

Szent István Egyetem

MIKROSZATELLITEK ADAPTÁLÁSA ÉS IZOLÁLÁSA
PULYKA ÉS LÚD ÁLLOMÁNYOK VIZSGÁLATÁHOZ

Doktori értekezés (PhD) tézisei

Kurjárné Korom Edit

Gödöllő

2013

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 Környezettudományi Kar
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet,
Halgazdálkodási Tanszék

Társ-témavezető: 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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK.....	4
2. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	5
3. AZ EREDMÉNYEK	11
3.1. Mikroszatellitek adaptálása	11
3.1.1. Bronzpulyka	11
3.1.2. Fodros tollú lúd	12
3.2. A génrezerv bronzpulyka populáció populációgenetikai vizsgálata	13
3.3. Új mikroszatellitek izolálása	13
3.3.1. Pulyka.....	13
3.3.2. Lúd	13
3.3.3. Az új pulyka mikroszatellitek térképpozíciójának megállapítása szekvenciaadatok felhasználásával	13
4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	15
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	21
6. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK.....	22
6.1 Az értekezés témakörében megjelent közlemények.....	22
6.2 Az értekezés témaköréhez szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények.....	23

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. A munka előzményei

A közeli jövőben várható élelmiszerhiány elkerülése érdekében az élelmiszer mennyiségét legalább a duplájára kellene növelni (Baile 2000, Eggen 2012). 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. 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 egyike volt a mikroszatellit marker, mint hatékony **molekuláris eszköz, mára már a fajok genomi szekvenciájának** meghatározása került előtérbe.

A technika fejlődése felgyorsította a folyamatot, és ma már több mint 80 gerinces genomjának teljes szekvenciaadata ismert, ám ez a szám szinte napról napra növekszik (Ensembl Genome Browser - www.ensembl.org). Mindezek ellenére 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 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).

Fel kell hívjam a figyelmet a génrezerv állományok fontosságára, hiszen jelenünk modern állattenyésztése segítségével bármikor visszanyúlhat az „ősi” gének tartalékaihoz, mivel a különböző nemesítési

módszerek alkalmazása a fajtákon belül a genetikai variabilitás csökkenéséhez vezet. A baromfi fajok húsa, köztük a pulykái 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, (intenzív tartásmód esetében) illetve, hogy rövid idő alatt igen nagy mennyiségű termék (mellhús, combhús) előállítására képesek (különösen a nagytestű hústermelő hibrideket tekintve).

1.2. Az értekezés célkitűzései

- 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. A markerek használhatóságuk tesztelése, kimutatásuk optimalizálása.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Kísérletben szereplő állatok

2.1.1. 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 röptetőkből. Egy vonalat 3-4 bak és a hozzájuk tartozó tojók (3-4 tojó/bak) alkotják.

A dúsított mikroszatellit könyvtár létrehozásához tíz, az ország több őstermelőjétől gyűjtött bronzpulyka egyedek vérmintáit használtam fel.

2.1.2. Fodros tollú lúd

A populációgenetikai vizsgálatokat adaptált tyúk mikroszatellitokkal végeztem a DE AGTC Állattenyésztési Tanszékének kísérleti telepén fenntartott génrezerv fodros tollú lúdpopuláció 132 egyedétől vett vérmintákból izolált DNS-en.

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

2.1.3. Mintagyűjtés módszere

A pulykák és ludak egyedi jelzést (szárnykrotália) kaptak a későbbi pontos azonosítás érdekében, míg a vérmintákat alvadásgátlót (0,056 M trinátrium-citrát és 0,086 M NaCl) tartalmazó, egyedi jelzéssel ellátott Falcon-csövekbe gyűjtöttem.

2.2 DNS izolálás, minősítés és tárolás

2.2.1 DNS izolálás sós-kicsapásos módszerrel - genotípus meghatározáshoz

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

Ebben az esetben KCl, NaCl, EDTA és SDS megfelelő arányú keverékével, és a centrifugálás alkalmazásával végeztem a kicsapást, befejezésül izopropanolos kicsapás következett. Az alkoholos mosás utáni szárítást követően TE pufferbe (0,01 M Tris-HCl 0,001 M EDTA) oldottam vissza a DNS-t, és a továbbiakban 4 °C-on tároltam.

2.2.2. 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 ezt is TE pufferben oldottam fel.

2.2.3. 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 µg/µl töménységűek 1,8-2 tisztaság mellett (260/280 nm). A nem megfelelő minőségű mintákat újra preparáltam, majd egységesen 0,05 µg/µl koncentrációra hígítottam, és a PCR reakciókban közvetlenül ezeket használtam. Mind a tömény, mind a hígított DNS mintákat a továbbiakban +5 °C-on tároltam.

2.3. Tyúk mikroszatellitek adaptációja pulyka és lúd állományok vizsgálatához

2.3.1. Az adaptált mikroszatellitek kimutatásának optimalizálása

A pulyka mikroszatellit adaptáláshoz Reed és munkatársai 2000-es cikke alapján választottam ki 56 db fluoreszcensen jelölt tyúk mikroszatellit, amelyeket a lúd vizsgálatokhoz is használtam.

2.3.2. Mikroszatellitek kimutatása ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-en

A mikroszatellit allélok bázispár pontosságú méret-meghatározását minden esetben fluoreszcens kapilláris gélelektroforézis (ABI PRISM 310 Genetikai Analizátor) segítségével végeztem. Az elektroforézis során a primerhez kötött fluoreszcens festéket (6-FAM, TET, HEX, TAMRA) lézerfény gerjeszti, az ennek hatására bekövetkező, eltérő hullámhosszú emissziókat méri és elemzi a hozzá kapcsolt számítógép. Megoldható volt az, hogy egy elválasztás alatt ne csak egy,

hanem több azonos festékkel jelölt lókuszt is kimutassak akkor, ha azok méretben megfelelően elkülöníthetők voltak.

2.4. A genotípus adatok populációgenetikai jellemzése

A mikroszatellit elemzésből kapott genotípus adatokat táblázatokba összesítettem, és ezekből számítottam ki az egyes populációkat jellemző mérőszámokat: a várt heterozigotitást (expected heterozygosity - H_e) és a valós heterozigotitást (observed heterozygosity - H_o) állományokra és lókuszekre is, hogy információt nyerjek azok heterogenitásáról. A kettő hányadosából számítottam a fixációs indexet, amely a populáció Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérését mutatja, illetve az abból levonható megállapításokhoz ad segítséget. Vizsgáltam a populációban detektált allélek számát, az allélek frekvenciáját (p_i), a polimorfizmus információ tartalmát (PIC) és az egyedek közötti genetikai távolságot (D_A).

Az adatok elemzését a Populations (Langella 2011) és a Microsatellite Toolkit (Park 2001) nevű programok használatával készítettem el. A heterozigotitás értékek közötti eltérés szignifikancia szintjét Markov lánc módszerrel (Guo és Thompson, 1992) határoztam meg ARLEQUIN 3.5 program segítségével (Excoffier et al. 2005).

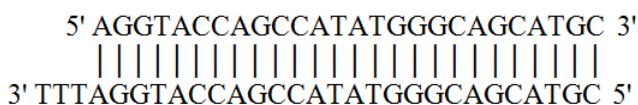
2.4. Ismétlődésekben dúsított könyvtár létrehozása

2.4.1 A DNS feldarabolása endonukleáz enzimekkel, és az adapter hozzákapcsolása

A Glenn és Schable által (2005) leírt módon végeztem a mikroszatellit szekvenciákban dúsított könyvtár elkészítését. Három, heterogametikus ivari kromoszómával rendelkező pulyka (tojó) kevert genomi DNS mintáiból készítettem a könyvtárakat, amelyhez fenol-kloroformos módszert (Blin és Stafford 1976) alkalmaztam. 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. A könyvtárkészítés során következő dúsítási lépés elősegítéséhez az ismétlődés tartalmú fragmentek végeihez saját tervezésű adapterszekvenciát ligáltam (1. ábra). Ehhez a duplaszálú

adapter elkészítéséhez a két egymással homológ szekvenciájú oligonukleotidot használtam azonos mennyiségben, a PTC-200 (MJ Research) PCR gépben először 95 °C-ra melegítettem, majd lassan (1 °C/sec) szobahőmérsékletűre hűtöttem.

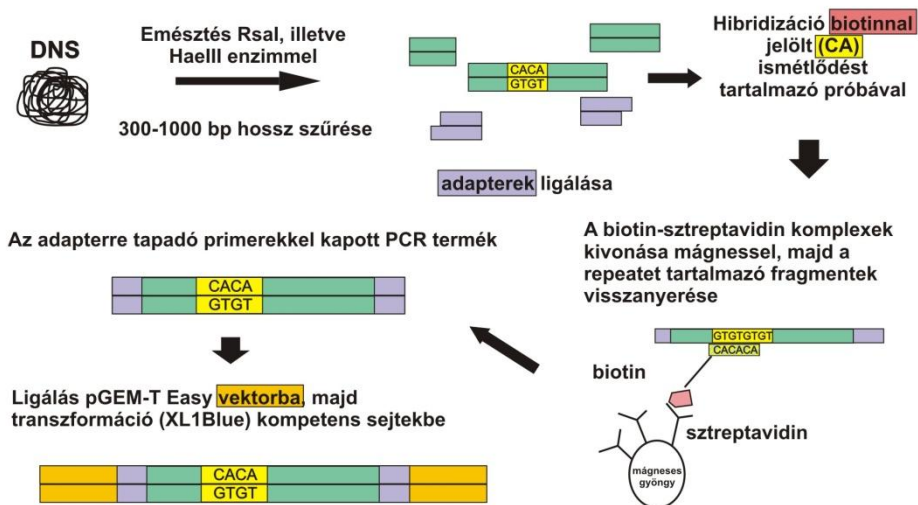
Ezután ezt a duplaszálú linkert ligáltam az emésztett fragmentekhez, amelynek eredményességét egy, a linkerszekvenciára tapadó primer segítségével PCR-el ellenőriztem.



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

2.4.2. 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) protokolljának módosított változatával. Az emésztést követően a fragmentek közül kiszűrtem a 500-1200 bp méretű fragmenteket, majd ezek végeire ligáltam a kétszálú adapterszekvenciát. A következő lépésben a biotinnal jelölt oligókat és a hozzájuk hibridizált DNS molekulákat sztreptavidinnel borított mágneses gyöngyök (MagneSphere, Promega) felületére kötöttem. Ezt követően biotinnal jelölt sztreptavidines gyönggyel kiválasztottam az ismétlődést tartalmazó szekvenciákat, és PCR-t alkalmazva kétszálúvá alakítottam őket. Ezután pGEM T-Easy vektorba ligáltam.



2. ábra. A dúsitott könyvtár létrehozásának lépései. A kevert DNS enzimes emésztését (RsaI ill. HaeIII) és az 500-1200 bázis mérttartományú fragmentek kiszűrését követően a fragmentekre adapterszekvenciákat ligáltam. A biotinnal jelölt sztreptavidines gyönggyel elkülönítettem az ismétlődést tartalmazó szekvenciákat, és PCR-rel kétszálúvá alakítottam őket, majd pGEM T-Easy vektorba ligáltam őket és megállapítottam a szekvenciájukat.

2.4.3. Könyvtár szűrése - kolónia-PCR és PIMA-PCR használatával

A pGEM-T Easy plazmidről M13 forward, M13 reverse primerekkel induló kolónia PCR-rel a plazmidba épült inszert nagyságát ellenőriztem. Ezek közül a PIMA-PCR segítségével válogattam ki az ismétlődést hordozókat. Ebben az M13 forward és M13 reverse primerek mellett még egy CA primert alkalmaztam, amelynek szekvenciája: (AC)₈DN volt. A dústítás megfelelően sikerült, így a későbbiekben ezt a lépést elhagytam.

2.4.4. Szekvencia meghatározás és primer tervezés

A két fragmentet adó klónok esetében meghatároztam az inszertek szekvenciáját. Ezt ABI PRISM 310 Genetic Analyser gépen (Applied Biosystems), Big Dye Terminator 3.1 kit alkalmazásával végeztem, a gyártó ajánlásai szerint. Oligo Explorer programmal terveztem specifikus primereket. Erre csak akkor volt lehetőség, ha az ismétlődést határoló

szekvenciárész elég hosszú volt, és lehetővé tette egy 18-25 bázis hosszúságú primer tervezését.

2.4.5. Új mikroszatellitek és kimutatásuk optimalizálása

Az új mikroszatellitek működését optimalizáltam, ennek első lépéseként Oligo Analyser program segítségével ellenőriztem a primerek optimális működési hőmérsékletét (T_m), és beállítottam a reakcióban használt $MgCl_2$ koncentrációt, majd a PCR hőmérsékleti profilját határoztam meg.

3. AZ EREDMÉNYEK

3.1. Mikroszatellitek adaptálása

3.1.1. Bronzpulyka

A vizsgálatokhoz előzetes irodalmi adatok alapján 56 mikroszatellit marker került kiválasztásra. Ebből 46 esetében (82,1%) sikerült specifikus PCR terméket detektálni, melyekből 20 mikroszatellit volt a vizsgálati tesztállományon polimorf (35,7%).

A fluoreszcens jelölésnek fontos szerepe volt a kimutatási csoportok (szettek) kialakításánál. A PCR reakcióban alkalmazott primer- és $MgCl_2$ koncentráció, a PCR hőmérsékleti profil és a reakciók végtermékeinek hossza (bp) mellett a fluoreszcens jelölés figyelembe vételével lehetett a kimutatási csoportokat kialakítani az ABI PRISM 310 Genetic Analyseres kimutatáshoz.

A pulyka esetén az állományok egyedeinek vizsgálatához összesen 15 mikroszatellitből (az I. és II. mikroszatellit csoport) állítottam össze két kimutatási csoportot. Az első csoportban 8 (1. táblázat), míg a második csoportban 7 (2. táblázat) mikroszatellit együttes kimutatása vált lehetővé. A termék felszorzósításhoz multiplex (azaz 3) sokszorzítási csoportot sikerült a termékméret és a fluoreszcens jelölés figyelembe vételével kialakítanom.

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

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

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

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

3.1.2. Fodros tollú lúd

A lúd mikroszatellit adaptálás esetében 26 mikroszatellitot választottam ki irodalmi adatok alapján. Ezek közül 16 esetében kaptam specifikus, azaz a lúdra jellemző terméket (61%).

3. táblázat: **Lúd vizsgálatához kialakított mikroszatellit csoport.** A táblázat tartalmazza a mikroszatellit primerek nevét, fluoreszcens jelölését és az alkalmazásukkal kapott termékek bázisban megadott mérettartományát.

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

A tesztmintákon 9 mikroszatellit bizonyult polimorfnek (34,6%). A további vizsgálatokhoz 5 mikroszatellit tudtam kiválasztani, amelyeket egy kimutatási csoportba tudtam rendezni (3. táblázat) a fluoreszcens jelölés alapján.

3.2. A génrezerv bronzpulyka populáció populációgenetikai vizsgálata

A vizsgált bronzpulyka és fodros tollú lúd állomány alléljeinek ismeretében számításokat végeztem, amelyekkel jellemezni tudtam mind a két állományt. Ezek a mérőszámok a következők voltak: a várt és a vizsgálatokban kapott allélek száma és mérete. A vizsgált állományra jellemző főallélek és a ritka allélek. Ezekből számítottam a várt és ténylegesen kapott heterozigotizációs értékeket, a fixációs indexet, a heterozigotizációt jellemző PIC értéket, illetve az állományok genetikai struktúrájának könnyebb és áttekinthetőbb értékelése céljából készítettem egy-egy dendogramot.

3.3. Új mikroszatellitek izolálása

3.3.1. Pulyka

A kapott eredmények hatására a markerek fejlesztése mellett döntöttem. Ezért mikroszatellit könyvtárakat készítettem, amiből 167 db ismétlődést tartalmazó szekvenciát szűrtem ki, és a kimutatásra alkalmasokra 61db primerpárt terveztem.

3.3.2. Lúd

A lúd estében is készítettem ilyen könyvtárat, amiből 32 klónt választottam ki, és ötre terveztem a kimutatáshoz primereket.

3.3.3. Az új pulyka mikroszatellitek térképpozíciójának megállapítása szekvenciaadatok felhasználásával

Miután megjelent a pulyka szekvenciaadatbázisa, összehasonlítottam a saját szekvenciaadataimat a nemzetközi pulyka szekvenciaadatbázissal.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

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*) rendelkezett, és napjainkban is rendelkezik (Groenen et al. 2000, Hillier et al. 2004, Takashi et al. 2004, Cogburn et al. 2007). Így adódott a lehetőség, hogy a baromfifajok vizsgálatához tyúk mikroszatelliteket próbáljak alkalmazni.

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, lúdnál 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 vizsgálatra alkalmas.

4.1. 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 egy-egy mikroszatellit tartalmazó PCR reakcióban lehet felszorzozni. 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 mikroszatellit 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 mikroszatellit, amely a vizsgált populációkban monomorfnek bizonyult. Ezek cseréje esetleg indokolt, ha más populációkban is kevés alléllal rendelkeznek. Én ezeket a mikroszatellit belső markerként alkalmaztam a kapilláris elektroforézis során, ugyanis a méretük állandó, így segítségükkel nyomon követhetem a gép megfelelő működését.

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

4.2. Óshonos baromfi populációk genetikai vizsgálata

Vizsgáltam az allélok számát és az egyes allélok gyakoriságát. Megállapítható, hogy az allélszám mind a 15 mikroszatellit esetén alacsony (1-4-ig), alacsonyabb a pulykafajra 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 vadpulyka esetén a vizsgált minták alacsony számának köszönhetően a sokkal kevesebb allélt találtam, azonban a LEI43-as marker 111bp-os allélja csak vadpulyka egyedekben volt jelen.

A genotípusadatokból meghatároztam az állományok várt (H_e)- és tényleges (H_o) heterozigotizációját. Jól látható, hogy a várt heterozigotizációs értékek csak kevésbé térnek el a kapott heterozigotizációs értékektől. Statisztikailag csak két mikroszatellit esetén (ADL150 és ADL293) igazolható az eltérés ($P < 0,05$). A populáció összesített várt heterozigotizációs értékénél tapasztalt eltérés (H_e : 0,28; H_o : 0,312) szintén nem volt szignifikáns.

A vadpulyka heterozigotizációs 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-többlet volt megfigyelhető. Vadpulykánál négy (ADL292, MCW18, ADL146, ADL191) mikroszatellitnél nem értelmezhető a F_{IS} érték számítása, mert homozigóta genotípusúak voltak az adott mikroszatelliteken. Az ADL272 és az ADL149 esetében kaptam pozitív értéket, ami a heterozigóták hiányát jelzi. A többi mikroszatellitnél a fixációs index negatív előjelű, ami itt is heterozigóta-többlet 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 dendrogramon is ábrázoltam.

A dendrogramon 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, 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.

4.3. Fodros tollú lúd állomány genetikai analízise

Ennél a populációnál a vizsgálatokat mindössze 5 mikroszatellittel végeztem, 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 fodros tollú lúd esetében is kiszámoltam az állomány várt- (H_e) és tényleges heterozigotizációs (H_o) értékeit.

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

A homozigóta LEI120 esetében a PIC érték nem volt értékelhető (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 mérsékelt informatív mikroszatellitek közé volt sorolható, mivel a kapott PIC értékek a 0,25 és a 0,5 közé estek.

Az egyedek közötti genetikai hasonlóságok könnyebb áttekinthetősége érdekében ennél a populációnál is készítettem egy dendrogramot. Az ábráról leolvasható, hogy igen gyakoriak az azonos és egymással nagyon hasonló genotípusú egyedek. Mindezek az adatok az állomány beltenyésztettségére utalnak. Emellett előfordulhat az is, hogy a szabad tartásban szaporított állomány egyes, nagyobb szaporodási eréllyel bíró egyedek több utóddal járultak hozzá a vizsgált generációhoz.

4.4. Új pulyka és lúd mikroszatellitek

Mindkét vizsgált fajból ismétlődő (dinukleotid) szekvenciában dúsított parciális genomi DNS könyvtárakat hoztam létre új mikroszatellit markerek izolálásához. A pulyka fajból összesen 61, a lúd fajból 5 új mikroszatellit markert fejlesztettem ki. Ennek során meghatároztam szekvenciájukat, majd primereket terveztem a kimutatásukhoz. Működésüket teszteltem illetve meghatároztam az optimális működési körülményeiket. Ezek a markerek alkalmasak állományok genetikai variabilitásának vizsgálatára, illetve gazdaságilag fontos értékmérő tulajdonságok genetikai hátterének felderítésére.

A pulyka mikroszatellitek esetén egy nemzetközi együtt működés keretében kísérletet tettünk a markerek genetikai térkép pozíciójának meghatározására is. Ennek során tizenegy új izolálású pulyka mikroszatellit marker genetikai térképpozícióját együttműködő partnerünk – Kent M. Reed és csoportja – állapította meg, majd helyezte el egy minnesotai térképezésipopuláció segítségével a pulyka konszenzus genetikai térképén, illetve térképezte a tyúk összehasonlító genetikai térképén (Reed et al. 2005). Ehhez a munkához egy előzetes szűrést kellett végezni a térképezésre használt állomány bizonyos egyedeinek DNS-én annak eldöntésére, hogy polimorf genotípust mutatnak-e, azaz alkalmasak-e a genetikai térképezésre az általuk használt állományon.

Később a 2010-re elkészült pulyka genomszekvencia lehetővé tette, hogy az új izolálású mikroszatellitek szekvenciaadatait felhasználva vizsgáljam azok pozícióját. A 61 db új izolálású mikroszatellitből hatot nem találtam meg az adatbázisban, illetve nem lehetett őket kromoszómához rendelni. A többi esetében sikerült meghatározni pozíciójukat a genomban. Ezek között szerepelnek az együttműködő által

térképezett mikroszatellitek is, azonban három esetében más eredményt hozott az összehasonlítás, ezek az MGP012, az MGP031 és az MGP43 mikroszatellitek. A genom szekvencia az MGP012 mikroszatellit a 13. kromoszómán, az MGP031 és az MGP43 pedig a 15. kromoszómán helyezkedik el, miközben az együttműködő az MGP012 elnevezésű mikroszatellit a 11. kromoszómához, az MGP31-es markert a 2. kromoszómához, az MGP043-as markert a 19. kromoszómára térképezte. Ennek magyarázata lehet, hogy a szekvenálás utáni nukleotidsorrend, illetve a genom-illesztések még nem tökéletesek, folyamatosan szerkesztik, fejlesztik őket és az ismétlődés tartalmú szekvenciák esetén ez különösen nehéz feladat. Annak eldöntésére, hogy a két térképezési módszer közül melyik jelzi pontosan a markerek pozícióját további vizsgálatok elvégzése szükséges.

5. Új tudományos eredmények

1. Sikeresen adaptáltam 46 db tyúk mikroszatellit 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.
2. 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 könyvtár 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.
4. Sikeresen adaptáltam 16 mikroszatellit primer párt lúdra, a különböző populációk genetikai jellemzéséhez. Ezek közül 5 mikroszatellit sikeresen egy kimutatási csoportba rendeztem.
5. Öt mikroszatellit 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.
6. 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 mikroszatellit fejlesztet

6. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

6.1 Az értekezés témakörében megjelent közlemények

Közlemények referált tudományos folyóiratban

- Szőke Sz., Komlósi I., **Korom E.**, Ispány M., Mihók S. (2004): Vizsgálatok egy génrezerv pulykapopulációban. Acta Agraria Debreceniensis 2004/13. 48-52. old.
- Szőke Sz., Komlósi I., **Korom E.**, Márton I., Mihók S. (2004): A statistical analysis of population variability in Bronze Turkey considering gene conservation. Arch Tierz, Dummerdorf. 47 (4):377-385. [IF:0,477]
- Korom E.**, Pinke O., Veress Gy., Kovács B., Szabó Gy., Varga L. (2004): A pulyka genetikai vizsgálatára alkalmas tyúk mikroszatellitek. A Baromfi. 7: (4) 42-47 old.
- Korom E.**, Bakos K., Veress Gy., Pinke O., Reed K. M., Varga L., Kovács B. (2010): Isolation of 11 new polymorphic dinucleotide microsatellites from CA enriched turkey genomic libraries. Archiv für Tierzucht. 2010 elfogadva. [IF:0,595 (2009)]

Közlemények konferencia kiadványokban

- Bakos K., Veress Gy., **Korom E.**, Pinke O., Kovács B., Varga L. (2008) 52 új pulyka mikroszatellit izolálása és térképezése, I. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, Gödöllő, április 11-12. 2008/4 (2) 409-415. old.

Konferencia előadások (absztrakt)

- Szabó Gy., **Korom E.**, Soller, M., Varga L.(2002): Az ivarérettség idejére ható QTL-ek térképezése tyúkon. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. Munkaértekezlete, Keszthely, május 14-17. GE-3. 111. old.
- Korom E.**, Hue, Y.G., Kovács B., Nagy T., Orbán L., Szabó Gy., Varga L. (2002): Pulyka mikroszatellitek izolálása a faj genetikai térképének kialakításához. MBK Napok, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő október 2-3.

- Kovács B., **Korom E.**, Hue, Y.G., Szabó Gy., Orbán L., Varga L. (2003): Pulyka mikroszatellitek izolálása, V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, április 13-15. P37. 118. old.
- Korom E.**, Nagy T., Kovács B., Komlósi I., Mihók S., Szabó Gy., Varga L. (2003): Tyúk mikroszatellitek felhasználása pulyka populáció genetikai jellemzésére. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, április 13-15. P36. 117.old.
- Szőke Sz., Komlósi I., **Korom E.**, Ispányi M., Mihók S. (2003) Egy pulyka populáció genetikai vizsgálata. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, április 13-15. P80. 156.old.
- Korom E.**, Nagy T., Kovács B., Komlósi I., Mihók S., Szabó Gy., Varga L. (2003): Tyúk mikroszatellitek alkalmazása pulyka populáció genetikai jellemzésére. EU Konform Mezőgazdaság és élelmiszerbiztonság konferencia, Gödöllő, június 5. II.kötet/ 26-31. old.
- Bakos K., Veress Gy., **Korom E.**, Pinke O. Kovács B. és Varga L. (2006) Új mikroszatelli-markerek izolálása pulykából ca-ismétlődésre dúsított genomi könyvtár segítségével. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai beszámoló ülése, Budapest, január 25.
- Veress Gy., Bakos K., **Korom E.**, Pinke O., Kovács B. és Varga L. (2006): Mikroszatellit markerek fejlesztése a pulyka géntérképéhez. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai beszámoló ülése, Budapest, szeptember 29.

6.2 Az értekezés témaköréhez szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Közlemények referált tudományos folyóiratban

- Varga, L.,Pinke O, Müller, G., Kovács, B., **Korom, E.**, Szabó, Gy. and Soller, M. (2005) Mapping a syntenic modifier on mouse chromosome 1 influencing the expression of the myostatin mutant (MstnCmpt-dl1Abc) Compact mouse. Genetics. 169:489-493 [IF: 4,289]
- Varga, L., Müller, G., Szabó, Gy., Pinke O, **Korom, E.**, Kovács, B., Patthy, L. and Soller, M. (2003) Mapping modifiers affecting muscularity of the myostatin mutant (MstnCmpt-dl1Abc) Compact mouse. Genetics, 165, 257-267. [IF: 4,276]

Veress Gy, Bakos K, **Korom E**, Pinke O, Kovács B, Varga L (2009) Sequence and expression analysis of the androgen receptor gene from Compact mouse, ARCHIV FUR TIERZUCHT-ARCHIVES OF ANIMAL BREEDING 52 (2), 212-214

Konferencia előadások (absztrakt)

Varga L., Kovács B., **Korom E.**, Pinke O., Szabó Gy. (2002): A hiperizmoltság mértékét befolyásoló miosztatin modifikátor gének térképezése egéren. MBK Napok, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő, október 2-3.

Varga L.; Müller G.; Szabó Gy.; Pinke O.; **Korom E.**; Kovács B.; Patthy L.; Soller, M.(2002): A hiperizmoltság genetikai hátterének felderítése Compact egéren. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, április 13-15, (absztrakt: E54) p.72

Pinke O., Huszti K., **Korom E.**, Kovács B., Szabó Gy. és Varga L. (2003) Komplex fenotípusos tulajdonságok feltérképezésére alkalmas speciális populáció létrehozása. "BIOMODELLEK 2003 -Laboratóriumi állatok biológiája, tenyésztése és felhasználása" tudományos tanácskozás, Budapest, november 13.

Pinke O, Huszti K, **Korom E**, Kovács B, Müller G, Szabó Gy, Varga L (2004) Komplex fenotípusos tulajdonságok feltérképezésre alkalmas populáció kialakítása egéren. Innováció, a tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumban - Agrárgazdasági modellek a 21. század mezőgazdaságában c. nemzetközi konferencia Budapest. 2004. április 16.

Varga L., Pinke O., Müller G., Kovács B., **Korom E.**, Szabó Gy. (2004) Térképezhető-e a szintenikus modifikátor? Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 9. Munkaértekezlete, Sopron, május 10-13.

Pinke O., Huszti K., **Korom E.**, Kovács B., Szabó Gy., Müller G., Varga L. (2004) A Compact modifikátor gének finomfelbontású térképezése "Advanced Intercross Lines" speciális populáció segítségével. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 9. Munkaértekezlete. Sopron, május 10-13.

- Pinke O., Bakos K., **Korom E.**, Veress Gy., Kovács B. és Varga L. (2005): Többgenerációs géntérképezési populációk egéren. Agrárkutatás 2005 konferencia, Fiatal Kutatók Fóruma, 74. Országos Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Kiállítás, Budapest, szeptember 1.
- Pinke O., Bakos K., Huszti K., Kovács B., Szabó Gy., Müller G., **Korom E.**, Veress Gy. és Varga L. (2005) Két AIL alpopuláció létrehozása genotipizálás segítségével. "BIOMODELLEK 2005"- Laboratóriumi állatok biológiája, tenyésztése és felhasználása" tudományos tanácskozás, Budapest, november 3.
- Veress Gy., Kovács B., **Korom E.**, Bakos K., Pinke O. és Varga L. (2006) A miosztatin, valamint néhány modifikátor szerepre esélyes gén szekvencia, és expressziós vizsgálata compact egéren. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai beszámoló ülés, Budapest, január 25. (10.old)
- Pinke O., Bakos K., Müller G., Veress Gy., **Korom E.**, Kovács B., Varga L. (2006) Nagyfelbontású genetikai térképezésre alkalmas speciális populációk – Advanced Intercross Lines – kialakítása. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai beszámoló ülés, Budapest, január 25. (11. old)
- Bakos K., Pinke O., Veress Gy., **Korom E.**, Kovács B., Müller G., Varga L. (2009) A mapping strategy for identifying modifier genes affecting the rate of muscularity in the Compact mouse. (Poszter) Central and Eastern European Laboratory Animal Science Conference (CEELA-2009), Budapest, 2009. május 23.