

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

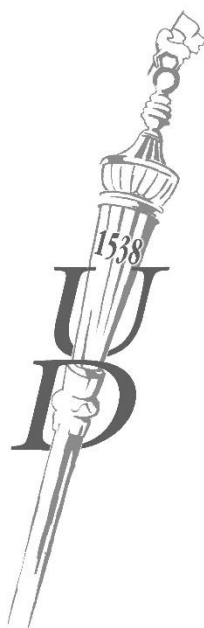
**MITOKONDRIÁLIS DNS VIZSGÁLAT HAGYOMÁNYOS MAGYARORSZÁGI
LÓFAJTÁK GENETIKAI VARIABILITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSÁRA**

Sziszkosz Nikolett

Témavezető:

Dr. Jávor András, CSc.

egyetemi tanár



DEBRECENI EGYETEM

Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017

TARTALOMJEGYZÉK

1. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI	3
2. A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI	4
3. A KUTATÁS MÓDSZEREI	5
3.1 MINTAGYŰJTÉS	5
3.2 MITOKONDRIÁLIS DNS VIZSGÁLAT	5
4. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI	9
4.1 GIDRÁN LOVAK MOLEKULÁRIS FILOGENETIKAI ANALÍZISE.....	9
4.2 KANCACSAALÁDOK ELLENŐRZÉSE MOLEKULÁRIS MARKEREK ALKALMAZÁSÁVAL.....	12
4.3 HUCUL LOVAK MOLEKULÁRIS FILOGENETIKAI ANALÍZISE	14
4.4 A HUCUL CYTB ÉS D-LOOP HAPLOTÍPUSOK ÖSSZEHASONLÍTÁSA PÓNI, ILLETVE KISLÓ HAPLOTÍPUSOKKAL.....	16
4.5 A HUCUL KANCACSAALÁDOK ELLENŐRZÉSE MOLEKULÁRIS MARKEREK ALKALMAZÁSÁVAL.....	17
5. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI	21
6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA.....	23
7. FELHASZNÁLT IRODALOM	24
8. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	27

1. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI

A világhírű hagyományos magyar lófajtákat folyamatos szakszerű tenyésztői munkával alakították ki, és mára a kulturális örökségünk részét képezik. Ezért kiemelt jelentőségű a jellegzetes tulajdonságok, az értük felelős gének megőrzése és vizsgálata (*Balog, 1997; Mihók, 2016*).

A hagyományos magyarországi lófajták közül a gidrán rendelkezik az egyik legkisebb populációval, mely jelentős kultúrtörténeti és genetikai értéket is képvisel a magyar állattenyésztésben (*Mihók, 2006*). A hucul fajta a tenyészkancák számát figyelembe véve szintén a veszélyeztetett csoportba sorolandó (*Jakabová és mtsai., 2009*). Ezen fajták értékes génkészletének megőrzéséhez nélkülözhetetlen genetikai struktúrájának feltérképezése, mely hasznos lehet az egyes fajták fajtavédelmi terveihez, genetikai státuszuk megértéséhez.

Az anyai módon öröklődő nagyfokú polimorfizmussal jellemezhető mitokondriális DNS (mtDNS) kiválóan alkalmas anyai vonalak genetikai struktúrájának vizsgálatára (*Taberlet és mtsai., 2011; Jianxing és mtsai., 2012*). Az utóbbi évtizedben több kutatócsoport is felhasználta a citokróm b (*CYTB*) gén vagy a kontroll régió – más néven D-loop – mitokondriális DNS szekvenciákat a házasított, valamint az ősi lovak származási kapcsolatának feltérképezésére. A fehérjét nem kódoló D-loop régió a mitokondriális genom legpolimorfabb szakasza (*Lopes és mtsai., 2005*). A kontroll régió mellett, újabban a fehérjekódoló *CYTB* szekvencia polimorfizmusainak vizsgálata is fontos szerepet tölt be a származás-ellenőrzések során, emellett kitűnően használható filogenetikai vizsgálatokban.

Dolgozatom fő célja a gidrán és a hucul kancavonalak diverzitásának meghatározása a fenti mtDNS markerek segítségével. További célunk volt a méneskönyvekben esetlegesen előforduló hibák vagy elírások felderítése, az optimalizált DNS alapú módszer hatékonyságának vizsgálata kancacsaládok haplotípus alapján való elkülönítésében.

2. A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI

- A magyarországi lófajták genetikai struktúrájának feltérképezése és karakterizálása mitokondriális DNS markerek alkalmazásával.
- A gidrán és hucul lófajták haplotípusainak kimutatása és genetikai diverzitásának vizsgálata a mitokondriális markerek segítségével.
- Bioinformatikai analízissel a magyarországi hucul kancaállomány genetikai jellegének összehasonlítása a GenBank-ban elérhető póni, illetve kislópopulációkkal.
- A vizsgálatba bevont gidrán és hucul kancák méneskönyvek adatainak és a molekuláris filogenetikai eredmények összehasonlítása, az esetleges eltérések megállapítása érdekében.

3. A KUTATÁS MÓDSZEREI

3.1 MINTAGYŰJTÉS

Munkánk során 250 gidrán kancától vett szőrminta vizsgálatát végeztük el, amelyek 17 magyarországi ménesből származtak, nevezetesen Bakonycsernye, Balatonalmádi, Biharkeresztes, Budapest, Csákvár, Debrecen, Győr, Gyűrűs, Lulla, Marócpuszt, Nagycsepely, Rédics, Sárkeresztes, Siklós, Tata, Tiszafüred, Zalaszentgrót.

Tanulmányunkban összesen 267 hucul kancától vett szőrminta vizsgálatát végeztük el, amelyek 14 magyarországi ménesből származtak, mégpedig Csemő, Gyűrűs, Hárskút, Izsák, Jósavfő (Aggteleki Nemzeti Park), Kisoroszi, Ólmod, Pécsely, Pénzesgyőr, Pilismarót, Rakamaz, Solt, Szigetcsép, Varbó.

A vizsgálat során felhasznált összes szőrmintát a tenyésztő vette és jól záródó tasakokban postázta részünkre. A laboratóriumi vizsgálatok megkezdéséig a minták tárolása nedvességtől mentesen, szobahőmérsékleten, egymástól elkülönítve, a kontaminációt elkerülve történt.

A D-loop szekvenálását tizenhét hucul minta esetében nem végeztük el, hanem FASTA formátumban a GenBank adatbázisból töltöttük le. A *Priskin és mtsai.*, (2010) által megállapított hucul haplocsoportok azonosítói a következők voltak: KC143336.1- KC143355.1

A bioinformatikai elemzés során 22 kiválasztott hucul haplotípust további, az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban elérhető 35 póni, illetve kisló *CYTB*, és D-loop haplotípus szekvenciájával hasonlítottuk össze. Mivel mindkét marker szekvenciáját vizsgáltam, így munkám csak azokra a mintákra fókuszált, melyeknek a teljes mtDNS szekvenciája elérhető volt.

3.2 MITOKONDRIÁLIS DNS VIZSGÁLAT

A genomiális DNS izolálása szőrhagymából történt a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) protokollja alapján (*FAO/IAEA*, 2004). A primertervezés során a Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) programot használtuk. Munkánk során a ló mtDNS (GenBank azonosító: X79547) két, filogenetikai analízisre alkalmas polimorf szakaszára; a 1192 bp hosszú D-loop és a 1140 bp hosszú *CYTB* gén szakaszaira terveztünk különböző primer

párokat. A tervezett hét primerpárból négy a D-loop régió, három primerpár pedig a *CYTB* egy-egy szakaszára volt specifikus. A primerek specifikációit a 1. *táblázatban* tüntettük fel, míg az általuk határolt szekvenciák az 1. *ábrán* láthatók.

1. táblázat: A vizsgálat során tervezett primerek specifikációi

	Primer elnevezése	Primer szekvencia	Termék hossza
A	Dloop1_F	ACGACAACAATTTACCCCTCA	961 bp
	Dloop1_R	GGGGAAGAAGGGTTGACAGA	
B	Dloop2_F	CCCCACATAACACCATAACC	883 bp
	Dloop2_R	ATCTAGGGGGATGCCTGTCT	
C	Dloop3_F	TCAGCAACCCTCCCAACTAC	652 bp
	Dloop2_R	ATCTAGGGGGATGCCTGTCT	
D	Dloop4_F	ACGTTATTCTCCGCATCAG	350 bp
	Dloop2_R	ATCTAGGGGGATGCCTGTCT	
E	Cyt1_F	TTCCACCGTGAATCTAACC	1092 bp
	Cyt1_R	GTCCGCCGATTCATGTTAGT	
F	Cyt2_F	GCATTCATGGGCTATGTCCT	643 bp
	Cyt1_R	GTCCGCCGATTCATGTTAGT	
G	Cyt3_F	TCATCATCACAGCCCTGGTA	556 bp
	Cyt3_R	ATGGTGCTTGCGAGTGGTAT	

```
>gi|577571|emb|X79547.1| Equus caballus mitochondrial DNA sequence, D-loop regio
ATTTCCTCCCTAAACGACAACAATTTACCCCTCATGTGCTATGTCAGTATCAGATTATACCCCCACATAACACCATACCCACCTGACATGCAATAT
CTTATGAATGGCCTATGTACGTCGTGCATTAAATTTGTCGCCCCATGAATAATAAGCATGTACATAATATCATTTTATCTTACATAAGTACATTATA
TTATTGATCGTGCATACCCCATCCAAGTCAAATCATTTCCAGTCAACACGCATATCACAGCCATGTTCACGAGCTTAATCACCAGCGCGGG
AAATCAGCAACCCCTCCCAACTACGTGTCCCAATCCTCGCTCCGGGCCATCCAAACGTTGGGGTTTCTACAATGAAACTATACTCGCATCTGGT
TCTTTCTCAGGGCCATTCACCCCAACCTCGCCCATCTTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCACAC
ATAACTGTGATTTTCATGCAATTTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGGCCGTCAAAGGCTCGACGCAGTCAATTAATTTG
AAGCTGGACTTAATTCGACCAATATGAGTGGCTGACCAACATTAAGGTGTTATTCAGTCCATGGTAGCGGGACATAGGAAACAAGTGCACCT
GTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
GTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
GTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT
CCACATATGTACATTCAACACAAATCTTGGCAAACCCCAAAACAAGACTAAACAATGCACAATCTTCATGAAGCTTAACCCCTCGCATGCCAAC
CATAATAACTCAACACACCTAACAATCTTAACAGAACTTTCCCCCGCCATTAATACCAACATGCTACTTTAATCAATAAAATTTCCATAGACAG
GCATCCCCCTAGATCTAATTTTCTAAATCTGTCAACCCCTCTTCCCC
```

```
>gi|40806321|gb|AY515159.1| Equus caballus cytochrome B (CYTB) gene
TAATCCACAGTGGATCTAATACACGACCAATGACATGAAAAATCATCGTTGATTTCAACTATAAGAACACCAATGACAAACATCTGGAAATCTC
ACCCACTAATTAATCATCAATCACTCTTTTATTGACCTACCGCCCTCAAAACATTTTCATCATGATGAACTTCGGCTCCCTCTAGGAATCT
GCCTAATCTCCAAATCTTAACAGGCTATTCTAGCCATACACTACACATCAGACAGGACAACTGCCTTCTCATCCGTCACTCACATCTGCCGA
GACGTTAACTACGGATGAATTATTCGCTACCTCCATGCCAAGGAGCATCAATATTTTTATCTGCCTTTCATTACGTAGGACGCGGCTCTAC
TAGGGCTCTTACACATCTCTAGAGACATGAACATTTGGAATCATCTCTTTTACAGTTATAGCTACAATCATTCATGGGCTATGTCCTTACCATGA
GGCCAAATATCTTTTGGAGAGCAACAGTCAATCAAGAACCTCTATCAGCAATTCCTACATCGGTACTACCTCGTCCGATGAACTGAGGTGG
ATTCTCAGTAGACAAAGCCACCTTACCGATTCTTTGCTTTCCACTATCCTACCTTCATCATCACAGCCCTGGTAATCGTACATTTTACTATTT
CTTCAGAAACAGGATCTAATAACCCCTCAGGAATCCCATCGATATGGACAAAATCCCATTCACCCATATTATACAATTAAGACATCTTAGG
ACTCTCTCTCTGATCTTGTCTCTACTAATCTAGTATTATCTCCCGGACCTCTAGGAGAGCCAGACAACTACACCCAGCTAACCCCTCTCAG
CACTCCCCCTCATATTAAACAGAAATGGTCTTCTGTGTTGGCTACGGCATCCTACGCTCCTATCCCAACAACTAGGCGGGCTATTAGCCCTAAI
CCTCTCATCTGATCCTAGCACTCATCCCAACCCCTCCACATATCAAAAACAACGAGCATAATATTCGGGCTCTCAGCCAATGCGTATTCTGACT
CTTAGTGCGAGACTTACTGACCTAACAATGAATCGGCGGAGAGCCAGTGGAACACCCATACGTAATTATCGGCCAATGGGCTCAATCTCTACT
TCTCCTAATTTCTATTTTATACCACTCGCAAGCACCATCGAAACAATCTTCTAAATGAAGA
```

1. ábra: A ló mtDNS D-loop és *CYTB* szekvenciárészletei FASTA formátumban. Kiemelve a szekvenciával identikus primerpárok vannak.

A primertervezés után gradiens (több hőfokon elvégzett) PCR reakció segítségével kiválasztottuk a legmegfelelőbb primerpárt az általunk tervezett hét primer közül és meghatároztuk az optimális primer tapadási hőmérsékletet (62,4 °C). A gélelektroforézis során a leginkább

elkülönült sávokat mutató „E” primerpárral folytattuk munkánkat, mely a *CYTB* génen belül fedett le hosszabb szakaszt:

CYTB gén:

- **14115F** 5'-TTCCCACGTGGAATCTAACC-3'
- **15206R** 5'-GTCCGCCGATTCATGTTAGT-3'

A D-loop régió belül *Priskin és mtsai.*, (2010) által alkalmazott összesen 298 bp hosszú szakaszt lefedő primerpárral dolgoztunk tovább:

D-loop régió:

- **15444F** 5'-ACCATCAACACCCAAAGCTG-3'
- **15742R** 5'-GCTGATTTCCTCGCGGCTTGCTG-3' (*Priskin és mtsai.*, 2010)

A primer tapadási hőmérséklet a gradiens PCR által meghatározott 62,4 °C volt. Az amplifikáció a MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) PCR készülékkel történt.

A nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel: 2%-os Seakemagároz (Lonza, USA), 1X TAE puffer (Termo Fisher Scientific, Waltham, USA), 0,5 mg/ml Gelred (Biotium, Hayward, CA, USA) történt a termékek ellenőrzése céljából. Az eredményeket UV fény alatt ellenőriztük.

A PCR termék tisztítását a Viogene DNA/RNA Extraction 'PCR-M Clean up System' (Viogene-BioTek, Taipei, Taiwan) kittel, a gyártó utasításai alapján végeztük. A végső, tisztított PCR termék minőségét, illetve DNS koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométer készülékkel határoztuk meg.

A minták szekvenálását az Eurofins MWG-Operon (Ebersberg, Németország) és a Macrogen Europe (Amszterdam, Hollandia) cégek végezték, szekvenáló primerként a PCR reakcióhoz is alkalmazott primereket használtuk.

Az eredmények bioinformatikai értékelése során a leolvasott nukleotidok helyességét a CodonCode Aligner v. 4.2.7 (CodonCode Corporation, 2014) programmal ellenőriztük. A szekvenáltatás során kapott szekvenciákat, illetve az NCBI adatbázisból letöltött szekvenciákat a ClustalW (*Larkin és mtsai.*, 2007) programmal hasonlítottuk össze. A nukleotid pozíciók meghatározása a GenBank adatbázisban elérhető (acc. nr.: X79547) és (acc. nr.: JN398377) referenciaszekvenciák alapján valósult meg. A standard diverzitásmutatók, úgymint a polimorf

helyek, haplotípus és nukleotid diverzitás meghatározása a DnaSP5 (Rozas és mtsai., 2009) szoftverrel történt. Kitekintésként (outgroup) mindkét marker esetében a szamár (*Equus asinus*, NC001788) szekvenciáját használtuk.

Az NCBI adatbázisban korábban nem publikált haplocsoportok meghatározása a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) online hasonlósági kereső programmal történt (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A DomeTree (<http://www.dometree.org/>) haplocsoport analízist elvégeztük mind a gidrán, mind a hucul fajtánál is, a kapott törzsfák vizualizálása a DARwin for Windows szoftver (<http://darwin.cirad.fr/>) használatával történt. A DomeTree haplocsoportok nukleotid pozícióinak jelölése a referencia szekvencián (GenBank acc. nr.: JN398377) alapul.

A kancacsaládokhoz tartozó mtDNS haplotípusok, illetve a különböző kisló és póni szekvenciák genetikai viszonyainak ábrázolása median-joining hálóval történt, a Network 4.6.0.0. (Bandelt és mtsai, 1999), illetve a PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>) programcsomagok segítségével történt. A median-joining módszer alkalmas az egymástól kis genetikai távolságra lévő egyedek, illetve haplotípusok összehasonlítására (Bandelt és mtsai, 1999).

A filogenetikai analíziseket a MEGA6 (Tamura és mtsai., 2013) programcsomagokkal végeztük el. A filogenetikai fák szerkesztése a maximum-likelihood, „legnagyobb valószínűség” algoritmus felhasználásával történt (Hasegawa és mtsai., 1985), emellett minden esetben „megismételhetőségi érték” (ún. bootstrap) analízist is végeztünk (Podani, 2003). A bootstrap érték minden esetben 1000 volt.

A szekvenciáknak legmegfelelőbb nukleotid szubsztitúciós modellt a jModelTest nevű programmal választottuk ki (Posada, 2008). Ennek megfelelően mindkét fajtánál a CYTB marker esetében a Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) plusz gamma (Hasegawa és mtsai., 1985), a D-loop marker esetében pedig a Tamura 3-parameter (T92) plusz gamma modelleket alkalmaztuk.

4. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

4.1 GIDRÁN LOVAK MOLEKULÁRIS FILOGENETIKAI ANALÍZISE

A beérkező minták közül a *CYTB* gén vizsgálatánál 250, a D-loop régiónál pedig 246 minta került értékelésre. A szekvenciák illesztését és a bioinformatikai normalizálást követően a *CYTB* génen belül 686 nukleotidnak, a D-loop régión belül pedig 202 nukleotidnak a vizsgálata valósult meg. A diverzitásmutatókat a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: A vizsgált mtDNS markerek fő diverzitásmutatói gidrán lovak esetében

mtDNS marker	Nukleotidok száma	Egyed-szám	Haplotípusok száma	Polimorf helyek	Haplotípus diverzitás $\pm$ SD	Nukleotid diverzitás $\pm$ SD
<i>CYTB</i>	686	250	24	23	0,874 $\pm$ 0,011	0,005 $\pm$ 0,001
D-loop	202	246	32	26	0,914 $\pm$ 0,008	0,021 $\pm$ 0,001
együtt*	893	242	49	-	0,940 $\pm$ 0,006	0,008 $\pm$ 0,001

*A *CYTB* és a D-loop markerek együttes alkalmazása

Mindkét mtDNS marker szekvenciaanalízise megerősítette a gidrán fajtán belüli jelentős genetikai variabilitást is. A *CYTB* szekvenciáknál 23 variábilis pozíciót találtunk, 21 esetben SNP, két esetben pedig inszerció és delécio áll a nukleotid eltérés hátterében. Ez a teljes hosszúságú, 686 bp-nyi szekvenciát figyelembe véve 3,35%-os polimorfizmust jelent. A D-loop marker valamennyivel több, 26 variábilis helyet mutatott, ami a teljes 202 bp-nyi szekvencia 12,9%-át teszi ki. A polimorf nukleotidok között a 25 SNP mellett, mindössze egy inszerció/deléciót azonosítottunk. Mindkét marker szekvenciája adenin(A)/timin(T)-gazdag volt, ami a *CYTB* markernél 55%-ot, míg a D-loop-nál 64,1%-ot jelentett.

Mindkét marker magas haplotípus diverzitás értékeket mutatott: $0,8735 \pm 0,011$ a *CYTB*-nél és $0,9136 \pm 0,008$ a D-loop-nál. A nukleotid diverzitás értékek is magasnak bizonyultak: $0,00472 \pm 0,00017$ (*CYTB*) és $0,02091 \pm 0,00068$ (D-loop). A haplotípusok közötti páros genetikai távolság (paired genetic distances) $0,001\text{--}0,013$ (*CYTB*) és $0,005\text{--}0,063$ (D-loop) volt. A filogenetikai irodalmat áttekintve megállapíthatjuk, hogy más fajokkal ellentétben (Ali és mtsai., 2015) a *CYTB* marker alapú vizsgálat viszonylag ritka a lovakban (Li és mtsai., 2006, Jianxing és mtsai., 2012). A tapasztalt *CYTB* nukleotid diverzitás paraméterek hasonlóak a kínai háziló

adataival. A 323 kínai őshonos ló és 84, a GenBank adatbázisból kiválasztott szekvencia vizsgálatával 114 különböző haplotípust azonosítottak (Yue és mtsai., 2012). A nukleotid diverzitásmutató 0,005 és 0,002 közé tehető. Emellett a haplotípus diverzitás 0,706 és 0,975 közötti, ami szintén átfedést mutat az általunk tapasztalt értékekkel (gidrán: 0,874; hucul: 0,835) (Yue és mtsai., 2012). Qin és mtsai (2009) huszonkét lichuan ló, 1140 bp hosszú *CYTB* szekvenciárészletét határozták meg. Hasonlóan a korábban leírt eredményekhez magas haplotípus és nukleotid diverzitás értékeket (0,840 és 0,048) tapasztaltak. A vizsgálataim során tapasztalt *CYTB* variabilitás is kiemeli a fajták genetikai sokféleségét, jóllehet a kapott haplotípus szám és a nukleotid diverzitás is alacsonyabb volt a D-loop markerhez viszonyítva.

A vizsgálatom során megállapított D-loop haplotípus-számokat tekintve, hasonló eredmények figyelhetők meg luzitán (27 haplotípus/145 ló) (Lopes és mtsai., 2005), lipicai (37 haplotípus/212 ló) (Kavar és mtsai., 2002) arab (27 haplotípus/200 ló) (Bowling és mtsai., 2000) és magasabb a kiso (7 haplotípus/136 ló) (Takasu és mtsai., 2014) lovak esetében is. A kapott D-loop haplotípus és nukleotid diverzitások is összhangban van korábbi kutatások eredményeivel. A megfigyelt nukleotid diverzitás, nagyban megegyezik az iráni ló populáció adataival (0,02) (Moridi és mtsai., 2013). A viszonylag magas érték alapján arra lehet következtetni, hogy az általuk vizsgált magyar fajták genetikailag variábilisabbak, mint a kerry bog ($0,0155 \pm 0,0040$), a sulfur (kén) musztáng ($0,001 \pm 0,002$). Másrésről a marwari ($0,03973 \pm 0,01262$) vagy a sorraia ($0,104 \pm 0,012$) lovak genetikai struktúrája még inkább diverzebb, mint amilyen a gidrán, vagy a hucul (Luís és mtsai., 2006; Prystupa és mtsai., 2012; Devi és Ghosh, 2013). A kapott haplotípusok szekvenciái megtalálhatók a GenBank adatbázisban az alábbi azonosítókkal: KT792934 – KT792957 és KT818891 – KT818922.

A filogenetikai analíziseket mindkét marker esetében elvégeztük külön-külön és kombinálva is. A 31 gidrán kancacsalád egyedei között a *CYTB* marker segítségével 24, míg a D-loop használatával 32 haplotípust sikerült elkülöníteni. Hasonlóan diverz adatokat írtak le egy korábbi hucul tanulmány során (Kusza és mtsai., 2013), valamint a zemaitukai lovakban is, annak ellenére, hogy történetük során mindkét fajta súlyos palacknyak-hatáson esett keresztül (Cothran és mtsai., 2005; Kusza és mtsai., 2013). A megfigyelt magas D-loop és *CYTB* haplotípus diverzitás megerősíti a tényt, hogy a gidrán több ősi anyai vonalból származik, amit alátámaszt, hogy a jelenleg ismert kancacsaládokat 16 alapító kancára vezethetőek vissza (Mihók, 2006).

A gidrán lovak filogenetikai vizsgálata során két különböző referenciaszekvenciát használtunk: X79547 és JN398377. A legtöbb filogenetikai vizsgálat az X79547 GenBank azonosítószerű, 2005-ben publikált szekvenciát használja, amely lehető teszi a D-loop haplotípusok a *Jansen és mtsai.*, (2002), illetve az *Achilli és mtsai.*, (2012) által meghatározott haplocsoportokba sorolását. A legújabb tanulmányok - mint amilyen a DomeTree adatbázis is - viszont a JN398377 GenBank azonosítószerű referencia szekvenciát alkalmazzák a filogenetikai vizsgálatokhoz. Ez utóbbi szekvenciát 2012-ben közzétették és pontosabb, mint a X79547 szekvencia.

A kapott gidrán haplotípusok közül egy-egy haplotípus (Ht1_{CYTB} és Ht1_{D-loop}) megegyezett a referencia szekvenciával, és a haplotípusok maximum 6 (CYTB) és 9 (D-loop) nukleotidban különböztek tőle.

A vizsgált populációban a huszonnégy CYTB haplotípus közül a Ht1_{CYTB} (n=54), Ht2_{CYTB} (n=49) és a Ht6_{CYTB} (n=44) volt a leggyakoribb. Hét haplotípus viszont csak 1-1 egyeddel képviseltette magát Ht11_{CYTB}, Ht17_{CYTB}, Ht18_{CYTB}, Ht20_{CYTB}, Ht21_{CYTB}, Ht22_{CYTB}, és Ht24_{CYTB}. A 250 gidrán kanca 24 haplotípusa közötti filogenetikai „maximum likelihood” törzsfán ábrázoltuk.

A D-loop marker esetében a leggyakoribb haplotípusok a következők voltak: Ht6_{D-loop} (n=47), Ht16_{D-loop} (n=35) and Ht1_{D-loop} (n=25). Tíz haplotípus viszont mindössze egy-egy állat állatra volt jellemző: Ht14_{D-loop}, Ht17_{D-loop}, Ht18_{D-loop}, Ht21_{D-loop}, Ht24_{D-loop}, Ht26_{D-loop}, Ht28_{D-loop}, Ht29_{D-loop}, Ht30_{D-loop}, and Ht31_{D-loop}.

Az NCBI adatbázis szekvenciái között elvégzett BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) vizsgálat hat új CYTB (Ht5_{CYTB}, Ht8_{CYTB}, Ht11_{CYTB}, Ht14_{CYTB}, Ht20_{CYTB}, and Ht21_{CYTB}) és négy új, eddig nem publikált D-loop (Ht12_{D-loop}, Ht28_{D-loop}, Ht29_{D-loop}, and Ht32_{D-loop}) haplotípust azonosított.

A kapott haplotípusok haplocsoport vizsgálatát is elvégeztem. A 32 D-loop haplotípus - a *Jansen és mtsai.*, (2002) által meghatározott – hét fő D-loop haplocsoportba sorolható, melyek eloszlása a következő volt: A: 31%, B: 3%, C: 28%, D: 19%, E: 3%, F: 13%, és G: 3%. Az Achilli-féle, összesen 18 haplocsoportot tartalmazó D-loop klasszifikációt figyelembe véve, mindössze az E haplocsoport nem képviseltette magát az általunk vizsgált gidrán kanca populációban.

A DomeTree (Peng és mtsai., 2015) adatai alapján a kapott CYTB haplotípusok tíz (A1b, A-Q, B1a2, D, G1a, G1b, G3, H, H-Q és M-N), míg a D-loop haplotípusok tizenhét (A1d, A3, AB, B1, B1a, D, G, G1, G1a, H-I, I, J1, J2, K, L, O, OP, R) haplocsoportba sorolhatók. Ellentétben

a többi haplocsoport klasszifikációval, a DomeTree adatbázis teljes mtDNS szekvencián és nem csak a D-loop markeren alapszik. Ebből kiindulva fontosnak tartottam a két marker kombinációjából kapott haplocsoportok megnevezését is. Abban az esetben, ha mindkét marker polimorfizmusait figyelembe vesszük, akkor kilenc haplocsoportot kaptunk (A1, AB, H, H-I, J-K, M-N, M-Q, B1, B1a).

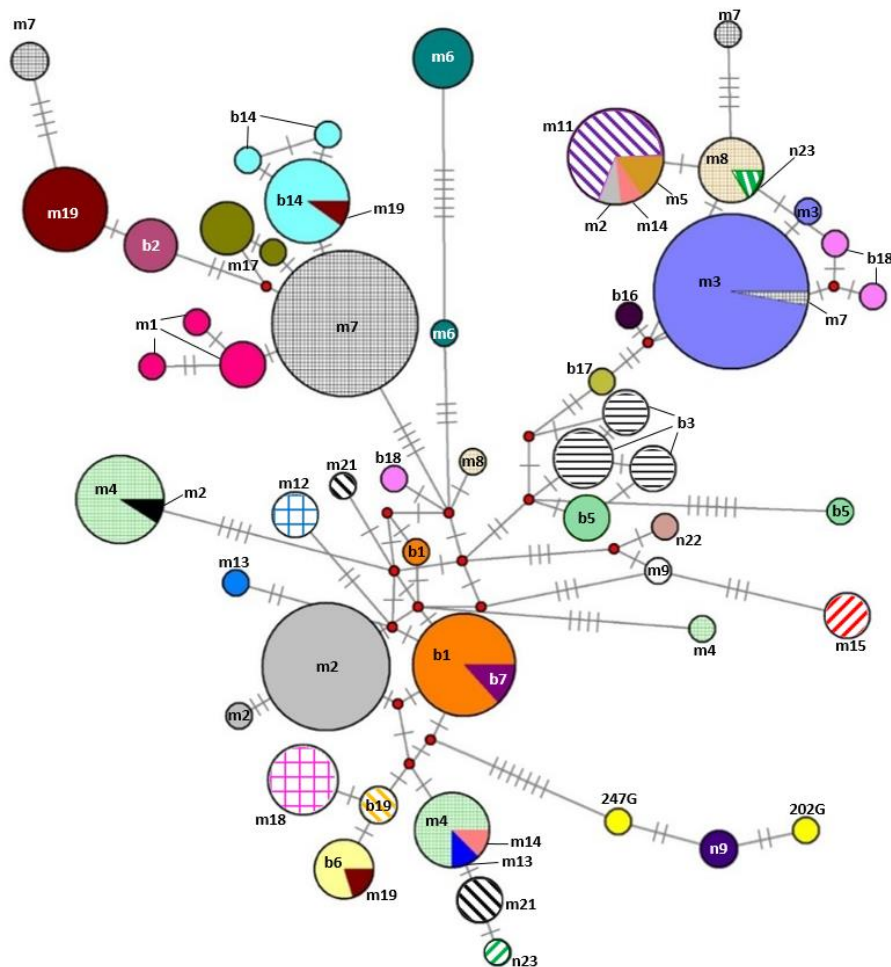
4.2 KANCACSA LÁDOK ELLENŐRZÉSE MOLEKULÁRIS MARKEREK ALKALMAZÁSÁVAL

Munkánk során a mtDNS markerek gyakorlati alkalmazását is vizsgáltam, a méneskönyvekben esetlegesen előforduló hibák/elírások felderítésére, illetve a mtDNS analízis hatásosságának vizsgálata kancacs családok haplotípus alapján való elkülönítésében.

Első lépésben a vizsgált markerekre külön-külön készítettünk filogenetikai törzsfákat. A harmincegy kancacs család közül a *CYTB* marker alkalmazásával 15 (48,4%), míg a D-loop-al 17 (54,8%) haplotípus különült el. A borodi 14, borodi 18 és mezőhegyesi 1 kancacs családok csak a *CYTB* segítségével, míg a mezőhegyesi 2, 3, 19 és borodi 2 kancacs családok csak a D-loop-al voltak elkülöníthetők.

Fontos megemlíteni, hogy egyes kancacs családok nem feltétlenül különültek el külön haplotípusra, illetve egy-egy haplotípuson több kancacs család is osztozik. Így a *CYTB* és a D-loop markerek kombinált alkalmazása (*Pedrosa és mtsai.*, 2005) egy lehetséges megoldás lehet a pontosabb kancacs család – mtDNS haplotípus összeegyeztetésre. Munkám következő szakaszában így a vizsgálatokat markerek kombinálásával is elvégeztük. A kombinált analízis alkalmazása esetén – a nagygyedszámra való tekintettel – a kancacs családok haplotípusok szerinti hálózatos (network) ábrázolását találtuk legmegfelelőbbnek (2. ábra). Eredményeink alapján így a cirkuláris törzsfákat a továbbiakban a hucul lovak esetében nem készítettünk.

A várakozásunknak megfelelően a *CYTB* és a D-loop együttes használatával pontosabb eredményeket kaptunk, mivel további hét gidrán kancacs család (mezőhegyesi 7, 8 és 21; borodi 5, 17, és 19; népies 23) is elkülönült. A két marker kombinációjával a borodi 1 és a borodi 7 egy közös haplotípust alkotott. Fontos megemlíteni, hogy öt kancacs család (mezőhegyesi 5, 11, 13, 14 és borodi 18) egyik marker használatával sem volt megfeleltethető egyértelműen egy haplotípusnak.



2. ábra: A *CYTB* és a D-loop markerek együttes alkalmazásával készített, összesen 242 gidrán minta szekvenciáját magába foglaló median-joining (Bandelt és mtsai, 1999) filogenetikai hálózat. A kancacsalád nem ismert a sárgával jelölt 247G és 202G minták esetében. Az ábrán feltüntetett kancacsaládok rövidítése a következő: m = mezőhegyesi; b = borodi; n = népies.

Összesen 247 gidrán kanca mintánál végeztük el a lovak méneskönyv szerinti besorolásának mtDNS polimorfizmus alapú ellenőrzését. A molekuláris vizsgálat eredményeként 227 (92%) egyednél sikerült a haplotípusokat a méneskönyvben feltüntetett kancacsaládnak megfeleltetni.

Az összes egyedszámot tekintve kilenc egyednél (3.6%) mondhatjuk azt, hogy olyan haplocsoportba kerültek, melyek más kancacsaládokra jellemzőek, így valamilyen eltérésről lehet szó. Ez az arány kiválónak mondható összehasonlítva a lipicai és a lengyel lovak méneskönyveivel,

ahol az eltérés 11-11% körüli (Kavar és mtsai., 2002). Az eltérések két-két állat esetén a mezőhegyesi 2-es, 14-es és 19-es, míg egy-egy esetben a mezőhegyesi 7-es, 13-as és a népies 23-as kancacsaládokat érintette.

A minták 1,6%-ában ugyanahhoz a haplocsoporthoz több kancacsalád is tartozott, ilyenkor nem sikerült egyértelműen megállapítani, hogy: 1.) eltérésről, 2.) közös eredetről, vagy 3.) a vizsgált marker polimorfizmusának hiányáról van szó. Következésképpen, két-két kancacsalád közös haplotípust alkotott (borodi 1-es és 7-es, illetve a mezőhegyesi 5-ös és 11-es). A borodi 7-es családba tartozó lovak nem formáltak külön haplotípust, ahogyan a mezőhegyesi 5-ös család tagjai sem. Előbbi kancák a borodi 1-essel, míg utóbbiak a mezőhegyesi 11-es család tagjaival osztoztak közös haplotípusokon. Ezek az eltérések összhangban vannak a gidrán fajta történetében leírt változásokkal (Mihók, 2006).

A D-loop régió vizsgálatakor több, összesen 32 haplotípus különítettünk el, így olyan kancacsaládok is feltérképezhetőkké váltak, melyeket a szimpla *CYTB* vizsgálatával nem sikerült elkülönítenünk. Ilyenek voltak a mezőhegyesi 2-es, mezőhegyesi 3-as, mezőhegyesi 19-es, borodi 2-es. Viszont egyes kancacsaládok vizsgálatánál a *CYTB* szakasz mutatkozott informatívabbnak, így a borodi 14-es, a borodi 18-as, a mezőhegyesi 1-es kancacsaládok (2. ábra) egyedei külön haplotípusba rendeződnek. A két mtDNS marker kombinált alkalmazásának jelentőségét kihangsúlyozza, hogy nyolc gidrán kancánál csak a kombinált markerek tették lehetővé a pontos kancacsaládba való besorolást, illetve a borodi 19-es kancacsalád tagjai csak ezzel a megközelítéssel váltak elkülöníthetővé.

Érdekes, hogy a mezőhegyesi 4-es kancacsalád egyedeire mindkét markernél két különböző haplotípus is jellemző volt, tehát feltételezhetően a mezőhegyesi 4-es kancacsalád két molekuláris alcsaládra bontható. A mezőhegyesi 4-es kancacsalád egyedei kombinált, illetve egyedi módszerrel is két különböző haplotípust alkottak. Ez az eltérés is igazolható, mivel a kancacsalád később kettévált (Mihók, 2006). Három esetben nem volt ismert a lovak kancacsaládja, de a molekuláris vizsgálatok alapján is elkülönült haplotípust alkottak.

4.3 HUCUL LOVAK MOLEKULÁRIS FILOGENETIKAI ANALÍZISE

A begyűjtött hucul minták közül a *CYTB* marker vizsgálatánál összesen 265, míg a D-loop régiónál 267 mintát értékeltünk. A hucul fajta diverzitásmutatóit a **3. táblázatban** foglaltuk össze.

A két mtDNA marker értékei mellett - a gidrán lovakhoz hasonlóan - a két marker szekvenciáinak összeillesztésével kapott eredményeket is feltüntettük.

3. táblázat: A vizsgált mtDNS markerek fő diverzitásmutatói hucul lovak esetében

mtDNS marker	Nukleotidok száma	Egyed-szám	Haplotípusok száma	Polimorf helyek	Haplotípus diverzitás $\pm$ SD	Nukleotid diverzitás $\pm$ SD
CYTB	686	265	13	13	0,835 $\pm$ 0,009	0,005 $\pm$ 0,001
D-loop	202	267	22	21	0,878 $\pm$ 0,009	0,024 $\pm$ 0,001
együtt*	893	240	30	-	0,889 $\pm$ 0,01	0,009 $\pm$ 0,001

*A CYTB és a D-loop markerek együttes, kombinált alkalmazása

A gidrán fajtához hasonlóan a hucul lovak genetikai struktúrájának feltérképezésével számos korábbi publikáció foglalkozik. Ezen tanulmányok főleg a D-loop szekvencia polimorfizmusain, vagy mikroszatellita vizsgálatokon alapulnak (Kusza és mtsai., 2013; Priskin és mtsai., 2010; Georgescu és mtsai., 2011). A CYTB marker jelentőségét viszont hucul lovakban még nem elemezték. A vizsgált CYTB szakaszban összesen 13 variábilis pozíciót azonosítottunk, melyek háttérében minden esetben SNP állt. A teljes 686 bp hosszúságú szekvenciát figyelembe véve, a kapott eredmény mindössze 1,9%-os polimorfizmust jelent. Ez a szám jóval kisebb a gidrán lovakkal összehasonlítva, ami azt feltételezi, hogy a CYTB kevésbé informatív a hucul fajtánál. A D-loop viszont polimorfabbnak bizonyult a CYTB-vel szemben. A 202 bp hosszú D-loop marker 22 polimorf helyet tartalmazott, ami a teljes szekvencia 10,9%-át fedi le, ami közel megegyezik a gidránnál tapasztalt aránnyal. A polimorf nukleotidok között mindössze egy inszerció/delécio-t (indel) azonosítottunk.

A gidránhoz hasonlóan a hucul lovaknál is magas haplotípus diverzitás értékeket tapasztaltunk: $0,835 \pm 0,009$ a CYTB-nél és $0,878 \pm 0,009$ a D-loop-nál. Emellett, a nukleotid diverzitás értékek szintén magasak voltak: $0,00484 \pm 0,00013$ (CYTB) és $0,02356 \pm 0,00055$ (D-loop). A haplotípusok közötti genetikai távolság a CYTB szakasznál 0,001–0,013, a D-loop régiónál pedig 0,005–0,063 volt. Korábbi hucul tanulmányok is hasonló diverz struktúráról számolnak be annak ellenére is, hogy a fajta két ismert palacknyak-hatáson is keresztül esett (Kusza és mtsai., 2013; Priskin és mtsai., 2010)

A 31 hucul kancacsalád között a *CYTB* marker segítségével 13, míg a D-loop használatával 22 haplotípust sikerült elkülöníteni. A tizenhárom *CYTB* haplotípus közül a Ht1_{CYTB} (n=58), Ht10_{CYTB} (n=57) és a H2_{CYTB} (n=56) volt a leggyakoribb, míg a Ht4_{CYTB}, Ht8_{CYTB}, Ht12_{CYTB} haplotípusokat csak egy-egy egyed esetében azonosítottuk. A 265 hucul kanca 13 *CYTB* haplotípusa közötti kapcsolatot filogenetikai „maximum likelihood” törzsfán ábrázoltuk.

A leggyakoribb D-loop haplotípusok a következők voltak: Ht5_{D-loop} (n=62), Ht4_{D-loop} (n=38), Ht3_{D-loop} (n=37), Ht6_{D-loop} (n=36), míg kilenc haplotípus (Ht12_{D-loop}, Ht14_{D-loop}, Ht15_{D-loop}, Ht16_{D-loop}, Ht17_{D-loop}, Ht18_{D-loop}, Ht19_{D-loop}, Ht20_{D-loop}, Ht21_{D-loop}, Ht22_{D-loop} csak egy-egy állatra volt jellemző.

A 22 D-loop haplotípus öt fő D-loop haplocsoportba sorolható: A: 45%, C: 23%, D: 14%, F: 14%, és G: 5%. Megállapíthatjuk, hogy az „A” haplocsoport dominál a hucul lovakban, a *Kusza és mtsai.*, (2013) által vizsgált 71 hucul egyed között szintén ez a haplocsoport volt a leggyakoribb. *Jansen és mtsai.*, (2002) közleménye kiter arra, hogy - hucul egyik legközelebbi rokona - a przewalski lovak főként az általuk megállapított „A” haplocsoportba, azon belül a 2-es alcsoportba tartoznak. Így a kapott eredmények tovább erősítik ezt a kapcsolatot a fajták között.

Az Achilli-féle D-loop haplocsoportokat figyelembe véve (*Achilli és mtsai.*, 2012) a vizsgált hucul kancák kilenc (A1; A'B'C'D'; E'F'G'; I; L; M; N; O; R) haplocsoportra különültek el. A DomeTree szerinti csoportosítás alapján pedig összesen 15 (A; A1b; A2; A-I; B1b; E-G; F-G; G; L; L2; L3a2; M; M-Q; Q2a; R) különböző haplocsoport különült el.

4.4 A HUCUL *CYTB* ÉS D-LOOP HAPLOTÍPUSOK ÖSSZEHAJONLÍTÁSA PÓNI, ILLETHE KISLÓ HAPLOTÍPUSOKKAL

A munkánk során kapott hucul haplotípusokat bioinformatikai analízis során különböző földrajzi területekről származó lovak haplotípusaival hasonlítottuk össze. Vizsgálataink fő célja a hucul kancák genetikai diverzitásának összehasonlítása különböző földrajzi területen élő póni, illetve kisló fajták között. A megbízható eredmények érdekében, összesen 35 minta került kiválasztásra, amelyeknek elérhető volt mind a *CYTB*, mind a D-loop szekvenciája.

Eredményeink alapján arra lehet következtetni, hogy a vizsgálatba bevont magyarországi hucul kancák genetikai struktúrája igen sokszínű, összevetve a rendelkezésre álló póni és kisló fajták adataival. Hat hucul *CYTB* haplotípus - a debao és a welsh pónikat kivéve - a yakut, shetlandi,

przewlalski-ló, mongol, kaszpi, chincoteague, exmoor, konik, noriker, fjord, izlandi, német lovaglópónival alkotott közös csoportot, míg hét haplotípus egyedi csoportot alkotott. A hucul lovak esetében összesen nyolc D-loop haplotípus alkotott közös haplotípust a yakut, mongol, kaszpi, welsh, chincoteague, exmoor, konik, német lovaglópónival, míg 14 esetben különálló csoportot formáltak. A kapott eredmények alapján látható, hogy az alkalmazott mtDNS markerek – polimorf voltuk miatt – hatásosan alkalmazhatók az adott fajtán belüli genetikai struktúra feltérképezésére, de akár kancacsaládok, leszármazottsági vonalak elkülönítésére is. Másrészt, nem alkalmasak az állatok földrajzi élőhelye szerinti elkülönítésére.

4.5 A HUCUL KANCACSalÁDOK ELLENŐRZÉSE MOLEKULÁRIS MARKEREK ALKALMAZÁSÁVAL

A kancacsaládok és mtDNS haplotípusok összehasonlító vizsgálatát összesen 240 kancán végeztük el, mely 19 *Priskin és mtsai.*, (2010), által vizsgált hucul kanca adatait is tartalmazta.

A mtDNS analízis 187 (78%) egyednél egyértelműen a méneskönyvvel egyező eredményt mutatott. A magyarországi hucul kancacsaládok közül az aggteleki Aspiráns és Árvácska egyedei alkotják a két legnépesebb családot, továbbá a lucsinai eredetű 12 Sarata és 4 Kitca kancacsalád mérete is számottevőnek mondható. Az elvégzett molekuláris vizsgálatok alapján ezen egyedek jól elkülönült, kancacsalád-specifikus haplotípusokat formálnak. A lehetséges elírások mellett fontos kiemelni, hogy az Aspiráns család esetében minden vizsgált egyed azonos haplotípusokba került.

Lehetséges méneskönyvi eltérésről 30 kancánál (12,5%) beszélhetünk. Ilyenkor a fent említett családokba tartozó egyedek a kombinált markerek alkalmazása esetén sem alkottak a közös haplotípust a méneskönyvben leírt kancacsalád többi tagjával. A nagyméretű populációknak köszönhetően nem meglepő, hogy a legtöbb ilyen eltérés az Árvácska (6), 4 Kitca (5), 12 Sarata (5) családban fordult elő. Az összehasonlítás során azt tapasztaltam, hogy a szlovákiai népies tenyésztésből kialakult 882 Gelnica családban is előfordul három elírás, ami az egyedszámokhoz viszonyítva jelentősnek mondható. Továbbá a Wrona, 5 Plosca, 3 Tatarca, 2 Lucina, 17 Aglaia, 11 Rotunda és az 1 Panca családoknál 1-1 kanca besorolásában merült fel a hiba lehetősége. Ezen sok egyedből álló családokra – a genetikai egyensúly fenntartása végett – nagyobb szelekciós nyomást kell kifejteni. A *CYTB* és a D-loop markerek kombinálásával készített median-joining filogenetikai hálózatot a **3. ábra** szemlélteti.

Huszonnégy esetben (10%) egy-egy haplotípushoz több kancacsalád is tartozott. Nyolc esetben az 5 Plosca családba tartozó egyedek az Aspiránsokkal alkottak közös haplotípust. Ezek az eredmények a két kancacsalád közös eredetét valószínűsíthetik.

Ellentétben a nagylétszámú kancacsaládokkal, a kevesebb egyedszámú családokra kisebb szelekciós nyomást kell gyakorolni. Hét kanca pedig a 3 Tatarca, 70 Sekacka és a Wydra család egyedeivel alkotott közös haplotípust. Kilenc lónál pedig a 4 Kitca és a 17 Aglaia szintén közös haplotípuson osztozott. A lecsökkent egyedszám miatt, a hucul kancacsaládok közül a lucsinai 3 Tatarca helyzete veszélyeztetettnek mondható. Eredményeink alapján 3 Tatarca család tagjai mtDNS-ük alapján nem alkottak külön haplotípust, hanem a Lengyelországban meghonosodott, egyébként magyar eredetű Wydra, és a szlovákiai eredetű Sekacka lovakkal osztoztak közös haplotípuson. Fontos kiemelni, hogy utóbbi lovak közül négy egyednél feltételezhetünk méneskönyvi eltérést. Két méneskönyvi Árvácska kancacsaládba tartozó állat a molekuláris vizsgálat alapján közös haplotípust alkotott a 4 Kitca és 17 Aglaia családba tartozó lovakkal. Ugyancsak ezen két család egyedeivel alkotott közös haplotípust egy-egy a méneskönyv szerint a 2 Lucina, illetve a 882 Gelnica családba tartozó kanca. E két család magyarországi létszámának a növelése is fontos, de nem lehetetlen, mivel Szlovákiában és Lengyelországban is megfelelő egyedszámban fordulnak elő (Mihók, 2016). A mtDNS eredmények is igazolják, hogy Magyarországon a 3 Tatarca mellett a Wydra és a Sekacka kancacsalád tagjai is kiemelt figyelmet érdemelnek.

Vizsgálatunkban nyolc kancánál (3%) nem volt ismert a méneskönyv szerinti kancacsalád. Egyedi, a többi kancacsaládtól elkülönülő haplotípus két kancánál volt megfigyelhető (5 Plosca, Wrona). Annak ellenére, hogy négy (825 Agla, 84 Polónia, 90 Macocha, Bajkalka) kancacsaládból is csak egy-egy minta állt rendelkezésünkre, mind a négy család egyedei elkülönült haplotípust alkottak.

A mtDNS haplotípusok és a méneskönyvi kancacsaládok összehasonlítását *Priskin és mtsai.*, (2010) által publikált 19 hucul kanca mintán is elvégeztük, melyek a kevésbé gyakori (5 Plosca, 825 Agla, 84 Polónia, Bajkalka, Bukovina, Wolga) kancacsaládokat is képviselték. A vizsgálat célja a kombinált (CYTB – D-loop) markerek alkalmasságának és hatékonyságának tesztelése volt.

Tizenhárom egyednél (68%) a kombinált markerekkel meghatározott haplocsoportjaink megegyeztek a *Priskin és mtsai.*, (2010) által kapott eredményekkel. A 84 Polonia családba tartozó egyed a kombinált módszerrel a többi mintától elkülönülve, egyedi haplotípust alkotott.

Négy mintánál a kombinált markerek alkalmazása bizonyult hatásosabbnak a kancacsaládok haplotípusokkal való társítására. Két, a Bukovina kancacsaládba tartozó egyed, elkülönült haplotípust alkottak. Továbbá, egy-egy a 825 Agla és a Bajkalka családból szintén elkülönült haplotípust alkotott. Ezek a lovak Priskin tanulmányában a szimpla D-loop marker használatával egy közös „825 Agla/Lucina/Bukovina” haplocsoportot formáltak. A kombinált analízis pontosságát kiemeli, hogy vizsgálatunkba bevont 2 Lucina lovak haplotípusa nem mutatott átfedést ezekkel a mintákkal.

Míg Priskin vizsgálatában a 5 Plosca családba tartozó „*Hroby Bolyhos*” elkülönült haplotípust alkotott, addig a mi eredményeink alapján az Aspiráns lovak egy részével alkotott közös haplotípust.

5. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

1. Dolgozatomban a gidrán és a hucul lófajták anyai vonalainak genetikai struktúráját vizsgáltam. Ismereteink szerint a gidrán lovak esetében jelen kutatás volt az első széleskörű mitokondriális DNS alapú analízis. Emellett a *CYTB* gén szekvencia-polimorfizmusait, illetve az általuk meghatározott haplotípusokat a hucul lovaknál szintén először írtam le. A vizsgált *CYTB* szakasz polimorfizmusai alapján 24 gidrán és 13 hucul haplotípust, míg a D-loop régió szekvenciája alapján 32 gidrán és 22 hucul haplotípust határoztam meg. Munkám során a gidrán fajtánál hat korábban még nem publikált *CYTB* (Ht5_{CYTB}, Ht8_{CYTB}, Ht11_{CYTB}, Ht14_{CYTB}, Ht20_{CYTB}, Ht21_{CYTB}) és négy D-loop (Ht12_{D-loop}, Ht28_{D-loop}, Ht29_{D-loop}, Ht32_{D-loop}) haplotípust, míg a hucul lovaknál két új D-loop (Ht16_{D-loop}, Ht18_{D-loop}) haplotípust azonosítottam. A meghatározott *CYTB* és a D-loop haplotípusok szekvenciáit szabadon elérhetővé tettem a GenBank adatbázisban.
2. Megállapítottam, hogy a gidrán és a hucul hagyományos magyar lófajták magasfokú genetikai változatossággal rendelkeznek, amit a magas haplotípus diverzitás mutatók is alátámasztanak. A haplotípus diverzitás a *CYTB* haplotípusok esetében a gidrán kancáknál 0,874, míg a hucul kancáknál 0,835 volt, a D-loop haplotípusoknál a gidrán lovaknál 0,914, míg a hucul lovaknál 0,878 értékeket kaptam.
3. A kapott hucul haplotípusokat bioinformatikai analízis során különböző földrajzi területekről származó lovak haplotípusaival összehasonlítva megállapítottam, hogy *CYTB* és D-loop a markerek alkalmazhatók az adott fajtán belüli genetikai struktúra feltérképezésére, azonban nem alkalmasak az állatok földrajzi élőhelye szerinti elkülönítésére.
4. Igazoltam, hogy a méneskönyvek vezetése mindkét fajta esetében pontosnak mondható. A gidrán lovaknál a kancacsalád és haplotípusok között elvégzett mtDNS analízis alapján az esetek 91,9%-a, míg a hucul lovaknál az esetek 78%-a egyértelműen a méneskönyvvel egyező eredményt mutatott.

5. Megállapítottam, hogy a *CYTB* és a D-loop mtDNS markerek kombinált alkalmazása pontosabb molekuláris és a méneskönyvi összehasonlítást tesz lehetővé. A markerek jövőben alkalmazhatóak lehetnek más tradicionális lófajták genetikai struktúrájának feltérképezésre, illetve a méneskönyvek genetikai alapú ellenőrzésére is

6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

1. Munkám során a gidrán és a hucul kancavonalak diverzitását vizsgáltam mtDNS markerek segítségével. A meghatározott mtDNS haplotípusok szekvenciáit szabadon elérhetővé tettem a GenBank adatbázisban. Kimutattam, hogy mindkét fajtánál léteznek olyan specifikus mtDNS haplotípusok, amelyekbe csak az adott kancacsalád egyedei tartoznak.
2. Vizsgálataim újdonsága és eredménye, hogy a *CYTB* és a D-loop markerek kombinálása hatékonyan alkalmazható a méneskönyvi adatok és a mtDNS polimorfizmusok által meghatározott haplotípusok összehasonlítására.
3. A mtDNS vizsgálat során kapott eredményeket, illetve a feltárt méneskönyvi eltérések a Kisbéri-félvér és Gidrán Lótenyésztő Országos Egyesület és a Póni- és Kislótenyésztők Országos Egyesület, mint gidrán, illetve a hucul fajtafenntartó a tenyésztési programjaikban hasznosíthatják.
4. Eredményeim alapján felhívom a figyelmet a lovak molekuláris markerekkel történő csoportosításának jelentőségére. Bár a méneskönyvi adatok az esetek többségében pontosnak mondhatók, kérdéses esetekben a mtDNS markerek egyes kancacsaládoknál biztonsággal alkalmazhatók a lovak kancacsaládba sorolásához.
5. Eredményeim hasznosak lehetnek az más fajták fajtavédelmi terveihez, elősegítve a fajok jelenlegi genetikai státuszának megismerését és a ritka genetikai variációk megőrzését.

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Achilli, A. - Olivieri, A. - Soares, P. - Lancioni, H. - Kashani, B. H. - Perego, U. A. - Nergadze, S. G. - Carossa, V. - Santagostino, M. - Capomaccio, S. (2012): Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109. 2449-2454.
2. Ali, M. E. - Razzak, M. A. - Hamid, S. B. A. - Rahman, M. M. - Al Amin, M. - Rashid, N. R. A. (2015): Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry* 177. 214-224.
3. Balog, Á. (1997). A biodiverzitás megőrzése. Budapest OMIKK.
4. Bandelt, H.J. - Forster, P. - Röhl, A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
5. Bowling, A. T. - Del Valle, A. - Bowling, M. (2000): A pedigree-based study of mitochondrial d-loop DNA sequence variation among Arabian horses. *Animal Genetics* 31. 1-7.
6. Cothran, E. - Juras, R. - Macijauskiene, V. (2005): Mitochondrial DNA D-loop sequence variation among 5 maternal lines of the Zemaitukai horse breed. *Genetics and Molecular Biology* 28. 677-681.
7. Devi, K. M. - Ghosh, S. K. (2013): Molecular phylogeny of Indian horse breeds with special reference to Manipuri pony based on mitochondrial D-loop. *Molecular Biology Reports* 40. 5861-5867.
8. Hasegawa, M. - Kishino, H. - Yano, T. A. (1985): Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22. 160-174.
9. Jakabová, D. - Gralak, B. - Burócziová, M. - Buleca Jr, J. - Maróti-Agóts, Á. - Massányi, P. - Zöldág, L. (2009): Diversity analysis of Hucul horse population based on molecular genetic data. *Magyar Állatorvosok Lapja* 131. 685-691.
10. Jianxing, C. - Yujiang, S. - Qingjie, P. - Lingjiang, M. - Lai, M. (2012): Analyses of Differences in the Maternal Structure of Different Geographical Domestic Horses. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 14. 013.

11. Kavar, T. - Brem, G. - Habe, F. - Sölkner, J. - Dovč, P. (2002): History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. *Genetics Selection Evolution* 34. 635-648.
12. Kusza, S. - Priskin, K. - Ivankovic, A. - Jedrzejewska, B. - Podgorski, T. - Jávora, A. - Mihók, S. (2013): Genetic characterization and population bottleneck in the Hucul horse based on microsatellite and mitochondrial data. *Biological Journal of the Linnean Society* 109. 54-65.
13. Larkin, M. A. - Blackshields, G. - Brown, N. - Chenna, R. - Mcgettigan, P. A. - Mcwilliam, H. - Valentin, F. - Wallace, I. M. - Wilm, A. - Lopez, R. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23. 2947-2948.
14. Li, J.-L. - Shi, Y.-F. - Bu, R.-Q. - Mang, L. (2006): PCR-RFLP analysis of the mtDNA Cytb gene in three different horse breeds. *Yi chuan* 28. 933-938.
15. Lopes, M. S. - Mendonça, D. - Cymbron, T. - Valera, M. - Da Costa-Ferreira, J. - Da Câmara Machado, A. (2005): The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. *Animal Genetics* 36. 196-202.
16. Luís, C. - Bastos-Silveira, C. - Cothran, E. G. - Do Mar Oom, M. (2006): Iberian origins of New World horse breeds. *Journal of Heredity* 97. 107-113.
17. Mihók, S. (2012). *Gidrán Méneskönyv*. Budapest, Kisbéri és gidrán lótenyésztő országos egyesület.
18. Mihók, S. (2006). *A gidrán ló monográfiája*. Debrecen, Kisbéri és Gidrán Lótenyésztő Országos Egyesület.
19. Mihók, S. (2016). *Fajtafenntartás, génmegőrzés, lóhasználat (változás)* Debrecen, Póni- és Kislótenyésztők Országos Egyesülete
20. Moridi, M. - Masoudi, A. - Vaez Torshizi, R. - Hill, E. (2013): Mitochondrial DNA D-loop sequence variation in maternal lineages of Iranian native horses. *Animal Genetics* 44. 209-213.
21. Peng, M. S. - Fan, L. - Shi, N. N. - Ning, T. - Yao, Y. G. - Murphy, R. W. - Wang, W. Z. - Zhang, Y. P. (2015): DomeTree: a canonical toolkit for mitochondrial DNA analyses in domesticated animals. *Molecular Ecology Resources* 15. 1238-1242.

22. *Posada, D.* (2008): jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25. 1253-1256.
23. *Prystupa, J. M. - Hind, P. - Cothran, E. G. - Plante, Y.* (2012a): Maternal lineages in native Canadian equine populations and their relationship to the Nordic and Mountain and Moorland pony breeds. *Journal of Heredity* 103. 380-390.
24. *Qin, F. - Wang, X.-B. - Zhang, Y.-S. - Zhang, M.-L. - Li, X.-F. - Lei, C.-Z.* (2009): Analyses on mtDNA cytb genetic diversity in Lichuan horse. *Hubei Agricultural Sciences* 12. 11-12.
25. *Rozas, J. - Librado, P. - Sánchez-Delbarrio, J. - Messeguer, X. - Rozas, R.* (2009): DnaSP v5. *DNA* 9. 16.
26. *Taberlet, P. - Coissac, E. - Pansu, J. - Pompanon, F.* (2011): Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. *Comptes Rendus Biologies* 334. 247-254.
27. *Takasu, M. - Ishihara, N. - Tozaki, T. - Kakoi, H. - Maeda, M. - Mukoyama, H.* (2014): Genetic Diversity of Maternal Lineage in the Endangered Kiso Horse Based on Polymorphism of the Mitochondrial DNA D-Loop Region. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76. 1451-1456
28. *Tamura, K. - Stecher, G. - Peterson, D. - Filipski, A. - Kumar, S.* (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30. 2725-2729.
29. *Yue, X. P. - Qin, F. - Campana, M. G. - Liu, D. H. - Mao, C. C. - Wang, X. B. - Lan, X. Y. - Chen, H. - Lei, C. Z.* (2012): Characterization of cytochrome b diversity in Chinese domestic horses. *Animal Genetics* 43. 624-626.

8. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/259/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sziszkosz Nikolett
Neptun kód: KL9K79
Doktori Iskola: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10050429

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű könyvrészletek (1)

1. **Sziszkosz, N.**, Kusza, S., Jávor, A., Mihók, S.: Gidrán lovak kancacsaládjainak ellenőrzése a D-loop régió egy szakaszának vizsgálatával.
In: III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2014. Konferenciakötet [elektronikus dokumentum]. Szerk.: Schaub Anita, Szabó István, Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat, Pécs, 1061-1066, 2015. ISBN: 9789636427412

Idegen nyelvű, hazai könyvrészletek (1)

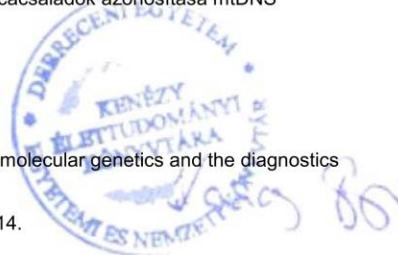
2. **Sziszkosz, N.**, Kusza, S., Jávor, A., Mihók, S.: Determining Gidran mare families using mitochondrial DNA marker.
In: 20th Youth Scientific Forum. Ed.: Bene Szabolcs, University of Pannonia, Georgikon Faculty, Keszthely, 528-537, 2014. ISBN: 9789639639577

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

3. **Sziszkosz, N.**, Kusza, S., Jávor, A., Mihók, S.: Méneskönyvi és molekuláris genetikai egybeesések a gidrán kancacsaládjainál az mtDNS alapján.
Agrártud. közl. 65, 69-73, 2015. ISSN: 1587-1282.
4. **Sziszkosz, N.**, Kusza, S., Jávor, A., Mihók, S.: A hucul kancacsaládok azonosítása mtDNS markerrel.
Agrártud. közl. 57, 75-79, 2014. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

5. **Sziszkosz, N.**, Jávor, A., Kusza, S.: Development of horse molecular genetics and the diagnostics of most important monogenic hereditary diseases.
Állatteny. takarm. 65 (3), 71-81, 2016. ISSN: 0230-1814.





Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

6. **Sziszkosz, N.**, Mihók, S., Jávör, A., Kusza, S.: Genetic diversity of the Hungarian Gidran horse in two mitochondrial DNA markers.
PeerJ. 4, 1-15, 2016. EISSN: 2167-8359.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1894>
IF: 2.177

További közlemények

Magyar nyelvű könyvek (1)

7. Czeglédi, L., **Sziszkosz, N.**, Kusza, S.: Molekuláris biológiai technikák az élelmiszer eredetvizsgálatban. [s.n.], [s.l.], 79 p., 2015.

Idegen nyelvű közlemények külföldi folyóiratban (2)

8. Kusza, S., **Sziszkosz, N.**, Nagy, K., Masala, A., Kukovics, S., Jávör, A.: Preliminary result of a genetic polymorphism of [beta]-lactoglobulin gene and the phylogenetic study of ten balkan and central european indigenous sheep breeds.
Acta Biochim. Pol. 62 (1), 109-112, 2015. ISSN: 0001-527X.
DOI: http://dx.doi.org/10.18388/abp.2014_846
IF: 1.187
9. Tropea, G., Parmakelis, A., **Sziszkosz, N.**, Balanika, K., Boudierka, A.: A New Species of *Euscorpius* Thorell, 1876 from Naples Province, Italy (Scorpiones: Euscorpiidae).
Euscorpius. 182, 1-12, 2014. EISSN: 1536-9307.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,364

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 2,177

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.08.28.

