág adott mág adott mág adott má

Azonosító	Nem	ADL292	MCW18	ADL0293	ADL272	ADL149	ADL266	ADL150	MCW80	ADL353	ADL146	LEI43	ADL191	ADL142	MCW83	ADL361
T 1	F	128-128	200-200	99-99	-	224-224	96-104	138-138	-	-	-	-	-	210-218	-	-
Т 2	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	-	-	-	210-218	-	-
Т 3	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	-	142-142	-	-	-	218-218	-	-
T 4	F	128-128	200-200	-	-	-	-	-	-	142-142	-	99-99	-	218-218	75-75	120-120
Т 5	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	104-104	138-138	-	142-142	-	-	-	210-218	-	120-120
Т 7	М	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-107	138-138	210-218	75-75	106-120
Т 8	М	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	148-148	195-195	107-107	138-138	210-210	75-75	120-120
Т 9	М	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-107	138-138	218-218	75-75	120-120
T 10	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-222	96-96	138-138	-	142-142	195-195	99-103	138-140	218-218	75-75	120-120
T 11	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	142-150	195-197	99-103	138-140	218-218	75-75	120-120
T 12	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	104-104	138-138	276-276	148-148	195-195	99-99	-	218-218	75-75	106-120
T 13	F	128-128	200-200	99-99	168-168	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-138	210-218	75-75	106-120
T 14	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	103-107	138-138	210-218	75-75	120-120
T 15	F	128-130	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	140-140	210-218	75-75	120-120
T 16	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-140	218-218	75-75	106-120
T 17	F	128-128	200-200	99-99	168-168	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-140	218-218	75-75	120-120
T 18	F	-	-	-	-	-	-	-	-	142-148	195-195	99-103	138-138	210-218	75-75	106-120
T 19	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-140	210-218	75-75	106-120
Т 20	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-138	218-218	75-75	120-120
T 21	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	-	99-103	138-138	218-218	75-75	106-120
Т 22	М	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	210-218	75-75	106-120

7. táblázat folytatása. A bronzpulyka mikroszatellitekel végzett vizsgálatok eredményeként kapott genotípusok. Az első oszlopban a bronz- (T) és a vadpulyka (V) egyedek azonosítóját tüntettem fel; míg a második oszlopban az egyedek neme látható. Ebben az oszlopban M (male): bak, F (female): tojó. Az első sor további oszlopai a vizsgálatban alkalmazott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellittek kapott genotípusait láthatjuk.

Azonosító	Nem	ADL292	MCW18	ADL293	ADL272	ADL149	ADL266	ADL150	MCW80	ADL353	ADL0146	LEI43	ADL191	ADL142	MCW0083	ADL361
T 23	М	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	-	-	-	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	75-75	120-120
T 24	М	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	-	-	-	142-148	195-195	99-107	138-140	210-210	75-75	120-120
Т 25	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-140	210-218	75-75	120-120
T 26	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	140-140	210-218	75-75	120-120
Т 27	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-140	210-218	75-75	120-120
T 28	F	128-128	-	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	218-218	75-75	106-120
Т 29	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-140	218-218	75-75	106-120
Т 30	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-138	210-218	75-75	106-120
T 31	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	120-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-138	218-218	75-75	106-120
Т 32	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	75-75	106-120
Т 33	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	140-140	218-218	75-75	120-120
Т 34	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	75-75	120-120
Т 35	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	140-140	210-218	67-75	120-120
Т 36	F	118-128	200-200	99-99	160-168	224-228	96-96	138-138	276-280	142-148	195-195	99-103	138-138	210-218	67-75	106-120
Т 37	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-140	210-218	67-75	106-120
Т 38	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	-	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-140	218-218	75-75	106-120
Т 39	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-140	218-218	75-75	106-120
Т 40	F	128-128	200-200	-	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-107	138-138	218-218	67-75	106-120
T 41	М	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-140	210-218	75-75	106-120
T 42	М	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-138	210-218	75-75	106-120
T 43	М	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-150	195-197	103-103	140-140	218-218	75-75	106-120
T 44	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-138	218-218	75-75	106-120
Т 45	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-222	96-96	138-138	276-276	-	-	-	-	-	-	-

7. táblázat folytatása. A bronzpulyka mikroszatellitekel végzett vizsgálatok eredményeként kapott genotípusok. Az első oszlopban a bronz- (T) és a vadpulyka (V) egyedek azonosítóját tüntettem fel; míg a második oszlopban az egyedek neme látható. Ebben az oszlopban M (male): bak, F (female): tojó. Az első sor további oszlopai a vizsgálatban alkalmazott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellittek kapott genotípusait láthatjuk

Azonosító	Nem	ADL292	MCW18	ADL293	ADL272	ADL149	ADL266	ADL150	MCW80	ADL353	ADL0146	LEI43	ADL191	ADL142	MCW0083	ADL361
T 46	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	-	99-107	138-140	210-218	75-75	120-120
Т 47	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-140	210-218	75-75	120-120
T 48	F	128-128	200-200	99-108	160-160	222-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	67-75	120-120
T 49	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	104-104	138-138	276-276	148-148	195-195	99-99	-	218-218	67-75	106-120
Т 50	F	128-128	200-200	99-99	168-168	224-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-140	210-218	67-75	106-120
Т 51	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	140-140	218-218	67-75	106-120
Т 52	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-107	138-140	210-210	75-75	106-120
Т 53	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-138	218-218	67-75	106-120
Т 54	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	120-138	276-276	142-148	195-195	107-107	138-140	218-218	67-75	106-120
Т 55	F	128-128	200-200	99-99	168-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	210-218	67-75	106-120
Т 56	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	104-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	67-75	106-120
Т 57	F	128-128	200-200	99-99	160-160	-	96-96	138-138	-	142-142	-	99-103	-	218-218	75-75	106-120
Т 58	М	128-128	200-200	-	160-168	224-224	104-104	138-138	-	142-148	195-195	99-107	138-140	210-218	75-75	106-120
Т 59	М	128-128	200-200	-	160-160	222-224	96-96	138-138	-	142-142	195-195	99-103	138-140	218-218	75-75	106-120
Т 60	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-138	210-218	65-75	106-120
T 61	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	134-138	210-218	65-75	106-120
Т 62	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-96	138-138	276-276	148-148	195-195	99-107	138-138	210-210	65-75	106-120
Т 63	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	134-138	210-210	65-75	106-120
Т 64	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	218-218	65-75	106-120
Т 65	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	-	142-142	195-195	-	138-138	210-218	65-75	106-120
T 66	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-138	210-218	65-75	106-120
Т 67	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	134-138	210-210	65-75	106-120

7. táblázat folytatása. A bronzpulyka mikroszatellitekel végzett vizsgálatok eredményeként kapott genotípusok. Az első oszlopban a bronz- (T) és a vadpulyka (V) egyedek azonosítóját tüntettem fel; míg a második oszlopban az egyedek neme látható. Ebben az oszlopban M (male): bak, F (female): tojó. Az első sor további oszlopai a vizsgálatban alkalmazott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellittel kapott genotípusait láthatjuk

Azonosító	Nem	ADL292	MCW18	ADL293	ADL272	ADL149	ADL266	ADL150	MCW80	ADL353	ADL0146	LEI43	ADL191	ADL142	MCW0083	ADL361
T 68	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-140	218-218	65-75	106-120
T 69	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-138	210-218	67-75	106-120
Т 70	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-280	142-142	195-195	99-107	138-140	210-210	67-75	106-120
T 71	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-138	210-218	67-75	106-120
Т 72	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-103	138-138	210-210	67-75	106-120
Т 73	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	134-138	210-218	65-75	106-120
Т 74	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	-	142-148	195-195	99-103	138-138	210-218	67-75	106-120
Т 75	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	-	142-148	-	99-103	138-138	218-218	67-75	106-120
Т 76	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	103-107	134-138	210-218	65-75	106-120
Т 77	М	128-128	200-200	-	160-168	222-224	96-104	138-138	-	142-148	195-195	103-107	138-138	210-218	67-75	106-120
Т 78	М	128-128	200-200	-	160-160	222-224	96-96	138-138	-	142-148	195-195	99-107	138-138	210-218	67-75	106-120
Т 79	F	128-128	200-200	99-99	168-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	218-218	75-75	106-120
Т 80	F	128-132	200-200	99-99	160-160	224-224	104-104	138-138	276-280	142-148	195-195	99-107	138-140	210-210	67-75	106-120
T 81	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-107	-	210-218	67-75	106-120
T 82	F	128-132	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	-	142-142	195-195	99-103	-	210-218	65-75	106-120
Т 83	F	128-132	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	-	-	-	99-107	-	-	65-75	-
T 84	F	128-132	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	-	142-142	195-195	99-103	138-140	210-210	65-75	106-120
Т 85	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	103-103	138-140	210-210	67-75	106-120
T 86	F	128-132	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-280	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	67-75	106-120
T 87	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-103	-	210-218	67-75	106-120
T 88	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-280	142-142	195-195	99-103	-	210-218	67-75	106-120
T 89	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	-	-	-	142-142	195-195	107-107	-	210-218	65-75	106-120
Т 90	F	128-132	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	103-103	-	210-210	67-75	106-120

7. táblázat folytatása. A bronzpulyka mikroszatellitekel végzett vizsgálatok eredményeként kapott genotípusok. Az első oszlopban a bronz- (T) és a vadpulyka (V) egyedek azonosítóját tüntettem fel; míg a második oszlopban az egyedek neme látható. Ebben az oszlopban M (male): bak, F (female): tojó. Az első sor további oszlopai a vizsgálatban alkalmazott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellittek kapott genotípusait láthatjuk

Azonosító	Nem	ADL292	MCW18	ADL293	ADL272	ADL149	ADL266	ADL150	MCW80	ADL353	ADL0146	LEI43	ADL191	ADL142	MCW0083	ADL361
T 91	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	276-280	142-148	195-195	99-107	-	210-218	75-75	106-120
Т 92	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-140	210-218	75-75	106-120
Т 93	F	128-132	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-280	142-142	195-195	99-107	138-140	210-218	75-75	106-120
Т 94	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	104-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-138	218-218	67-75	106-120
Т 95	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-280	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	67-75	106-120
Т 96	F	128-132	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	-	142-148	195-195	99-103	138-140	210-218	67-75	106-120
Т 97	М	128-128	200-200	99-99	168-168	224-224	96-96	138-138	-	142-142	193-193	103-103	138-138	210-210	67-75	106-120
Т 98	М	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-104	138-138	-	148-148	193-195	103-103	138-138	210-218	65-75	106-120
Т 99	М	128-128	200-200	-	168-168	222-224	96-96	138-138	-	-	-	-	-	-	-	-
Т 100	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	138-138	276-276	148-148	195-195	99-107	138-140	210-218	67-75	106-120
T 101	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-138	218-218	67-75	106-120
T 102	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-138	218-218	67-75	106-120
Т 103	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	104-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-138	218-218	67-75	106-120
Т 104	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-103	138-140	218-218	67-75	106-120
Т 105	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	84-96	138-138	276-276	-	195-195	99-99	140-140	210-210	67-75	106-120
T 106	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	140-140	210-218	75-75	106-120
Т 107	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-103	140-140	210-218	67-75	106-120
T 108	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	84-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	218-218	67-75	106-120
Т 109	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	-	67-75	106-120
T 110	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-138	218-218	67-75	106-120
T 111	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-140	210-218	67-75	106-120
T 112	F	128-128	200-200	99-99	-	224-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-103	138-140	210-210	67-75	106-120
T 113	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-107	138-138	210-218	75-75	106-120

7. táblázat folytatása. A bronzpulyka mikroszatellitekel végzett vizsgálatok eredményeként kapott genotípusok. Az első oszlopban a bronz- (T) és a vadpulyka (V) egyedek azonosítóját tüntettem fel; míg a második oszlopban az egyedek neme látható. Ebben az oszlopban M (male): bak, F (female): tojó. Az első sor további oszlopai a vizsgálatban alkalmazott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellittel kapott genotípusait láthatjuk

Azonosító	Nem	ADL292	MCW18	ADL293	ADL272	ADL149	ADL266	ADL150	MCW80	ADL353	ADL0146	LEI43	ADL191	ADL142	MCW0083	ADL361
T 114	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-140	218-218	75-75	106-120
T 115	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	-	-	-	148-148	195-195	99-99	138-140	210-218	75-75	120-120
T 116	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	276-280	142-142	-	103-107	134-134	210-218	67-75	120-120
T 117	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	140-140	210-218	75-75	120-120
T 118	М	128-128	200-200	-	168-168	224-224	96-96	138-138	-	142-142	195-195	99-103	138-138	210-218	75-75	120-120
T 119	М	128-128	200-200	-	160-160	224-224	104-104	138-138	-	142-142	195-195	103-107	138-140	210-218	67-75	106-120
T 120	F	128-132	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-280	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	67-75	106-120
T 121	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-140	210-218	67-75	106-120
T 122	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-197	103-103	138-140	210-218	67-75	106-120
T 123	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	99-107	138-138	218-218	67-75	106-120
T 124	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	104-104	138-138	276-276	142-150	195-195	99-103	138-140	218-218	67-75	106-120
Т 125	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	103-103	138-138	210-218	67-75	106-120
T 126	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-222	96-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	138-140	218-218	75-75	106-120
T 127	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-107	140-140	218-218	67-75	106-120
T 128	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	148-150	195-197	99-103	138-140	218-218	67-75	106-120
T 129	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-150	-	99-103	138-140	218-218	75-75	106-120
T 130	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	104-104	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	138-138	210-218	75-75	106-120
T 131	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	142-142	-	103-107	140-140	218-218	67-75	106-120
T 132	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	138-138	276-276	142-142	-	99-107	138-140	218-218	67-75	106-120
T 133	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	103-107	134-134	210-218	67-75	106-120
T 134	F	128-128	200-200	81-99	160-168	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	103-103	138-140	210-218	67-75	106-120
T 135	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	140-140	218-218	75-75	106-120
T 136	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	-	138-138	276-276	-	195-195	99-107	138-140	210-218	67-75	106-120

7. táblázat folytatása. A bronzpulyka mikroszatellitekel végzett vizsgálatok eredményeként kapott genotípusok. Az első oszlopban a bronz- (T) és a vadpulyka (V) egyedek azonosítóját tüntettem fel; míg a második oszlopban az egyedek neme látható. Ebben az oszlopban M (male): bak, F (female): tojó. Az első sor további oszlopai a vizsgálatban alkalmazott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellittek kapott genotípusait láthatjuk

Azonosító	Nem	ADL292	MCW18	ADL293	ADL272	ADL149	ADL266	ADL150	MCW80	ADL353	ADL0146	LEI43	ADL191	ADL142	MCW0083	ADL361
T 137	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	134-134	210-218	67-75	106-120
T 138	М	128-128	200-200	-	-	-	-	-	-	142-148	-	99-103	138-140	218-218	75-75	106-120
T 139	М	128-128	-	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	-	99-99	140-140	218-218	75-75	106-120
T 140	М	128-128	200-200	-	160-160	224-224	96-96	138-138	-	142-142	195-195	99-99	140-140	210-218	75-75	106-120
T 141	М	128-128	200-200	-	160-160	222-224	96-96	138-138	-	142-142	-	103-103	138-140	210-218	75-75	106-120
T 142	М	128-128	200-200	-	160-160	224-224	96-96	138-138	-	142-148	-	99-99	138-138	210-218	75-75	106-120
T 143	М	128-132	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	-	142-142	-	103-107	-	210-210	75-75	106-120
T 144	М	-	-	99-99	160-160	222-224	-	-	-	142-148	-	99-103	-	210-210	75-75	106-120
T 145	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	104-104	138-138	276-276	142-148	-	103-103	138-138	210-210	75-75	106-120
V 149	М	128-128	200-200	87-99	160-160	222-224	96-104	120-138	276-276	142-148	195-195	99-111	140-140	210-218	67-75	106-120
Т 150	F	128-128	200-200	87-99	160-160	222-224	96-104	120-138	276-276	142-142	195-195	99-107	-	210-210	67-75	106-120
T 151	F	128-128	200-200	-	160-164	222-224	96-104	120-138	276-276	142-148	195-195	99-103	138-138	210-218	75-75	106-120
T 152	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	120-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	210-210	75-75	106-120
T 153	F	128-128	200-200	87-99	160-160	222-224	96-104	120-138	276-276	142-148	195-195	103-107	138-140	210-218	75-75	106-120
T 154	F	128-128	200-200	87-99	160-168	224-224	96-104	120-138	276-276	142-142	195-195	99-99	138-138	218-218	75-75	106-120
V 155	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-104	120-138	276-278	-	-	99-99	-	-	-	-
V 156	F	128-128	200-200	87-99	168-168	224-224	96-104	120-138	276-276	142-148	195-195	99-111	140-140	210-210	75-75	106-120
V 157	М	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-104	120-138	276-276	142-142	195-195	99-99	140-140	210-216	75-75	106-120
T 158	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-96	138-138	276-276	142-142	-	99-103	138-138	218-218	75-75	-
T 159	F	128-128	200-200	99-99	160-168	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-103	140-140	210-218	75-75	106-120
T 160	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-222	96-96	138-138	276-276	-	-	99-99	138-140	-	75-75	-
V 161	М	128-128	200-200	99-99	160-160	222-222	96-104	138-138	276-278	142-148	195-195	107-111	140-140	210-218	67-75	106-120

7. táblázat folytatása. A bronzpulyka mikroszatellitekel végzett vizsgálatok eredményeként kapott genotípusok. Az első oszlopban a bronz- (T) és a vadpulyka (V) egyedek azonosítóját tüntettem fel; míg a második oszlopban az egyedek neme látható. Ebben az oszlopban M (male): bak, F (female): tojó. Az első sor további oszlopai a vizsgálatban alkalmazott mikroszatellitek elnevezését tartalmazza, míg a többi sorban az egyedek adott mikroszatellittel kapott genotípusait láthatjuk

Azonosító	Neme	ADL292	MCW18	ADL293	ADL272	ADL149	ADL266	ADL150	MCW80	ADL353	ADL0146	LEI43	ADL191	ADL142	MCW0083	ADL361
T 162	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	276-276	142-148	195-195	99-99	138-140	210-218	65-75	106-120
T 163	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-278	142-142	195-195	99-103	138-138	210-218	67-75	106-120
T 164	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-224	96-96	138-138	276-276	142-148	195-195	103-103	140-140	210-210	67-75	106-120
T 165	F	128-128	200-200	99-99	160-168	222-224	96-104	138-138	-	148-148	195-195	99-103	138-140	218-218	67-75	106-120
T 166	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-96	138-138	276-276	142-142	195-195	99-99	140-140	210-218	65-75	106-120
V 167	М	-	-	-	-	-	-	-	-	142-148	195-195	99-111	140-140	216-218	67-75	106-120
T 168	F	128-128	200-200	99-99	160-160	222-222	104-104	138-138	-	142-142	195-195	99-107	138-138	218-218	67-75	106-120
T 169	F	128-128	200-200	99-99	160-160	224-224	96-104	138-138	-	142-142	195-195	99-103	138-140	218-218	67-75	106-120

12. táblázat. A fodros tollú lúd populáció egyedeinek genotípus adatai. A táblázat tartalmazza a lúd egyedek azonosítószámát, a mikroszatellit markerek elnevezéseit, a mikroszatellit allélek bázispárban megadott méretét. A "-" jelölés esetén nincs értékelhető eredmény.

Egyed- azonosító	LEI0120	MCW0018	ADL0142	ADL0361	MCW0080
FL 0001	270-270	208-208	202-204	103-103	-
FL 0002	270-270	208-208	202-204	103-103	-
FL 0003	270-270	206-208	204-204	103-103	-
FL 0004	270-270	206-208	202-202	103-115	-
FL 0005	270-270	208-208	202-204	103-103	-
FL 0006	270-270	208-208	202-204	103-115	-
FL 0007	270-270	-	-	103-103	-
FL 0008	270-270	-	-	103-103	-
FL 0009	270-270	206-206	202-202	103-103	-
FL 0011	270-270	-	-	103-103	-
FL 0012	270-270	208-208	202-202	115-115	238-238
FL 0061	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0014	270-270	206-208	196-202	115-115	206-238
FL 0062	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0016	270-270	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0017	270-270	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0018	270-270	208-208	202-204	115-115	206-238
FL 0019	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0020	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0021	-	208-208	202-202	115-115	238-238
FL 0022	270-270	206-208	202-204	-	206-238
FL 0023	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0024	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0025	-	206-208	196-202	115-115	206-238
FL 0026	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0063	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0028	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0029	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0030	-	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0031	270-270	206-206	196-202	115-115	206-238
FL 0032	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0034	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238

Egyed- azonosító	LEI0120	MCW0018	ADL0142	ADL0361	MCW0080
FL 0035	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0036	270-270	206-208	202-204	115-115	206-238
FL 0037	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0038	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0039	270-270	206-208	196-202	115-115	206-238
FL 0040	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0041	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0042	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0043	-	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0044	270-270	206-206	202-202	-	206-238
FL 0046	270-270	206-208	202-202	-	206-238
FL 0047	270-270	206-206	202-202	115-115	238-238
FL 0048	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0049	270-270	-	-	115-115	206-238
FL 0050	270-270	206-206	204-204	115-115	206-238
FL 0051	270-270	206-208	202-202	115-115	238-238
FL 0052	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0053	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0054	270-270	206-206	202-204	115-115	206-238
FL 0055	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0056	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0057	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0058	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0059	270-270	206-206	202-202	115-115	238-238
FL 0060	270-270	208-208	202-202	-	206-238
FL 0064	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0065	270-270	208-208	202-202	-	238-238
FL 0066	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0067	270-270	206-206	196-202	115-115	206-238
FL 0068	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0070	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0071	-	208-208	202-202	115-115	206-238

12. táblázat folytatása A fodros tollú lúd populáció egyedeinek genotípus adatai. A táblázat tartalmazza a lúd egyedek azonosítószámát, a mikroszatellit markerek elnevezéseit, a mikroszatellit allélek bázispárban megadott méretét. A "-" jelölés esetén nincs értékelhető eredmény.

12. táblázat folytatása. A fodros tollú lúd populáció egyedeinek genotípus adatai. A táblázat tartalmazza a lúd egyedek azonosítószámát, a mikroszatellit markerek elnevezéseit, a mikroszatellit allélek bázispárban megadott méretét. A "-" jelölés esetén nincs értékelhető eredmény.

Egyed- azonosító	LEI0120	MCW0018	ADL0142	ADL0361	MCW0080
FL 0072	-	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0073	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0074	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0075	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0077	270-270	206-208	196-202	115-115	206-238
FL 0079	-	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0081	-	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0082	-	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0083	-	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0085	-	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0086	-	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0087	-	-	-	115-115	206-206
FL 0088	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0090	270-270	206-208	202-204	115-115	206-238
FL 0091	270-270	208-208	202-202	115-115	238-238
FL 0092	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0093	270-270	-	202-202	-	206-238
FL 0094	270-270	206-208	196-202	115-115	206-238
FL 0095	270-270	208-208	202-204	115-115	206-238
FL 0096	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0097	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0098	-	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0099	-	206-208	202-202	-	206-238
FL 0100	270-270	208-208	202-202	-	206-238
FL 0101	-	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0102	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0103	-	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0104	270-270	206-208	202-202	115-115	238-238
FL 0105	-	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0106	-	208-208	202-204	115-115	206-238
FL 0107	-	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0108	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238

Egyed- azonosító	LEI0120	MCW0018	ADL0142	ADL0361	MCW0080
FL 0110	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0111	270-270	206-208	202-202	-	238-238
FL 0112	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0113	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0114	270-270	206-208	202-204	115-115	206-238
FL 0115	270-270	-	-	115-115	206-238
FL 0116	270-270	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0118	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0121	270-270	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0122	-	208-208	202-202	-	238-238
FL 0123	270-270	208-208	202-204	115-115	206-238
FL 0124	270-270	206-208	196-202	115-115	206-238
FL 0125	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0126	-	206-208	202-204	115-115	206-238
FL 0127	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0128	270-270	206-208	202-204	115-115	206-238
FL 0129	-	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0130	270-270	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0131	270-270	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0132	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0133	270-270	206-208	202-202	115-115	206-238
FL 0134	-	206-208	196-202	115-115	238-238
FL 0135	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0136	270-270	-	-	115-115	206-238
FL 0137	270-270	208-208	202-202	115-115	238-238
FL 0138	270-270	206-208	196-196	115-115	206-238
FL 0139	-	206-206	196-202	115-115	206-238
FL 0140	270-270	206-206	202-202	115-115	206-238
FL 0143	270-270	208-208	196-204	115-115	206-238
FL 0144	-	-	-	115-115	-
FL 0145	270-270	208-208	202-202	115-115	206-238
FL 0146	270-270	208-208	196-202	115-115	206-238

12. táblázat folytatása. A fodros tollú lúd populáció egyedeinek genotípus adatai. A táblázat tartalmazza a lúd egyedek azonosítószámát, a mikroszatellit markerek elnevezéseit, a mikroszatellit allélek bázispárban megadott méretét. A "-" jelölés esetén nincs értékelhető eredmény.

12.	táblázat	folytatása 🛽	A fodros	s tollú lúd pop	uláció egy	edeinek genot	ípu	i s adatai. A tá	iblázat t	artalmazza a
lúd	egyedek	azonosítósz	zámát, a	mikroszatellit	markerek	elnevezéseit,	a	mikroszatellit	allélek	bázispárban
meg	gadott mé	retét. A "-" j	elölés es	etén nincs érték	celhető ered	mény.				

Egyed- azonosító	LEI0120	MCW0018	ADL0142	ADL0361	MCW0080
FL 0147	270-270	204-208	202-202	-	206-238
FL 0148	270-270	208-208	196-202	115-115	206-238
FL 0149	-	204-208	196-202	115-115	206-238
FL 0150	-	-	202-204	115-115	238-238

14. táblázat. Új izolálású mikroszatellitek. A táblázatban a markerek neve után a kimutatásukhoz használt primerek szekvenciáját és hosszát, a mikroszatellitben található ismétlődő motívum leírását, az NCBI adatbázisban leírt szekvenciaazonosítókat láthatjuk. A táblázat utolsó oszlopában a kimutatás eredményéül kapott termék hosszát (bp) adtam meg.

Mikroszatellit	Primon grokyongia	Primerhossz	Ismátlődő motívum	Szekvencia	Termékhossz
elnevezés		(bp)		azonosító	(bp)
MC P001	TGGCAACAAGCACTGACGAA	20	(CA)/		80
MGruui	AACGCTTCAAAGAAACGGCTC	21	(CA)+	-	07
MC D002	CCCTTGGAACAGCTTTAGAA	20		_	100
MGI 002	CCAATAGCCTTTTGAAATCAG	21	(AAAC)0A(AAAC)5	-	177
MC D003	TGTGAGGTGGACAGGTGATG	20			144
MGI 003	TTTAGCAGGGTCTTATGACAGTG	23	(AIC)4	-	144
MC 2004	GCTATGTTCTTATGTTCCACCCTCA	25	(GAG)6	_	162
MG1 004	TGGCTACAAAACGAGACAGAGGAT	26	(0A0)0	-	102
MC D005	CCTGTGAATGCTTAGGTGATGA	22	(CA)A		242
MGF005	GATAGGCACACAAGACCATTAGTT	26	(CA)4		242
MC 2006	GCACTCCCCTGCCTCCT	17	(CA)5		122
MGI 000	AACCAGGTGTTTCCTTCGC	19	(CA)5	-	122
MC 2007	CACCTACACGCAGATGGC	18	(GT)7	_	03
MGI 007	CGATAAGCGGCTTGGC	17	(01)/	-)3
MC 2008	GAGTTAAAGGCTCCCTACCATT	22	(GT)7	_	158
MGI 008	TCGCAGTCAGGAGATTGGAT	20	(61)/	-	158
	GGGAGACCTCCAACCACGT	19	(TG)7	_	157
MG1009	CCTTTTCAGCCGCTACACC	19	(10)/	-	137
MCP010	AGTAAAAATAGGTTTGCCCGTA	22	(GT)7	DO526388 1	173
10101010	TTACGAGGCACCAGGACC	18	(01)/	DQ320300.1	175
MCD011	CAGCAATTTCTACGTCCTCTCA	22	(TC)22		152
MGPUII	CCACAGCTAAGTAACATTCCTCAT	24	(10)22	-	132

Mikroszatellit	Duimon grahvancia	Primerhossz	Iamátlődő matérum	Szekvencia	Termékhossz	
elnevezés	Frimer szekvencia	(bp)	Ismetiodo motivum	azonosító	(bp)	
MCD012	AGGTAGCACAGCCTTATTTCA	21		DO 407(22.1	95	
MGP012	ACCCAAGCCTCATTACAACA	20	(61)26C(61)1/161	DQ49/633.1	85	
MCD012	GGCAAAAGGGAGATCTAAGC	20	(\mathbf{TC})		125	
MGP015	AACAGGGCAAGGGATATGAT	20	(10)0	-	155	
MCD014	CTTTGCTGTGCTCAGGGAT	19	(CA)14C(CA)2		175	
MGF014	GCGATTGTTGGTAGTGTTGTT	21	(CA)14C(CA)2	-	175	
MCP015	TCTGATTTTATGGTTTCCTGAT	22	(AT)5(GT)4AT(TG)3		114	
WIGI 015	ATCTTGCTACTCAGTGAATCTACA	24	(A1)5(01)4A1(10)5	-	114	
MCP016	TGTGCATGCGCTTGTGA	17	$(\mathbf{C}\mathbf{A})\mathbf{Z}$		163	
MGF010	CACTATTGGTCACTGGGTCTG	21	(CA)/	-	105	
MCD017	TCCGTCCATCACATCCT	17	TG(GT)2(TG)4	- 1	178	
MGF017	CCTTGGCAGATATTAACTCA	20	10(01)2(10)4		178	
MCD018	GAGCAGGCTTTGAGCAGTC	19	(AC)10	DO407634 1	118	
WIGI 018	CAGAGATGTCCAGGTGTGTTG	21	(AC)10	DQ497034.1	110	
MCP010	CAGTGAAAATACCAGCCGATAC	22			178	
WIGI 019	ACTGGCTTTACCTCCCGTG	19	(CA))(CACO)2CAC		178	
MCD020	AGCTTGTGGATTGCTCCTT	19	(TG)7CG(CT)2G		150	
WIGF 020	CAGTTCTGCTACTCTGCGTTAC	22	(10)/20(01)20	-	139	
MCP021	TGTTGGTAGTGTTGTTGTCAGC	22	(CA)15		120	
1/101 021	TCACCCACAGGATGAAGGA	19	(CA)15	-	127	
MCP022	GGAGGTCAGTGAACACAGGAA	21	(GT)8	DO526381 1	128	
WIGF 022	ACACGGGTGAGAAGGCAGT	19	(01)8	DQ320301.1	120	

14. táblázat folytatása. A táblázatban a markerek neve után a kimutatásukhoz használt primerek szekvenciáját és hosszát, a mikroszatellitben található ismétlődő motívum leírását, az NCBI adatbázisban leírt szekvenciaazonosítókat láthatjuk. A táblázat utolsó oszlopában a kimutatás eredményéül kapott termék hosszát (bp) adtam meg.

Mikroszatellit	Drimon grolyconoio	Primerhossz	Iamátlődő matínum	Szekvencia	Termékhossz
elnevezése	Primer szekvencia	(bp)	Ismetiodo motivum	azonosító	(bp)
MC D023	ATCTTATTTGAATGGTGGTGTGG	23	TGC(TG)13		144
WIGI 025	ATTCTGCTGGTAGCCTTCCC	20	100(10)15	-	144
MC D024	ACTGCTTACTTTGATATGTGGTTC	24	(TG)2G(TG)9		166
MGF024	AGCTGACCCGTATAGTATCTGC	22	(10)20(10)9	-	100
MCD025	CAAATGTGCTGCTTGTGGTC	20	(TG)2(GT)10		112
WIGF 025	AGGGCTCTGGGAAGAAGTG	19		-	112
MCD026	GGCAGTGATTTCTCGCAGTCT	21	(CA)9		108
MGP020	GCCACTCCTAAAATTCCAGCA	21		-	198
MC D027	TTGCTGTTCGTATGAGAATGAC	22	(CA)15		00
MGF027	CACAAGCACGTCACAATCAA	20	(CA)13	-	00
MC D028	GCTACAGACCCAATCGCAG	19		-	102
MGF 028	TATTTCCTTGATGTGGAGTTGC	22	(AC)SCEAC		105
MCD020	AACCACCCATTTTCTTACGC	20	(GT)12	-	105
MIGF 029	TTAATCCAAGGACTGTGAGTCAA	23	(01)12		105
MCD020	GTGGAGAGTGTGAGCATACGC	21			124
MGP050	CAGAGATGCAACTCACAGCCT	21	(CA)9	-	154
MC D021	TCAGAGCGAGCAGGCAC	17	$(\Lambda C) \epsilon$	DO526201 1	129
MGF 051	GAGCTGGAGGGGGGGGGAGGATC	18	(AC)0	DQ320391.1	128
MC P032	CATGACCATGGAGCAGGAC	19	(CA)3(CA)4		130
WIGF 032	CGGCTGGAAACTCGTGAC	18	(CA)5(CA)4	-	150
MC D022	CCAGAACTGCACCTGTGAAT	20			165
WIGP055	TCGCTGTTGCTCACTCCA	18	(01)0(1A10)2	-	165

14. táblázat folytatása. A táblázatban a markerek neve után a kimutatásukhoz használt primerek szekvenciáját és hosszát, a mikroszatellitben található ismétlődő motívum leírását, az NCBI adatbázisban leírt szekvenciaazonosítókat láthatjuk. A táblázat utolsó oszlopában a kimutatás eredményéül kapott termék hosszát (bp) adtam meg.

Mikroszatellit	Duineau anglasan si s	Primerhossz	T	Szekvencia	Termékhossz	
elnevezés	r rimer szekvencia	(bp)	Ismetiodo motivum	azonosító	(bp)	
MCD034	GTTAGACAGCCTTGGTGCC	19	(TC)7		70	
MGr034	AAATGGGACTCTCCGCAG	18	(10)/	-	70	
MCD025	CAGGGGAGATTTCTGGAGTT	20		DO526282 1	76	
MGr035	GTGCCAATCACTAGGACTGTCT	22	(AC)0	DQ320382.1	70	
MCD026	CCAGAGCTGCTGCAACAAT	19	(TG)10		177	
MGP030	CCTGGTCTAGTGGTTGGTGAT	21	(10)10	-	177	
MCD027	ACTTCACTGCCTTTCTATTTGC	22	(4C)10		124	
MGP03/	CACAAAAACAGAGGAGAAATGG	22	(AC)10	-	124	
MCD029	CCCAGAAGCCTGAGTAACAA	20			122	
MGP038	AGGATGGTTCCACCTACAGTC	21	(AC)4	-	132	
MCD020	CTCCACCACCCCTGATGAT	19	(CA)		01	
MGP039	AGCACTGGGCTGCACGT	17	(CA)8	-	91	
MC D040	GGCTGCTCCTCACCATCTG	19	(TC)12	DO526282 1	210	
MGr040	GACCGCCTCACTTGGATTC	19	(10)15	DQ320383.1	219	
MCD041	TTAG:TGACAAAGACAGGCAAGC	23	(TC)2TA(TC)11		175	
MGP041	GATAGTCGTAGGGTCTGTTGTCTG	24	(10)31A(10)11	-	175	
MCD042	GGCTGCCTTGATGTCCTG	18			157	
MGP042	GATTTATGTCTGCGTGGTGC	20	(CA)40A(CA)5	-	157	
MCD042	AGCAGGTGGAATAAAGTAGCA	21	(TC)15	DO526202 1	115	
MGr043	GCTGTGGAGGGGAAAGG	17	(10)15	DQ320392.1	115	
MCD044	GATGGAGATGCTGATGCCT	19	(CA)15		172	
MGr044	GCCCGTGGTTGGTAAGAT	18	(CA)15	-	1/2	

14. táblázat folytatása. A táblázatban a markerek neve után a kimutatásukhoz használt primerek szekvenciáját és hosszát, a mikroszatellitben található ismétlődő motívum leírását, az NCBI adatbázisban leírt szekvenciaazonosítókat láthatjuk. A táblázat utolsó oszlopában a kimutatás eredményéül kapott termék hosszát (bp) adtam meg.

14. táblázat folytatása. A táblázatban a markere	k neve után a kimutatásukhoz haszná	Ilt primerek szekvenciáját és hoss	zát, a mikroszatellitben talá	ilható ismétlődő motívum leírását,
az NCBI adatbázisban leírt szekvenciaazonosítók	at láthatjuk. A táblázat utolsó oszlopá	ban a kimutatás eredményéül kap	ott termék hosszát (bp) adta	am meg.

Mikroszatellit	Daimon and have air	Primerhossz		Szekvencia	Termékhossz
elnevezése	Primer szekvencia	(bp)	Ismetiodo motivum	azonosító	(bp)
MC P045	CACATTTCTCAGTAAGCAGCAG	22			152
MGI 045	AAGCCTACCTCCCAGCG	17	(10)31C(11000(10)31A(10)4	-	152
МСР046	AGGCTTCAAGTGCTACCTGG	20	(AC)16	DO526385 1	103
14101040	GCAA:ACAG:AACATTAG:TTTGTAACA	28	(AC)10	DQ320383.1	175
MCD047	GATGAACAGGATCTTTGGAGG	21		D0526202 1	157
MGP047	CACAGGCTTTGGGAAGGA	18	(CA)4	DQ520595.1	157
MCD049	TTTGTCTTGACGCATCCCT	19			05
MGP048	ACTGCTCCTTACTACCAATCCA	22	(10)2	-	95
MCD040	TGGGCATCACTCATTACACAA	21	(CA)16	D0526296 1	105
MGP049	GAGAAAAGGGAAAATAATGATGAC	24	(CA)10	DQ520500.1	105
MCD050	GGAAGGAAACAACCACCAGT	20			186
MGP050	CAAAAAATGCTTAATGGTAAGAT	24	(CA)/	-	
MCD051	GGTTCTAAAGCAGTTCTGTTCC	22	$(CA)^2 A C(CA)^2$		04
MGF 051	GAGCGAAAGCGATGAGGT	18	(CA)SAC(CA)S	-	94
MCD052	CCACGAGCAGATGGAAGC	18			175
MGP052	CGCATGTGTTCTGCTACACTC	21	(AC)9	-	1/5
MCD052	TTGAATTAAATGATCTCCAAAGTG	24	(TC)7		151
MGP055	CAATCAGAGGCACTTCAAGC	20	(10)/	-	151
MCD054	AGCGGCTCACCATACTGTTA	20			164
MGP054	ATTGAAACCTACAGCCACCA	20	(CA)6	-	164
MCD055	AAGGCTGTTGGTCTGTCTCC	20	(TCC)6		142
MGP055	TGTCTGTTTCCCACCACTGA	20	(100)0	-	143

14. táblázat folytatása. A táblázatban a markerek neve után a kimutatásukhoz használt primerek szekvenciáját és hosszát, a mikroszatellitben található ismétlődő motívum leírását,
az NCBI adatbázisban leírt szekvenciaazonosítókat láthatjuk. A táblázat utolsó oszlopában a kimutatás eredményéül kapott termék hosszát (bp) adtam meg.

Mikroszatellit elnevezése	Primer szekvencia	Primerhossz	Ismétlődő motívum	Szekvencia azonosító	Termékhossz
		(bp)			(bp)
MGP056	GAGCATCTTCCATTCCCTTC	20	(CA)8	-	130
	ATTGCAGTATAGTTAAGGCTTTGA	24			
MGP057	TTGAAGGCGTGGTGCATA	18	(AC)12	-	125
	ATTCAATGGGAACAAGCCTAC	21			
MGP058	GTCTTGCTCCTTCTTCATT	22	(CA)6A(CA)4	-	88
	CGCTGCAGGGATTCTTATT	19			
MGP059	CCATCAGCACAGCAGGACTT	20	(CA11	-	106
	GTTAGCAGCAGCCACACCTT	20			
MGP060	GGCAAGGGAGGGCAGAA	17	(CA)6	-	218
	CCATCAGCAGAGCAGTCCAG	20			
MGP061	CCACACGCATCACTCAGC	18	(CA)7	-	126
	CAGGGCGAGGAGGAGAA	17			





M18 Nte0804snp Nte030 Nte0286 Nte030 Nte0286 Nte030 Nte0286 Nte0499 MNT106 Nte0534

19/a. ábra. A pulyka 1. kromoszómája (MGA1)

Az ábrán a pulyka 1. kromoszómájára térképezett markereket láthatjuk. Piros kerettel kiemelve az MGP040 és MGP46 markerek láthatóak. Az MGA1 mellett a tyúk 1. homológ kromoszómája (GGA1) és pirossal bekeretezve az izolált pulykamarkerek láthatóak.





Az ábrán a pulyka 2. kromoszómájára térképezett markereket láthatjuk. Piros kerettel kiemelve az MGP035, MGP18, MGP049 és az MGP31 markerek láthatóak. A MGA2 mellett a vele homológ tyúk 3. kromoszómát, és a rajta megtalált MGP035, MGP18-at láthatjuk.



19/c. ábra. A pulyka 3. kromoszómája (MGA3)

A piros keretben jól látható mind a pulyka 3., mind a vele homológ tyúk 2. kromoszómán az MGP010-es mikroszatellit.

MNT391 MNT157 Nte0971

End



19/d. ábra. A pulyka 8. kromoszómája

Az ábrán a pulyka 8. kromoszómája és a rajta lévő MGP022-es mikroszatellit marker látható (piros keretben).

A vele homológ tyúk 6. kromoszómára nem tudták térképezni ezt a mikroszatellit markert.



Start

End

ADI 184

MNT082

MGP047 Nte0914 H

Nte0022 Nte0149 Nte0572 Nte0732 MNT-Rm02/Nm20

0

19/e. ábra. A pulyka 19. kromoszómája (M19)

M34

Az ábrán a pulyka 19. (M19) és a vele homológ tyúk 13-as (GGA13) kromoszómájára térképezett markereket láthatjuk. Piros kerettel kiemelve az új izolálású MGP043 mikroszatellit markert jelöltem.

MNT243



19/f. ábra. A pulyka 35. kromoszómája (M35)

Az ábrán a pulyka 35. (M35) és a vele homológ tyúk 18. (GGA18) kromoszómájára térképezett markereket láthatjuk. Piros kerettel kiemelve találjuk meg az új izolálású MGP047 mikroszatellit markert.



19/g. ábra. A pulyka 11. kromoszómája (M11)

Az ábrán a pulyka 11. kromoszómája és a rajta lévő MGP012-es mikroszatellit marker látható (piros keretben). Sajnos a vele homológnak térképezett tyúk kromoszómán nem található meg ez a mikroszatellit marker.

19/h. ábra. A tyúk 11. kromoszómája (GGA11)

Az ábrán a tyúk 11. kromoszómája és a rajta lévő MGP012-es mikroszatellit marker látható (piros keretben).

A GGA11. tyúk kromoszóma mellett található a vele homológ M9. pulyka kromoszóma, de ezen nem találták meg ezt a mikroszatellit markert (MGP012).





KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segítségével bármilyen módon is hozzájárult dolgozatom elkészítéséhez.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek:

Dr. Kovács Balázsnak és Dr. Varga Lászlónak, hogy e hosszúra nyúló munkában végig ösztönöztek, segítettek, és irányítottak a helyes irányba.

Hálával tartozom Csenki-Bakos Katalinnak, Dr. Veress Gyulának, Dr. Szabó Gyulának, Pinke Orsolyának, Sóvári Krisztinának, Galli Györgyné Zsuzsának, vagyis az egész Géntérképezés Állatokon Csoportnak a lelki, elméleti és a kísérletek gyakorlati megvalósításához nyújtott segítségükért.

Külön köszönettel tartozom a családomnak, akik végig mellettem álltak, és bíztak abban, hogy egyszer eljutok idáig.