

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉS- ÉS TAKARMÁNYOZÁSTANI TANSZÉK

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: Dr. Bánszki Tamás MTA doktora

Témavezetők:

Dr. habil Jávor András
mezőgazdaság-tudomány kandidátusa

Dr. h.c. Fésüs László
MTA doktora

**MOLEKULÁRIS GENETIKAI ESZKÖZÖK ALKALMAZÁSA
A BOORoola (FecB) MUTÁCIÓT HORDOZÓK AZONOSÍTÁSÁRA
A SZAPORA MERINÓ FAJTÁBAN**

Készítette:
Árnyasi Mariann
doktorjelölt

Debrecen
2003.

**MOLEKULÁRIS GENETIKAI ESZKÖZÖK ALKALMAZÁSA
A BOORoola (FecB) MUTÁCIÓT HORDOZÓK AZONOSÍTÁSÁRA
A SZAPORA MERINÓ FAJTÁBAN**

*Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Állattenyésztési Tudományok tudományágban*

Írta: **Árnyasi Mariann** doktorjelölt

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:	Dr. Veress László	DSC
Tagok:	Dr. Komlósi István	PhD
	Dr. Mucsi Imre	CSC

A doktori szigorlat időpontja: 2003. április hó 22.

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat	Aláírás
Dr. Lengyel Attila	CSC	
Dr. Komlósi István	PhD	

A bíráló bizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:			
Titkár:			
Tagok:			
			
			
			
			
			
			

Az értekezés védésének időpontja: 200.....

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
1. Bevezetés	1.
2. Témafelvetés	3.
3. Irodalmi áttekintés	5.
3.1. A FecB gén	5.
3.1.1. A FecB gén eredete	5.
3.1.2. A fecB gén térképezése	7.
3.1.3. A FecB gén „működése”	11.
3.2. A FecB gén elterjedése	12.
3.2.1. A FecB gén elterjedése a Világban	12.
3.2.2. A fecB gén Magyarországon – a szapora merinó	16.
3.3. A FecB genotípus meghatározása	18.
3.3.1. A FecB genotípus meghatározása fenotípus alapján	18.
3.3.2. A FecB genotípus meghatározása marker genotípus alapján	22.
3.3.3. A FecB genotípus meghatározása direkt génteszt alapján	24.
3.4. Molekuláris genetikai módszerek és markerek a FecB mutációt hordozó egyedek azonosításához	26.
3.4.1. Restrikciós fragment hossz polimorfizmus	27.
3.4.2. Egyszerű szekvencia hossz polimorfizmus	28.
3.4.3. Egyszerű nukleotid polimorfizmus	30.
3.4.4. Konformáció polimorfizmus	30.
4. Saját vizsgálatok anyaga és módszere	36.
4.1. Ovulációs ráta vizsgálatok	36.
4.2. Marker vizsgálatok	37.
4.2.1. Marker genotípus meghatározás	37.
4.2.1.1. Mintavétel	38.
4.2.1.2. Mintaelőkészítés	39.
4.2.1.3. Polimeráz láncreakció	40.
4.2.1.4. Mikroszatellit allélok meghatározása kapilláris-elektroforézissel	42.

4.3. Direkt génteszt vizsgálatok	43.
4.3.1. A BMPR-IB receptorban bekövetkezett mutáció kimutatása	44.
4.3.1.1. Mintavétel	44.
4.3.1.2. Mintaelőkészítés	44.
4.3.1.3. Polimeráz láncreakció	44.
4.3.1.4. Restrikciós fragment hossz polimorfizmus, agaróz-gélelektroforézis	45.
4.4. A marker és direkt génteszt vizsgálatoknál alkalmazott statisztikai módszerek	46.
5. Vizsgálati eredmények és azok értékelése	51.
5.1. Ovulációs ráta vizsgálatok eredménye	51.
5.2. Marker vizsgálatok eredménye	52.
5.3. Direkt génteszt vizsgálatok eredménye	61.
5.4. A direkt génteszt és a markervizsgálatok eredményeinek összehasonlítása	64.
5.5. A direkt génteszt és a fenotípus alapján történő genotípus meghatározás eredményeinek összehasonlítása	66.
5.6. Az egyes FecB genotípus meghatározási módszerek idő- és költség igényének összehasonlítása	71.
6. Következtetések	73.
7. Új tudományos eredmények	78.
8. Gyakorlatnak átadható eredmények	79.
9. Összefoglalás	80.
10. Irodalomjegyzék	85.
Melléklet	
Köszönetnyilvánítás	

1. Bevezetés

Magyarország juhtenyésztésében az első kultúrfajta a merinó volt. A 18. század harmadik harmadában a cseh morva és osztrák területekről, illetve Sziléziából és Szászországból kerültek posztógyapjas, elektorál és negretti fajtaváltozatok a Kárpát-medencébe. Később az állomány olyan gyors ütemben gyarapodott, hogy kialakult az elektorál-negretti posztógyapjas változat. Ebben az időben a nagybirtok egyik legjövedelmezőbb gazdasági ágazatának ígérkezett. Az európai piacokon a 19. század második felében megjelent a tengeren túlról, olcsó vízi úton szállított finomgyapjú, s ez véget vetett a hazai finomgyapjú termelés korábbi konjunktúrájának. A század második felétől az ipari gyapjú feldolgozás-technikai változásával a posztó helyett a szövet és hurkolt készítmények előállítása került előtérbe. Ez az új technikai eljárás elsősorban a merinó fésűs-gyapjas rambouillet változatának kedvezett. A fésűs merinó állomány egyre növekedett, mely a nagyobb nyírósúly, durvább fűrtfinomság mellett jelentős árbevétel többletet eredményezett s ez javította a juhtartás gazdaságosságát.

A 20. század elején jelent meg először Magyarországon a merinó hús típusú változata. A hazai húsmerinó kialakításában elsősorban a franciaországi precose és a tőlünk északra és keletre található húsmerinó változatok vettek részt.

A két világháború között az ország merinó állományának többségét, elsősorban a fésűs merinókat, fejték. Sajnos a jól tejelő törzsjuhászatok többsége a világháború áldozata lett.

A második világháború után újra a gyapjútermelés került előtérbe, s így a tenyészcél is elsősorban a gyapjúhozam növelése volt. Az 1960-as évek végétől kezdődően azonban változtak a piaci igények, egyre növekedett a külföldi kereslet a vágóbárányok iránt. A hústermelő képesség javítása érdekében a hosszú éveken át tartó fajtatisztta tenyésztést követően különböző, vágóbárány termelést célzó húsirányú keresztezési konstrukciókat alakítottak ki. Egyre nagyobb figyelem irányult a szapora fajtákra is, hiszen tudjuk, hogy a hústermelés jövedelmezőségét döntően az egy anyajuhtól évente értékesített bárányhús mennyisége határozza meg, ezért a húsminőség, a bárányok egyedi hústermelő képessége mellett a szaporaság játszik szintén fontos szerepet a gazdaságos termelés kialakításában. A jelenlegi jövedelmezőségi viszonyok mellett a gazdaságos szint 1,5-1,6 hasznosult bárányszaporulat (JÁVOR és mtsai., 1999; KUKOVICS és mtsai., 1999; JÁVOR, 1998).

Egy faj, illetve fajta potenciális szaporasága genetikailag meghatározott. Hogy mennyire sikerül kihasználni a genetikai potenciált, az a különböző környezeti tényezőktől (takarmányozás, tartástechnológia, emberi tényezők) és azok kölcsönhatásaitól függ. Ha ez a potenciális szaporaság egy adott fajtában eleve alacsony, akkor a környezeti igények maximális kielégítése mellett sem érhetünk el kimagasló javulást. Az állomány termelőképességét a jobb teljesítményű egyedek kiválogatásával javítani tudjuk. A szaporaság azonban poligénes tulajdonság, azaz több gén együttesen határozza meg a fenotípust. Örökölhetőségi értéke kicsi, a hagyományos, fenotípus alapján történő szelekcióval csak hosszú idő után és nagy szelekciós differenciált alkalmazva érhetünk el javulást, s mindemellett csak a genetikai potenciál által meghatározott maximális termelőkapacitásig juthatunk el. Ezt igazolják a szaporaság növelésére irányuló kísérletek, mely szerint hagyományos szelekciós eljárást alkalmazva átlagosan, mindössze 1,3% éves realizált, egy anyára vetített hasznosult béránszaporulat növekedést érhetünk el (MORRIS, 1990).

A szaporaság növelésének másik módja lehet a szapora fajtákkal (pl. finn lapály, vagy romanov) történő keresztezés, melynél azonban csak az első generációban számolhatunk jelentős heterózis hatással az említett tulajdonságra vonatkozóan.

A legtöbb poligénes tulajdonságnál az egyes gének tulajdonságot befolyásoló hatása kicsi. Előfordulhat azonban, hogy a tulajdonság kialakításáért felelős géncsoportból egy-egy gén relatíve nagy hatással rendelkezik, és sok esetben az átlagtól nagyobb termelésre képesíti az állatot. Ezek az úgynevezett **nagyhatású, vagy major gének**, – amelyek a szaporaság vonatkozásában is megtalálhatók –, s amelyeket ha keresztezéssel sikerül bevinni egy kis termelőképességű populációba, úgy azzal az állomány genetikailag meghatározott potenciális szaporaságát növelni tudjuk. Ezért jelentősen felértékelődtek azok a genotípusok, amelyeknél sikerült valamilyen nagyhatású gén jelenlétét kimutatni. A juhok esetében a booroola gén volt a világon elsőként lejegyzett szaporaságot befolyásoló nagyhatású gén.

A gén jelenlétére az 1960-as években figyeltek fel Ausztráliában, a „booroola” farmon, az akkor még magyarázatra szoruló szokatlanul nagy szaporaságok előfordulása miatt. A CSIRO több mint két évtizeden át tartó megfigyelésének eredményeként feltételezték, hogy a nagy szaporaságot egy spontán mutált gén befolyásolja. A merinó fajtacsalád posztógyapjas, fésűs-gyapjas és húsmerinó változatai után felbukkant egy, a föld legnagyobb szaporaságot elérő fajtáival vetekedő szapora merinó fajtaváltozat is. Felismerve jelentőségét néhány év alatt a világ valamennyi

kontinensére eljutott és a világ számos országában keresztezési programokat indítottak szapora vonalak, illetve szintetikus fajták kialakítása érdekében.

2. Témafelvetés

Magyarországra 1980-ban kerültek az első booroola egyedek (5 kos és két anyajuh) Veress László professzor úr kezdeményezésére, melyet további import vásárlások követtek. A booroola kosok magyar merinó anyákkal történő keresztezését követően, egy kidolgozott tenyésztési program eredményeként 1992-ben „szapora merinó” néven új fajta született. A tenyésztők célja az volt, hogy egy a magyar merinónál szaporább, sűrítve ellelhető fajtát hozzanak létre, mely a heterózis hatás kiaknázására irányuló, vágóbárány előállítást célzó keresztezésekben anyai partnerként alkalmazható (VERESS és mtsai., 1987). A tenyészállatok szelekciójánál alapkövetelmény, hogy azok a mutáns FecB gént hordozzák. A mutáció közvetlenül az ovulációs rátát (OR) befolyásolja, és csak a nőivarban jut kifejeződésre. A hordozás megállapítása mindaddig a nőivarú egyedeknél azok saját teljesítménye, a kosoknál viszont csak leányivadékaik ovulációs ráta eredménye alapján történt.

A fajta keresztezési konstrukciókban, a gyakorlatban nem terjedt el. Ennek oka az, hogy a szapora merinó egyedek kifejlettkori súlya, a bárányok magzat és báránykori növekedési erélye, valamint súlygyarapodása elmarad a magyar merinóétól. Az F1 anyák esetében is előfordulhat, hogy 3 bárányt ellenek, s ez csak megfelelő üzemi viszonyok mellett nevelhető fel. A fajta igazi értéke azonban a FecB mutáció hordozásában rejlik. Szapora merinó kosokkal cseppvérkeresztést végezve növelni lehetne kevésbé szapora, de nagyobb kifejlettkori súllyal és jó hústermelő képességgel rendelkező fajták szaporulatát. Egyszeri keresztezéssel ugyanis a mutáció bevitel megoldható és a továbbiakban szisztematikus visszakeresztéssel az eredeti fajta kedvező tulajdonságai fenntarthatóak. A cseppvérkeresztést követően azonban a mutációt hordozó egyedek folyamatos szelekciójára van szükség. A mutáció nyomon követésének eddigi módja bonyolult volt és sok időt vett igénybe. Bár a törzstenyészet esetén alkalmasnak bizonyult e módszer, hiszen a hordozók aránya évről évre növekedett, de a kosok minősítéséhez születésüktől számítva legalább 32-35 hónap szükséges. Egyszerűbb genotípus meghatározási módszerre van szükség, mind a törzstenyészet, mind az árutermelő juhászatokat tekintve. Olyanra, amely lehetővé teszi a mutáns FecB gént hordozó egyedek gyors és pontos azonosítását. Erre a megfelelő

megoldást a molekuláris genetikai módszerek alkalmazása jelentheti, melyek lehetővé teszik a DNS szintű szelekciót. Ez vagy a tulajdonságot meghatározó mutációval kapcsoltan öröklődő polimorfizmusok vizsgálatával, vagy ha már ismert maga a mutáció, akkor annak közvetlen azonosítása révén lehetséges.

Mindezek ismeretében munkám során a legújabb molekuláris genetikai eszközök alkalmazásával a mutációt hordozók azonosításának hatékonyabbá tételét tűztem ki feladatul. Célom volt

- megvizsgálni, hogy az OarAE101 és a BM1329 mikroszatellit markerek alkalmasak-e állomány szinten a booroola mutációt hordozók azonosítására, a szapora merinó állományban,
- felmérni annak lehetőségét, hogy a vizsgált markerek alkalmasak-e a booroola a mutáció öröklődésének nyomon követésére annak más állományokba történő bevitele esetén,
- összehasonlítani a hagyományos fenotípus alapján történő genotípus meghatározási módszert a direkt génteszten alapuló módszerek hatékonyságával,
- megvizsgálni, megállapítani, hogy az eddig végzett módszerekkel elért eredmények megbízhatósága, alkalmazhatósága milyen,
- adaptálni a módszert a mutáció hordozás ondóból történő megállapítására.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A FecB gén

3.1.1. A FecB gén eredete

A **booroola merinó** a világ legszaporább juhajtáinak egyike. Eredetét tekintve ausztrál merinó. New South Wales-ben, Ausztráliában, a Booroola farmon egy gyapjútermeléssel foglalkozó testvérpár, a Sears fivérek, különös figyelmet fordítottak a tulajdonukban lévő juhállomány szaporaságának növelésére. A „Booroola” állomány kialakítása tulajdonképpen egy három bárányt ellő anya kiválasztásával kezdődött. Ezt követően az ikreket ellő anyákat egy külön állományba gyűjtötték. Az egyes ellésű bárányok később visszakerültek az eredeti „ausztrál merinó” csoportba, míg az anyák és az ikerellésből származó jerke bárányok maradtak a „szapora” nyájban. A Sears testvérek halálát követően 1959-ben az „iker-ellő nyájat” a CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization - Tudományos és Ágazati Kutatási Szervezet) Állattenyésztési Intézete megvásárolta és vizsgálta azt az állományt, melyet az állatok származási helye, a Sears fivérek tulajdonában lévő „booroola” birtok alapján neveztek el. Ez időszakban, az állományban a szaporulati arány átlagosan 190% volt. Ezt a kivételes képességét egy, a szaporaságot meghatározó nagyhatású génnek köszönheti, melyet a COGNOSAG (Committee on Genetic Nomenclature of Sheep and Goats) booroola génnek nevezett el (COGNOSAG, 1989) és a lókuszt „FecB” rövidítéssel jelölte. A FecB gén alléljai közül a vad típus jele a „+” a mutáns allél pedig a „B”. Ezen kívül a mutáns allélt „Fec^B”-ként is jelölhető. A FecB gén a juh egyik testi kromoszómáján található, melyet az alomnagyságra (DAVIS és KELLY, 1983; PIPER és BINDON, 1982a) és az ovulációs rátára (DAVIS és mtsai., 1982) irányuló szegregációs vizsgálatok alapján mutattak ki. A fenotípus a mendeli törvényeknek megfelelő öröklődést mutat, mely bizonyítja, hogy nagyhatású génről van szó. A génnek additív hatása van az ovulációs rátára és részleges dominanciát mutat az alomszámot illetően. Ausztrál vizsgálatok alapján a normál merinó anyák átlagos ovulációs rátája 1,5, a heterozigóta hordozóké 2,9, a homozigóta anyáknál pedig 4,7 (PIPER és mtsai., 1985). További vizsgálatok alapján más szerzők is hasonló eredményeket közöltek a mutáns FecB gén ovulációs rátát és alomszámot növelő hatásáról. A Fec^B allél egyszeri jelenléte az ovulációs rátát átlagosan 1,3-1,6-al, az

alomszámot 0,9-1,2-el növeli (DAVIS és mtsai., 1982). BINDON és mtsai. (1985) merinó x booroola keresztezésből származó utódoknál 47-87%-os növekedést tapasztaltak az ovulációs rátában, 45-56%-al nőtt az alomszám. Az 1-33%-os bárányelhullás következtében az anyáknént leválasztott bárányszám így is 16-37%-al több volt, mint a kontroll merinó esetében.

Nyilvánvalóvá vált, hogy a mutáció kifejeződése ivarra-korlátozott, mivel a booroola kosok szaporodásbiológiai, termékenyítő képességére vonatkozó vizsgálati eredmények (here növekedési ráta, here méret, napi ondótermelés), valamint a hormonális jellemzők (plazma FSH és LH koncentrációja) nagyon hasonlóak voltak a normál merinó kosokéval (O'SHEA és mtsai., 1983; PURVIS és mtsai., 1983; WALKER és mtsai., 1985; BINDON és mtsai., 1985). A nőivarú egyedeken végzett vizsgálatok eredményeit - booroola anyák esetében kimutatott jelentős FSH növekedés az ivari ciklus során - egy visszacsatolási elégtelenségnek („feedback deficiency”) tulajdonították, mely valószínűleg a folyamatban szerepet játszó inhibitor kisebb mennyiségben való jelenlétéből adódhat. Booroola anyáknál mindössze 1/3-a volt a mért inhibitor szint a kontrol merinó anyákhoz viszonyítva (CUMMINS és mtsai., 1983.; BINDON, 1984; SCOTT és mtsai., 1980). Így feltételezhető, hogy ez a visszacsatolási elégtelenség okozza a nagy ovulációs ráta (OR) kialakulását (HENDERSON és FRANCHIMONT, 1983; MC.NATTY és mtsai., 1990).

Ugyan a mutáns FecB gén jelenlétét a booroola merinó fajtában jegyezték fel, sokáig vitatott kérdés volt, hogy vajon ott is alakult e ki, vagy a XVIII. század utolsó éveiben Indiából vásárolt kistestű bengáli (Garole) fajtájú juhokkal került ez az értékes tulajdonság az ausztrál merinóba (TURNER, 1982; PIPER és mtsai., 1988). A közelmúltban történt felfedezés, amely egyértelműen bizonyította, hogy egy pont mutáció felelős a „booroola” fenotípus megjelenéséért - erről bővebben egy későbbi fejezetben esik szó -, olyan közvetlen DNS vizsgálat elvégzésére adott lehetőséget, mely a mutáció eredetének kiderítését segítette. DAVIS és mtsai. (2002) nyolc különböző szapora juhajtán (garole (bengal) – India; jávai - Indonézia; thoka - Izland; woodlands - Új-Zéland; olkuska - Lengyelország; lacaune - Franciaország; belclare - Írország; chambridge - Írország) végezték el a direkt génteszt vizsgálatot, melynek eredményeként a bengáli (garole) és jávai juhokban kimutatták a FecB mutációt, a többi

6 fajtában viszont nem. Ez egyértelműen bizonyítja azt a feltevést, hogy a mutáció a bengáli juhval került Ausztráliába.

2.1.2. A FecB gén térképezése

Egy faj genomját, az adott fajra jellemző meghatározott számú kromoszómapár alkotja (sertésnél 19, szarvasmarhánál 30, juhnál 27, ló esetében 32) (WEAVER és HEDRICK., 2000). Emlősnél ezekbe a kromoszómákba megközelítőleg 3 milliárd bázispár hosszúságú DNS szekvencia van „csomagolva”, s a juh faj esetében a kódoló régiók körülbelül 70-100.000 gént határoznak meg (HALEY ÉS VISSCHER, 1998).

Elnézve ezeket a számokat lehetetlen vállalkozásnak tűnik az egy-egy tulajdonság kialakításáért felelős gének meghatározása. **A genetikai háttér felderítéséhez** nagy segítséget jelent, hogy a fajok között a fehérjét kódoló szekvenciák, kromoszóma régiók konzerválódtak az evolúció során. Így a humán oldalon elért eredmények és ismeretek felhasználhatóak az egyes állatfajok genetikai térképének készítésénél, a gének pontos helyének meghatározásánál.

Amikor a gének, vagy beszéljünk egyszerűen csak egy-egy bizonyos DNS szakasról, közel helyezkednek el egymáshoz ugyanazon a kromoszómán, akkor nem függetlenül öröklődnek, hanem a meiózis során együtt hasadnak. Ezt a jelenséget genetikai kapcsoltságnak nevezik. A genetikai kapcsoltságot CORRENS, BATESON és PUNNETT (BATESON, 1909) jegyezte föl elsőként, mint a mendeli öröklődés törvénye alóli kivételt. Az egyes gének, vagy markerek távolsága a fenotípus-szegregációs kísérletek során fellépő rekombináció gyakorisága alapján határozható meg, melyet **centi Morgan-ben (cM)** fejeznek ki. Minél távolabb van két lókuszt egymástól, annál nagyobb a lehetőség a rekombinációra. Ha például két lókuszt közötti távolság 10 cM, az azt jelenti, hogy a rekombináció gyakorisága 10%.

Természetesen a gén megtalálása a legnehezebb. A feladat megoldása hosszú időt vesz igénybe, ezért az első vizsgálatok is elsősorban a mutáns FecB génnel genetikailag kapcsolt fehérje (pl. vércsoport) illetve DNS polimorfizmusok keresésére irányultak. A biokémiai markerek azonosítása nemcsak az egyedek genotípus meghatározását gyorsítaná és tenné pontosabbá, de fontos előrelépést jelentene a gén molekuláris szerkezetének és működésének megismerésében is.

FÉSÜS és mtsai. (1991) booroola merinó x magyar merinó R1 és R2 egyedeknél tanulmányozták 8 biokémiai polimorfizmus (transzferrin, hemoglobin, albumin, hemopexin, x-protein, α_1 -proteázgátló (Pi2), α_1 -glükoprotein (Ptf), arilészteráz-A) előfordulását és kapcsolatát a FecB mutációval. A Pi2^F és a Ptf^F allélok pozitív, de nem szignifikáns hatását mutatták ki az ovulációs ráta és az alomnagyság vonatkozásában.

NGUYEN és mtsai. (1992) Franciaországban 11 B+ booroola merinó és 370 ++ genotípusú merino d'arles anyajuh utódaiban vizsgálták a Fec^B allél és hét vércsoport-rendszer (A, B, C, D, M, F41), három biokémiai polimorfizmus (Tf, Hb, CA) és az OLA (fehérvérsejt antigén) allélek szegregálódását. Kapcsoltságra utaló összefüggést nem találtak. TATE és mtsai. (1992) szintén fehérje polimorfizmusok kapcsoltságát vizsgálták erre a célra létrehozott keresztezett családokban, heterozigóta booroola B+ kosok féltestvér utódaiban (Alb; ES-A; szén-sav anhidráz; CA; kataláz; Cat; diaforáz - Dia1; Glükóz foszfohexóz izomeráz - GPI; hemoglobin - Hb; Hpx; izocitrát dehidrogenáz - IDH; leucin amidopeptidáz - LAP; malonsav dehidrogenáz - Me1; plazminogén - OPA; szuperoxid diszmutáz - SOD; transzferrin - Tf; D-vitamin kötő fehérje - Gc; X-Prot). A 17 fehérje közül 10 esetében találtak eltérést az egyedek között és mindegyiknél előfordult rekombináció. A FecB lókusztól a rekombinációs gyakoriság alapján számított távolságok a következők voltak: NADH diaforáz (DIA1) – 9,2 cM; arilészteráz (EsA) – 11,9 cM; béta hemoglobin (HBB) – 17,5 cM; leucin amidopeptidáz (LAP) – 19,7; malik enzim (ME1) – 14,8 cM; eritrocit 'X' fehérje (Prot-X) – 25,3 cM; post-transzferrin (PTF) – 2,2 cM; transzferrin (TF) – 33,8 cM. A Hemoglobin B allélja és a FecB allél között egyetlen család (6 utód) esetében sem lépett fel rekombináció, a kis elemszám miatt azonban nem állítható egyértelműen a két allél együttes öröklődése, melyet HENKES és mtsai. (1994) vizsgálati eredményei is megerősítettek. Munkájukban 20 biokémiai vér polimorfizmust tanulmányoztak, többek között a hemoglobint is, melynél nem találtak kapcsoltságot a B allél és a FecB lókusztól között. Ugyanakkor TATE és mtsai. (1992) által közöltekkel ellentétben, gyenge összefüggést sikerült kimutatniuk a malik enzim (ME) és a Fec^B allél között. A Fec^B allélt hordozó egyedeknél közel háromszor olyan gyakran fordult elő a ME FS genotípus az ME FF genotípushoz képest. WATSON és KHATTAB (1964) megállapítása szerint számos további vizsgálatra van szükség az egyértelmű kapcsoltság kimutatásához, mivel két fenotípus közötti összefüggést a fenotípust meghatározó gének fizikai kapcsoltságán túl egyéb tényezők is okozhatják, mint például a pleiotrópia vagy a szelekció.

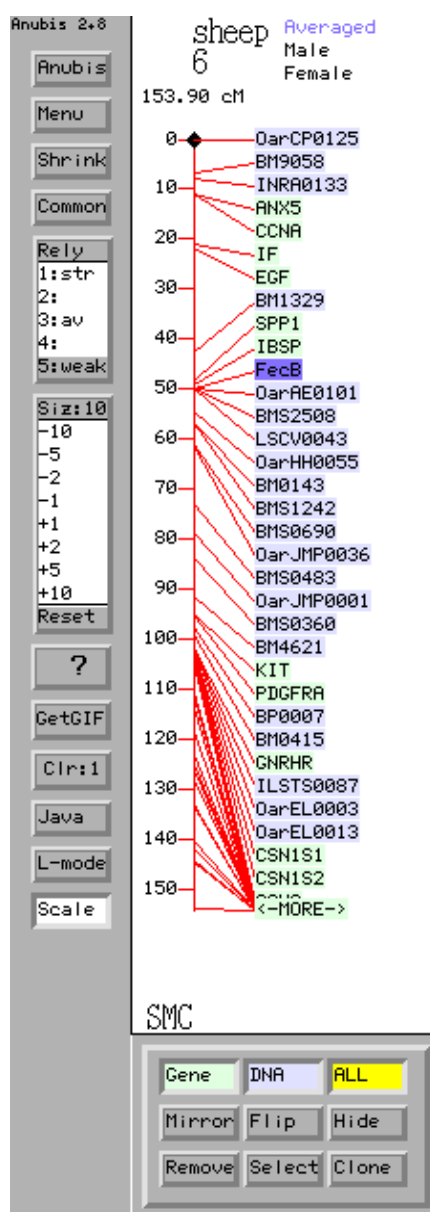
Az első jelentős eredményt a booroola gén térképezésében 1993-ban közölték, miszerint genetikai kapcsoltságot találtak 12 féltestvér-családban végzett szegregációs vizsgálat alapján két mikroszatellit marker (OarAE101 és OarHH55), az emberi 4-es kromoszóma 4q25-os régiójából származó epidermal növekedési faktor (EGF-epidermal growth factor), és a FecB lókuszt között (MONTGOMERY és mtsai., 1993). Továbbá kapcsoltságot mutattak ki az OarAE101 mikroszatellit marker és az SSP1 (secreted phosphoprotein 1) lókuszt között, mely szintén a 4-es humán kromoszómán helyezkedik el, a 4q21-23 régióban. A különböző fajok konzerválódott kromoszóma régióinak összehasonlítása és a kapcsoltsági vizsgálatok alapján a szerzők feltételezése az volt, hogy a FecB mutáció valószínűleg az EGF és SSP1 lókuszok között helyezkedik el a juh 6 kromoszómáján. A távolságot a FecB és az EGF között 26, a FecB és az SSP1 között 14 cM-ben állapították meg.

Egy évvel később MONTGOMERY és mtsai. (1994) kapcsoltsági vizsgálataikat tovább folytatva a FecB lókuszt tartalmazó kapcsoltsági csoportot további markerrel (BM143, mely egy szarvasmarha mikroszatellit) és génekkel (CSN1S1 – kazein- α_{s1} ; PDGFRA - platelet-derived growth factor receptor- α) egészítették ki, melyek feltételezett sorrendje: EGF, FecB, SSP1, OarAE101, OarHH55, BM143, PDGFRA, CSN1S1. Eredményeik alapján egyértelmű következtetést vontak le, miszerint a FecB lókuszt a juh 6. kromoszómáján egy olyan kapcsoltsági csoportnak a tagja, mely a szarvasmarhában és az emberben is konzerválódott.

Francia kutatócsoport miniszatellitek, vérféjérje csoportok és a FecB lókuszt kapcsoltságát tanulmányozta merinó d'arles (++) anyák és booroola merinó (B+) kosok keresztezéséből származó utódokban. A szerzők eredményeik alapján úgy találták, hogy a vizsgált polimorfizmusok közül hét miniszatellit (Synthetic Tandem Repeat – STR) (16C514, 16C518, 16C5A6, 16C24A10, 16C5A3, PERI9, 012012) kapcsolt a FecB lókusszal, azonban azt nem közrefogják, hanem valamennyi annak egyik oldalán helyezkedik el. Kapcsoltságot mutattak ki továbbá az A vércsoport és a vizsgált markerek között (LANNELUC és mtsai., 1994).

Ezen kromoszóma régióra koncentrált sorozatos kapcsoltsági vizsgálatok egyre közelebbi genetikai markerek felderítéséhez vezettek, tovább bővítve a juh 6. kromoszómáján lévő ismert markerek számát. LORD és mtsai. (1998) a FecB lókuszt egy 10 cM hosszúságú régióban a BM1329 és az OarAE101 mikroszatellit markerek közé lokalizálták.

Később 2001-ben több kutató csoport is, egymástól függetlenül, szinte egy időben számolt be egy *olyan pontmutációról*, melyet a **bone morphogenic protein receptor-IB (BMPR-1B - csont morfológiai fehérje receptor-1B) receptor** kódoló szekvenciájában találtak és egyértelmű összefüggést mutatott a booroola anyák nagy ovulációs teljesítményével. (WILSON és mtsai., 2001; SOUZA és mtsai., 2001; MULSANT és mtsai., 2001). A juh 6. kromoszóma FecB gént tartalmazó régiójának fizikai kapcsoltsági térképe a 1. ábrán látható.



1. ábra: A juh (*Ovis aries*) 6. kromoszóma FecB gént tartalmazó régiójának fizikai kapcsoltsági térképe

Forrás: <http://www.thearkdb.org/cgi-bin/> Software © Copyright 1997-2001 Roslin Institute

3.1.3. A FecB gén „működése”

A csont morfogenetikai fehérjék (bone morphogenetic proteins; BMPs) a szállító növekedési faktor- β (transforming growth factor- β - TGF- β) család tagjai. Olyan multifunkcionális fehérjék, melyek különböző sejttípusok differenciálódását és növekedését szabályozzák. Különleges szerepet töltenek be az emlősök, kétélűek és rovarok embrionális fejlődésében, a csontok kialakulásában, az immunfolyamatokban, a sérülések 'gyógyításában' (MASSAGUE, 1998; HOGAN, 1996; WINNER és mtsai., 1995; LETTERIO és ROBERTS, 1998). Kulcsszerepet játszanak továbbá az emlősök termékenységében is. A BMP receptor gén a petefészekben jut kifejeződésre (SHIMASAKI és mtsai., 1999).

A FecB mutáció a BMP-1B receptort kódoló szekvencia 830-as pozíciójában (GenBank referenciaszám:AF312016) bekövetkezett Adenin $\rightarrow$ Guanin helyettesítés, amely a fehérje aminosav sorrendjében is változást idéz elő (1. melléklet). A vad típusnál előforduló *glutamin* helyett egy *arginin* kapcsolódik a fehérjeláncba a 249. aminosav pozícióban. A growth differentiation factor-5 (GDF-5 – növekedés differenciáló faktor-5) és a BMP-4 fehérje természetes ligandumai a BMPR-1B (bone morphogenic protein receptor-1B - csont morfológiai fehérje receptor-1B) receptornak, és normál esetben *gátolják* a juhok granulosa sejtjeinek progeszteron termelését. A nevezett hormon a granulosa sejtek differenciálódásához és a sárgatest kifejlődéséhez szükséges. In vitro kísérletekkel is igazolták, hogy a BB homozigóta anyajuhok granulosa sejtjeinek egyrészt nagyobb mértékű volt a progeszteron termelése, mint a mutációt nem hordozó egyedeké, másrészt kevésbé voltak érzékenyek (fogékonyak) a GDF-5 és a BMP-4 progeszteron szekréciót gátló működésére. Mindezek egyértelműen arra engednek következtetni, hogy a BMPR-1B receptorban bekövetkezett mutáció felelős a receptor funkciójának módosulásáért. Ez eredményezi annak részleges inaktivitását, megakadályozva a GDF-5 és a BMP-4 ligandumokkal való kapcsolódását, így azok inhibitori szerepének betöltését. A vizsgált egyedek közül a BMPR-1B mutációt hordozók kivétel nélkül nagy ovulációs rátájúak voltak. Negatív kontrollként 6 különböző fajtából (coopworth, finn, gotland, prindale, romney, texel) származó, összesen 65 egyedet vizsgáltak meg, de a mutáció csak a booroola vonalból származó egyedeknél volt kimutatható (WILSON és mtsai., 2001).

Annak bizonyítása céljából, hogy a mutáció nem merinó specifikus, négy, nem booroola merinó állományt teszteltek (Franciaországból, Németországból,

Spanyolországból és Ú-Zélandról), és a mutáció valamennyi esetben hiányzott. Ezzel szemben Szaud-Arábiából, Hollandiából és az Egyesült Államokból származó összesen 80 egyed, melyek a FecB génbevitel program eredményeként született booroola keresztezett egyedek voltak, hordozták a mutációt (WILSON és mtsai., 2001). Nem sokkal ezen eredmények megjelenése előtt új-zélandi kutatók egyértelmű összefüggést mutattak ki a szintén kivételes szaporaságáról ismert hanna és inverdale juhajtásban a magas ovulációs ráta és a juh X ivari kromoszómáján elhelyezkedő BMP-15 fehérjében (mely szinten az EGF- β család tagja) bekövetkezett mutáció között (GALLOWAY és mtsai., 2000). Mindezek az eredmények csak megerősítik a BMP család tagjainak és az ide tartozó receptoroknak az ovulációs ráta szabályozásában betöltött szerepét.

3.2. A FecB mutáció elterjedése

3.2.1. A FecB mutáció elterjedése a Világban

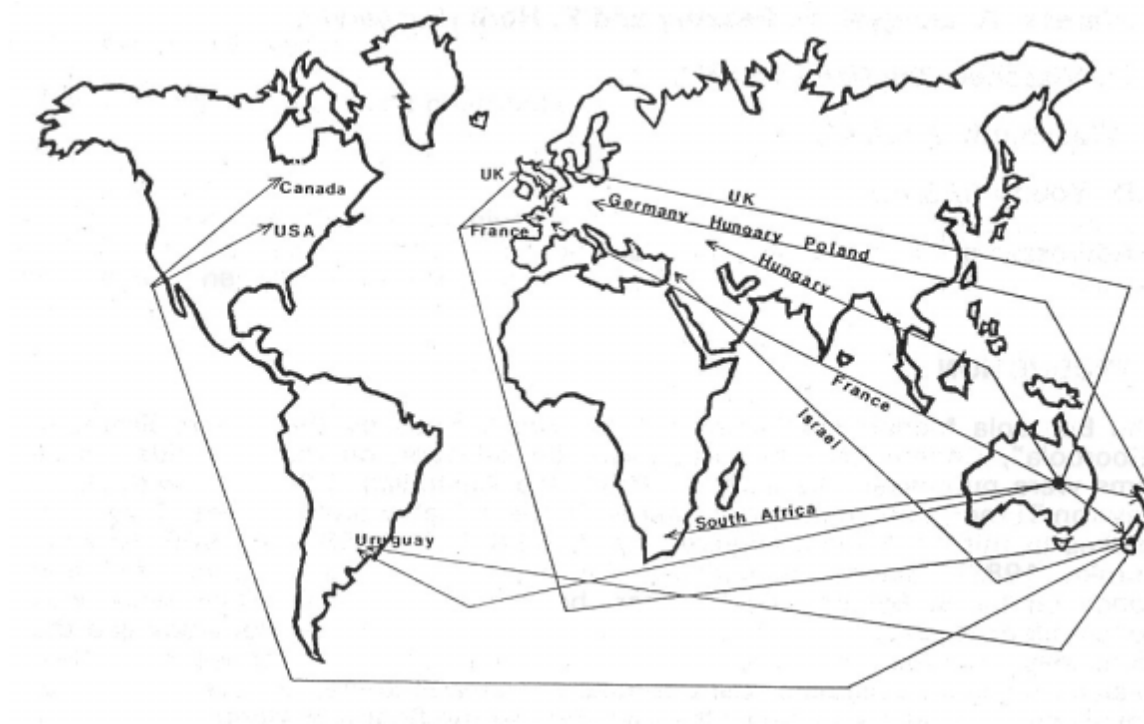
A juh fajban, az elsőként feljegyzett szaporaságot befolyásoló nagyhatású gén a booroola volt. Felfedezését követően más fajtákban is sikerült bizonyítani szaporaságot meghatározó nagyhatású gén jelenlétét. A juh fajtákban napjainkig lejegyzett nagyhatású géneket, és eredetüket összefoglalóan az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Szaporaságot befolyásoló nagyhatású gének és szaporaságra gyakorolt hatásuk a juh fajban

Gén	Leírás	A gén hatása	Szerzők
Belclare	Az ír belclare fajtában írták le	Heterozigóta formában 3,3-al növeli az OR-t	REYNAUD és mtsai. (1999)
Booroola	Juh 6. kromoszómájára térképezték; booroola fajtában írták le először	Homozigóta formában 2,7-3,0-al növeli az OR-t, 1,1-1,7-el az alomszámot	WILSON és mtsai. (2001)
Cambridge	A cambridge fajtában fedezték fel; juh mikroszatellit markerekkel való kapcsoltságát mutatták ki a juh 15-ös kromoszómán	Homozigóta formában 2,14-3,44-el növeli az OR-t	GLAZKO és mtsai. (1997)
Inverdale	Az X ivari kromoszómán található heterozigóta formában fertilitást okoz	Heterozigóta formában 0,6-al növeli a leválasztott bárányszámot	GALLOWAY és mtsai. (2000)
Javanese	Három indonéziai juhajtásban is leírták jelenlétét	Homozigóta formában 2,6-al növeli az OR-t, 1,8-2,0-vel az alomszámot	BRADFORD és mtsai. (1986)
Lacaune	A juh 11-es kromoszómájára térképezték	Heterozigóta formában 1,0-el növeli az OR-t	BODIN és mtsai. (1998)
Thoka	A cheviot juhban írták le	Heterozigóta formában 0,7-el nő az alomszám	RUSSEL és mtsai. (1997)
Woodlands	X kromoszómán öröklődik, Új-Zélandon a coopworth juhban írták le	Heterozigóta formában 0,39-el növeli az OR-t	DAVIS és mtsai. (2001)

Felismerve jelentőségüket a juhállományok szaporaságának növelésében, számos országban indítottak keresztezési programokat a Fec („fecundity”) génnek nem szapora fajtákba történő bevitelére.

Az első booroola merinó kosokat még azelőtt exportálták Ausztráliából, hogy a nagyhatású gén létét felismerték volna. A FecB nagyhatású gén meglétének bizonyításával a booroola merinó világon való elterjedése felgyorsult. Ehhez nagyban hozzájárult a biotechnika (technológia) fejlődése, mellyel lehetővé vált friss és mélyhűtött szaporítóanyag (ondó), illetve mélyhűtött embriók exportálása is (2. ábra) (THIMONIER és mtsai., 1991).



Forrás: THIMONIER és mtsai., 1991

2. ábra: A booroola mutáció elterjedése a Világban

Európában Magyarország volt az első, mely booroola kosokat importált a FecB mutáció hazai merinó állományokban történő elterjesztésére, 1980-ban. Később csatlakozott Franciaország, Anglia, az egykori Csehszlovákia, Németország, Lengyelország, Hollandia, Spanyolország. A közel-keleti országok közül Izrael, a tengeren túlról pedig USA és Kanada. A legtöbb országban elsősorban keresztezésekbe bevonva, a mutációt hordozó egyedek folyamatos használatával igyekeztek a Fec^B allél gyakoriságát növelni egy-egy állományban. Néhány országban a mutáció bevitelét

követően új fajta kialakítására került sor, mint például a hyfer Ausztráliában, a boolyse Kanadában, vagy éppen Magyarországon a szapora merinó.

Az awassi és assaf kiváló tejtermelő fajták, szaporaságuk azonban nagyon alacsony. Izraelben homozigóta booroola merinó kosok spermáját felhasználva mesterséges termékenyítéssel hoztak létre F1 állományokat. Ezt követően az F1 kosokkal újra awassi és assaf anyákat párosítottak. A B+ heterozigóta anyák esetében átlagosan 0,6-al volt nagyobb az alomszám, így feltételezték, hogy homozigóta anyák esetében átlagosan 1-el növelhető a választott bárányszám a nem génhordozó helyi fajtákhoz viszonyítva. Az így létrehozott állományok - melyet affec néven neveztek el - nemcsak intenzív, hanem extenzív körülmények között is tarthatók, ahol az awassi eredetileg is preferált (FAHMY, 1998). Franciaországban a merinó d'arles x booroola merinó keresztezettek merinó d'arles fajtával történő szisztematikus keresztezéssel egy új szintetikus szapora merinó vonal kialakítása volt a cél (BODIN és mtsai., 1990). Ausztráliában ugyanakkor egy háromlépcsős keresztezési programon belül a FecB mutáció segítségével igyekeztek növelni a border leicester x merinó anyák reprodukciós teljesítményét. Így a nagyobb szaporaságú F1 anyákat később terminál hústípusú kosokkal párosítva nagyobb számú, megfelelő minőségű vágóbárányt tudtak értékesíteni egy anyára vetítve (PIPER és mtsai., 1988).

Franciaországban és Ausztráliában végzett booroola keresztezésekből származó állományok OR és alomnagyságra vonatkozó adatai a 2., 3. táblázatokban találhatóak. Az eredmények egyértelműen bizonyítják a FecB mutáció szaporaságot növelő hatását.

2. táblázat: Helyi fajták x booroola merinó F1 utódainak szaporulati eredményei Ausztráliában

Anyai fajta	Az anyák %-os megoszlása az ovulációs ráta alapján						Az anyák %-os megoszlása az alomszám alapján					
	1	2	3	4	>4	átlag	1	2	3	4	>4	átlag
BLB	7,7	31,3	26,4	20,3	14,2	3,07	17,0	42,7	29,2	7,6	3,5	2,31
BLM	19,4	66,7	13,9			2,13	38,8	60,2	1,0			1,66
DHB	9,3	37,2	37,2	8,5	7,7	2,75	23,5	45,2	25,2	3,9	0,8	2,14
DHM	38,7	57,5	3,8			1,73	51,0	49,0				1,45

BLB= border leicester x booroola, BLM= border leicester x merinó

DHB=dorset horn x booroola, DHM=dorset horn x merinó

Forrás: PIPER és mtsai., 1988

3. táblázat: A FecB mutációt hordozó és nem hordozó merinó d'arles anyák %-os megoszlása az ovulációs ráta és az alomszám alapján

Az anyák genotípusa	Ovulációs ráta						Alomszám					
	1	2	3	4	>4	átlag	1	2	3	4	>4	átlag
++	91,4	8,1	0,4	-	-	1,09	69,9	28,1	2,0	-	-	1,32
++/B+ (*)	60,1	25,7	3,4	0,8	-	1,45	48,0	45,0	7,0	-	-	1,61
B+	12,9	57,6	22,9	5,7	1,0	2,24	28,7	45,2	23,3	2,6	0,3	2,00

(*) ebbe a csoportba azokat az anyákat sorolták, amelyekről nem tudták egyértelműen megállapítani,

hogyan hordozók, vagy sem

Forrás: BODIN és mtsai., 1990

Sajnos a nagyobb alomszámmal együtt jár a nagyobb mértékű bárányelhullás is. OSIKOWSKI és BORYS (1980) lengyel merinó, wielkopolska, kamienicka és uhruska lengyel fajtákat kereszteztek booroola merinó kosokkal. Az F1 generációban a szaporulati arány 1,82 bárány/anya volt, amely átlagosan 55%-al volt magasabb, mint a helyi fajtáké. Azonban a bárányok gyengébb életképessége következtében a választott bárányszám alig volt magasabb a keresztezett állományban, mint a helyi fajtákban.

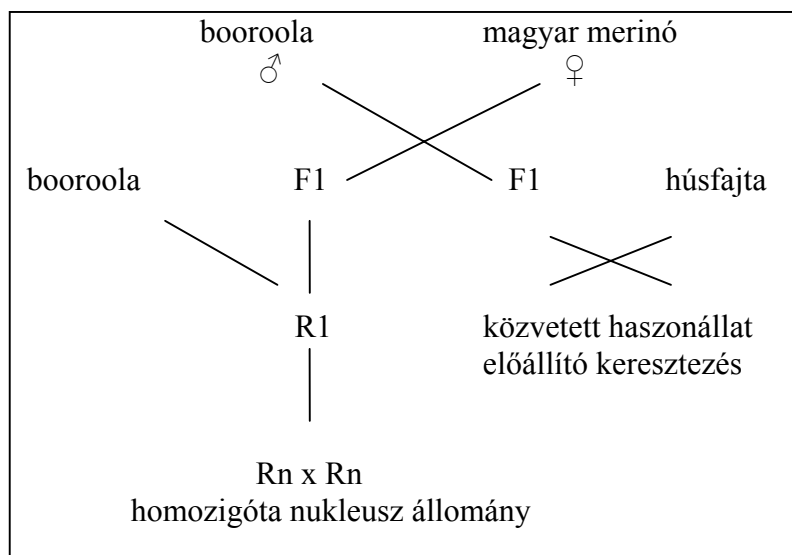
Természetesen a bárányelhullást sok tényező befolyásolja. Így az anyák takarmányozása, az adott helyi fajta báránynevelő képessége is. Amennyiben kielégítjük az anyák környezettel és takarmánnyal szemben támasztott, megnövekedett igényét, visszaszorítható a bárányelhullás és nagyobb hasznosult bárányszaporulatot érhetünk el. Takarmányozási kísérletekben is igazolták, hogy nem a booroola mutáció felelős az ikeralmok esetén jelentkező nagyobb bárányelhullásért, hanem az anyák hiányos fehérje és energiaellátása. Amennyiben a vemhesség utolsó harmadában és az ellést követő első hónapban az iker, illetve több báránnyal vemhes anyákat kiegészítő takarmányozásban részesítik, úgy a késői, a vemhesség 3. harmadában bekövetkező magzatelhalás és a választásig bekövetkező bárányelhullás jelentős mértékben visszaszorítható (KLEEMANN és mtsai., 1993a; KLEEMANN és mtsai., 1993b; HINCH és mtsai., 1996)

3.2.2. A FecB gén Magyarországon - a szapora merinó

Veress László professzor úr javaslatára 1980-ban érkeztek az első booroola egyedek Magyarországra, Kaposvárra. A tenyészállatok döntő többségét James Innes Haldon Station nevű új-zélandi booroola merinó törzsjuhászatából vásárolták. 1980 és 1989 között összesen 32 tenyészkost, 6 anyát és 6 szopósbarányt hoztak magyarországi tenyésztésre, majd 1984-ben B+ anyajuhok és BB kosoktól származó 100 mélyhűtött embrió Ausztráliából való importjára is sor került. (LENGYEL és mtsai., 1990; VERESS és mtsai., 1995)

A booroola merinó hazai alkalmazásával kapcsolatban a tenyésztők a következő alternatívákban gondolkodtak:

1. Az első lépés homozigóta booroola merinó állomány kialakítása génrezervátum, illetve kos előállítás érdekében fajtaátalakító keresztezéssel; a cél a FecB mutációra homozigóta állományt úgy létrehozni, hogy a magyar merinó fenotípusát, nagyobb kifejtettkori testtömegét megőrizze, ahogy ezt Új-Zélandon a kent és corridale fajták esetében sikerült rögzíteni (ALLISON és mtsai., 1979). Hasonló kísérletekről számolt be ELSEN és ORTAVANT (1984) a merinó d'arles fajtával kapcsolatban, illetve később az USA-ban és Kanadában is hasonló keresztezéseket végeztek és hasonló eredményeket értek el. (THIMONIER és mtsai., 1991).
2. Ezt követően merinó anyákból kiindulva olyan közvetett haszonállat-előállító keresztezést célszerű indítani, amelyben a booroola a második partner. A booroola F1 anyákat ezután tömeges, jól izmolt húsfajtájú kosokkal párosítanak (német húsmerinó, feketefejű német húsjuh, suffolk, stb). Az így született bárányszaporulat minden egyede jó minőségű pecsenyebarányként értékesíthető (3. ábra).
3. A booroola mutáció alkalmazásának további lehetősége alacsony szaporaságú fajtákba történő bevitele és elterjesztése. (VERESS és mtsai., 1987; VERESS és mtsai., 1988; LENGYEL és mtsai., 1990; VERESS, 1991; LENGYEL és PÁSZTHY, 1994)



Forrás: VERESS, 1983

3. ábra: A booroola merinó hazai alkalmazásának lehetőségei

Az ország különböző törzsjuhászataiban (Törtel, Csenger, Kaposvár, Hajdúböszörmény) indítottak keresztezést az importált kosokkal homozigóta állomány kialakítása érdekében. Az 1990-es évek elején már Magyarország rendelkezett a legnagyobb ellenőrzés alatt álló merinó jellegű booroola merinó keresztezett állománnyal Európában (SZÉKELY és mtsai., 1990; LENGYEL és mtsai., 1990). A keresztezési programba vont tenyészetek közül azonban kettőben, miután a magyar merinó x booroola merinó jerek az első és második ellésük szaporulati aránya alapján nem különböztek a saját merinó anyák teljesítményétől, s az OTAP utasítására abbahagyták a keresztezést (VERESS és mtsai., 1987).

A debreceni és csengeri juhászat tenyésztési programját az import tenyészállatok közül 17 új-zélandi eredetű kosra, 3 anyára és azok 5 béranyára alapozták. Míg a debreceni állomány esetében a homozigócia kialakítására, Csengerben csupán a mutációt hordozók (B+) előállítására törekedtek (VERESS és mtsai., 1991; VERESS és mtsai., 1998).

A sok éves tenyésztői munka eredményeként végül a magyar merinó x booroola merinó keresztezésből előállított fajtaváltozat **szapora merinó** néven, a keresztezett F₂ nemzedék anyai teljesítménye alapján, 1992-ben megkapta a fajtaelismerést, és a Mezőgazdasági Fajtainósító Tanács köztenyésztésre engedélyezte.

A *debreceni nyájat* - mely vizsgálatom tárgyát képezi - 1988-ban alapították a volt Debreceni Agrártudományi Egyetem (jelenleg DE ATC) Állattenyésztési és Kísérleti telepére került csengeri és a törteli magyar merinó x booroola merinó keresztezésből származó 93 (F1 illetve R1) jerkeutódra, és a James Innestől vásárolt 2 tenyészkosra illetve 3 anyajuhra alapozva. Ezek között előfordult homozigóta mutáns (BB), heterozigóta és a mutációt nem hordozó egyed egyaránt. Az állomány létszámát saját szaporulatból folyamatosan növelték 200 körüli anyajuhlétszámmá. Az anyajuhokat részben importból származó, részben saját tenyésztésű kosokkal pároztatták, vagy termékenyítették.

Az állományban a homozigócia létrehozásán és fenntartásán túl a sűrítve elletés hajlamának, a kifejelettkori testsúly növelésének és egy finomabb (22-24 mikron) és hosszabb fürtű (6-8cm) gyapjútermelésnek az egyidejű növelésére törekedtek. Különös figyelmet fordítottak a „négyes mentesség” kialakítására, ezért a brucellózis, klamidiózis, leptospirozis és Maedi-Visna betegségre szerológiai pozitív egyedeket folyamatosan szűrték és selejtezték (VERESS és mtsai., 1995). Az állomány jelenleg mind a négy betegségtől mentes.

A kis egyedszám miatt a tenyésztők feltétlenül szükségesnek tartották a genealógiai vonaltenyésztés alkalmazását a véletlenszerű rokonpárosítás megelőzése érdekében. A származási adatok alapján megállapították, hogy a debreceni és a csengeri tenyészetekben használt import kosok egy ausztráliai törzstenyészetből származó 9 kos közvetlen, vagy közvetett leszármazottai. Ezért a genealógiai vonalakat a közös ősök szerint számozták, az alvonalakat pedig A, B, C, D betűvel jelölték. (MAGYAR és mtsai., 1997).

3.3. FecB genotípus meghatározása

3.3.1. A FecB genotípus meghatározása fenotípus alapján

A *szapora merinó* esetében a tenyészállatok kiválasztásánál jelentős követelmény, hogy a FecB mutáció homozigóta vagy heterozigóta hordozói legyenek. A booroola nagyhatású gén meglétének felismerését követően évtizedeken keresztül csak a fenotípus alapján történhetett a hordozók azonosítása.

A mutáció közvetlenül az ovulációs rátát befolyásolja, így a tulajdonság közvetlenül csak a nőivarú egyedeken mérhető. Az egyedek genotípusának

meghatározását ezért az *anyajuhok* esetében azok OR vizsgálata, a *kosok* esetében pedig leányutódaik OR eredménye alapján végezték.

A FecB mutációt hordozó nőivarú egyedek azonosítása

Elsőként DAVIS és mtsai. (1982) dolgoztak ki eljárást a FecB genotípus meghatározására. Booroola merinó anyákat a ciklus során mért legmagasabb ovulációs rátájuk alapján osztályozták a következő módon: 5, vagy annál nagyobb OR esetén az anyajuh BB, 3 vagy 4 OR esetén B+, 1 vagy 2 OR esetén pedig ++ genotípusú. A pontos genotípus meghatározás érdekében egyedenként legalább három, vagy annál több OR mérésre van szükség (PIPER és BINDON, 1982b). A megbízhatóság tovább növelhető, ha az OR mérést nem egy évben végzik, hanem több éven keresztül (PIPER és mtsai., 1984). Hangsúlyozni kell azonban, hogy ezeket a határértékeket merinó anyajuhokra vonatkoztatva állapították meg. Más fajtákkal végzett booroola keresztezettek esetén, mint például a romney vagy a coopworth, téves genotípus meghatározáshoz vezethet e módszer. Ezeknek a fajtáknak az átlag ovulációs ráta értéke ugyanis eleve magasabb, mint a merinóé (DAVIS és HINCH, 1984). TATE és mtsai. (1992) a coopworth x booroola keresztezetteken végzett FecB kapcsoltsági vizsgálataiknál ezért a DAVIS és mtsai. (1982) által leírt kritériumokat tovább szigorították úgy, hogy a B+ genotípushoz az anyának legalább két 3-as, vagy legalább egy 3-nál nagyobb OR értékkel kellett rendelkeznie. A ++ genotípusba akkor sorolták az egyedeket, ha volt legalább egyszer 1, és nem volt egyszer sem 3, vagy annál nagyobb OR értékük. Minden vizsgálatba vont anyajuh legalább 3, vagy annál több OR értékkel rendelkezett, melyet 2 éven át mértek. E módszert alkalmazták MONTGOMERY és mtsai. (1994) a FecB – marker kapcsoltsági vizsgálataiknál texel, coopworth, romney és perendale, valamint merinó anyák booroola kosokkal történt keresztezéséből származó utódok génhordozásának megállapítására. Az anyajuhok ebben az esetben is legalább 3-as OR eredménnyel rendelkeztek, mely két év mérési eredményéből állt össze. Az ovulációs ráta mérésekor az anyajuhok helyi érzéstelenítést kaptak MONTGOMERY és HAWKER (1987) által leírtaknak megfelelően.

A DAVIS és mtsai. (1982) által FecB genotípus meghatározására kidolgozott kritériumok általánossá tétele érdekében különböző statisztikai eljárásokat dolgoztak ki a témával foglalkozó kutatók. Ilyen például a diszkriminancia analízis (FERNANDEZ-ABELLA, 1985), klaszter analízis (OWENS és mtsai., 1985) vagy a legnagyobb valószínűségi teszt (ELSEN és mtsai., 1988). Utóbbit Franciaországban a booroola

génnel kapcsolatban végzett szegregációs vizsgálatoknál kiterjedten alkalmazták. LANNELUC és mtsai. (1994) ismert heterozigóta genotípusú (merinó d'arles x booroola merinó) kosokkal nem hordozó merinó d'arles anyajuhokat kereszteztek, majd a leányutódok genotípusát azok ovulációs rátáját alapul véve, ELSEN és LE ROY (1991) módszere szerint, legnagyobb valószínűség teszttel határozták meg. Fix hatásként a testsúly és az életkor szerepelt. Eredményeik azt mutatták, hogy a testsúly nem, az életkor viszont szignifikáns hatással volt az ovulációs rátára. Az ovulációs rátát az utódok egy illetve két éves korában, ősszel mérték. Első évben 3 alkalommal (melynél az első mérésakor progeszteronos ivarzás szinkronizálást alkalmaztak), majd a következő évben két alkalommal.

MULSANT és mtsai. (2001) nem hordozó merinod'arles anyák és heterozigóta (B+) kosok visszakeresztezéséből származó utódokon végzett vizsgálataiknál az utódok genotípusát szintén a legnagyobb valószínűségi analízist alkalmazva határozták meg. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeként találták meg a 'booroola' fenotípusért felelős mutációt.

Mivel a debreceni állományban az anyajuhokat sűrítve elletik, mely mérsékli az ovulációs rátát, ezért VERESS és mtsai. (1998) eltértek a korábban leírtaktól és az anyajuhok besorolását az alábbiak szerint végezték: amennyiben a mért átlagos ovulációs ráta érték 4, vagy annál több volt akkor homozigóta, ha átlagosan 3 volt akkor heterozigóta, ha 2, vagy ennél kevesebb volt akkor az anyajuhot nem hordozónak minősítették. A sűrítve elletés alomszámot mérséklő hatását már korábban több szerző is közölte (RICORDEAU, 1982; WEISHEIT, 1979; VERESS és mtsai., 1979; VERESS, 1991). Mivel a nagy alomszám kialakulását az ovulációs ráta közvetlenül befolyásolja a VERESS és mtsai. (1998) által módosított kategóriák megalapozottnak tűnnek.

A FecB mutációt hordozó kosok azonosítása

A kosok genotípusa ivadékvizsgálat útján határozható meg. A szapora merinó állomány kialakítására használt illetve az állományban termékenyítő kosok FecB minősítésére többféle módszert alkalmaztak a tenyésztők. Az első módszer alapja, melyre már korábban több szerző is említést tett (ALLISON és mtsai., 1979; PIPER és mtsai., 1980, 1981; DAVIS és mtsai., 1982), a következő. Fiatal kos és nem hordozó anyajuh párosításból származó leányutódoknál OR vizsgálatot végeztek,

összehasonlítva a mutációt nem hordozó fajta azonos korú jerkéinek OR eredményeivel. Ha az utódok mintegy 80%-a 3-as, vagy ennél nagyobb OR-t ér el, úgy a kos homozigótának (BB), ha az utódok csupán fele éri el az említett eredményt, úgy heterozigótának (B+) minősül. Amennyiben az ivadékcsoport eredménye nem különbözik az egykorú nemhordozó társakétól, úgy a kos nem tekinthető hordozónak (++)).

Ez alapján az 1980-1982 között vásárolt 10 import kosból egy bizonyult homozigótának, egy nem volt hordozó, 8 pedig heterozigóta minősítést kapott (VERESS, 1998). Az 1986-ban importált 8 booroola merinó kos közül 3-at csupán szüleik genotípusa alapján minősítettek (anyjuk OR eredménye és apjuk Új-Zélandon becsült FecB genotípusa alapján), 4 kos esetében figyelembe vették a leányutódok szaporulati teljesítményét is, az előzőekben leírtak szerint. Mindezek alapján 7 kos homozigóta hordozónak bizonyult. A 8. import kos hordozó voltát egy később, a minősítés gyorsítása érdekében bevezetett módszer alapján határozták meg. A módszer lényege, hogy a jerkéket 6 hónapos korban, 28 kg élősúly felett 625 NE PMSG-vel kezelték, ivarzást indukálva, majd 5-8 nap múltán elvégezték az OR vizsgálatot (MAGYAR és mtsai., 1997). A módszert hasonló vizsgálatokra több kutatócsoport is alkalmazta (DAVIS és KELLY, 1983; KELLY ÉS MTSAI., 1983; OLDHAM és mtsai., 1984; LANNELUC és mtsai., 1994). A nem hordozók a PMSG-re nem, vagy csak alig reagálnak, a hordozók annál élénkebben. E módszerrel több kos egyszerre született leányai hasonlíthatók össze. Előnyös, ha az ivadékvizsgálatra szánt kosok leányai a gént nem hordozó kortársakkal is összehasonlításra kerülnek. Az egyes nőivarú egyedekre azonban az egyszeri vizsgálat nem nyújt megbízható információt, de a kosoknál a módszer ismételhetősége, illetve megbízhatósága kedvező. Ezzel a módszerrel 1988-1993 között összesen 18 – egy kivételével – hazai tenyésztésű kos ivadék vizsgálatát értékelték. (MAGYAR és mtsai., 1997; VERESS, 1998; VERESS és mtsai., 1998)

A debreceni állományban 1992-től kezdték folyamatosan selejtezni a nem génhordozó egyedeket, majd a B+ anyajuhok közül azokat, melyek évente csupán egyszer ellettek és bérányaikat nem jól nevelték. 1994-re a vizsgált állomány 50%-a 4-es, vagy ennél nagyobb OR eredményt adott. 1997-ben az anyajuhok és jerkék több mint 70%-át, 1998-ban körülbelül 80%-át aját OR vizsgálata, illetve szülei korábbi minősítése alapján BB genotípusúnak becsülték (MAGYAR és mtsai., 1997; VERESS, 1998).

3.3.2. A FecB genotípus meghatározás marker genotípus alapján

Mindaddig, amíg maga a tulajdonságot meghatározó gén nem ismert, csak a génnel kapcsolt markerek felhasználása útján tehetjük hatékonyabbá a génhordozók szelekcióját a hagyományos módszerekhez képest.

A booroola gén azonosítására irányuló kutatások eredményeként a FecB gén mutációját hordozó juh 6. kromoszóma kapcsoltsági térképe egyre részletesebbé vált. A FecB lókuszhoz olyan közeli mikroszatellit markereket sikerült feltérképezni, amelyek, távolságukból adódóan, már alkalmasak lehetnek genetikai markerként a Fec^B allélt hordozó egyedek azonosítására. A markerek segítségével végzett szelekció (MAS – Marker Assisted Selection) célja tehát az, hogy a fenotípus alapján végzett szelekciót DNS szintű szelekcióval helyettesítse, illetve kiegészítse. A módszer alapja a genetikai kapcsoltság, melyről egy korábbi fejezetben már szóltam.

A marker gyakorlatban, szelekcióban való alkalmazásáig az alábbi lépcsőfokokat kell végigjárni:

1. Keresnünk kell olyan markereket, amelyek biztosan kapcsoltan öröklődnek a számunkra fontos termelési tulajdonságot meghatározó génnel.
2. A következő lépés annak meghatározása, hogy a génhez közeli marker mely allélja öröklődik együtt a génnel. (az adott állományban a marker genotípus és a fenotípusos teljesítmény közötti hatásvizsgálat alapján)
3. Ha már bizonyítottuk a marker allél – gén kapcsolatát, akkor (akár a teljesítményvizsgálat elhagyásával) a marker genotípus alapján elvégezhető a szelekció.

A MAS alkalmazásának számos gyakorlati előnye van a hagyományos szelekciós eljáráshoz képest, melyeket FÉSÜS (1997) a következőkben foglalta össze:

- A szelekció az állat igen korai életszakaszában elvégezhető, még mielőtt a tulajdonság kifejeződne. Akár egyetlen embrió sejt is elég ahhoz, hogy a kívánt információhoz jussunk.
- A termelési teljesítményekre vonatkozó drága adatfelvételek részben, vagy egészen kiiktathatóak. A booroola gén esetében ez a költség-, idő- és munkaigényes OR vizsgálatok elhagyását jelenthetné, mely nemcsak a szelekció hatékonyságának növelését biztosítaná, de az állatok számára is jóval

kíméletesebb eljárást jelentene, hiszen a vizsgálathoz csak kis mennyiségű szövetmintára (vér, szőrhagyma, ondó stb.) van szükség.

- A marker genotípus eredménye független a környezeti hatásoktól.
- A marker genotípus mindkét nemben meghatározható, függetlenül attól, hogy csak az egyik ivarban mérhető. Ez a booroola génhordozók azonosításánál a kosok igazán időigényes ivadékvizsgálatának elhagyását tenné lehetővé.

Az előnyök mellett azonban nem hagyhatók figyelmen kívül a módszer gyenge pontjai:

- egy adott állományon belül a „marker allél” – „gén” kapcsoltsági viszonyát családonként kell meghatározni
- a marker – gén közötti távolság miatt - távolságtól függően - esély van arra, hogy a kapcsoltsági viszony egyik generációról a másikra megváltozik (ez 10 cM távolság esetében 10% esélyt jelent) (FÉSÜS, 1999).

Számos szimulációs vizsgálat készült a MAS és a hagyományos szelekciós eljárások hatékonyságának összehasonlítására. A MAS eredményessége sok tényezőtől függ. Ezek a következők: hány markert alkalmaznak, milyen messze van a marker a géntől, mekkora a generációs intervallum, milyen a felszaporítani kívánt gén gyakorisága a kiinduló állományban, stb. (DAVIS és DENISE, 1998). Az irodalomban közöltek alapján azonban általánosságban megállapítható, hogy – a fent vázolt nehézségek ellenére is – azoknál a tulajdonságoknál lehet igazán előnye a MAS-nak a tisztán fenotípus alapján végzett szelekcióhoz képest, amelyeknek kicsi az öröklődhetőségi értéke (ZHANG és SMITH, 1992; MEUWISSEN és GODDARD, 1996), csak az egyik ivarban mérhetők (RUANE és COLLEAU, 1996; LANDE és THOMPSON, 1990), a tulajdonság az egyed életének csak későbbi szakaszában jut kifejeződésre, illetve nehéz a tulajdonság mérése (MEUWISSEN és VAN ARENDONK, 1992). Mivel a booroola gén a szaporaságra, közvetlenül az ovulációs rátára hat, melyre az előbb említett jellemvonások kivétel nélkül jellemzőek, joggal várható kedvezőbb eredmény a mutáns FecB gént hordozó egyedek markerek segítségével végzett szelekcióját tekintve.

A lehetőséget kihasználva egyes országban, ahol booroola keresztezéseket végeztek, markervizsgálatokat is indítottak a génhordozók azonosításának elősegítésére. LEYHE-HORN és mtsai. (1998) és WEIMANN és mtsai. (2001) két mikroszatellit

lókusz, az OarAE101 és a BM1329 markerként való alkalmasságát vizsgálta ebből a célból. Az előbbi egy juh, az utóbbi egy szarvasmarha mikroszatellit, melyek közötti távolságot 10 cM-ben állapította meg LORD és mtsai. (1998) hím ivar esetében. A FecB lókusz a két mikroszatellit lókusz között található. Leyhe-Horn és Weimann mtsai. val német merinó x booroola merinó keresztezett féltestvér családokban tesztelték a mikroszatellit allélok Fec^B alléllal való szegregációját, valamint felmérték különböző fajtákban (merinó, romanov, tiroli hegyijuh és keletfríz) a vizsgált mikroszatellitek allélgyakoriságát. A gyakorisági értékekben jelentős különbségeket találtak a négy fajta között. A szegregációs vizsgálatokban egyértelmű kapcsoltságot állapítottak meg egy BM1329 és egy OarAE101 mikroszatellit allél, valamint a Fec^B allél között. A genetikai kapcsoltságot a leányutódok OR eredményei is igazolták. Kísérleteik eredményei alapján megállapították, hogy bár a Fec^B alléllal kapcsoltan öröklődő allélok a génbevitel recipiens fajtájaként szereplő német merinó fajtában is jelen van, azonban csak nagyon kis %-ban fordul elő. Amíg direkt génteszt nem áll rendelkezésre a két mikroszatellit relatíve hatékony eszközként alkalmazható génbeviteli programban a gén öröklődésének nyomonkövetésére.

GOOTWIN és mtsai. (1998) awassi x booroola keresztezett állományban szintén ezeket a mikroszatelliteket alkalmazták markerként a FecB mutációt hordozó egyedek kiválogatására. Ismert genotípusú kosokat alkalmaztak a mutáció awassi állományba történő bevitelére. Az alkalmazott 6 kos közül kettő hordozott olyan mikroszatellit allélt, mely kis gyakorisággal fordult elő az awassi populációban. Ezen allélok elterjesztése estén az adott awassi állományban a nevezett markerek alkalmasak a gént hordozók azonosítására.

3.3.3. FecB genotípus meghatározás direkt génteszt alapján

Egy tulajdonság javítására irányuló szelekció akkor lehet a leghatékonyabb, ha közvetlenül a tulajdonságot meghatározó génre, a genotípus alapján szelektálunk.

Már számos termelést javító, vagy betegséget okozó mutációt sikerült azonosítani (BLAD szarvasmarhában; halotán gén sertésben; myostatin szarvasmarhában; kappa-kazein, béta-laktoglobulin szarvasmarhában, juhban stb.), ezek azonban csak nagyon csekély hányadát képezik a termelési tulajdonságokat befolyásoló géneknek. A booroola génre irányuló kutatások az 1950-es években kezdődtek, és csak

néhány évtized után, 2001-ben jelentek meg azok a publikációk, melyekben a nagy ovulációs rátát okozó mutáció azonosítását közölték (WILSON és mtsai., 2001; SOUZA és mtsai., 2001; MULSANT és mtsai., 2001). A továbbiakban sem a fenotípus mérésére, sem markervizsgálatokra nincs szükség a booroola mutációt hordozó egyedek kiválogatásához. A direkt génteszt vizsgálatokkal azok a hibátényezők is megszűnnek, melyekkel a markervizsgálatoknál még számolni kell. Így

- a génteszt általánosan bármely állományban elvégezhető
- nem kell számolnunk egy esetlegesen fellépő rekombinációval, hisz itt közvetlenül a tulajdonságot meghatározó génnek a kimutatásáról van szó.

Dolgozatom megírásakor nem találkoztam az irodalomban a direkt génteszt gyakorlati alkalmazásával kapcsolatos közlésekkel. Valószínű, hogy sok országban felhasználják majd a lehetőséget a Fec^B allélt hordozó egyedek ily módon történő azonosítására. A booroola gén eredetének tisztázása során viszont már e módszert alkalmazták DAVIS és mtsai. (2002), melyet az irodalmi áttekintésben már ismertettem. A direkt génteszt szelekcióban való alkalmazásának jelentőségét igazolják a gyakorlati állattenyésztésben, más állatfajok esetén történő felhasználásuk eredményessége. Magyarországon sikeres programot hajtottak végre a holstein fríz állományok BLAD mentesítésével kapcsolatban (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency). Jelenleg a fajta már mentes a betegségtől. Hasonló program folyik a sertésállományok stresszérzékenységeért felelős mutációt hordozó egyedek kisselektálására, sikerrel. (FÉSÜS és mtsai., 1997; FÉSÜS és mtsai., 1998).

3.4. Molekuláris genetikai módszerek és markerek a FecB mutációt hordozó egyedek azonosításához

A genetikai markereket 3 nagy csoportba sorolják: morfológiai markerek (vagyis maga a fenotípus), a fehérje alapú markerek és a DNS alapú markerek.

Ahhoz, hogy egy markert genetikai markerként alkalmazhassunk, az alábbi feltételeknek kell megfelelni:

1. legyen polimorf
2. mutasson eltérést a vizsgált populációban az egyedek között
3. ez jelenjen meg a különböző biológiai szinteken, vagyis az egyedek fenotípusos eltérésétől a DNS polimorfizmusig.

Mivel vizsgálataim DNS markerekre irányultak, illetve a FecB lókusztérképezése során is azok nyújtottak hasznos előrelépést jelentő információkat, ezért a továbbiakban csak azokra térek ki részletesebben.

A **DNS markerek** a DNS lánc olyan speciális kis szakaszai, melyek eltérést (polimorfizmust) mutatnak szekvenciájukban az egyedek között az adott fajon, vagy fajtán belül (LIU BEN HUI, 1997).

A kimutatásukra alkalmas eljárások alapvetően kétféle módszerre épülnek:

A.) nukleinsav hibridizáció

A hibridizációs próba olyan technikai eljárás, mely jelölt nukleinsavakat használ próbaként (melyek klónozott, vagy szintetikus DNS fragmentek) azokkal komplementer, vagy homológ molekulák azonosítására.

B.) polimeráz láncreakció (PCR – polymerase chain reaction)

A polimeráz láncreakció a DNS egy meghatározott szakaszának mesterséges amplifikálását lehetővé tevő labortechnikai eljárás (MULLIS és FALOONA, 1987). A leggyakrabban használt genetikai DNS markerek azonosítása, illetve kimutatása ezen technikán alapul.

A reakcióhoz szükség van a kiinduló, templát DNS-re, nukleotidokra (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), két szintetikus oligodukleotid primerre (ezek a sokszorozítani kívánt DNS szakasz végeinek komplementerei) és végül hőstabil polimeráz enzimre.

Leggyakrabban a *Thermus Aquaticus* baktérium által termelt Taq polimerázt alkalmazzák. A láncreakció lépései:

1. a kétszálú DNS denaturációja (92-96 °C)
2. primerek kapcsolódása a templát megfelelő végeihez (50-70 °C)
3. primerek elongációja a DNS polimeráz segítségével (72 °C)

A három lépés együttesen ad egy ciklust, melyek számát 35-40-nél tovább nem érdemes növelni az enzim inaktiválódása, illetve a primerek és a nukleotidok elhasználódása miatt. Rendszerint 30 körüli ciklus szám után rendelkezésre áll annyi amplifikált DNS másolat, mely elegendő a további vizsgálatokhoz (4. ábra).

Amennyiben több genomrészlet vizsgálatát végezzük egyszerre, akkor multiplex PCR reakcióról beszélünk (EDWARDS és GIBBS, 1994). Ilyenkor a PCR csőben egy mintán több különböző genomrészletre (lókusza) specifikus primerpár működik. A módszer alkalmazásával jelentősen lehet csökkenteni az egy lókuszt vizsgáló vizsgálatára vetített anyagköltséget és a vizsgálati időt.

3.4.1. Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

(Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP)

RFLP volt az első, széles körben alkalmazott DNS marker (BOTSTEIN és mtsai., 1980). Amikor a genomiális DNS molekulát valamely restrikciós endonukleázzal kezeljük – ezek olyan, baktériumok által termelt enzimek, melyek specifikus szekvencia felismerő hellyel rendelkeznek és csak ezt, a néhány nukleotidból álló palindrom szekvenciát képesek hasítani – akkor az emésztést követően meghatározott számú és hosszúságú fragmentumot kapunk. Napjainkban több ezer, a baktériumok védekező mechanizmusában szerepet játszó restrikciós enzimet írtak le (NATHANS és SMITH, 1975; KOBAYASI és mtsai., 1999). Amennyiben egy mutáció a DNS szekvenciájában olyan változást idéz elő, hogy az enzimfelismerő helyet hoz létre, vagy éppen töröl, úgy az enzimes emésztés után a vad típushoz képest az eredeti fragmentumok hossza és száma változni fog. Ez adja a különbséget az egyes genotípusok (illetve allélok) között.

Kimutatása történhet hibridizációval, Southern blot (SUTHERN, 1975) analízis segítségével, amikor az agaróz gélen elkülönített DNS fragmentumok specifikus próbával való hibridizációval azonosíthatóak (5. ábra). Ez volt az első, RFLP kimutatására alkalmas módszer, ma azonban elsősorban, a jóval gyorsabb és kevésbé

érzékeny PCR technikát alkalmazzák. A *PCR-RFLP módszer* során csak a DNS egy rövid, RFLP-t tartalmazó régióját sokszorosítják, majd ezt követően az adott restrikciós endonukleázzal emésztik. A különböző fragmentumok ezt követően agaróz gélen futtatva, ethidium bromiddal festve UV fényben láthatóvá válnak (6. ábra). Bár leggyakrabban az ethidium bromidot alkalmazzák, az ezüst festés szintén alkalmas a DNS gélben történő kimutatására. Ennek érzékenysége legalább olyan jó, mint az ethidium bromidé és óriási előnye, hogy nem toxikus. A DNS megjelenítésének másik módja a radiokatív jelölés. A festéssel szembeni előnye, hogy sokkal érzékenyebb és mivel nem denaturáló körülmények között is megvalósítható, az elválasztott komponensek később biológiailag aktív formában visszanyerhetők. Az RFLP alkalmazásában korlátozó tényező, hogy csak két allélos rendszert jelent, így a vizsgált egyedek csak két genotípus csoportba sorolhatók. (ARCHIBALD és HALEY, 1993).

Számos RFLP markert használtak a *FecB* gén térképezése során, mint például a kiválasztott foszfofehérje 1 (SPP1), vagy az epidermális növekedési faktor (EGF) (MONTGOMERY és mtsai., 1993). Ily módon azonosítható számos jelentős, más állatfajban előforduló betegségért felelős mutáció, mint például a BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) allél szarvasmarhában, a stresszérzékenységért felelős Hal n allél sertésben (FÉSÜS és mtsai., 1997b, 1998).

3.4.2. Egyszerű szekvencia hossz polimorfizmus

(Simple sequence length polymorphisms – SSLPs)

Az SSLP-k olyan DNS szakaszok, melyek meghatározott számú bázis többszöri egymás utáni ismétlődései. Két típusát különböztetjük meg:

1. **miniszatellitek** (VNTRs – variable number of tandem repeats) (JEFFREYS és mtsai., 1985), melyek ismétlődő egységei 10-50 bázisból állnak, és vannak a
2. **mikroszatellitek** (STRs – simple tandem repeats) (EDWARDS és mtsai., 1991), amelyek sokkal rövidebb, általában két, három, vagy négy nukleotidból álló ismétlődő egységekből (tandem) épülnek fel. (pl. (AT)_n egy adenin-timin bázispár (tandem) n alkalommal történő egymás utáni ismétlődéseit jelenti.)

A mikroszatellitek jóval népszerűbb és gyakrabban használt DNS markerek, mivel véletlenszerűen bárhol megtalálhatóak szétszóródva a genomban, ezzel szemben a miniszatellitek elsősorban a kromoszómák végein helyezkednek el (EDWARDS és mtsai., 1991). Másik előnyük, hogy jóval rövidebbek, így a leggyorsabb és

legáltalánosabban használt PCR technika segítségével pontosabban meghatározhatóak, mind a jóval hosszabb fragmentet adó miniszatellitek. Az SSLP-k előnye, hogy sokallélos rendszerek, nagyfokú heterozigotizással rendelkeznek, a Mendeli szegregáció szabályait követik és ugyanaz a marker különböző állatfajokban is előfordulhat (GEORGES és mtsai., 1989; JEFFREYS és mtsai., 1985). Így az RFLP markerek mellett a mini- és mikroszatellitek a kapcsoltsági vizsgálatok során egyre népszerűbbé váltak és óriási előrelépést jelentettek a booroola gén pontos helyének meghatározásában (MONTGOMERY és mtsai., 1992; LANNELUC és mtsai., 1994; LORD és mtsai., 1998). A FecB génhordozó egyedek azonosítására és azok kiválogatására GOTWINE és mtsai. (1998) valamint LEYHE-HORN és mtsai. (1998) ugyancsak mikroszatelliteket teszteltek.

Az egyes mini illetve mikroszatellit markerek különböző alléljainak meghatározására többféle módszer áll rendelkezésre.

PCR technika segítségével a markert tartalmazó DNS szakasz sokszorosítható, majd *agaróz gél elektroforézissel* a különböző allélok hosszuk alapján elkülöníthetők, a már korábban említett módon meghatározhatóak. Ma már azonban elsősorban automatizált rendszereket alkalmaznak a mikroszatellit marker allélok detektálására.

Lézer indukált fluoreszcens kapilláris elektroforézis

Fluoreszcens festékkel jelölt primereket használva PCR segítségével amplifikáljuk a markert tartalmazó DNS szakaszt. Ezt követően az egyes allélok elkülönítése és azonosítása úgy történik, hogy az ismeretlen hosszúságú fragmenteket tartalmazó DNS mintát ismert hosszúságú belső standard mintával futtatjuk, amelyek együtt haladnak keresztül egy kapillárison, azonos elektroforetikus körülmények között. Az elektroforetikus térben történő vándorlás sebessége a fragmentumok hosszától függően változik. A kapillárison való áthaladás során lézer fény hatására a fluoreszcens festékkel jelölt minták a festékre jellemző hullámhosszúságú fényt bocsátanak ki, melyet a rendszer érzékel, és azok vándorlási sebességét a belső standardhoz viszonyítva azonosítja. Így módon az allélok hossza precízen, pontosan meghatározható.

3.4.3. Egyszerű nukleotid polimorfizmus

(SNP – Single nucleotide polymorphism)

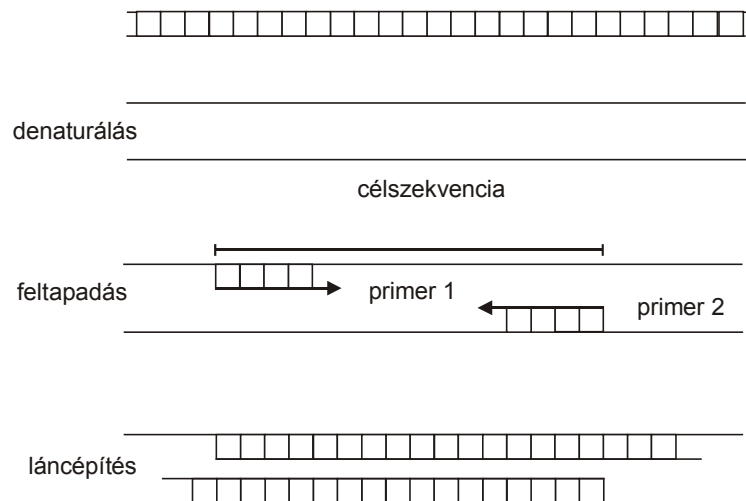
Az SNP-k egyszerű pontmutációk, amelyek szétszóródva megtalálhatók szinte a genomban. Előfordulhat, hogy megjelenésével restrikciós enzim felismerő helyet alakít ki, vagy töröl, így RFLP-ként könnyen azonosíthatók. Számuk azonban olyan nagy, hogy sok esetben detektálásukhoz más módszerre van szükség. Erre alkalmas a DNS chip technológia (WANG et al, 1998), vagy a 'Dinamikus allél-specifikus hibridizáció' (Dynamic Allele-Specific Hybridization – DASH) (PENNISI, 1998). A booroola fajtában leírt, nagy ovulációs ráta szintén egy pontmutációnak köszönhető, melynek eredményeként a gén által kódolt fehérje szerkezete megváltozott és nem tudja betölteni eredeti funkcióját. Mivel a mutáció ez esetben nem hozott létre és nem is törölt restrikciós endonukleáz felismerő helyet, így kimutatása a már korábban említett PCR-RFLP módszer kissé módosított változatával történhet, amikor a restrikciós helyet amplifikációval hozzuk létre. Ezt angolul ***Amplification Created Restriction Site-nak hívják (ACRS)*** (7. ábra). Wilson és mtsai. (2001) ezt az eljárást alkalmazták a Fec^B allélt hordozó egyedek azonosítására.

3.4.4. Konformáció polimorfizmus

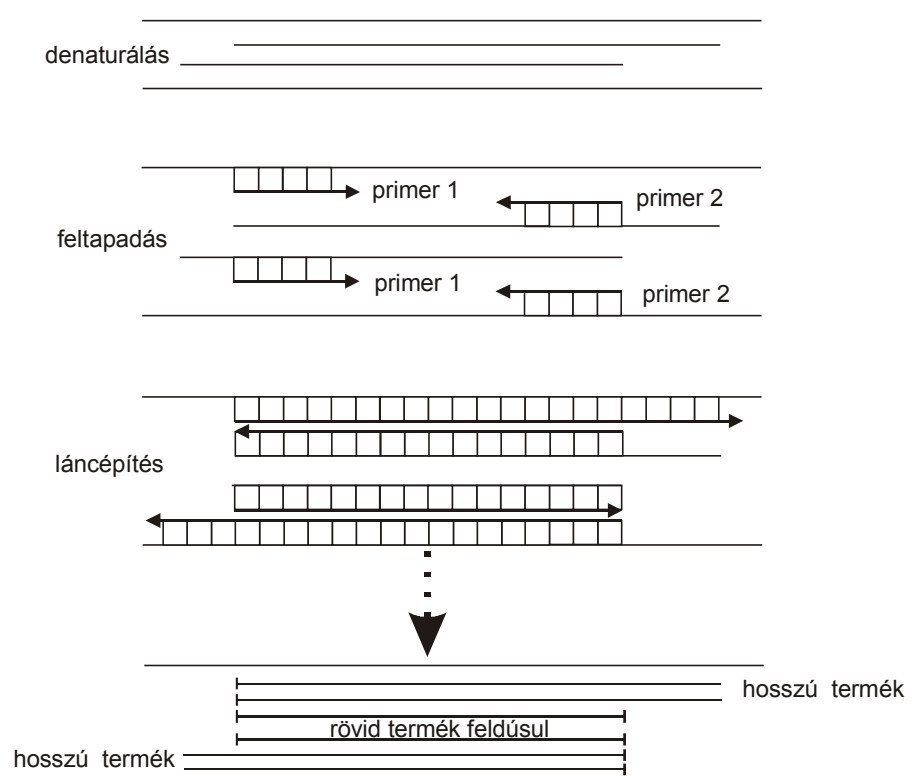
(Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis – SSCP)

Az SSCP analízis pontmutáció, deléció (törlés), vagy inverzió (beékelődés) kimutatására alkalmas. A módszer azon alapszik, hogy az említett változásokat tartalmazó mutáns DNS egyszálú állapotban más másodlagos szerkezetet vesz fel. Ezáltal az elválasztó mátrixban (poliakrilamid) más lesz a mozgékonyága, mint a vad típusú DNS szálnak. A gélmintázat leolvasásakor a homozigóta minta esetében 2 sávot, a heterozigóta esetében négy sávot láthatunk. A módszerrel elsősorban 300 bázis allatti hosszúságú fragmentumok vizsgálhatók, mivel ebben a méretben a kis változások még ki tudják fejteni hatásukat a másodlagos struktúrára (8. ábra). (FÉSÜS és mtsai., 2000). Használatával a mutációk 70-95%-a detektálható (NATARAJ és mtsai., 1999). Ezt az eljárást alkalmazták MULSANT és mtsai. (2001), valamint DAVIS és mtsai. (2002) kísérleteik során a FecB mutáció kimutatására.

1. ciklus



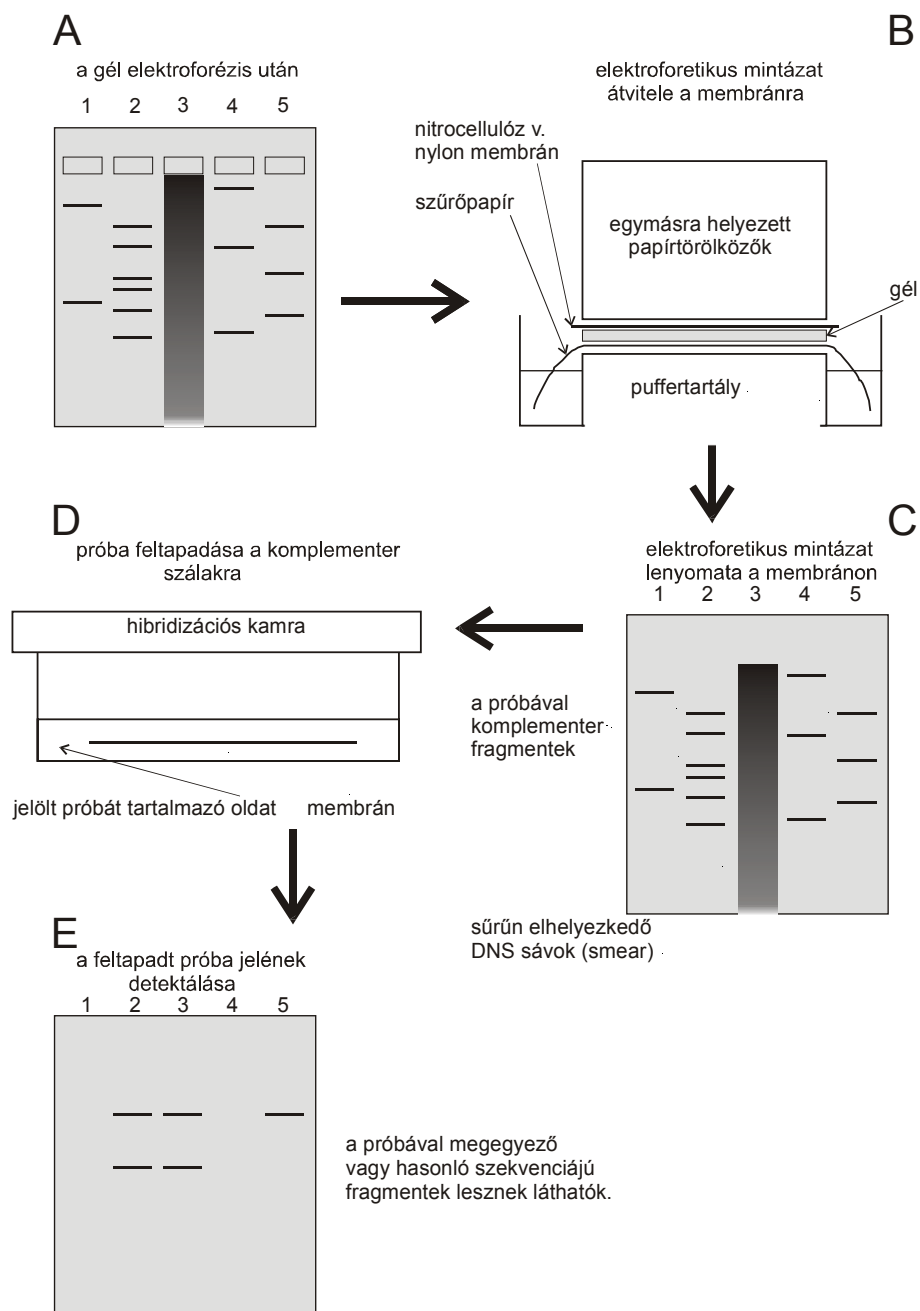
2. ciklus



4. ábra: A polimeráz láncreakció (PCR) főbb lépései

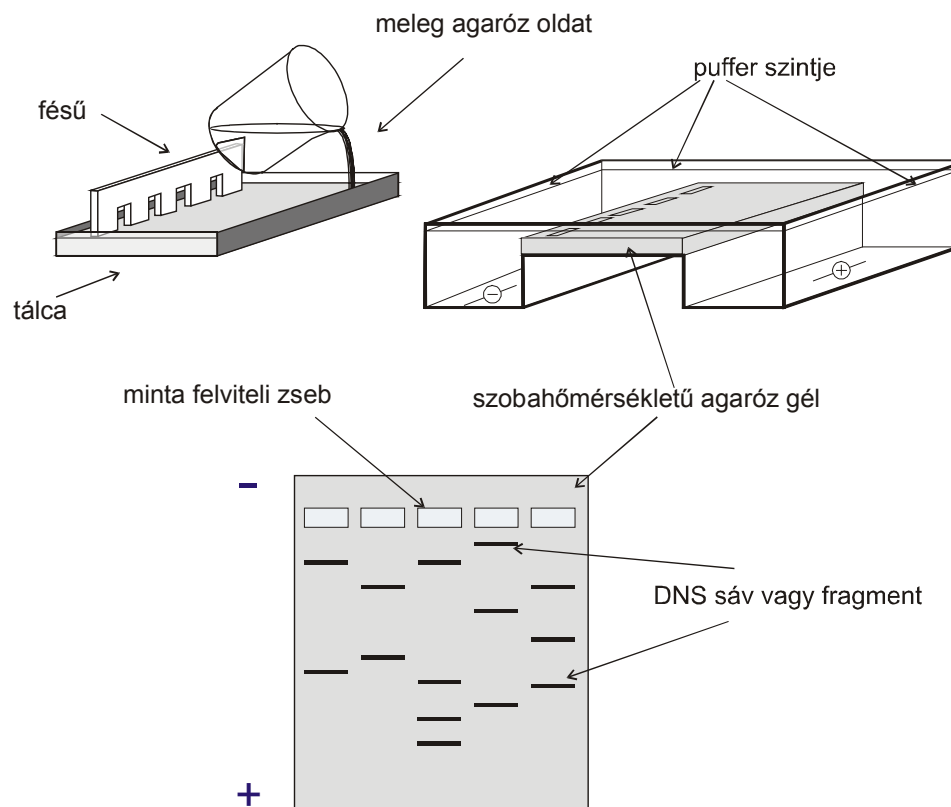
1.ciklus: a hő hatására szétvált DNS szálakra feltapadnak a primerek és azok 5'-3' irányú szintézise megkezdődik. Az újonnan növekvő szálak túlnőnek egymás kapcsolódási helyein, új kapcsolódási helyeket létrehozva.

2.ciklus: az első ciklus termékeinek denaturálása után már azok is mintául szolgálnak az újabb láncok szintéziséhez. Itt már rövid, a primerek végei által jól definiált hosszúságú termékek is keletkeznek. A harmadik és a további ciklusokban a hosszú termék lineárisan, a rövid termék exponenciálisan sokszorozódik, mely mennyisége a reakció végére sokszorosan felülmúlja a kiindulási illetve a hosszú termékek mennyiségét. (FÉSÜS és mtsai., 2000)



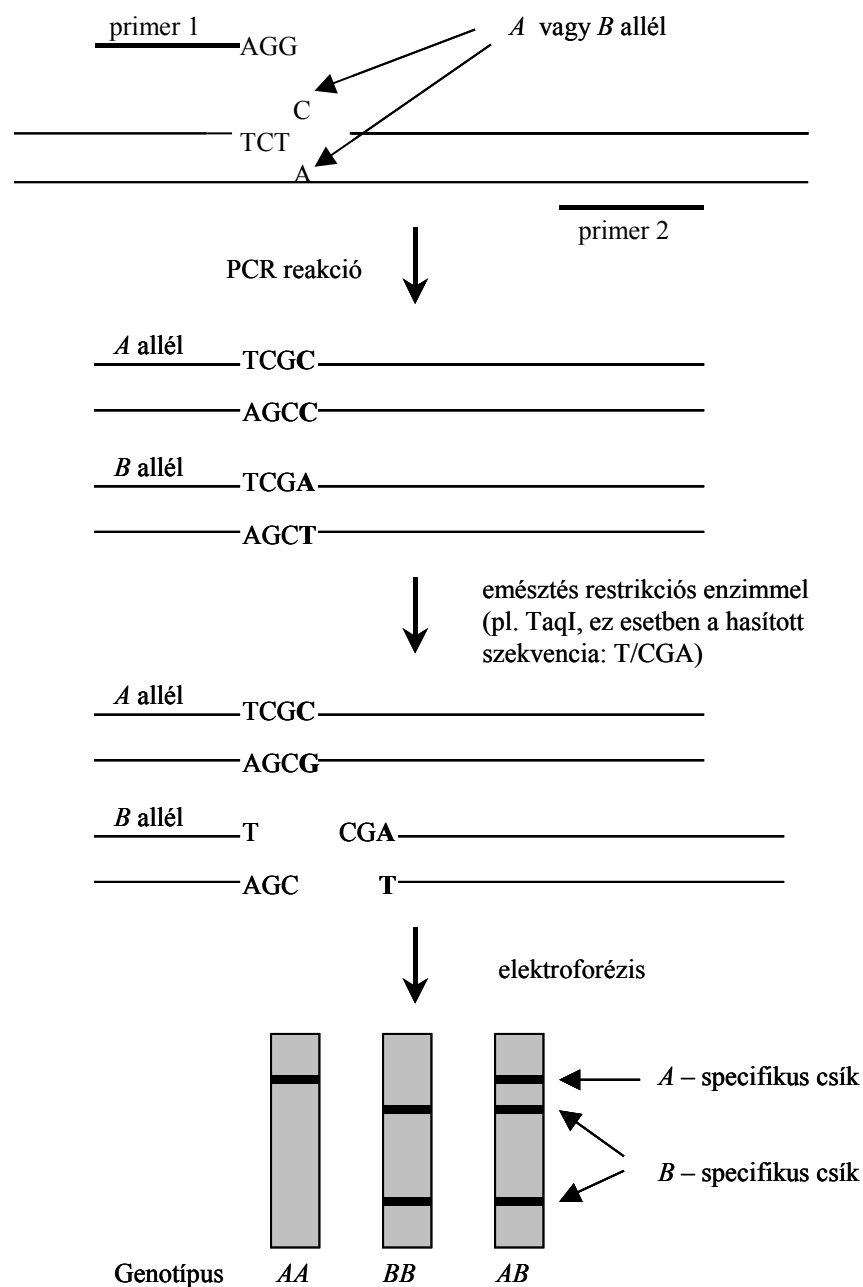
5. ábra: Southern blot

Elektroforézist követően (A) a DNS sávok folyamatosan fenntartott puffer áramlással átvihetők könnyen kezelhető és hosszú ideig eltartható membránra a papírtörülközők szívóhatásának köszönhetően (B). A membránon rögzített mintázathoz (C) jelölt próbát hibridizáltatva (D), a membránon létrejött mintázat lenyomatából csak próbával azonos vagy hasonló bázissorrendet tartalmazó DNS sávok lesznek láthatók (E). A gélen (A) és a membránon (C) bemutatott mintázatot a munka folyamatában nem szükségszerű láthatóvá tenni. A fragmentek helye csak a szemléltetés kedvéért lett bemutatva az (A) és (C) ábra részen. 1., 2., 4., 5. csatorna: alacsony komplexitású mintázat; 3. csatorna: sok helyen vágó restriktációs endonukleázzal emésztett genomikus DNS mintázata (FÉSÜS és mtsai., 2000).



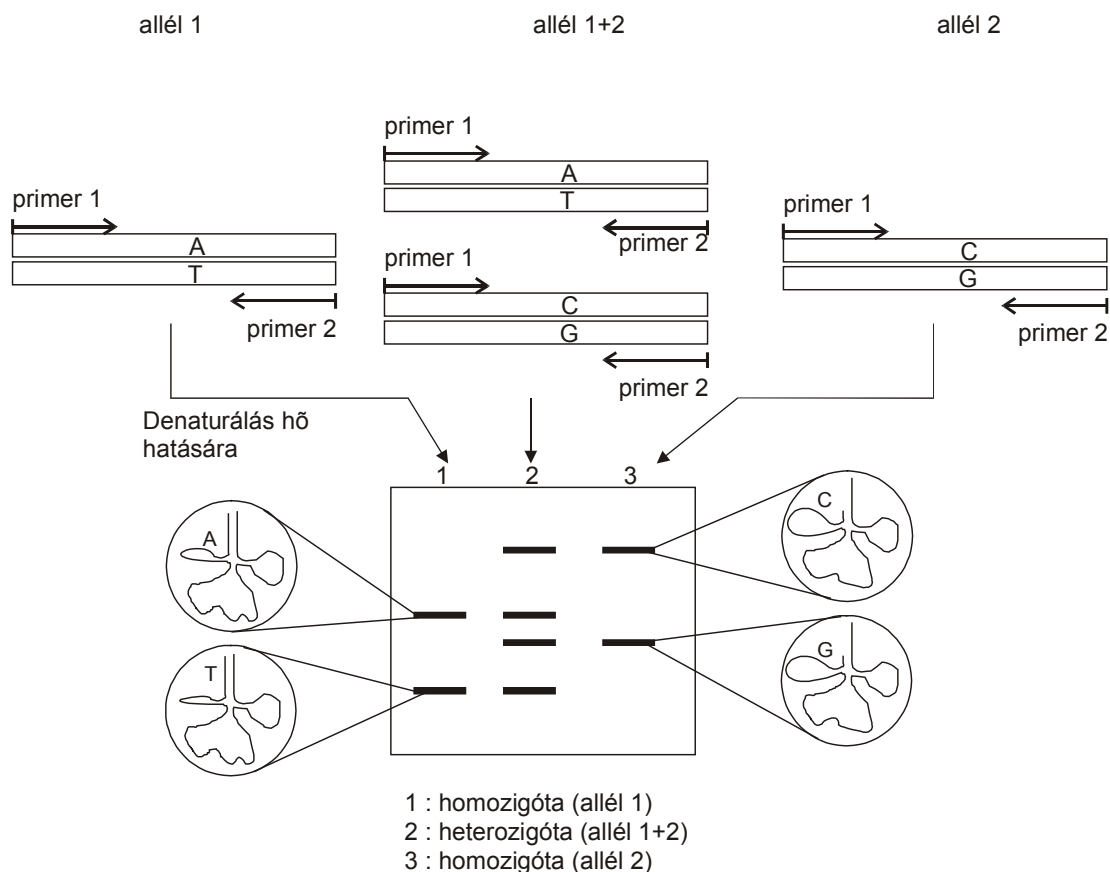
6. ábra: Gélöntés és elektroforézis

Az elválasztó mátrix (itt agaróz) a meglévő puffer oldatban melegítés hatására feloldódik. A mintafelviteli helyek biztosítása érdekében fésűvel ellátott tálcára kiöntve az oldatokat, annak lehülése után kialakul a zselatin szerű, az agaróz koncentrációjától függő pórus átmérőjű gél. Miután a gél az elektroforézis tankba, a pufferoldat alá kerül, a minták a zsebekbe pipettázhatók. Egyenáram hatására a pozitív pólus felé vándorló DNS molekulák hosszuktól függően más-más távolságban lesznek észlelhetők az elválasztás végén. (FÉSÜS és mtsai., 2000)



7. ábra: ACRS, restrikciós hasítóhely létrehozása amplifikációval

Az eljárás olyan allélok kimutatására alkalmas, amelyek eredetileg nem mutatnak RFLP-t. Az egyik primer valamely bázisának vagy bázisainak – a felhozott példa esetében az utolsónak – kicserélésével egy adott restrikciós enzimre specifikus restrikciós hasítóhely (itt TaqI) hozható létre az egyik allélnak megfelelő PCR termékben, amely elektroforetikusan megkülönböztethető a másik alléltól. (BARANYI, 2000)



8. ábra: SSCP, Egyszálú DNS másodlagos szerkezetének polimorfizmusa

A kétszálú PCR terméket denaturálás után gyorsan visszahűtve intra molekuláris kapcsolatokat létrehozó egyszálú DNS (ssDNS) láncokat lehet kapni, melyeket nem denaturáló körülmények között elektroforetikusán szeparálunk. Az egyszálú láncok vándorlási távolsága a bázissorrendjük által meghatározott térbeli szerkezetüktől függ. (FÉSÜS és mtsai., 2000)

4. Saját vizsgálatok anyaga és módszere

4.1. Ovulációs ráta vizsgálatok

A marker genotípus és fenotípus (ovulációs ráta) közötti varianciaanalízis elvégzéséhez a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum kismacsi állattenyésztési kísérleti telepén tenyésztett szapora merinó állomány nőivarú egyedeinek OR adatait gyűjtöttem 1998-2001 között.

Az ovulációs ráta mérése Dr. Magyar Károly vezetésével MAGYAR (1994) által leírtak alapján történt.

A méréshez szükséges eszközök :

- állattartó állvány
- laparoszkóp

A méréshez szükséges vegyszerek:

- jódtinktúra
- antibiotikum (pl. sumetrolin)
- nitrogén gáz

Az ovulációs ráta meghatározása az ivarzást követő 4-8 nap múlva történt. Az állatok a vizsgálat előtt 24 órával nem kaptak sem takarmányt, sem ivóvizet. A szúrás helye a vizsgálat előtt jódtinktúrával fertőtlenítésre került, illetve az állatok 5 ml Sumetrolint kaptak a fertőzés megelőzésére.

A méréseket minden esetben ősszel, a fő tenyészszezonban végeztük, ivarzásszinkronizáló szerek alkalmazása nélkül. Kossal való keresztetés után az ivarzó anyajuhokat kiválogattuk. Az ovulációs ráta meghatározása a válogatást követő 7-10 nap múlva történt a mindkét oldali petefészken fellelhető sárgatestek száma alapján. Vizsgálataimhoz az 1998-ban tenyésztésben álló anyajuhok korábbi években, hasonló módon mért ovulációs ráta adatait is felhasználtam, melyet a kísérleti telepen vezetett tenyésztési naplóból gyűjtöttem össze.

Összesen 101 szapora merinó anyajuh (n=101) OR mérését és OR adatának gyűjtését végeztem el. Mivel azonban csak **64 anyajuh** esetében volt ismert a vizsgálat éve, a mérés kori életkor, ezért csak azok eredményeit vettem figyelembe a későbbi értékeléseknél.

4.2. Marker vizsgálatok

A témafelvetésben megfogalmazott kérdések megválaszolásához az 1998. szeptember és 2001. szeptember között a *debreceni szapora merinó állományban* élő tenyészállatok, a vizsgált időszakban az állományban született bárányok (beleértve a választás után értékesítésre került, vagy esetleg tenyésztésbe vétel előtt elhullott egyedeket is), valamint a már nem élő, de mélyhűtött szaporítóanyaggal rendelkező tenyészkosok (beleértve 8 booroola merinó tenyészkost is), **összesen 407** (n=407) egyed genotípus vizsgálatát végeztem el.

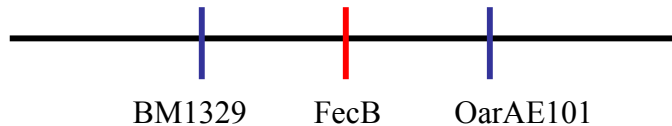
A booroola gént hordozó és nem hordozó állományokban előforduló mikroszatellit allél- és genotípus gyakoriság értékeinek összehasonlításához, a FecB mutációt nem hordozó kontroll állományként Bakk József és Ványai Gusztáv magánvállalkozók *magyar merinó tenyészetéből* származó, véletlenszerűen kiválogatott, 23-23, **összesen 46** (n=46) egyed marker genotípusát határoztam meg.

A vizsgálatokat a herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet molekuláris genetikai laboratóriumában végeztem el.

4.2.1. Marker genotípus meghatározás

Több szerző is felhívta a figyelmet arra, hogy markerek segítségével végzett szelekciónál a marker és a gén közötti kapcsoltság egy esetleges rekombináció alkalmával módosulhat és a szelekciót téves irányba vezetheti. A kockázat csökkentése érdekében célszerű 2, vagy annál több markert választani, lehetőleg úgy, hogy azok közrefogják a vizsgálat tárgyát képező gént (lókuszt) (SIMM, 1998; HALEY és KNOTT, 1992; LANDER és BOTSTEIN, 1989).

Vizsgálataimhoz, a fent említett szempontokat figyelembe véve, azt a két mikroszatellit lókuszt választottam, melyek a FecB lókuszt két oldalán helyezkednek el. A PhD munkám megkezdésekor a rendelkezésre álló irodalmi adatok szerint ezek a legközelebb lokalizált ismert markerek voltak, és több szerző által is alkalmasnak bizonyultak génhordozók azonosítására (9. ábra). Nevezetesen: OarAE101 (GeneBank adatbázis referenciaszáma: AF394445) és BM1329 (GeneBank adatbázis referenciaszáma: AF394444). Mindkét marker két bázis ismétlődéséből - (CA)_n - álló tandem egységeket tartalmaz.



9. ábra: A markerek és a FecB lókuszt elhelyezkedésének sematikus váza a juh 6. kromoszómán

Forrás: PIPER és RUVINSKY (1997)

4.2.1.1. Mintavétel

Vizsgálataimat a magyar merinó esetében vérmintából végeztem, a szapora merinó esetében vér és ondó mintákat is felhasználtam. Az ondó minták az állományban 1998-2003 között használatban lévő, valamint a már nem élő, de a fajta kialakításában felhasznált tenyészkosoktól származtak, (összesen n=33 egyedről). Hat kos esetében mindkét minta (ondó és vér) is a rendelkezésemre állt, így esetükben azt is tesztelni tudtam, hogy a különböző minták esetén is azonos eredményeket kapok-e.

Vérmintavétel:

Szükséges eszközök:

5 ml-es EDTA véralvadásgátlót tartalmazó műanyag vércsővek

fecskendő

injekciós tű

A vérminta vétel az állatok torkolati vénájából (vena jugularis) történt, 2,5-3,0 ml mennyiségben egyedenként, EDTA véralvadásgátlót tartalmazó csövekbe. Állatonként külön injekciós tűt használtam ügyelve arra, hogy az egyes egyedek vérmintái egymással ne szennyeződjenek. A mintákat feldolgozásig -20°C-on tároltam.

Ondó-mintavétel:

A már korábban levett és műszalmában, folyékony nitrogénben tárolt ondó mintákat az OMT Rt. pallagi állomása bocsátotta rendelkezésemre.

A mintákat -20°C-on, mélyhűtőben tároltam feldolgozásig.

4.2.1.2. *Mintaelőkészítés*

A DNS vizsgálatok elvégzéséhez tiszta genomiális DNS-re van szükség, melynek előkészítése az alábbi módon történt:

DNS izolálása vérből (ZSOLNAI és ORBÁN, 1999):

szükséges vegyszerek:

- vémosó oldat (10 ml 1M Tris; pH 7,5 + 1ml 0,2M EDTA; pH 7,43)
- Proteináz K (15 mg Proteinase K por-enzim + 1 ml steril desztillált víz) (Promega, Medison, USA) (-20 C-on tárolva)
- Lízis puffer (10mM Tris + 50 mM KCl + 0,5% Tween 20) (ezeket 1000ml-re deszt.vízzel felöntjük, majd autoklávban 110°C-on sterilezzük)

módszer:

A genomiális DNS izolálása Tris-EDTA oldattal történt. Eppendorf csövenként 0,5 ml (50 µl) vémosó oldatot adagoltam *(a vörös vértetek eltávolítása céljából, mivel a Fe²⁺ ionok inhibeálják a PCR reakciót.)*, majd 50 µl vérmintát mostam be az oldatba. Az elegyet 10 másodperces keverés után 2 percig centrifugáltam (1200 fordulat/perc). Centrifugálás után a felülúszó elegyet leöntöttem, majd a mosás, keverés, centrifugálás műveletét még kétszer megismételtem.

A harmadik mosást követően a felülúszó elegyet ismét eltávolítottam és a csövek aljára tapadt sejtpelletet reszuszpendáltam 100µl lízis puffert és 4,0µl Proteináz K enzimet tartalmazó elegyben. Az emésztés 56°C-os vízfürdőben 60 percig történt, majd az enzim deaktiválása céljából a mintákat 10 percre 94°C-os vízfürdőbe helyeztem.

Az előkészített mintákat -20°C-on tároltam a további vizsgálatig.

DNS izolálás hígított spermából (ZSOLNAI és FÉSÜS, 1996):

szükséges vegyszerek:

- 0,11 M NaAc oldat
- ethanol
- A oldat (0.4 M NaOH + 1 M DTT + desztillált víz)
- B oldat (1 M HCl-TRIS pH 8,5 + 1 M HCl Merk + desztillált víz)

- Proteináz K (15 mg Proteinase K por-enzim + 1 ml steril desztillált víz) (Promega, Medison, USA) (-20°C -on tárolva)
- 10%-os Chelex (BioRad)

módszer:

A spermát a műszalmából Eppendorf csőbe adagoltam, hozzáadtam 500µl 0,11 M-os NaAc oldatot, mellyel összekevertem, majd 2 percig 1200 fordulaton centrifugáltam. A felülúszó elegyet leöntöttem. Ezt követően a mosás és keverés műveletét még kétszer megismételtem. A centrifugálások után a minta erősen letapadt az Eppendorf csövek aljára, amit izzított és ethanolban lehűtött platinakacccsal kevertem fel.

A harmadik mosást követően a csöveket 5-10 percig szűrőpapíron szikkasztottam. Ezután minden mintához 250 µl A oldatot adagoltam és 1 órára 65°C-os vízfürdőbe helyeztem. Vízfürdő után 250 µl B oldatot és 20 µl Proteináz K-t adagoltam a mintákhoz. Az emésztés 1 órán át 56°C-os vízfürdőben történt, majd az enzim deaktiváláshoz a mintákat 10 percre 95°C-os vízfürdőbe helyeztem.

A minta további tisztítását Chelex-el végeztem, mely megköti a PCR reakciót zavaró fémionokat. A vízfürdőből kivett mintákból 250 µl-t mértem be csőenként, ehhez 200 µl 10%-os Chelexet adagoltam. Keverés után 30 percre 56°C-os vízfürdőbe helyeztem a mintákat, majd rázás és centrifugálás (1200 fordulaton, 10 másodpercig) után 8 percre 100°C-os vízfürdőbe. Az így előkészített mintákat -20°C-on tároltam a további vizsgálatokig.

Az előkészített, tisztított DNS mintákból következő lépésként a vizsgálatom tárgyát képező mikroszatellit markerek amplifikálását végeztem el PCR segítségével.

4.2.1.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

szükséges vegyszerek:

PCR elegy:

- desztillált víz
- 10x puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0, 1% Triton X-100) (Promega, Medison, USA)

- 2,5 mM MCl_2 (Promega, Medison, USA)
- 0,2 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia Biotech, USA)
- 0,12 μM OarAE101 primer1 (PE-Applied Biosystem, Warrington, USA)
- 0,12 μM OarAE101-HEX primer2 (PE-Applied Biosystem, Warrington, USA)
- 0,28 μM BM1329 primer1 (PE-Applied Biosystem, Warrington, USA)
- 0,28 μM BM1329-FAM primer2 (PE-Applied Biosystem, Warrington, USA)
- 0,25 U Taq DNS polimeráz (Promega, Medison, USA)
- 20-100 μM genomiális DNS
- paraffin olaj

Az alkalmazott primerek szekvenciája és elnevezése:

OarAE101-HEX:

5' AAA TAT ATT TGA AAA AAC TGT ATC TCC C 3'

OarAE101

5' TTC TTA TAG ATG CAC TCA AGC TAG G 3'

MONTGOMERY és mtsai. (1993)

BM1329-FAM

5' TTG TTT AGG CAA GTC CAA AGT C 3'

BM1329

5' AAC ACC GCA GCT TCA 3'

BISHOP és mtsai. (1994)

módszer:

PCR reakciókhoz egy Perkin Elmer programozható PCR készüléket (DNA Thermal Cyclor) használtam.

Miután vizsgálataim két különböző lókuszra (mikroszatellitre) irányultak, *multiplex analízist* végeztem.

vegyszerek bemérése steril fülke alatt történt. Először a mintát nem tartalmazó PCR elegyet mértem össze, mely a „PCR elegy”-nél felsorolt vegyszereket, az ott megadott koncentrációban tartalmazta 10 μl térfogatban. Az elegyre paraffin olajat cseppentettem párolgásának megakadályozására, majd az olaj alá, a PCR elegybe 0,94 μl előkészített mintát mértem.

PCR kondíciók:

<u>Kezdő denaturáció</u>	94 °C	1 perc	} 26 ciklus
Denaturáció	94 °C	30 másodperc	
Primerek kapcsolódása	49 °C	30 másodperc	
<u>Elongáció</u>	72 °C	30 másodperc	
Záró szakasz	72 °C	10 perc	

4.2.1.4. Mikroszatellit allélok meghatározása kapilláris-elektroforézissel

szükséges vegyszerek:

- Tamra-500 (PE-Applied Biosystem. Warrington, USA)
- Formamid (Amresco, Solon, Ohio) (denaturálva tartja a DNS szálát)
- PCR termék

módszer:

A PCR termékek (mikroszatellit allélok) detektálását és analizálását ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-rel (Perkin Elmer) végeztem.

Mintaelőkészítés lépései elektroforézishez:

1. 1 µl PCR termék, 12 µl deionizált Formamid és 0,5 µl Tamra-500 bemérése a mintacsőbe
2. Inkubálás 95°C-on 5 percig
3. Hűtés jégben 2-3 percig
4. Minták elhelyezése a készülékbe

A PCR termékekből 1-1µl mintát vettem, erre 0,5 µl Tamra-500 és 12 µl Formamidot mértem. A mintákat ezután 5 percig 95°C-on inkubáltam, majd jégbe helyeztem 2-3 percre. Ezt követően kerültek a minták az ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-be.

Az adatbegyűjtés az ABI PRISM 310 Data Collection Software segítségével történt. Az allélok azonosítására a 310 GeneScan Analysis 2,1 programot használtam,

mely a belső standard alapján határozza meg a mikroszatellit fragmentumok helyeit. Az adatok értékelését (a fragmentumok hosszának meghatározása) a Genotyper programmal végeztem. A futtatás körülményeit a 4. táblázat tartalmazza:

4. táblázat: A kapilláris-elektroforézis futtatásának körülményei

Virtuális szűrő	„C”
Belső standard	Tamra-500; standard fragmentumok hossza: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 300
Alkalmazott kapilláris	hossza:30 cm; átmérője: 52 µm
Injektálási idő	13 s
Feszültség (injektálás és futtatás alatt)	15kV
Hőmérséklet	60°C
Futtatás ideje	22 perc

4.3. Direkt génteszt vizsgálatok

A direkt génteszt vizsgálatokra 2002 őszén és 2003 tavaszán került sor. A elvégzéséhez a marker vizsgálatokhoz gyűjtött szapora merinó egyedektől (n=399) származó vér és ondó mintákat használtam fel, valamint vérmintát vettem a 2002-ben, illetve 2003. márciusáig született és továbbtenyésztésre megtartott egyedektől (n=41) is. Emellett rendelkezésemre állt 14 booroola tenyészkos mélyhűtött ondóminája. Kontrollként a mikroszatellit vizsgálatoknál is tesztelt (nem génhordozó) magyar merinók mintái szerepeltek (n=46), továbbá 3 texel tenyészkos genotípus vizsgálatát is elvégeztem.

A laboratóriumi munkát ez esetben is a herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet molekuláris genetikai laboratóriumában végeztem.

4.3.1. A BMPR-1B receptorban bekövetkezett mutáció kimutatása

(forced restriction fragment length polymorphism)

A BMPR-1B receptorban bekövetkezett pontmutáció kimutatását ACRS (ACRS – amplifikációval létrehozott restrikciós hasítóhely) módszerrel végeztem. Mivel a mutáció - mely egy adenin guaninnal való kicserélődése - nem hozott létre és nem is törölt enzimfelismerő helyet, ezért azt, WILSON és mtsai. (2001) által leírt módon amplifikációval hoztam létre. Így a PCR eredményeként 140 bp hosszúságú terméket kapok, mely az AvaII restrikciós enzim felismerő helyét tartalmazza. Az AvaII enzim a mutációt hordozók esetében vágja a DNS szálát. Az enzimes emésztést követően a homozigóta hordozók esetében 110 bp hosszúságú fragmentek, heterozigótáknál 110 bp és 140 bp, homozigóta nemhordozóknál pedig 140 bp hosszúságú fragmentek keletkeznek, melyek agaróz-gélelektroforézis segítségével elválaszthatók.

4.3.1.1. Mintavétel

A mintavétel a mikroszatellit vizsgálatoknál leírtak alapján történt

4.3.1.2. Mintaelőkészítés

A mintaelőkészítés a mikroszatellit vizsgálatoknál leírtak alapján történt.

4.3.1.3. Polimeráz láncreakció

Szükséges vegyszerek:

PCR elegyhez:

- desztillált víz
- 10x puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0, 1% Triton X-100) (Promega, Medison, USA)
- 1,5 mM $MgCl_2$ (Promega, Medison, USA)
- 0,2 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia Biotech, USA)
- 0,1 μ M primer 1 (PE-Applied Biosystem, Warrington, USA)
- 0,1 μ M primer 2 (PE-Applied Biosystem, Warrington, USA)
- 0,25 U Taq DNS polimeráz (Promega, Medison, USA)
- 20-100 μ M genomiális DNS

Az alkalmazott primerek szekvenciája, elnevezése:

FecB1 (forward): 5' GTC GCT ATG GGG AAG TTT GGA TG 3'

FecB2 (reverse): 5' CAA GAT GTT TTC ATG CCT CAT CAA CAC **GG TC** 3'

Módszer:

A FecB2 primer szekvenciájában a pirossal jelölt nukleotid a mutáció helyét jelöli. PCR reakciókhoz egy Thermo Hybaid programozható PCR készüléket (PCR-Express) használtam.

A vegyszerek bemérése steril fülke alatt történt. Először a mintát nem tartalmazó PCR elegyet mértem össze, mely a fentiekben felsorolt vegyszereket, az ott megadott koncentrációban tartalmazta 10µl térfogatban. Az elegyből 9,06µl-t adagoltam a mintacsövekbe, majd a kiadagolt PCR elegybe 0,94 µl előkészített mintát mértem.

PCR kondíciók:

Kezdő denaturáció	94 °C	1 perc	} 35 ciklus
Denaturáció	94 °C	15 másodperc	
Primerek kapcsolódása	65 °C	30 másodperc	
Elongáció	72 °C	30 másodperc	
Hűtés	4 °C	∞	

4.3.1.4. Restrikciós fragment hossz polimorfizmus, agaróz-gélelektroforézis

Szükséges vegyszerek:

- 1 x TBE oldat
- 4% agaróz gél (MetaPhor agarose - BioRad; Cambrex BioScience, Rockland, USA)
- 0,33 mg/ml Etidium Bromid (BioRad)
- dd H₂O
- 10 x puffer
- 5 U AvaII enzim (BioLabs)

A PCR termék emésztése AvaII restrikciós endonukleázzal történt. Az enzim specifikus felismerő szekvenciája: **G / G W C C**

A mutáció helyét piros szín jelzi. Ha nincs mutáció, akkor az enzim nem ismeri fel a szekvenciát és nem vág (...**A** G W C C...). Ha a mutáció jelen van, akkor az enzim vágja a DNS szálát (A → G kicserélődés: ...**G** G W C C...).

A 10µl térfogatú PCR termékhez mintánként 5 U enzimet adagoltam, majd 37°C-os vízfürdőbe helyeztem. Az emésztés egy teljes éjszakán át történt. Ezt követően a mintákat 4%-os agaróz gélen futtattam, BioRad gélfuttató kádban. A minták festése etidium bromiddal történt.

Az elektroforézis körülményei az alábbiak voltak:

6,66 V/cm - 8 percig, majd

9,33 V/cm - 8 percig.

4.4. A marker és direkt génteszt vizsgálatoknál alkalmazott statisztikai módszerek

Marker vizsgálatok

Annak meghatározására, hogy a vizsgált két mikroszatellit genotípusok hatással vannak-e az ovulációs rátára, alkalmasak-e a kiválasztott mikroszatellitek molekuláris genetikai markerként az egyedek FecB génhordozásának megállapítására, egyváltozós többtényezős varianciaanalízis vizsgálatot végeztem. A vizsgálatba vont összesen 115 megfigyelés (OR mérés) 64 egyedtől származott. Az OR mérések különböző években, egyedenként eltérő ismétlésekben, és különböző életkorban történtek, ezért ezeket a tényezőket figyelembe véve, fix hatásként szerepeltettem a modellben. Az életkor esetében, annak nagy szórása miatt, 3 korcsoportot alakítottam ki. A csoportosítást az irodalomban közölt életkor ovulációs rátát befolyásoló hatását figyelembe véve végeztem. A fix hatásként szereplő mérés évei között az 1996 és 1997-es év adatai nem szerepelnek, mivel az egyes évekre vonatkozóan 3-nál kevesebb adat állt a rendelkezésemre.

Az adatok elemzését az ún. REML (Restricted Maximum Likelihood) módszerrel végeztem, mely a legkisebb négyzetes átlag módszerén alapul és alkalmas a normál eloszlású függő változók és a többnyire diszkrét, független változók kombinációi közötti hatásvizsgálatra. A számításokhoz a Mixed Model Least-Squares and Maximum Likelihood Computer Programme PC-2 statisztikai programcsomagot

használtam (HARVEY, 1999). A varianciaanalízis során figyelembe vett tényezők jellemző adatait az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: A markerekre végzett egyváltozós többtényezős varianciaanalízis jellemző adatai

Ható tényezők	Változatok száma	Változatok megnevezése	A változatonkénti OR megfigyelések száma
Mérés éve	6	1994	9
		1995	14
		1998	9
		1999	40
		2000	21
		2001	22
Korcsoportok	3	1*	34
		2*	38
		3*	43
BM1329 marker genotípus	4	158-158	64
		158-160	28
		158-162	11
		158-164	12
OarAE101 marker genotípus	6	87-87	73
		87-91	18
		87-99	17
		87-107	4
		87-109	2
		91-105	1

1* - az OR mérés 2,5 éves kor alatt történt

2* - az OR mérés 2,5 - 5,5 éves korban történt

3* - az OR mérés 5,5 éves kor felet történt

A tényezőkön belüli változatok (csoportok) közötti szignifikáns különbségek meghatározásához a következő képletet használtam (SVÁB, 1981):

$$SzD_{P\%} = t_{P\%} \sqrt{\frac{HibaMQ(r + r_i)}{rr_i}}$$

ahol,

$SzD_{P\%}$ - legkisebb szignifikáns különbség értéke P szignifikancia szinten

$t_{P\%}$ - a hiba szabadságfokára P szignifikancia szinten megadott táblázati t érték

hiba MQ - közepes négyzetes eltérés hibája

$r; r_i$ - az ismétlések száma az összehasonlított genotípus csoportoknál

Direkt génteszt vizsgálatok

Az állományban fellelhető booroola gén ovulációs rátára való hatásának vizsgálatára a mikroszatellit vizsgálatokhoz hasonlóan a REML módszert alkalmaztam. A vizsgálatban ugyanazon egyedek adatait szerepeltettem, melyek a markervizsgálatoknál is felhasználtam. Fix hatásként a FecB genotípus mellett a mérés éve és az életkor szerepelt. A varianciaanalízis jellemző adatait a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A FecB génre végzett egyváltozós többtényezős varianciaanalízis jellemző adatai

Ható tényezők	Változatok száma	Változatok megnevezése	A változatonkénti OR megfigyelések száma
Mérés éve	6	1994	9
		1995	14
		1998	9
		1999	40
		2000	21
		2001	22
Korcsoportok	3	1*	34
		2*	38
		3*	43
FecB genotípus	3	++	11
		B+	51
		BB	53

1* - az OR mérés 2,5 éves kor alatt történt

2* - az OR mérés 2,5 - 5,5 éves korban történt

3* - az OR mérés 5,5 éves kor felet történt

Genotípus- és allélgyakoriságok kiszámítása

Genotípus gyakoriság

A populációk genotípus-gyakoriságát az alábbi képlet alapján számoltam:

$$P_i = N_i / n$$

ahol,

P_i - az i genotípus gyakorisága

N_i – az i genotípusú egyedek száma

n – összes egyedszám.

Allélgyakoriság

A vizsgált lókuszokon előforduló allélok gyakoriságát a genotípus gyakoriság ismeretében számítottam ki, melyre a következő általános szabályt alkalmaztam: az autoszomán elhelyezkedő lókuszok esetében a lókuszon fellelhető adott allél gyakoriságát megkapjuk, ha az allélt homozigótaként hordozó egyedek gyakoriságához hozzáadjuk az allélt heterozigótaként hordozók gyakoriságának felét.

A fajtán belüli mikroszatellit markerek polimorfizmus információ tartalmának vizsgálatához a PIC (Polymorphic Information Content) értéket határoztam meg, amellyel becsülhető, hogy az adott állományban a családok milyen aránya várható marker-informatívna, vagyis lesz heterozigóta. A számításhoz az alábbi képletet alkalmaztam (LYNCH és WALSH, 1997):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

ahol,

n - az egyes allélok száma

p_i és p_j - az allélok gyakoriságai

A vizsgált fajták esetében a marker allélok gyakorisága közötti különbség statisztikai igazolásához a Chi2 próbát alkalmaztam és az alábbi képletet használtam (SVÁB, 1981):

$$\chi^2 = \frac{\sum \frac{a_j^2}{a_j + b_j} - \frac{n_a^2}{n_a + n_b}}{\frac{n_a}{n_a + n_b} - \left(\frac{n_a}{n_a + n_b} \right)^2}$$

ahol,

a, b - a vizsgált fajták

j - az egyes allélok

k - az allélok száma

a_j, b_j - az egyes allélok gyakorisága

n_a - az „a” fajta összes megfigyelési egysége

n_b - a „b” fajta összes megfigyelési egysége

A marker genotípusok FecB genotípuson belüli eloszlásának vizsgálatához szintén χ^2 próbát használtam. A számításokhoz az alábbi képletet alkalmaztam (SVÁB, 1981):

$$G_1 = \frac{\sum_{1a}^2}{n_a} + \frac{\sum_{1b}^2}{n_b} + \dots + \frac{\sum_{1k}^2}{n_k}$$

$$A = \frac{G_1}{n_1} + \frac{G_2}{n_2} + \dots + \frac{G_v}{n_v}$$

$$\chi^2 = (A-1)n$$

- n - összes elemszám
- $n_a, n_b, \dots, n_k$ - az egyes marker genotípusokon belüli egyedek száma
- $n_1, n_2, \dots, n_v$ - az egyes booroola genotípuson belüli egyedek száma
- a, b, ..., k - az adott marker genotípus, adott booroola genotípuson belül előforduló egyedek száma

Az egyes vizsgálatoknál szereplő egyedszámot a jobb áttekinthetőség céljából a 7. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat: Az egyes vizsgálatokban szereplő egyedszámok

Vizsgálat típusa	Egyedszám	Összesen n
Ovulációs ráta vizsgálatok	64 szapora merinó anyajuh (115 mérési adata)	64
Varianciaanalízis vizsgálatok a marker genotípus és ovulációs ráta, valamint a FecB genotípus és ovulációs ráta között	64 szapora merinó anyajuh (115 mérési adata)	64
Marker genotípus meghatározás	399 szapora merinó 8 booroola merinó 46 magyar merinó	453
FecB genotípus meghatározás direkt génteszt segítségével	440 szapora merinó 14 booroola merinó 46 magyar merinó 3 texel	503
A marker genotípus és FecB genotípus eredményeinek összehasonlítása	387 szapora merinó 8 booroola merinó	395
Becsült FecB genotípus és a direkt génteszt eredmények összehasonlítása nőivarban	90 szapora merinó	90
Becsült FecB genotípus és a direkt génteszt eredmények összehasonlítása hímivarban	12 booroola merinó 13 szapora merinó	25

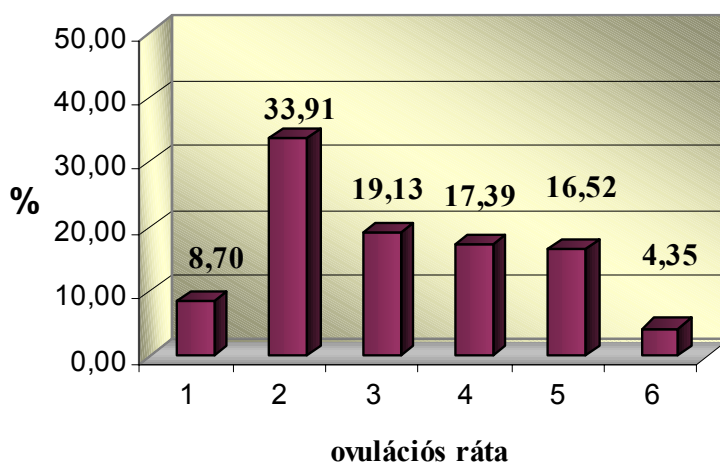
5. Vizsgálati eredmények és azok értékelése

5.1. Ovulációs ráta vizsgálatok eredménye

A 101 szapora merinó közül 61 egyed csak PMSG kezelés nélkül mért OR eredménnyel rendelkezett, 9 egyednek csak indukált OR eredménye volt, és 31 egyed esetében mind indukció nélküli, mind indukált OR eredmény is a rendelkezésemre állt.

A marker genotípus és ovulációs ráta, valamint a direkt génteszt alapján meghatározott genotípus és ovulációs ráta között végzett varianciaanalízis vizsgálatokhoz annak a 64 egyednek vettem figyelembe az OR eredményeit, melyek származása, az OR mérésének éve, illetve az anyák OR mérés kori életkora is ismert volt. Továbbá ezeknél az egyedeknél a marker genotípus, és a direkt génteszt vizsgálatokat is el tudtam végezni. A 64 szapora merinó anyától összesen 115 mérési adatot gyűjtöttem. Egy anyától rendelkezésemre álló mérések száma 1-3 volt. A számítás során alkalmazott program segítségével az ismétlések számát is figyelembe vettem.

A 64 anyajuh OR értékeinek megoszlása az 10. ábrán látható. Az ovulációs ráta számtani átlag értéke a vizsgált anyák esetében 3,12. Az ábra adataiból leolvasható, hogy az OR eredmények 8,7% adott egyes ovulációs számot. Igen magas aránnyal (33,91%) fordult elő a kettes ovuláció. Az eredmények közül 57,39% volt a 3, vagy ennél magasabb ovulációs szám, és ebből közel 40% esett a génhordozásra utaló 3-as érték felé.

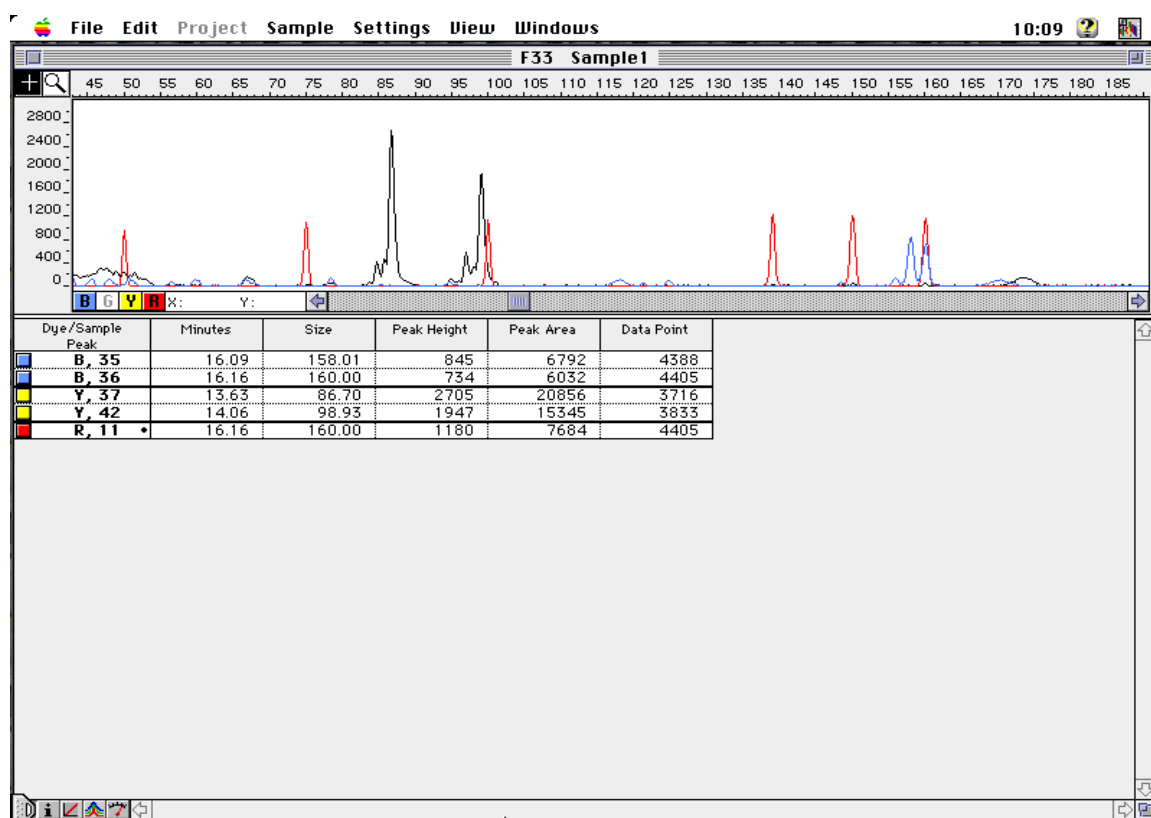


10. ábra: Az ovulációs ráta értékek nagyság szerinti megoszlása

5.2. Marker vizsgálatok eredménye

Multiplex analízist alkalmazva egyetlen vizsgálattal sikerült egy adott egyed genotípusát mindkét mikroszatellit lókuszra meghatároznom. Ez felére csökkentette a vizsgálathoz szükséges időt, és kedvezőbb volt a költségráfordítás is.

A marker genotípus meghatározás során a szapora merinó és magyar merinó állományokban mindkét mikroszatellit lókusz esetében összesen 6 allélt azonosítottam. Az egyes allélokat bázispárban (bp) kifejezett hosszuk alapján neveztem el. A marker vizsgálatok során, a Genotyper program által készített göbén az egyes allélcsúcsok jól látható módon elkülönültek. Az 11. ábrán egy mindkét lókuszra heterozigóta egyed eredménye látható.



11. ábra: A 9195-ös fülszámú szapora merinó tenyészkos marker genotípus eredménye. A fekete színű csúcsok az OarAE101, a kék csúcsok a BM1329 mikroszetellit lókusz alléljait jelentik. Piros színnel a belső standard csúcsai láthatók. OarAE101 marker allélok hossza: 158 bp és 160 bp. A BM1329 marker allélok hossza 87 bp és 99 bp.

Az ábrán szereplő táblázatban található adatok közül az eredmények értékelése szempontjából a „Size” oszlopából olvasható értékek a lényegesek, melyek az allélok hosszát jelölik.

Az egyes allélok előfordulása, valamint azok gyakorisági értékei a szaporaságra nem szelektált magyar merinó juhok esetében jelentősen eltértek mind a szelektálatlan szapora merinó, mind a kiválogatott populáció (tenyészállomány) esetén kapott allélgyakorisági értékektől (8., 9. táblázat).

A χ^2 próba eredménye alapján a két populáció (ez a 8. és 9. táblázatokban szereplő teljes állomány és a magyar merinó összehasonlítását jelenti) allélgyakorisági értékei szignifikánsan különböznek bizonyultak $P < 0,1\%$ hibaszázalék mellett. Az OarAE101 mikroszatellit esetén kapott χ^2 érték 176,39, míg a táblázatbeli érték (DF=5) 20,5 volt. A BM1329-es lókusznál 25,12 volt a számított és 20,5 a táblázatbeli χ^2 érték DF=5 szabadságfoknál.

8. táblázat Az OarAE101 mikroszatellit marker allélok megoszlása a vizsgált állományokban

	Teljes állomány (1998-2003)*	Tenyészegyedek (1998-2003)**	OR-el rendelkező anyajuhok***	Magyar merinó
N	407	227	64	46
Allélok				
87	0,732	0,785	0,82	0,07
91	0,184	0,133	0,08	0,78
99	0,063	0,062	0,06	0,15
105	0,010	0,009	0,01	-
107	0,006	0,009	0,02	-
109	0,005	0,002	0,01	-

* az 1998-2003 között a debreceni szapora merinó állományban fellelhető egyedek

** az 1998-2003-között a debreceni szapora merinó állományban tartott tenyészegyedek

*** a marker-OR varianciaanalízishez felhasznált 64 szapora merinó anyajuh eredménye

9. táblázat A BM1329 mikroszatellit marker allélok megoszlása a vizsgált állományokban

	Teljes állomány (1998-2003)*	Tenyészegyedek (1998-2003)**	OR-el rendelkező anyajuhok***	Magyar merinó
N	407	227	64	46
Allélok				
158	0,706	0,732	0,80	0,152
160	0,149	0,133	0,10	0,435
162	0,066	0,064	0,04	0,196
164	0,076	0,069	0,06	-
170	0,003	0,002	-	0,174
172	-	-	-	0,043

* az 1998-2003 között a debreceni szapora merinó állományban fellelhető egyedek

** az 1998-2003-között a debreceni szapora merinó állományban tartott tenyészegyedek

*** a marker-OR varianciaanalízishez felhasznált 64 szapora merinó anyajuh eredménye

A szapora merinó fajtában a vizsgált marker lókuszok polimorfizmus információ tartalma eltérő volt. ($PIC_{BM1329}=0,436$, $PIC_{OarAE101}=0,385$). A BM1329 esetén kapott magasabb érték azt mutatja, hogy nagyobb valószínűséggel találunk olyan családokat az állományban, amelyek marker informatívak, vagyis heterozigóták. Hasonlóan polimorfabb a BM1329-es marker a magyar merinó fajtában is, mely az allélgyakorisági értékek eloszlásában is látható. A BM1329-es mikroszatellit PIC értéke 0,7 volt, ugyanakkor az OarAE101 marker polimorfizmus információ értéke jóval kisebbnek bizonyult ($PIC_{OarAE101}=0,33$).

A szapora merinóban az OarAE101 lókuszon a 87-es, a BM1329 lókuszon a 158-as allél dominál, több mint 70%-os arányt képviselve. A magyar merinó fajtában is egy-egy, a 91-es és a 160-as allél nagyobb arányú előfordulása a jellemző (78, illetve 43,5%). Ezek az allélok ugyanakkor a szapora merinóban jóval kisebb, 0,184 illetve 0,149 gyakorisággal fordultak elő. Figyelemre méltó továbbá, hogy a 105, 107 és 109-es, valamint a 164-es allélok, kis százalékban ugyan, de csak a szapora merinóban voltak kimutathatók. A 164-es allélt eredeti booroola tenyészkos esetében is sikerült azonosítanom (64-es fülszámú tenyészkos). A χ^2 próba eredményei alapján a két fajta az allélgyakorisági értékeik szerint különbözőnek tekinthetők, így feltételezhető, hogy ezek az allélok a booroola oldalról kerültek a szapora merinó fajtába.

A 87 és 158-as allélok nagyarányú jelenléte a szapora merinó fajtában annak tulajdonítható, hogy a fajta kialakítása során, illetve azt követően a tenyésztők a booroola mutációt igyekeztek feldúsítani az állományban, és a Fec^B allél valószínűleg a legtöbb családban e két alléllal (87, 158) kapcsolatosan öröklődött. Ezt a feltevést erősíti az a tény is, hogy az állományban használt kosok döntő többsége e két allélt homo-, illetve heterozigóta formában hordozza. A 33 kos közül, melynek sikerült a marker genotípusát meghatározni, 19 egyed a 158-as allélra homozigóta volt, 11 pedig heterozigótaként hordozta. A 87-es allél 24 kos esetében homozigóta, 8-nál pedig heterozigóta formában volt jelen. A 33 kos közül 8 booroola merinó, melyek közül 5 egyed mindkét említett allélra homozigóta. A tenyészkosok marker genotípus eredményeit a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: Az 1998-2003 között használatban lévő, valamint a szapora merinó kialakítása során felhasznált tenyészkosok marker genotípus eredményei

Sorszám	Kos fülszáma	Fajta	OarAE101	BM1329	Felhasznált minta
1.	046	booroola	-	-	ondó
2.	61	booroola	87/87	158/158	ondó
3.	63	booroola	-	-	ondó
4.	64	booroola	87/91	160/164	ondó
5.	71	booroola	87/87	158/158	ondó
6.	73	booroola	-	-	ondó
7.	74	szapora merinó	-	-	ondó
8.	76	booroola	87/87	158/158	ondó
9.	097	szapora merinó	87/87	158/160	vér
10.	0155	szapora merinó	-	-	ondó
11.	0157	szapora merinó	-	-	ondó
12.	0159	szapora merinó	87/87	158/160	ondó
13.	0173	szapora merinó	87/87	158/158	ondó
14.	178	szapora merinó	87/87	158/158	ondó
15.	226	szapora merinó	87/87	158/162	ondó/vér
16.	278	szapora merinó	87/99	158/158	ondó
17.	319	szapora merinó	87/91	162/164	ondó/vér
18.	332	booroola	87/87	158/160	ondó
19.	910	szapora merinó	87/87	158/158	ondó
20.	914	szapora merinó	87/87	158/164	ondó
21.	2189	szapora merinó	87/87	158/158	ondó/vér
22.	3166	szapora merinó	87/87	158/158	ondó/vér
23.	3190	szapora merinó	87/87	158/160	ondó/vér
24.	3231	szapora merinó	-	-	ondó
25.	3244	booroola	87/87	158/158	ondó
26.	3260	szapora merinó	87/87	158/158	ondó/vér
27.	3394	szapora merinó	87/91	158/158	vér
28.	3619	szapora merinó	87/87	158/158	vér
29.	4130	booroola	87/87	158/158	ondó
30.	4204	booroola	87/99	158/162	ondó
31.	7234	booroola	-	-	ondó
32.	8120	booroola	-	-	ondó
33.	8257	szapora merinó	-	-	vér
34.	8290	szapora merinó	91/91	158/160	vér
35.	8502	booroola	-	-	ondó
36.	9162	szapora merinó	87/87	158/158	vér
37.	9195	szapora merinó	87/91	158/160	ondó
38.	011551	szapora merinó	87/87	158/158	vér
39.	41457	szapora merinó	-	-	ondó
40.	51537	szapora merinó	-	-	ondó
41.	220212	szapora merinó	87/87	158/158	vér
42.	220452	szapora merinó	87/87	158/158	vér
43.	220506	szapora merinó	87/87	158/158	vér
44.	220548	szapora merinó	87/91	162/162	vér
45.	220647	szapora merinó	87/87	158/164	vér
46.	220650	szapora merinó	87/107	158/164	vér

A feltételezésem igazolásához varianciaanalízist végeztem a marker genotípus és a booroola gén által közvetlenül befolyásolt ovulációs ráta értékekre vonatkozóan. Az egyváltozós többtényezős varianciaanalízis eredményét a 11. táblázat tartalmazza.

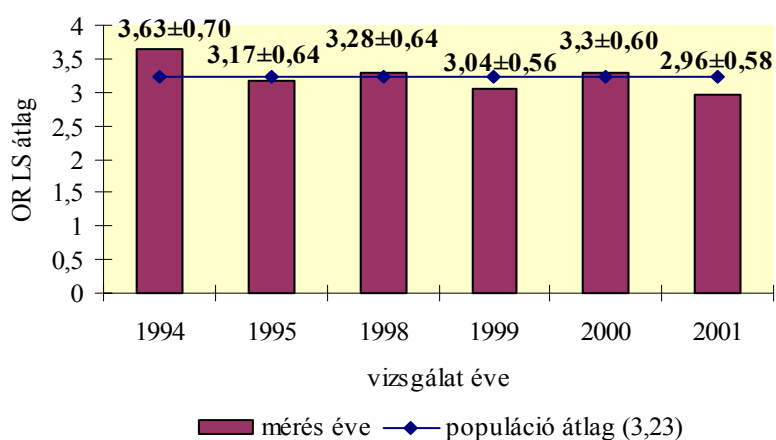
11. táblázat: A marker genotípus - ovulációs ráta egytényezős varianciaanalízis eredménye

Forrás	DF	SS	MS	F	P
MU-YM	1	0,037	0,037	0,044	0,834
Mérés éve	5	1,848	0,370	0,444	0,819
Korcsoport	2	1,231	0,616	0,739	0,480
BM1329	3	8,973	2,991	3,591	0,016*
OarAE101	5	2,900	0,580	0,696	0,630
Hiba	99	82,456	0,833		

* $P < 0.05$

Az értékelésben fix hatásként a mérés éve, az anyajuhok OR mérés kori életkora és a marker genotípusok szerepeltek.

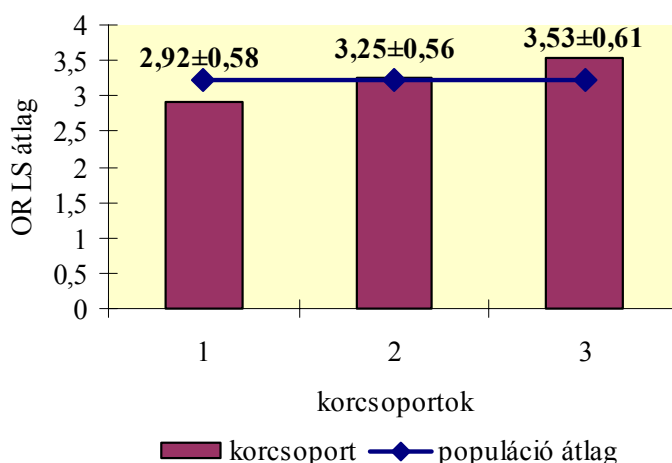
A mérés évének hatása, mely az egyes években a takarmányozásban fellépő különbségekből és az eltérő klimatikus viszonyokból adódhat, nem befolyásolta szignifikánsan az ovulációs rátát. A különböző mérési évek estén kapott legkisebb négyzetes OR átlag értékek a populáció átlag (3,23) körül ingadoztak (12. ábra).



12. ábra: Az anyajuhok OR átlagának alakulása a mérés évének függvényében

Több szerző is beszámolt arról, hogy az életkor befolyásolja az OR értékek alakulását. Jerkék esetében a mért OR érték akár 20-30%-al is kisebb lehet, mint többször ellett anyajuhok esetében (VERESS, 1998). M. ESTUTY (1999) a debreceni szapora merinó állományban végzett vizsgálataiban szintén úgy találta, hogy a kor szignifikáns hatással volt az ovulációs rátára, mely az életkor előrehaladtával emelkedett.

MONTGOMERY és mtsai. (1985) romney x booroola merinó keresztezett jerkék és anyák ovulációs rátáját évente egyszer, a fő tenyész-szezonban mérték. Eredményeik szerint 1,5 és 3,5 éves kor között szignifikánsan nőtt az ovulációs ráta, a nemhordozóknál átlagosan 1,25-ről 1,45-re, heterozigóta hordozók esetében pedig átlagosan 2,43-ról 3,07-re ($P < 0,01$). A 3,5 és 5,5 éves kor közöttiek esetében nem volt szignifikáns különbség az ovulációs ráta értékben.

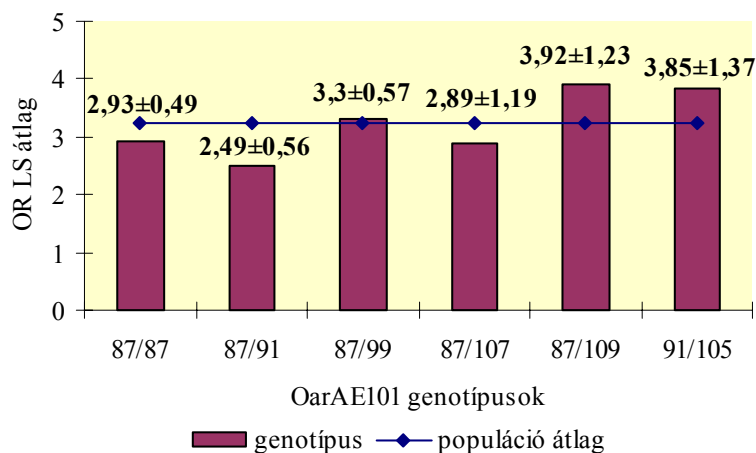


13. ábra: Az anyajuhok OR átlagának alakulása korcsoportok szerint

A vizsgálatomba vont szapora merinó egyedek esetén a legkisebb négyzetes OR értékek korcsoportonkénti megoszlását az 13. ábrán tüntettem fel. Az életkor előrehaladtával az OR értékek átlaga növekedett, de a különbség nem volt szignifikáns $P < 0,05$ szinten az egyes korcsoportok között.

A mikroszatellit genotípus és ovulációs ráta közötti hatásvizsgálat az értékelt két lókuszt esetén eltérő eredményt adott.

Az OarAE101 mikroszatellit marker genotípus nem befolyásolta szignifikánsan az ovulációs rátát ($P < 0,05$). Ez azt jelenti, hogy statisztikailag nem volt igazolható kapcsolat a mikroszatellit allélok és az OR értéket alapvetően meghatározó Fec^B allél között.

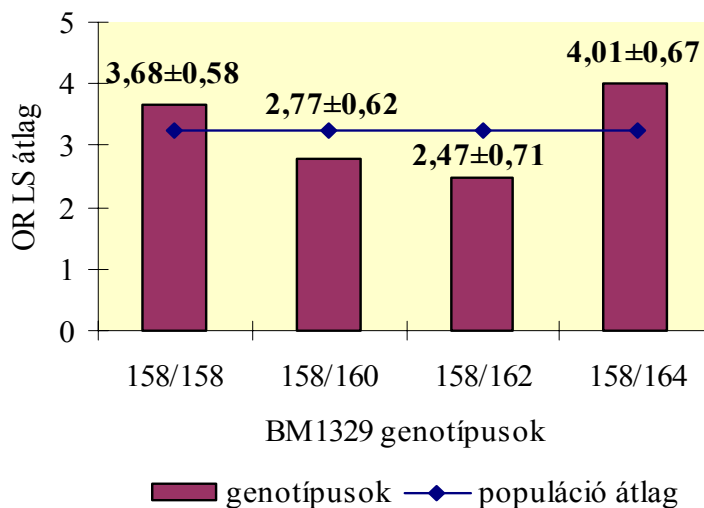


14. ábra: Az anyajuhok OR átlagának alakulása az OarAE101 genotípus függvényében

A 87-es és a 91-es allélok olyan genotípusokban egyaránt előfordultak, melyek között voltak populáció átlagon aluli (87/87; 87/91; 87/107), illetve populáció átlagon felüli OR átlaggal rendelkező egyedek (87/91; 91/105). A 87/99-es genotípusú egyedek OR átlaga a vizsgált 64 egyed átlag OR értékétől alig tért el (14. ábra). Ebbe a genotípusba tartozó egyedek ($n=7$) között voltak olyanok, amelyek az ovulációs rátájuk alapján a mutációt homozigótaként hordozónak, illetve homozigóta vad típusnak minősültek. Így a 87, 91 és 99-es allélok esetében a Fec^B alléllal való kapcsoltság egyedenként változik. A fellépő rekombináció eredményeként vannak olyan egyedek, amelyeknél a +, és vannak olyanok, amelyeknél a B alléllal öröklődnek kapcsolatosan az említett mikroszatellit allélok. A 87/109-es és a 91/105 –ös genotípus a vizsgálatban mindössze 1-1 egyedhez volt köthető. A magas OR érték alapján az egyedek homozigóta hordozónak becsülhetők. Esetükben feltételezhető, hogy mind a 87 és 91-es, mind pedig a 105 és 109-es allélok együtt öröklődtek a Fec^B alléllal.

A másik vizsgált marker a BM1329 szarvasmarha mikroszatellit volt. E lókusztan esetében a genotípus szignifikánsan befolyásolta az ovulációs rátát $P<0,05$ szignifikancia szinten. Az egyes genotípus csoportok közötti különbségeket tekintve a 158/158 és a 158/164 között, illetve a 158/160 és a 158/162 genotípus csoportok legkisebb négyzetes OR átlaga között nem volt szignifikáns a különbség. A 158/158, 158/164 genotípus csoportok OR értéke azonban szignifikánsan nagyobbak bizonyultak a 158/160 és 158/162 genotípus csoportok OR átlagához viszonyítva. A 158/158 és

158/160 genotípus csoportok a populáció OR átlagát (3,23) 0,44 illetve 0,78-al múlták felül. (15. ábra).



158/158 – 158/160 között $SzD_{p<5\%} = 0,41$; 158/158 – 158/162 között $SzD_{p<5\%} = 0,59$
 158/160 – 158/164 között $SzD_{p<5\%} = 0,62$; 158/162 – 158/164 között $SzD_{p<5\%} = 0,79$

15. ábra: Az anyajuhok ovulációs ráta átlagának alakulása a BM1329 genotípus függvényében

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a 158-as és a 164-es allélok kapcsolatosan öröklődnek a Fec^B alléllal az állományban. A 158-as allél esetében egyes családokban a kapcsoltság megváltozott, mivel olyan genotípusokban is előfordul (olyan allélkombinációban), ahol a csoport legkisebb négyzetes OR átlaga alapján egyértelműen gént nem hordozónak bizonyult. Az állományba kerülése is kétoldalú lehetett, mivel a szapora merinó kialakításánál felhasznált magyar merinó állományban is előfordul.

A kapcsoltság megváltozásának igazolására informatív meiózisra van szükség. Az informatív meiózisok száma nagyon kevésnek bizonyult az állományban a 87-es és 158-as allélokra vonatkozó nagymértékű homozigotizáció miatt. A vizsgált 407 egyedből 139 87/87, 158/158 homozigóta volt. Ez az egyedek 34%-át jelenti. Mindemellett közel 18%-uk a két gyakori allél közül egyikre homozigóta, másokra heterozigóta.

A nőivarban, 12 anyajuh esetében, melyek 9 családba tartoznak, összesen 28 informatív meiózist találtam. Ebből 5 esetben fordult elő rekombináció a 87 és 158-as allélok között, ami 0,178 gyakoriságú előfordulást jelent.

A genotipizált kosok közül mindössze 5 egyed kétszeresen heterozigóta a vizsgált markerekre. Esetükben összesen 52 informatív meiózis fordult elő, ebből 8 rekombináció, ami 0,153-as gyakoriságú előfordulást jelent.

Az OarAE101 és BM1329 mikroszatellit lókuszokat LEYHE-HORN és mtsai. (1998) és WEIMANN és mtsai. (2001) szintén a booroola mutációt hordozók azonosításának céljából tesztelték német merinó x booroola merinó keresztezett állományban. Felmérték továbbá 4 fajtában a két mikroszatellit marker alléljainak előfordulását (német merinó, romanov, kelet fríz, tiroli hegyijuh). Említésre méltó, hogy az általuk talált 10 OarAE101 és 6 BM1329 allélok típusa és gyakorisága nagy eltérést mutatott mind az általuk vizsgált fajták között, mind pedig a magyar és a szapora merinóban általam azonosított allélokat tekintve. A szerzők az OarAE101 marker esetében említést tesznek 97, 101, 111, 113, 115, 117 és 119-es allélok jelenlétéről is, ugyanakkor nem azonosítottak 87, 91 és 105-ös allélokat, ami a szapora merinó és részben a magyar merinó esetében fellelhető volt. A BM1329-es markert tekintve a 166, 174, 178 és 180-as allélok jelenlétéről is beszámolnak a német kutatók, míg ezek sem a szapora, sem a magyar merinóban nem voltak jelen. Ugyanakkor, a 158 és 160-as allélok csak az általam tesztelt fajtában fordultak elő. A német merinó x booroola merinó családokban vizsgált marker allél – Fec^B allél kapcsolatát tekintve úgy találták, hogy a BM1329-es lókuszon a 162-es, az OarAE101-es lókuszon pedig a 97-es allél öröklődik együtt a mutációval. Az említett allélok ugyan a nemhordozó német merinó állományban is jelen voltak, de csak kis (0,1 illetve 0,07) gyakorisággal. A szerzők megállapítása szerint a két mikroszatellit hatékony szelekciós eszközt jelent a génhordozók azonosítására, amíg a direkt génteszt nem áll rendelkezésre.

GOOTWINE és mtsai. (1998) awassi x booroola keresztezett egyedeken vizsgálták a BM1329 és OarAE101 markerek alléljainak booroola génnel való kapcsoltságát. Homozigóta hordozó kosokkal nem hordozó awassi anyajuhokat párosítottak, majd az F1 generációt awassi kosokkal visszakeresztették. Az így létrehozott R1 generációban vizsgálták a marker allélok és a Fec^B allél közötti kapcsoltságot. A 6 homozigóta kos közül kettő hordozott olyan mikroszatellit allélt, amelyek alacsony gyakorisággal fordultak elő az awassi fajtában. Az említett kosok keresztezett utódai esetében a Fec^B allél öröklődése nyomon követhető.

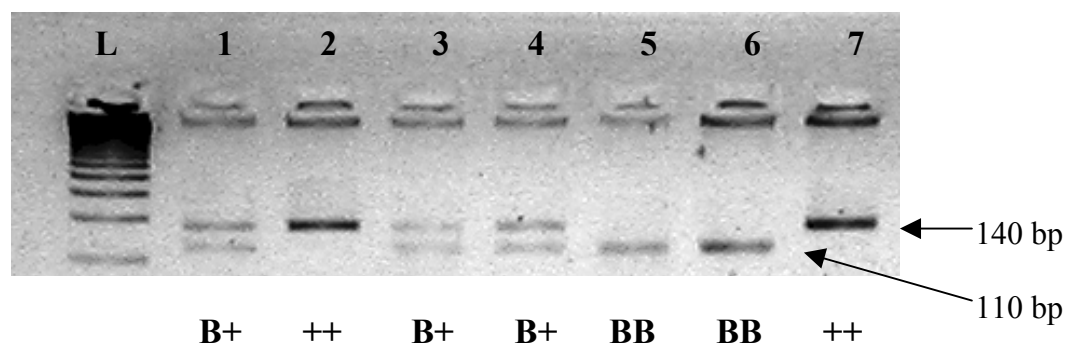
Mivel a szerzők az egyes lókuszokon előforduló allélok hosszát nem tüntették fel, azokat csak az ABC betűivel jelölték, így az általuk leírt allélokat nincs lehetőségem összevetni az általam, illetve a német kutatócsoport által azonosítottakkal.

5.3. A direkt génteszt eredményei

A booroola gén azonosítására irányuló több évtizedes munka eredményeként 2001-ben sikerült bizonyítani a booroola fajtában, a nagy ovulációs rátát okozó mutáció jelenlétét, és annak működését. Ez a felfedezés azt jelenti, hogy a továbbiakban már nincs szükség sem ovulációs ráta mérésre, sem marker teszt kidolgozására a mutáció hordozás tényének megállapításához.

A szapora merinó fajtában elvégzett direkt génteszt vizsgálataim az alábbi eredményeket adták.

A FecB genotípus meghatározás a direkt génteszt segítségével, a gélelektroforézis után kapott gélmintázat alapján történt. A nemhordozó egyedeket egy 140 bp hosszúságú gélcsík jelzi, a heterozigótáknál két gélcsík látható (110 és 140 bp hosszúságú), míg a homozigóták esetében 110 bp hosszúságú fragmentumot kapunk, ahogy azt a 16. ábra is mutatja.



16. ábra: A BMPR-1B mutáció („booroola gén”) kimutatására mesterségesen létrehozott RFLP gélelektroforézis képe. 'L' – 50 bázispár léptékű molekulalétra; '1-6' – szapora merinók anyák; '7' kontrollként használt texel kos; '2, 7' – homozigóta nem génhordozó; '3, 4' – heterozigóta génhordozó; '5, 6' homozigóta génhordozó.

A FecB genotípus és az ovulációs ráta varianciaanalízis vizsgálata a várakozásnak megfelelő eredményt adott (12. táblázat).

12. táblázat: A FecB genotípus és az ovulációs ráta közötti varianciaanalízis eredménye

Forrás	DF	SS	MS	F	P
MU-YM	1	1,357	1,357	1,631	0,204
Mérés éve	5	1,789	0,358	0,430	0,828
Korcsoport	2	1,811	0,906	1,089	0,341
FecB genotípus	2	42,799	21,399	25,720	0,000***
Hiba	105	87,362	0,832		

*** $P < 0.001$

A FecB genotípus $P < 0,001$ valószínűségi szinten szignifikánsan befolyásolta az ovulációs rátát.

Az évjárat hatása gyakorlatilag nem mutatkozott meg eredményeimben és statisztikailag nem volt bizonyítható a kor hatása sem, melyet az 5.2. fejezetben részletesen kifejtettem.

13. táblázat: A legkisebb négyzetes OR átlag érték alakulása a FecB genotípus szerint

FecB genotípus	Megfigyelés n	Legkisebb négyzetes OR átlag	Szórás
++	11	1,70	$\pm 0,45$
B+	51	2,59	$\pm 0,30$
BB	53	3,97	$\pm 0,30$

BB és B+ között $SzD_{P<0,1\%} = 0,60$; BB és ++ között $SzD_{P<0,1\%} = 1,024$

A vizsgált hibaszázalék mellett ($P < 0,001$) a BB és B+, valamint a BB és ++ genotípus esetén volt szignifikáns a különbség a legkisebb négyzetes OR átlag értékekben. Eredményeim alapján a Fec^B allél egyszeri jelenléte 0,89-el növelte a levált

petesejtek számát a mutációt nem hordozókhoz képest. Amennyiben az egyed a Fec^B allélra homozigóta volt, akkor a legkisebb négyzetes OR átlag 2,27-el múlta felül a nemhordozók ovulációs teljesítményét (13. táblázat).

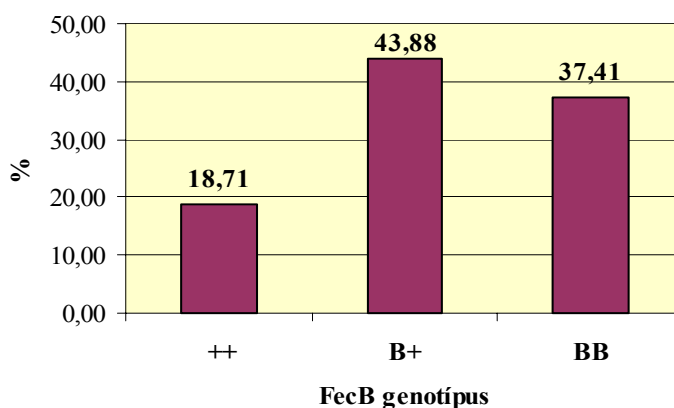
PIPER és mtsai. (1985) közlése szerint egy Fec^B allél 1,65-el növeli átlagosan az OR értéket. DAVIS és mtsai. (1982) szintén hasonló hatásról számol be. Heterozigóták esetén 1,3-1,6-al, homozigóták esetén 2,7-3,0-al nő az ovulációs ráta a nemhordozókhoz viszonyítva.

Az általam kapott értékek alul maradnak a nemzetközi irodalomban közöltekhez képest. Ennek oka az lehet, hogy a biztosított takarmányellátás mellett a génhordozók és a nemhordozók közötti genetikai különbség fenotípusosan nem tudott kellően érvényesülni.

Az ovulációs ráta variációs koefficiens értéke, a CV% 29,22, ismételhetőségi értéke pedig 0,35 volt. MAGYAR (1994) ugyanebben az állományban hasonló ismételhetőségi értéket kapott (0,4).

A direkt génteszt eredménye a nőivarban

A jelenlegi nőivarú állomány (n=138) direkt génteszt alapján meghatározott FecB genotípus szerinti megoszlása a 17. ábrán látható. Az állomány 37,41%-a BB homozigóta, 43,88%-a B+ heterozigóta és 18,71%-a homozigóta ++ genotípusú. A hordozók az állományban összesen 81,29%-ot tesznek ki.



17. ábra: A 2003 januárban tenyésztésben álló nőivarú szapora merinó állomány FecB genotípus szerinti %-os megoszlása.

A direkt génteszt eredménye a hímivarban

Összesen 49 tenyészkos booroola genotípusát határoztam meg. A kosok FecB genotípus szerinti megoszlása az 14. táblázatban látható. Mind a booroola, mind a szapora merinó kosok között voltak mutációt nem hordozó egyedek. Sajnos a heterozigóta kosok száma is elég magas mindkét fajta esetében. A texel kosok közül mindhárom nemhordozónak bizonyult, a várakozásnak megfelelően.

14. táblázat: A vizsgált tenyészkosok FecB genotípus szerinti megoszlása

Fajta	FecB genotípus			Összesen
	BB	B+	++	
booroola	5	8	2	15
szapora merinó	15	14	2	31
texel	0	0	3	3

A direkt génteszt megbízhatóságát mutatja, hogy a kontrollként tesztelt valamennyi magyar merinó (n=46) illetve 3 texel egyed eredménye ++ volt. Továbbá 20 szapora merinó - hetero-, illetve homozigóta hordozó - esetében elvégzett ismételt vizsgálatok eredményei is teljes mértékben megegyeztek.

Összesen 6 tenyészkos esetében arra is lehetőségem volt, hogy kétféle szövetmintából (vér és ondó) is elvégezzem a géntesztet, mely szintén mind a 6 kosnál ugyanazt az eredmény hozta. Így a már nem élő, csak szaporítóanyaggal rendelkező tenyészkosok esetében is teljes biztonsággal lehetett meghatározni a FecB genotípust. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy az ivadékvizsgálat alapján téves FecB genotípusúnak becsült kosok szaporítóanyagának jövőbeli felhasználását átértékeljük, és a direkt génteszt alapján homozigótának bizonyult egyedeket preferáljuk a tenyésztői munkában.

5.4. A direkt génteszt és a markervizsgálatok eredményeinek összehasonlítása

Miután 2001-ben azonosították a booroola mutációt, a későbbiekben újabb markervizsgálatok elvégzésére már nincs szükség. A marker vizsgálatok eredményei alapján történő feltételezéseimet azonban igazolhatják az egyedek marker és FecB genotípus összehasonlításának eredményei.

15. táblázat: A FecB genotípusokon belüli marker genotípusok eloszlása a szaporámerinó állományban (n=egyedszám, a zárójelben szereplő érték a marker genotípus gyakorisága a FecB genotípuson belül)

OarAE101 marker genotípus	FecB genotípus		
	BB n	B+ n	++ n
87/87	135 (0,65)	69 (0,33)	4 (0,02)
87/91	5 (0,04)	76 (0,7)	28 (0,26)
87/99	11 (0,27)	19 (0,48)	10 (0,25)
87/105	1 (0,17)	5 (0,83)	0 (0)
87/107	0 (0)	5 (1)	0 (0)
87/109	0 (0)	2 (1)	0 (0)
91/91	0 (0)	3 (0,21)	11 (0,79)
91/99	0 (0)	3 (0,60)	2 (0,40)
91/105	1 (1)	0 (0)	0 (0)
91/109	0 (0)	0 (0)	1 (1)
99/99	0 (0)	0 (0)	2 (0)
99/105	0 (0)	0 (0)	1 (1)
99/109	0 (0)	0 (0)	1 (1)

számított $\chi^2_{p<0,1\%} = 215,83$
 táblázatbeli $\chi^2_{p<0,1\%} = 51,02$
 DF= 24

BM1329 marker genotípus	FecB genotípus		
	BB n	B+ n	++ n
158/158	118 (0,59)	71 (0,36)	10 (0,05)
158/160	2 (0,03)	52 (0,65)	26 (0,32)
158/162	2 (0,05)	29 (0,74)	8 (0,21)
158/164	27 (0,71)	11 (0,29)	0 (0)
158/170	0 (0)	1 (1)	0 (0)
160/160	0 (0)	1 (0,14)	6 (0,86)
160/162	0 (0)	1 (0,11)	8 (0,89)
160/164	1 (0,07)	12 (0,86)	1 (0,07)
160/170	0 (0)	0 (0)	1 (1)
162/162	0 (0)	1 (1)	0 (0)
162/164	0 (0)	3 (1)	0 (0)
164/164	3 (1)	0 (0)	0 (0)

számított $\chi^2_{p<0,1\%} = 216,73$
 táblázatbeli $\chi^2_{p<0,1\%} = 48,3$
 DF=22

A χ^2 próba eredményeként mind az OarAE101, mind a BM1329 mikroszatellit marker genotípusoknak a FecB genotípus csoportokon belüli eloszlása szignifikánsnak bizonyult $P<0,1\%$ -os megbízhatósági szinten (15. táblázat). Az eredmény a két mikroszatellit lókuszt FecB lókusszal való kapcsoltságát igazolja.

A genotípus megoszlásokból az is látható, hogy arányaiban, döntő mértékben a 87-es, valamint a 158-as és 164-es allélok öröklődtek együtt a Fec^B alléllal. A három allél és a Fec^B allél közötti kapcsoltság megváltozását ugyanakkor mutatja az a tény, hogy mindhárom nevezett alléllra a homozigóta genotípusú egyedek között egyaránt

előfordultak B+ heterozigóta és ++ homozigóta egyedek is. A táblázatban az is látható, hogy a 87/109-es genotípusban szereplő egyedek heterozigóta B+ genotípusúak. Az ovulációs ráta és marker genotípus eredménye után tett feltételezésem helyesbítésre szorul, mivel az OR alapján homozigóta BB-nek becsült 87/109-es anyajuh B+ heterozigóta.

A magyar merinóban legnagyobb arányban megtalálható allélok (91-es 0,78; a 160-as allél 0,435 gyakorisággal) azok, amelyek elsősorban a vad típusú booroola alléllal öröklődtek kapcsoltan a szapora merinó állományban. Az előforduló rekombináció miatt azonban előfordulnak olyan egyedek is e fajtában, amelyek esetében a 91-es és 160-as allélok a Fec^B alléllal öröklődtek együtt.

5.5. A direkt génteszt és a fenotípus alapján történő genotípus meghatározás eredményeinek összehasonlítása

Annak meghatározására, hogy a nemhordozók nagy arányú jelenléte a szapora merinó állományban köszönhető-e a fenotípus alapján történő genotípus becslés hibájának, összevetettem a fenotípus alapján történő genotípus becslés eredményeit a direkt génteszt eredményeivel.

A nőivar esetében összesen 90 egyed becsült genotípus eredménye állt rendelkezésemre (melyeket a tenyészegyedenként kiállított Juhnyilvántartó lapokon vezetett adatok alapján gyűjtöttem) (16. táblázat).

A 90 egyed közül összesen 71 esetben egyezett meg a két eredmény. Összesen 15 esetben fordult elő, hogy a génteszt alapján heterozigótának bizonyult anyajuh FecB genotípusát homozigótának (BB) becsülték az OR eredménye alapján (13. táblázat). Egy-egy olyan eset volt, hogy a homozigóta hordozót heterozigótának, illetve a nemhordozót homozigóta BB genotípusúként jegyezték. Két anyajuhot, mely a direkt génteszt alapján nem volt hordozó, az OR eredménye alapján homozigóta hordozónak értékelték. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a direkt génteszt eredménye és az anyák OR teljesítménye alapján becsült genotípus 79%-ban egyezett meg, 20%-ban túlbecsülték a valós genotípust és mindössze 1%-ban fordult elő, hogy a hordozás mértékét alulbecsülték. Mindezek azt mutatják, hogy a FecB genotípus megállapítása az anyák ovulációs ráta eredménye alapján 79%-os biztonsággal működött az állományban, és kis mértékű túlértékelésre adott lehetőséget.

16. táblázat: Anyajuhok becsült és direkt génteszt alapján megállapított FecB genotípusa

Születési év	Fülszám	Becsült genotípus	Direkt génteszt eredménye	Születési év	Fülszám	Becsült genotípus	Direkt génteszt eredménye
1993	3246	BB	BB	1995	O13610	BB	BB
1996	153523	BB	BB	1990	O213	BB	BB
1992	287	BB	BB	1990	O263	BB	BB
1992	295	BB	BB	1990	O291	BB	BB
1993	322	BB	BB	1998	8159	B+	BB
1993	324	BB	BB	1992	225	BB	B+
1993	370	BB	BB	1992	236	BB	B+
1998	810	BB	BB	1991	1212	BB	B+
1998	896	BB	BB	1993	3186	BB	B+
1991	1100	BB	BB	1993	3233	BB	B+
1992	2166	BB	BB	1993	3287	BB	B+
1992	2185	BB	BB	1993	3342	BB	B+
1992	2223	BB	BB	1998	8157	BB	B+
1992	2293	BB	BB	1999	9172	BB	B+
1993	3121	BB	BB	1996	120967	BB	B+
1993	3179	BB	BB	1996	121252	BB	B+
1993	3227	BB	BB	1996	121856	BB	B+
1993	3305	BB	BB	1996	153143	BB	B+
1993	3313	BB	BB	1995	O12606	BB	B+
1993	3317	BB	BB	1995	O12846	BB	B+
1993	3322	BB	BB	1999	94	B+	B+
1993	3392	BB	BB	1993	3126	B+	B+
1993	3396	BB	BB	1993	3232	B+	B+
1998	8145	BB	BB	1993	3270	B+	B+
1998	8154	BB	BB	1993	3288	B+	B+
1998	8294	BB	BB	1993	3298	B+	B+
1998	8318	BB	BB	1998	8305	B+	B+
1999	9179	BB	BB	1999	9115	B+	B+
1996	120631	BB	BB	1999	9140	B+	B+
1996	121898	BB	BB	1999	9221	B+	B+
1996	153169	BB	BB	1997	154412	B+	B+
1996	153507	BB	BB	1997	220481	B+	B+
1991	121	BB	BB	1997	220551	B+	B+
1992	223	BB	BB	1995	O12271	B+	B+
1992	257	BB	BB	1995	O13300	B+	B+
1992	281	BB	BB	1998	853	B+	B+
1993	3268	BB	BB	1992	2270	B+	B+
1995	O13438	BB	BB	1993	3178	B+	B+
1997	154371	BB	BB	1993	3198	B+	B+
1997	154959	BB	BB	1993	3299	B+	B+
1997	155132	BB	BB	1996	121111	B+	B+
1997	220407	BB	BB	1995	O12677	B+	B+
1997	220449	BB	BB	1997	220337	BB	++
1995	O12903	BB	BB	1993	339	B+	++
1995	O13256	BB	BB	1993	3289	B+	++

Összesen 25 tenyészkos hagyományos, fenotípus alapján becsült genotípusa állt rendelkezésemre, így ezeknél az egyedeknél volt lehetőségem összevetni a becsült eredményt a direkt DNS teszt eredményeivel.

Az 1986-ban importált kosok esetében a FecB genotípust egyrészt az anyajuhok OR teljesítménye és az apák becsült genotípusa, másrészt az anyajuhok OR teljesítménye és a kos, nem hordozó anyajuhok termékenyítéséből származó leányutódaik hormonkezelés nélküli OR eredménye alapján határozták meg Új-Zélandon.

17. táblázat: Az 1986-ban importált kosok becsült genotípusa

Sorszám	Kos fülszáma	Fajta	Becsült genotípus*	Direkt génteszt eredménye	Felhasznált minta
1.	332 ¹	booroola	BB	B+	ondó
2.	3244 ²	booroola	BB	B+	ondó
3.	4130 ²	booroola	BB	BB	ondó
4.	4187 ²	booroola	BB	-	-
5.	4204 ²	booroola	BB	B+	ondó
6.	59 ¹	booroola	BB	-	-
7.	5140 ¹	booroola	BB	-	-

¹az anyajuhok korai OR eredménye és az apák (Új-Zélandon) becsült genotípusa alapján

²az anyajuhok és leányutódok OR eredménye alapján

*Forrás: VERESS és mtsai., 1991

Mint ahogy az 17. táblázatban látható a hazai tenyésztők - az új-zélandi tenyésztők tájékoztatása alapján - valamennyi kosról azt feltételezték, hogy a Fec^B allélt homozigóta formában hordozzák. Sajnos a 7 kos közül csak 4-től maradt vissza mélyhűtött szaporítóanyag, így csak azoknak az egyedeknek állt módomban meghatározni a FecB genotípusát. A génteszt eredménye szerint a 4 kos közül csak egy bizonyult homozigótának, a többi egyszeresen hordozta a Fec^B allélt.

Az 18. táblázatban az 1988-1993 között ivadékvizsgált kosok becsült és direkt génteszt alapján meghatározott FecB genotípusa látható. A kosok ivadékvizsgálatánál a csengerben tenyésztett, booroola mutációt nem hordozó magyar merinó anyajuhok booroola kosokkal történt párosításából született leányutódok ovulációs ráta értékét vették figyelembe. A leányutódokat OR értékét 6 hónapos korban, PMSG-vel való kezelést követően határozták meg. Az így kapott eredmény alapján becsülték a tenyészkosok genotípusát. Mint a táblázatból kitűnik számos eltérés van a két módszer alapján kapott eredmények között. A 11 kos közül 5 esetében ugyanazt a genotípust

becsülték a tenyésztők, mint amit a direkt génteszt alapján kaptam. Egy kos esetében a hordozást alul - homozigóta helyett heterozigótának értékelték az állatot -, a többi 5 esetében azonban túlbecsülték, homozigótának értékelték, de a Fec^B allélt csak egyszeresen hordozták. Ez azt jelenti, hogy mindössze 45%-ban sikerült a valós genotípust becsülni, 10%-ban alul, 45%-ban viszont túlértékelték a hordozás mértékét. Ez a módszer megbízhatóságát jellemzi.

18. táblázat: Kosok ivadékvizsgálata leányaik korai (PMSG-vel való kezelést követő) OR vizsgálata alapján (1988-1993)

Sorszám	A kos fülszáma	Fajta	Becsült genotípus*	Direkt génteszt eredménye	Felhasznált minta
1.	61	booroola	BB	B+	ondó
2.	63	booroola	BB	B+	ondó
3.	64	booroola	BB	B+	ondó
4.	0159	szapora merinó	B+	B+	ondó
5.	0173	szapora merinó	BB	BB	ondó
6.	178	szapora merinó	BB	BB	ondó
7.	0269	szapora merinó	B+	-	-
8.	0293	szapora merinó	B+	-	-
9.	730	szapora merinó	B+	-	-
10.	844	szapora merinó	B+	-	-
11.	910	szapora merinó	B+	BB	ondó
12.	914	szapora merinó	BB	B+	ondó
13.	952	booroola	B+	-	-
14.	3118	booroola	B+	-	-
15.	8105	szapora merinó	B+	-	-
16.	9195	szapora merinó	BB	B+	ondó
17.	41457	szapora merinó	B+	B+	ondó
18.	51537	szapora merinó	B+	B+	ondó

* Forrása: MAGYAR és mtsai., 1997

A következő táblázatban (19. táblázat) 7 booroola merinó, 24 szapora merinó, továbbá az a 3 texel kos, illetve eredménye található, melyeket a direkt génteszt esetében kontroll, a mutációt nem hordozó mintaként szerepeltettem. A 31 booroola és szapora merinó tenyészkos közül 16 bizonyult homozigóta hordozónak, 11 heterozigóta formában hordozta a Fec^B allélt. Négy tenyészkos viszont nem hordozó, genotípusa ++.

A 31 vizsgált kos közül mindössze 10 feltételezett genotípusa állt a rendelkezésemre, amelyet a tenyésztők a kosok leányutódainak ovulációs rátája, illetve a szülők genotípusa alapján határoztak meg. A tenyésztők a 10 tenyészkos közül 8

esetében jól becsülték a genotípust. A másik két esetben viszont egy nem hordozót heterozigótának, egy heterozigóta hordozót homozigótának feltételeztek.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a leányutódok OR eredménye és a szülői genotípus alapján a FecB genotípus 80%-os megbízhatósággal becsülhető. A tenyésztők 20%-ban túlértékelték azt.

19. táblázat: Tenyészkosok becsült és direkt génteszt alapján meghatározott FecB genotípusa

Sorszám	Kos fülszáma	Fajta	Becsült genotípus	Direkt génteszt eredménye	Felhasznált minta
1.	71	booroola	BB	BB	ondó
2.	73	booroola	BB	BB	ondó
3.	74	szapora merinó	BB	BB	ondó
4.	76	booroola	BB	BB	ondó
5.	226	szapora merinó	-	B+	ondó/vér
6.	278	szapora merinó	-	BB	ondó
7.	319	szapora merinó	BB	B+	ondó/vér
8.	2189	szapora merinó	BB	BB	ondó/vér
9.	3166	szapora merinó	BB	BB	ondó/vér
10.	3190	szapora merinó	-	B+	ondó/vér
11.	3231	szapora merinó	B+	++	ondó
12.	3260	szapora merinó	-	BB	ondó/vér
13.	7234	booroola	-	++	ondó
14.	8120	booroola	-	++	ondó
15.	8502*	booroola	B+	B+	ondó
16.	8257	szapora merinó	-	BB	vér
17.	8290	szapora merinó	-	++	vér
18.	9162	szapora merinó	-	B+	vér
19.	0155	szapora merinó	-	BB	ondó
20.	0157	szapora merinó	-	BB	ondó
21.	046*	booroola	B+	B+	ondó
22.	011551	szapora merinó	-	BB	vér
23.	3394	szapora merinó	-	B+	vér
24.	3619	szapora merinó	-	B+	vér
25.	220212	szapora merinó	-	BB	vér
26.	220452	szapora merinó	-	BB	vér
27.	220506	szapora merinó	-	BB	vér
28.	220548	szapora merinó	-	B+	vér
29.	220647	szapora merinó	-	BB	vér
30.	220650	szapora merinó	-	B+	vér
31.	097	szapora merinó	-	B+	vér
32.	357	texel	-	++	vér
33.	55640	texel	-	++	vér
34.	121054	texel	-	++	vér

*csengeri tenyészetben nem hordozó anya párosításából született leányutódok OR-ja alapján (MAGYAR és mtsai., 1999)

A többi kos esetén a genotípus becslés: utódok OR rátája, szaporulati eredménye alapján, valamint szülői genotípus alapján történt (Forrás: Tenyésztési napló)

5.6. Az egyes FecB genotípus meghatározási módszerek idő- és költség igényének összehasonlítása

A direkt génteszt további nagy előnye, megbízhatósága mellett az, hogy – mint ahogy e fejezet elején már említettem – igen korai, az egyed születését követő azonnali genotípus meghatározást tesz lehetővé. A vizsgálat egy nap alatt elvégezhető. A hagyományosnak mondható, fenotípus alapján történő genotípus meghatározás a nőivar esetében legkorábban két éves korban lehetséges, hiszen az állatnak ivarérettnek kell lennie, legalább 3 alkalommal történő, szinkronizálás nélküli OR mérésre van szükség. A becslés pontosságát javítja, ha több év eredményét is figyelembe vesszük. A hímivar esetében ivadékvizsgálat szükséges, melynek időigénye minimum 24 hónap, ha a leányutódok korai, PMSG-vel történő kezelést követő OR mérési eredménye alapján történik. Külön beavatkozás nélkül akár 30-32 hónapra is szükség lehet. A marker vizsgálatokat tekintve, a marker genotípus meghatározás már szintén elvégezhető közvetlenül az egyed megszületése után, hisz itt is DNS szintű vizsgálatról van szó. Azonban a marker allél – Fec^B allél közötti kapcsoltság megállapításához szükség van a korábbi, előzetesen elvégzett fenotípus vizsgálati eredményekre is. Amennyiben az hatásvizsgálat alapján egyértelmű kapcsoltság mutatható ki, a későbbi fenotípus vizsgálatok elhagyhatóak. Így a génhordozás megállapításának időigénye az említett előzetes értékeléseket követően, a direkt génteszthez hasonlóan, egy nap alatt elvégezhető.

Az egyes módszerek költségigényét tekintve a fenotípus alapján történő genotípus meghatározás a legköltségesebb, ami ***elsősorban az állatok tartási, takarmányozási költségéből adódik***. A nőivar esetében magának az egyednek a tartási költségeivel kell számolni, míg a hímivar esetében a kos tartásán túl az általuk fedezettett anyajuhok (kb. 30 anyajuh) és az OR méréshez „használt” leányutódok tartási költségeit is figyelembe kell venni. *Magának az ovulációs rátának a mérési költsége tulajdonképpen elhanyagolható*, mely csupán a vizsgálatot végző személy munkadíja, s ez mindegyik módszer esetében fennáll.

A marker teszt esetén, csak a DNS vizsgálat költségeivel kell számolnunk, mivel az előzetes, marker – Fec^B allélok közötti kapcsoltsági vizsgálatokhoz szükséges OR mérések már eleve adottak. Egy mikroszatellit vizsgálat költsége jelenleg kb. 2500-3000 Ft (9,5-11 EURO). A direkt génteszt esetében is hasonló költséggel lehet

számolni. Természetesen *a módszer megbízhatósága a dirket génteszt esetében a legnagyobb*. Az általam tanulmányozott 3 FecB genotípus meghatározási módszer idő és költségigényének összefoglaló adatait a 20. táblázat tartalmazza.

20. táblázat: A FecB genotípus meghatározásra felhasznált módszerek költség és időigénye

Vizsgálati módszer	Időigénye		Költségigénye	
	<i>hímivarban</i>	<i>nőivarban</i>	<i>hímivarban</i>	<i>nőivarban</i>
Fenotípus alapján történő FecB genotípus becslés	24-32 hó	24 hó	300.000-450.000Ft	10.000-15.000Ft
Marker genotípus alapján történő FecB genotípus meghatározás	1 nap	1 nap	2.500-3.000Ft	2.500-3.000Ft
Direkt génteszt alapján történő FecB genotípus meghatározás	1 nap	1 nap	2.500-3.000Ft	2.500-3.000Ft

6. Következtetések

A szapora merinó állományon végzett molekuláris genetikai vizsgálataim eredményei alapján az alábbi következtetések vonhatók le.

Ovulációs ráta vizsgálatok

Azon 64 szapora merinó anyajuh OR eredményét értékeltem, melyeknél minden adat a rendelkezésemre állt a további marker és direkt génteszt vizsgálatokhoz. Az ovulációs ráta értékek nagysága, illetve azok megoszlása az állomány FecB mutáció hordozását igazolják, hiszen a mért értékek több, mint 40%-a a hordozásra utaló 4-es vagy annál nagyobb ovulációs ráta érték közé esett.

Marker vizsgálatok

A magyar merinó és a szapora merinó állományokban végzett mikroszatellit vizsgálatok eredményeként 6 OarAE101 és 6 BM1329 mikroszatellit allélt azonosítottam. Az egyes allélok előfordulása a két állományban jelentősen eltért, és a különbség $P < 0,1\%$ hibaszázalék mellett szignifikánsnak bizonyult.

- A szignifikáns különbség alapján megállapítható, hogy a két állomány ezen lokuszok vonatkozásában különbözik.

A szapora merinó állományban a 87-es OarAE101 és a 158-as BM1329 marker allél dominált, melyek a magyar merinó állományban csak kis %-ban fordultak elő. Mivel a tenyésztők a booroola mutációt igyekeztek feldúsítani a szapora merinó állományban, a homozigotizáció kialakítására törekedve, feltételezhető, hogy a legtöbb családban e két allél kapcsolatosan öröklődik a Fec^B alléllal. Erősíti ezt a tényt az is, hogy az állományban használt és preferált tenyészkosok jelentős része az említett két marker allélt homo-, vagy heterozigóta formában hordozta. Azonosítottam 3 OarAE101 (105, 107, 109) és 1 olyan BM1329 (164) mikroszatellit allélt a szapora merinó állományban, mely a magyar merinónál nem fordult elő. Közülük a 164-es allélt booroola merinó kosnál is kimutattam.

- Ebből következtethető, hogy ezek az allélok a booroola oldalról kerülhettek az állományba.

A marker genotípus – ovulációs ráta közötti varianciaanalízis eredménye alapján az OarAE101 mikroszatellit lókuszt nem volt szignifikáns hatással az ovulációs rátára. Az állományban legnagyobb gyakorisággal előforduló 87-es és 91-es allélok egyaránt előfordultak olyan genotípus csoportokban, melyek OR átlaguk alapján nem hordozónak, illetve mutáció hordozónak minősültek.

- Így esetükben a kapcsoltság családonként változik.

A BM1329 mikroszatellit marker szignifikánsan befolyásolta az ovulációs ráta alakulását. E lókuszra nézve négyféle genotípus fordult elő a varianciaanalízis vizsgálatba vont 64 egyedet tekintve.

- Az eredmény arra utal, hogy a 158 és 164-es allélok öröklődnek kapcsoltan a Fec^B alléllal.
- A 158-as allél alacsony OR átlaggal rendelkező genotípus csoportokban is előfordult. Ez azt jelenti, hogy a 158-as allél Fec^B alléllal való kapcsoltsága néhány családban megváltozott és az alacsony OR átlaggal rendelkezők esetében nem öröklődik együtt a Fec^B alléllal.

A kapcsoltsági viszonyok megváltozását igazolják a rekombinációs esetek vizsgálatának eredményei. Az állományban előforduló, összesen 80 informatív meióziszból 13 volt rekombináns, ami 16,25%-os előfordulást jelent. Az informatív meióziszok kis számának oka az állomány nagyfokú homozigotizációja. Az állomány 34%-a kétszeresen homozigóta volt a 87 és 158-as allélokra, valamint 18%-a az egyikre homo-, másikkra heterozigóta genotípusú volt. Ezt támasztják alá az egyes markerekre kapott PIC értékek is, mely a marker-informatív családok előfordulásának gyakoriságát mutatják ($PIC_{BM1329}=0,436$, $PIC_{OarAE101}=0,385$).

A marker allélok és a Fec^B allél közötti egyértelmű kapcsoltsági viszonyt a későbbiekben elvégzett marker genotípus és Fec^B genotípus összehasonlításából származó eredmények mutatják. A marker genotípusok Fec^B genotípus csoportokon belüli eloszlása szignifikáns volt $P<0,1\%$ hibaszázalék mellett, vagyis az eloszlás nem a véletlennek köszönhető.

- Az eredmény a két mikroszatellit lókuszt FecB lókusszal való kapcsoltságát igazolja. A marker genotípusok eloszlása a booroola genotípustól függően változik.

A genotípus eloszlások a csak marker és ovulációs ráta eredmények alapján tett feltételezéseimet támasztják alá, miszerint:

- A szapora merinó állományban legnagyobb arányban a 87-es, valamint a 158-as és 164-es allélok öröklődnek kapcsolatosan a booroola alléllal. A **BB genotípusú** egyedek 88,2%-a az OarAE101 markerre homozigóta 87/87, a BM1329-es markerre pedig 77,6%-a homozigóta 158/158, 17,7%-a pedig 158/164-es genotípusú.
- A vad típusú Fec⁺ allél elsősorban a 91-es, valamint a 160 és 162-es marker allélokhöz kapcsolódik. A ++ egyedek 17,3%-a 91/91-es genotípusú, 51,6%-a pedig heterozigóta a 91-es allélra. A BM1329-es marker lókuszra a ++ genotípusú egyedek 10%-a 160/160, 80%-a pedig heterozigóta formában hordozza a 160, illetve 162-es allélokat.
- A mikroszatellit markerekre vonatkozóan összességében megállapítható, hogy a vizsgált szapora merinó állományban populáció szinten egyértelmű kapcsoltsági viszony nem mutatható ki a marker allél és Fec^B allél között. Ez csak családi szinten határozható meg. A marker teszt önmagában az állományon belül nem alkalmas a génhordozás tényének, a FecB genotípusnak a megállapítására.
- A szaporaság növelésére irányuló keresztezési programokat tekintve, a marker teszt eredmények a mutáció beviteli programokban felhasználhatók, hiszen a BB homozigótának bizonyult kosok esetében bizonyos, hogy az általuk hordozott marker allélok kapcsolatosak a booroola mutációval. Így az utódokban a tenyészkos által hordozott marker allél jelenléte a Fec^B allél jelenlétére utal. Természetesen egy-egy beviteli program esetén először a „recipiens”, nem hordozó állomány marker genotípusának meghatározása szükséges, mivel csak olyan állományban használható egy adott homozigóta BB kos, amelyben a tenyészkos által hordozott marker allél nem mutatható ki. Mivel a szapora merinó és a magyar merinó fajta a marker allélok eloszlásában, a Chi² próba eredményeként, szignifikánsan különböznek bizonyult, az eltérő genotípusú egyedek párosítása

megalapozott. A Fec^B allél bevitelét követően a booroola gén a marker genotípus alapján nyomon követhető. Természetesen a genetikai kapcsoltság itt is megszűnhet a marker lókuszt és a $FecB$ lókuszt közötti távolság mértékének megfelelően. WEIMANN és mtsai. (2001) a $FecB$ lókuszt közrezáró két mikroszatellit marker közötti távolságot 13 cM-ben állapította meg, ami a rekombinációnak 13%-os előfordulási lehetőségét jelenti. Tehát amennyiben a marker tesztet alkalmazzuk a booroola gén nyomonkövetésére 13%-os hibalehetőséggel kell számolnunk.

Direkt génteszt vizsgálatok

A $FecB$ genotípus és ovulációs ráta közötti varianciaanalízis a várakozásnak megfelelő eredményt adott. A $FecB$ genotípus $P < 0,001$ szinten szignifikánsan befolyásolta az ovulációs rátát.

- Mivel a direkt génteszt maga a nagy ovulációs számot kiváltó mutáció mutatható ki, a magas szinten megbízható szignifikáns hatás igazolja, hogy az ovulációs ráta alakulását a szapora merinó állományban valóban a BMPR-1B receptorban bekövetkezett mutáció okozza.
- A $FecB$ genotípus nőivarban és hímivarban kapott százalékos megoszlása mutatja, hogy a tenyésztők célkitűzése még nem valósult meg, hiszen az állomány jelenleg még nem érte el a 100%-os homozigotizációt a Fec^B allélra. A jelenlegi szapora merinó állomány 40,4%-a homozigóta BB.

Összevettem a fenotípus alapján becsült és a direkt génteszt alapján meghatározott $FecB$ genotípus eredményeket a szapora merinó állományban.

- A nőivar esetén az egyezés 79%-os volt. A tenyésztők 20%-ban túlbecsülték a genotípust, ami részben magyarázatul szolgál arra, hogy miért olyan magas még mindig a nem génhordozók, illetve a heterozigóták aránya a nőivarú állományban.

A leányutódok korai OR eredménye alapján a tenyésztők a kosok $FecB$ genotípusát a direkt génteszt eredményeihez viszonyítva nagy eltéréssel becsülték.

Mindössze 45%-ban értékelték azonosnak a direkt génteszt eredményeivel összevetve, és 45%-ban túlértékelték azt.

- A nőivarban megállapítottakhoz hasonlóan ez esetben is az a következtetés vonható le, hogy a hagyományos módszer „hibája” miatt a tévesen mutációt hordozónak becsült kosok használatát preferálva nem sikerült a vártnak megfelelő mértékben növelni a BB homozigóták arányát az állományban. Itt elsősorban a 319-es és a 914-es kosokat emelném ki. Mindkettőt BB homozigótának becsültek, de a direkt génteszt eredménye alapján B+ genotípusúnak bizonyult. A 319-es kos 6 évi tenyésztésben való használata alatt (1996-2001 között) összesen 101 utód született, a 914-es kosnak ugyanezen időszak alatt 36 (SZÁRAZ, 2002). A 8290-es kóstól, mely nemhordozónak (++) bizonyult, 2000-ben és 2001-ben 61 anyával történő párosításából összesen 107 utódja született, melyek közül 29-et tenyésztésbe állítottak. Természetesen ++ és B+ egyedek jelentősebb arányú jelenlétének oka lehet még a hibás származás, vagy esetleg a kis egyedszám miatt, egyéb tulajdonságai alapján (sűrítve elletethetőség, szarvatlanság, nagyobb súlygyarapodás) értékesebbnek bizonyult nemhordozó egyedek állományban tartása.

A tenyészkosok egy részének genotípusát a leányutódok szinkronizálás nélkül, természetes ivarzási ciklusban mért ovulációs eredményeik alapján becsülték a tenyésztők. Ezen egyedekénél a vélt és valós FecB genotípus eredmények a nőivar esetén kapott mértékben voltak egyezők (80%).

- Ez a módszer tehát jóval megbízhatóbbnak bizonyult, mint a PMSG kezelést követő OR meghatározás alapján történő genotípus meghatározás, pontossága azonban még mindig jelentősen alulmarad a direkt génteszthez képest.

A fenotípus alapján történő genotípusbecsléstől eltérően a direkt génteszt vizsgálatok teljesen megbízható eredményt adtak. Ezt igazolja egyrészt az, hogy a megvizsgált, a FecB mutációt nem hordozó 46 magyar merinó egyed és 3 texel kos ++ genotípusúnak bizonyult a DNS teszt alapján, továbbá az, hogy 20 mutációt hordozó (heterozigóta és homozigóta) szapora merinó egyed ismételt vizsgálata során szintén azonos eredményt kaptam.

- Így az általam alkalmazott, külföldi szakirodalomból átvett direkt génteszt módszer segítségével teljes bizonyossággal állapítható meg az egyed FecB genotípusa.

A FecB genotípus meghatározásához alkalmazott DNS teszt vizsgálatokhoz különböző szövetminták álltak rendelkezésemre. Az esetek jelentős részében vérmintából vontam ki a vizsgálatok alapját képező DNS-t. A szapora merinó kialakítására használt import booroola tenyészkosok, és számos hazai tenyésztésű szapora merinó kos azonban már elpusztult, esetükben a mélyhűtött szaporítóanyag állt csak rendelkezésemre. Hat tenyészkos esetében lehetőségem volt mind vér, mind ondó mintából elvégezni a DNS tesztet, melyek egyforma eredménnyel szolgáltak.

- Tehát mindkét szövetmintát alkalmazva megbízható eredménnyel számolhatunk a DNS teszt alkalmazását illetően.

7. Új tudományos eredmények

1. Megállapítottam, hogy a nemzetközi irodalomban javasolt mikroszatellit markerek (OarAE101 és a BM1329) a szapora merinó állományban, állomány szinten, nem alkalmazhatóak a FecB mutációt hordozó egyedek azonosítására. Annak magyar merinóba történő bevitele esetén, amennyiben a kos és a termékenyítendő anyajuh marker genotípusa eltér, alkalmasak lehetnek a Fec^B allél nyomonkövetésére.
2. A BMPR-1B mutáció kimutatására alkalmas direkt génteszt módszert adaptáltam, és elsőként alkalmaztam Magyarországon a FecB genotípus meghatározására. A módszer alkalmazásával bizonyítottam, hogy a szapora merinóban valóban ez a mutáció okozza a nagy szaporaságot.
3. Megállapítottam, hogy a nőivar esetében az ovulációs ráta alapján 79%-os biztonsággal határozható meg a FecB genotípus és 96,7%-os megbízhatósággal becsülhető a mutáns booroola gén hordozása.
4. Megállapítottam, hogy a hímvivarban a leányutódok PMSG kezelés nélküli, illetve PMSG kezelést követő ovulációs ráta értékek alapján történő FecB

genotípus meghatározás megbízhatósága eltérő. Kezelés nélkül 80%, kezelés esetén mindössze 45%.

5. Megállapítottam, hogy a vérből történő direkt génteszt lehetővé teszi az egyedek booroola mutáció hordozásának gyors, születés utáni meghatározását. Ismételt vizsgálatokkal igazoltam a direkt génteszt megbízhatóságát, illetve adaptáltam a módszert ondóból történő genotípus meghatározásra.

8. Gyakorlatnak átadható eredmények

1. A vizsgált mikroszatellit markerek FecB mutációt hordozó egyedek szelekciójára való alkalmazását a szapora merinó állományban nem javaslom, mivel azok a Fec^B allél – marker allél kapcsoltsági viszonya az állomány egészére vonatkozóan nem egyértelmű. Keresztezési programokban alkalmas lehet, de a direkt génteszt kidolgozásával ezek jelentősége háttérbe szorul.
2. A direkt génteszt alkalmazásával meghatároztam az 1998-2003 között tenyésztésben tartott nőivarú egyedek (így a jelenlegi állományt is beleértve), illetve a tenyésztésben használt (már elpusztult illetve jelenleg meglévő) tenyészkosok FecB genotípusát. Az eredmények ismeretében javasolni tudom mely tenyészkosok használata, illetve milyen párosítási terv lenne előnyös a jövőt illetően. *A 2003-as tavaszi születésű bárányok FecB genotípus szerinti szelekciója már az általam szolgáltatott eredmények alapján történt.* Azonos megbízhatóságúnak bizonyult vizsgálataim során a vér és az ondó mintából elvégzett direkt génteszt eredménye. Ennek jelentősége abban áll, hogy a már nem élő tenyészkosok - melyektől csak ondó minta állt a rendelkezésemre – genotípusát is sikerrel meg tudtam határozni. Így a jövőben, mesterséges termékenyítéssel a biztosan homozigóta BB genotípusú egyedek használatát tudom javasolni.

9. Összefoglalás

A juhtenyésztés gazdaságosságát az egy anyajuhra jutó éves hasznosult bárányszaporulat alapvetően meghatározza. Magyarországon a juhállomány döntő részét kitevő magyar merinó szaporulati teljesítménye elmarad a kívánatostól. A szaporaság növelésére irányuló törekvések tekintetében nagy kiugrási lehetőséget jelentett e tulajdonságot befolyásoló nagyhatású gének felfedezése, amelyeket ha keresztezéssel sikerül bevenni egy kis termelőképességű populációba, úgy azzal az állomány genetikailag meghatározott potenciális szaporaságát növelni tudjuk. A juhok esetében a booroola gén volt a világon elsőként felismert szaporaságot befolyásoló nagyhatású gén. Felismerve jelentőségét néhány év alatt a világ valamennyi kontinensére eljutott és számos országában keresztezési programokat indítottak szaporavonalak, szintetikus fajták kialakítása érdekében.

Magyarországra 1980-ban érkeztek az első booroola egyedek, s egy kidolgozott keresztezési program eredményeként 1992-ben létrehozták a szapora merinó fajtát. A tenyészállatok kiválogatásánál alap követelmény, hogy a booroola gén mutációjának homo-, vagy heterozigóta hordozói legyenek. A hordozás tényének megállapítása mindeddig a nőivarú egyedeknél azok saját teljesítménye, a kosoknál viszont csak leányivadékaik ovulációs ráta eredménye alapján történt. A módszer költséges és nagyon hosszú időt vesz igénybe. Emiatt igazán a gyakorlatban nem is terjedhetett el, csak a törzsállomány egyedeinek szelekciójánál alkalmazták.

Vizsgálatom célja volt a legújabb molekuláris genetikai eszközök alkalmazásával a mutációt hordozók azonosítását hatékonyabbá tenni.

Munkám elkezdésekor csak a booroola lókusszal kapcsoltan öröklődő markerek álltak rendelkezésre, így vizsgálataim első fele a FecB lókuszhoz közel eső, azt közrefogó OarAE101 és BM1329 mikroszatellitekre irányult. Vizsgáltam van-e hatása a marker genotípusnak a booroola gén által közvetlenül befolyásolt ovulációs ráta alakulására. A vizsgálatot 1998-2001 között a debreceni szapora merinó állomány egyedein végeztem. Az allélgyakoriságok felméréséhez, illetve az egyes marker allélok eredetének meghatározásához nem génhordozó magyar merinó egyedek genotipizálását

is elvégeztem az említett mikroszatellit lókuszokra. A vizsgálatokhoz szükséges genomialis DNS-t vér és ondó mintákból nyertem.

A munkám második felét a direkt génteszt vizsgálatok képezték. A magas ovulációs ráta kialakulásáért felelős, BMPR-1B receptorban bekövetkezett mutáció felfedezése jelentette a közvetlen DNS teszt elvégzésének lehetőségét. A nemzetközi irodalomból adaptált módszerrel az 1998-2003 között a debreceni szapora merinó állományban tenyésztett nőivarú egyedek, továbbá a fajta kialakításánál felhasznált, Ausztráliából importált booroola merinó, valamint a hazai tenyésztésű szapora merinó kosok FecB genotípusát határoztam meg. Vizsgáltam a direkt génteszt alapján meghatározott FecB genotípus hatását az ovulációs rátára. Összehasonlítottam a fenotípus alapján és a direkt génteszt alapján kapott genotípus eredményeket, és a módszerek megbízhatóságát.

Mind a marker genotípus, mind a FecB genotípus ovulációs rátára gyakorolt hatásának vizsgálatához olyan ovulációs eredményeket vettem figyelembe, melyek mérésére ősszel került sor, ivarzásszinkronizáló szerek alkalmazása nélkül.

Az ovulációs ráta értékek nagysága, illetve azok megoszlása az állomány FecB mutáció hordozásának tényét erősítették, hiszen a mért értékek több, mint 40%-a esett a hordozásra utaló 4-es vagy annál nagyobb ovulációs ráta értékek közé.

A marker vizsgálatok során kapott allélgyakorisági értékek jelentősen eltértek a szapora merinó és a magyar merinó állomány esetében, mely alapján szignifikánsan különbözőnek bizonyultak. Az OarAE101 lókuszon azonosított, összesen 6 allél közül 3 allél (87, 91, 99) mindkét állományban jelen volt, 3 (105, 107, 109) viszont csak a szapora merinó esetében volt jelen. Ez arra utal, hogy az utóbbiak valószínűleg a booroola oldalról kerülhettek a szapora merinó fajtába. A BM1329 mikroszatellit esetén szintén 6 allélt azonosítottam, melyek közül 3 (158, 160, 162) előfordult mindkét fajtában, a 164-es csak a szapora merinóban, a 172-es pedig csak a magyar merinóban volt kimutatható. A 164-es allélt booroola kos esetében is sikerült azonosítanom, így feltételezhető, hogy ez az allél szintén booroola eredetű. Az allélok gyakoriságát tekintve a 87-es OarAE101 és a 158-as BM1329 mikroszatellit allél dominált a szapora merinó fajtában. E két allél nagyarányú jelenléte annak köszönhető, hogy a legtöbb családban kapcsoltan öröklődtek a Fec^B alléllal, hiszen a tenyésztők a booroola gén

elterjesztésére, homozigóta állomány kialakítására törekedtek. Majd ezt a kapcsoltságot a később elvégzett marker és direkt génteszt eredmények összevetése is alátámasztotta.

A marker genotípus és ovulációs ráta varianciaanalízis eredményeként megállapítható, hogy az OarAE101 genotípus nem volt szignifikáns hatással az ovulációs rátára, míg a BM1329 genotípus szignifikánsan befolyásolta a levált petesejtek számát. A BM1329-es mikroszatellit marker genotípusok közül a 158/158, 158/164 genotípus csoportok OR értéke szignifikánsan nagyobbak bizonyult a 158/160 és 158/162 genotípus csoportok OR átlagához viszonyítva, és a vizsgálatba vont állomány átlagát is jelentősen meghaladta. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a 158-as és a 164-es allélok kapcsoltnak öröklődnek a Fec^B alléllal az állományban. A 158-as allél esetében a kapcsoltság valamely szülőnél megváltozott, mivel olyan genotípusokban is előfordul (olyan allélkombinációban), ahol a csoport legkisebb négyzetes OR átlaga alapján egyértelműen gént nem hordozónak bizonyult. Az állományba kerülése is kétoldalú lehetett, mivel a szapora merinó kialakításánál felhasznált magyar merinó állományban is előfordul. A 164-es allél a merinó állományban nem volt jelen, így az csak booroola keresztezéssel kerülhetett az állományba.

A marker allélok és a Fec^B allél közötti egyértelmű kapcsoltsági viszonyt a későbbiekben elvégzett marker genotípus és $FecB$ genotípus összehasonlításából származó eredmények mutatják. A marker genotípusok $FecB$ genotípus csoportokon belüli eloszlása szignifikáns volt, ami a két mikroszatellit lókuszt $FecB$ lókusszal való kapcsoltságát igazolja. A marker genotípusok eloszlása a booroola genotípustól függően változik.

A genotípus eloszlások a csak marker és ovulációs ráta eredmények alapján tett feltételezéseimet támasztották alá. A szapora merinó állományban legnagyobb arányban a 87-es, valamint a 158-as és 164-es allélok öröklődnek kapcsoltnak a booroola alléllal. Ugyanakkor az előforduló rekombinációk miatt ez a kapcsoltsági viszony egyes családoknál megváltozott. A vad típusú Fec^+ allél elsősorban a 91-es, valamint a 160 és 162-es marker allélokhöz kapcsol.

A marker vizsgálatok eredménye alapján megállapítható, hogy a szapora merinó állományban populáció szinten egyértelmű kapcsoltsági viszony nem mutatható ki a marker allél – Fec^B allél között. Ez csak egyedi szinten határozható meg. A marker teszt önmagában az állományon belül nem alkalmas a génhordozás tényének, a $FecB$

genotípusnak a megállapítására. Felhasználható lenne ugyanakkor mutáció beviteli programok során. Itt azonban az ismert homozigóta genotípusú kosok közül azok használhatók, melyek marker genotípusa eltér a „recipiens” állomány egyedeinek marker genotípusától. Az előző mondatban azért a „lenne” szót használtam, mert 2001-ben olyan direkt génteszt elvégzésére vált lehetőség, mely a nagy ovulációs rátát okozó BMPR-1B receptorban bekövetkezett mutáció kimutatására alkalmas. Ezzel tulajdonképpen a marker vizsgálatok elveszítették fontosságukat.

A booroola gén felfedezése óriási jelentőségű, hiszen azt jelenti, hogy ezentúl sem fenotípus mérésre, sem marker kapcsoltsági vizsgálatokra nincs szükség. A direkt DNS teszttel a génhordozás ténye az állat születését követően azonnal, ivartól függetlenül meghatározható.

A direkt génteszt vizsgálatoknál a FecB genotípus és ovulációs ráta varianciaanalízis eredménye igazolta a booroola mutáció állományban való jelenlétét. A FecB genotípus magas megbízhatósági szinten szignifikáns hatással volt az ovulációs rátára. A FecB genotípus nőivarban és hímivarban kapott százalékos megoszlása mutatja, hogy a tenyésztők célkitűzése még nem valósult meg, hiszen az állomány jelenleg még nem érte el a 100%-os homozigotizást a Fec^B allélra. A jelenlegi állomány 40,4%-a homozigóta BB.

Összehasonlítottam a fenotípus alapján becsült, és a direkt génteszt segítségével meghatározott FecB genotípust. Az anyajuhok körében átlagosan 80%-ban egyezett meg a becsült és a valós genotípus, és 20% körüli értékben a tenyésztők túlértékelték az egyedek hordozásának mértékét. Mindez magyarázatul szolgálhat arra, hogy a nem génhordozó, illetve a heterozigóta B+ egyedek miért vannak olyan nagy arányban jelen a fajtában. Hasonlóan elvégeztem a vizsgálatokat a hímivarban is, mely közel azonos eredményt adott. Ez csak megerősíti az előző állítást, miszerint a tévesen homozigótának értékelt kosok preferált használatával nem tudták a kívánt mértékben növelni a BB homozigóták számát.

A tenyészkosoktól levett és hűtve tárolt szaporítóanyag vizsgálatával sikerült olyan egyedek genotípusát is meghatározni, beleértve az import booroola, illetve hazai tenyésztésű szapora merinó kosokat, melyek már elpusztultak. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy sikerült újra értékelni azok booroola genotípusát, és a jövőbeli tenyésztői

munkában javaslatot tudok tenni a tenyészkosok használatát illetően a valós genotípus eredményekre támaszkodva.

A szaporítóanyag mintaként való alkalmazása során is megbízható eredménnyel számolhatunk, melyet igazol az a tény, hogy ugyanazon egyed vér és ondó mintájából elvégzett direkt génteszt vizsgálatok azonos genotípus eredményt adtak.

A célkitűzéseim alapján eredményeim a következőkben foglalhatóak össze:

- Megállapítottam, hogy az általam alkalmazott mikroszatellit markerek nem alkalmasak állomány szinten a FecB mutációt hordozók kiválogatására, ez csak családi szinten lehetséges. Így a markerek segítségével végzett szelekciós módszer a szapora merinó állományban nem alkalmazható. Keresztezési programokban azonban, amennyiben a kos és a termékenyítendő anyajuh marker genotípus eltér, ezek a mikroszatellitek alkalmasak a Fec^B allél nyomonkövetésére. Igaz ennek jelentősége háttérbe szorul a booroola mutáció felfedezése miatt.
- Megállapítottam, hogy a nőivar esetében az ovulációs ráta alapján 79%-os biztonsággal határozható meg a FecB genotípus és 96,7%-os megbízhatósággal becsülhető a mutáns booroola gén hordozása.
- Megállapítottam, hogy a hímivarban a leányutódok PMSG kezelés nélküli, illetve PMSG kezelést követő ovulációs ráta értékek alapján történő FecB genotípus meghatározás megbízhatósága eltérő. Kezelés nélkül 80%, kezelés esetén mindössze 45%.
- A direkt génteszt módszerével a valós FecB genotípus teljes biztonsággal állapítható meg, mindkét általam vizsgált szövetminta (vér és ondó) esetében.

A booroola mutáció direkt génteszt segítségével való közvetlen kimutathatósága nemcsak a szapora merinó fajta tenyésztését, a fajtán belül a hordozók gyors és egyszerű azonosítását jelenti és segíti, hanem a fajta szélesebb körben való elterjesztésében is nagy jelentőséggel bírhat. A szaporaság növelésére irányuló keresztezési programokban a bonyolult, idő és költségigényes fenotípusos teljesítmény mérés és a marker vizsgálatok elhagyhatók. A keresztezést követően a „recipiens” állományban a direkt géntesztel egyszerűen nyomon követhető a Fec^B allél útja, megkönnyítve, és hatékonyabbá téve ezzel a tenyészállatok szelekcióját.

10. Irodalomjegyzék

1. ALLISON, A.J. – Stevenson, J.R. – Kelly, R.W. (1979): Reproduction and wool production of progeny from high fecundity (Booroola) merino rams crossed with Merino and Romney ewes. Proc. 4th World Conf. Anim. Prod. Buenos Aires.2. pp.:665
2. ARCHIBALD, A. – Haley, C. (1993): Mapping the complex genomes of animals and man. Outlook on Agriculture, 22. pp.:79-84.
3. BARANYI, M. (2000): Tejfehérje genetikai vizsgálatok hazai szarvasmarha fajtákban. Doktori értekezés (PhD), Gödöllő, pp.:31.
4. BATESON, W. (1909):Mendel's Principle of Heridity. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
5. BINDON, B.M. (1984): Reproductive biology of the Booroola Merino sheep. Australian Journal of Biological Sciences. 37.(3). pp.:163-189.
6. BINDON, B.M. – PIPER, L.R. – Cummins, L.J. – O'Shea, T. – Hillard, M.A. – Findlay, J.K. – Robertson, D.M. (1985): Reproductive endocrinology of the Booroola Merino. In: Land, R.B. – Robinson, D.W.: Genetics of Reproduction in Sheep. Butterworth, London, pp.:217-235.
7. BISHOP, M.D. – Kappers, S.M. – Keele, J.W. – Stone, R.T. – Sunden, S.L.F. – Hawkins, G.A. Solinas Tolodo, S. – Fries, R. – Grosz, M.D. – Yoo, J. és Beattie, C.W. (1994): A genetic linkage map for cattle. Genetics 136. pp.:619-639
8. BODIN, L. – Cornu, C. – Elsen, J. – Molenat, G. – Thimonier, J. (1990): The Effect of Booroola Genotype on Some Traits in a Merino d-Arles Flock. In: Major Genes for Reproduction in Sheep. J. M. Elsen, L. Bodin, J. Thimonier. Eds. (Paris: INRA). pp.:371-381.
9. BODIN, L. – Elsen, J.M. – Poivey, J.P. – San Cristobal-Gaudy, M. – Belloc, J.P. – Eychenne, F. (1998): Hyper-prolificacy in the French Lacaune sheep breed. Proceedings of the 6th World Congress on Genetic Applied Livestock Production. Armidale, Vol. 27. pp.:11-14.
10. BOTSTEIN, D. – White, R.L. – Skolnick, M. – Davis, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 32. pp.:314-331.

11. BRADFORD, G.E. – Quirke, J.F. – Sitorus, P. – Inounu, I. – Tiesnamurti, B. – Bell, F.L. – Fletcher, I.C. – Torell, D.T. (1986): Reproduction in Javanese sheep: evidence for a gene with large effect on ovulation rate and litter size. *Journal of Animal Science*. 63. pp.: 418-431.
12. COGNOSAG (1989): Standardised nomenclature for sheep and goats. In: *Proceedings of the 1987 Workshop*. Lavoiser, Paris. pp.:49-52
13. CUMMINS, L.J. – O'Shea, T. – Bindon, B.M. – Lee, V.W. – Findlay, J.K. (1983): Ovarian inhibin content and sensitivity to inhibin in Booroola and control strain Merino ewes. *J Reprod Fertil*. 67. pp.:1-7.
14. DAVIS, G.H. – Dodds, K.G. – Wheeler, R. – Jay, N.P. (2001): Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biology of Reproduction* 64. pp.:216-221.
15. DAVIS, G. H. – Galloway, S. M. – Ross, I. K. – Gregan, S. M. – Ward, J. – Nimbkar, B. V. – Ghalsasi, P. M. – Chanda-Nimbkar – Gray, G. D. – Subandriyo – Inounu, I. – Tiesnamurti, B. – Martyniuk, E. – Eythorsdottir, E. – Milsant, P. – Lecerf, F. – Hanrahan, J. P. – Bradford, G. E. – Wilson, T. – Nimbkar, C. (2002): DNA test in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of Reproduction*. 66:6. pp:1869-1874.
16. DAVIS, G.H. – Hinch, G.N. (1984): Introduction and management of the Booroola gene into sheep flocks in New Zealand. In: *The Genetics of Reproduction in Sheep*. Eds. R.B. Land and D.W. Robinson, Butterworths, London. pp:139-148.
17. DAVIS, G.H. – Kelly, R.V. (1983): Segregation of a major gene influencing ovulation rate in progeny of Booroola sheep in commercial and research flocks. *Proc. N. Z. Soc. Anim.Prod.* 43. pp.:197-199.
18. DAVIS, G.H. – Montgomery, G.W. – Allison, A.J. – Kelly, R.W. and Bray, A.R.(1982): Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*.25. pp.:525-529.
19. DAVIS, G.P. – DeNise, S.K. (1998): The impact of genetic markers on Selection. *J. Anim. Sci.* 76. pp.:2331-2339.
20. EDWARDS, A. – Civitello, A. – Hammond, H.A. – Caskey, C.T. (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American J. Human Genet.* 49. pp.:746-756.
21. EDWARDS, M.C. – Gibbs, R.A. (1994): Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods and Application, Review*. 3.pp.:65-75.

22. ELSÉN, J.M. – Le Roy, P. (1991): Genotype determination at a major locus in a progeny test design. In: Major Genes for Reproduction in Sheep. J. M. Elsen, L. Bodin, J. Thimonier. Eds. (Paris: INRA). pp.:441-445.
23. ELSÉN, J.M. – Ortavant, R. (1984): Le gene Booroola mise en évidence fonctionnement perspectives d'utilisation 9 ième. Journées Recherche Ovine et Caprine, Paris, INRA. pp.:415-451.
24. ELSÉN, J.M. – Vu Tien Khang, J. – Le Roy, P (1988): Statistical model for genotype determination at a major locus in a progeny test design. Genet. Sel. Evol. 20. pp.:211-226.
25. FAHMY, M.H. (1998): Zootechnical aspects of major genes in sheep production. 49th Annual Meeting of EAAP. Warsaw. Poland. 24-27 Augusts, SA1.2.
26. FERNANDEZ – Abella, D. (1985): Contribution à l'étude endocrinienne comparée des brebis Mérinos d'Arles et des brebis prolifiques Booroola x Mérinos. Thèse Docteur Ingénieur en Sciences Agronomiques, E.N.S.A. Rennes – Université Rennes 1.
27. FÉSÜS, L. (1997): Markerek segítségével végzett szelekció háziállatokban. 1. Közlemény: Előzmények és elméleti alapismeretek. Állattenyésztés és Takarmányozás. Vol. 46. No.4. pp:289-296.
28. FÉSÜS, L. (1999): Molekuláris genetikai markerek segítségével végzett szelekció háziállatokban. 5. Közlemény: A booroola gén (FecB). Vol: 48. No.3.pp.:291-300.
29. FÉSÜS, L. – Komlósi, I. – Varga, L. – Zsolnai, A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft. Budapest.
30. FÉSÜS, L. – Lengyel, A. – Pászthy, Gy. – Al Dabbag, A. (1991): Biochemical markers in the Booroola population imported to Hungary in: Major gene for Reproduction in sheep (ed. By J.M. Elsen, L. Bodin and J. Thimonier), INRA, Toulouse, France. pp.:271-2.
31. FÉSÜS, L. – Zsolnai, A. – Anton, I. (1997): Markerek segítségével végzett szelekció háziállatokban. 2. Közlemény: Bovine Leukocyte Deficiency (BLAD). Állattenyésztés és Takarmányozás. Vol. 46. No.6., pp:481-492.
32. FÉSÜS, L. – Zsolnai, A. – Anton, I. (1998): Markerek segítségével végzett szelekció háziállatokban. 3. Közlemény: A sertés stresszérzékenysége. Állattenyésztés és Takarmányozás. Vol. 47. No.2. pp:113-137.

33. GALLOWAY, S.M. – McNatty, K.P. – Cambridge, L.M. – Laitinen, M.P. – Juengel, J.L. – Jokiranta, T.S. – McLaren, R.J. – Luro, K. – Dodds, K.G. – Montgomery, G.W. – Beattie, A.E. – Davis, G.H. – Rivos, O. (2000): Mutation in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and fertility in a dosage-sensitive manner. *Natural Genetics*. 25. pp.:279-283.
34. GEORGES, M. – Leqarre, A.S. – Castelli, M. – Hanset, R. – Vassart, G. (1989): DNA fingerprint in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenetic and Cell Genetic*. 47. pp.:127-131.
35. GLAZKO, V.I. – Owen, J.B. – Ap Dewi, I. – Axford, R.F.E. (1997): An association of haemoglobin protein (HBB) with ovulation rate in Cambridge sheep. *Animal Science* 64. pp.:279-282.
36. GOOTWINE, E. – Yossefi, S. – Zenou, A. – Bor, A. (1998): Marker assisted selection for FecB carriers in Booroola Awassi crosses. *Proc. 6th. World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Armidale, Australia, 11-16, January*. 24. pp.:161-164.
37. HARVEY, L.R. (1999): *Mixed Model Least-Squares and Maximum Likelihood Computer Programme PC-2. Manual*.
38. HALEY, C. – Visscher, P. (1998): DNA markers and genetic testing in farm animal improvement: current application and future prospects, In: *Annual Review of the Roslin Institute, Edinburgh, 1998/99*. pp.:28-39.
39. HALEY, C.S. – Knott, S.A. (1992): Simple regression method for quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, 69. pp.:315-324.
40. HENDERSON, K.M. – Franchimont, P. (1983): Inhibin production by bovine ovarian tissues in vitro and its regulation by androgens. *J. Repr. Fert.* 67. pp.:291-298.
41. HENKES, L.E. – Weimer, T.A. – Moraes, J.C.F. (1994): Genetic markers and the fertility gene (Fec^B) in a $\frac{3}{4}$ Romney Marsh x $\frac{1}{4}$ Merino Booroola flock. *Small Ruminant Research*. 14. pp.:55-59.
42. HINCH, G.N. – Lynch, J.J. – Nolan, J.V. – Leng, R.A. – Bindon, B.M. – Piper, L.R. (1996): Supplementation of high fecundity Border Leicester x Merino ewes with a high protein feed: its effect on lamb survival. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 36:2. pp.:129-136.
43. HOGAN, B. L. (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10. pp.:1580-1594.

44. JÁVOR, A. (1998): A juhászat minőségorientált menedzsmentje. „AGRO-21” Füzetek. Az agrárgazdaság jövőképe. Stratégiai kutatási programok az agrárgazdaság minőségi dimenziói. No. 21. pp.:87-102.
45. JÁVOR, A. – Kukovics, S. – Nábrádi, A. (1999): A juhászat gazdasági helyzete és minőségi fejlesztése. „AGRO-21” Füzetek. Az agrárgazdaság jövőképe. Stratégiai kutatási programok az agrárgazdaság minőségi dimenziói. No.30. pp.:60-65.
46. JEFFREYS, A.J. – Wilson, V. – Thein, S.L. (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 314. pp.:67-73.
47. KELLY, R.W. – Owens, J. L. – Crosbie, S.F. – McNatty, K.P. – Hudson, N.(1983): Influence of Booroola Merino genotype on the responsiveness of ewes to pregnant mares' serum gonadotrophin luteal weights and peripheral progesterone concentrations. *Animal Reproduction*. Csi. 6. pp.:199-207.
48. KLEEMANN, D.O. – Walker, S.K. – Walkley, J.R.W. – Ponzoni, R.W. – Smith, D.H. – Grimson, R.J. – Seamark, R.F. (1993a): Effect of nutrition during pregnancy on birth weight and lamb survival in FecB Booroola x South Australian Merino ewes. *Animal Reproduction Science*. 31. 3-4. pp.:213-224.
49. KLEEMANN, D.O. – Walker, S.K. – Walkley, J.R.W. – Ponzoni, R.W. – Smith, D.H. – Grimson, R.J. – Seamark, R.F. (1993b): Effect of nutrition during pregnancy on fetal growth and survival in FecB Booroola x South Australian Merino ewes. *Theriogenology*, 39:3. pp.:623-630.
50. KOBAYASI, I. – Nobusato, A. – Kobayasi-Takahashi, N. – Uchiyama, I. (1999): Shaping the genome-restriction-modification systems as mobile genetic elements. *Currents Opinions in Genetic Development*. Review. 9. pp.:649-656.
51. KUKOVICS, S. – Jávör, A. – Nábrádi, A. (1999): Juhászat a minőségi átalakulás útján. In: minőség és agrárstratégia. Magyarország az ezredfordulón. Stratégiai kutatások a Magyar Tudományos Akadémián. Agrárium. MTA könyv, Szerk.: Glatz F. pp.:271-299.
52. LANDE, R. – Thompson, R. (1990): Efficiency of marker assisted selection in improvement of quantitative traits. *Genetics*. 124. pp.:743-756.
53. LANDER, E.S. – Botstein, D. (1989): Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage map. *Genetics*. 121.pp.:185-199.
54. LANNELUC, L. – Drinkwater, R.D. – Elsen, J.M. – Hetzel, D.J.S. – Nguyen, T.C. – Piper, L.R. – Thimonier, J. – Harrison, B. – Gellin, J. (1994): Genetic markers for the Booroola fecundity (Fec) gene in sheep. *Mammalian Genome*. 5.pp.:26-33.

55. LENGYEL, A. – Pászthy, Gy. (1994): A booroola (FecB) gén hatása a magyar merinó anyák reprodukciós teljesítményére. Szaktanácsok. Pannon Agrártudományi Egyetem. Kaposvár. 1-4. pp.:13-15.
56. LENGYEL, A. – Pászthy, Gy. – Horn, P. (1990): Forming the homozygous Hungarian Booroola Merino. In: Major Genes for Reproduction in Sheep. J. M. Elsen, L. Bodin, J. Thimonier. Eds. (Paris: INRA). pp:41-42.
57. LETTERIO, J.J. – Roberts, A.B. (1998): Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev. Immunol.* 16. pp.:137-161.
58. LEYHE-HORN, B. - Koch, D. – Gauly, M. – Anastassiadis, C. And Erhardt, G. (1998): Suitability of microsatellites BM1329 and OarAE101 as markers for introgression of FecB locus into different sheep breeds. 49th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Warsaw, Poland, August 24-27.
59. LINCH, M. – Walsh, B. (1997): Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. Pp.:492-493.
60. LIU, BEN-HUI (1997): Statistical Genomics: linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press.USA. Florida. pp:62-83.
61. LORD, E.A. – Davis, G.H. – Dodds, K.G. – Henry, H.M. – Lumsden, J.M. – Montgomery, G.W. (1998): Identification of Booroola Carriers using microsatellite markers. 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, New South Wales, Australia, January 11-16.
62. M. ESTUTY (1999): Factors affecting prolificacy in the Prolific Merino. Master of Science Thesis. Debrecen.
63. MAGYAR, K. – Veress, L. – Tasi, Zs. – Pécsi, A. – Horváth, Vné. – Babik, S. (1997): Egy juhtenyésztési program és eddigi eredményei. 2. Közlemény: Néhány biotechnológiai módszer alkalmazása. *Állattenyésztés és Takarmányozás.* 46. 1. pp.:41-50.
64. MAGYAR, K. – Veress, L. – Tasi, Zs. – Pécsi, T. – Babik, S. – Horváth, I. (1999): Zootechnical and genetic aspects of a Prolific Merino program. *Acta Veterinaria Hungarica.* 47. 1. pp.:17-31.
65. MAGYAR, K. (1994): Laparoscópos módszerek alkalmazása a juhtenyésztésben. Kandidátusi értekezés, Debrecen
66. MASSAGUE, J. (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67. pp.: 753-791.

67. MC.NATTY, K.P. – Henderson, K.M. – Fleming, J.S. – Clarke, I.J. – Bindon, B.M. – Piper, L.R. – O'shea, Z. – Hillard, M.A. – Findlay, J.K. (1990): The physiology of the Booroola ewe. In: In: Major gene for Reproduction in sheep (ed. By J.M. Elsen, L. Bodin and J. Thimonier), INRA, Toulouse, pp.:103-125.
68. MEUWISSEN, T.H. – Goddard, M.E. (1996): The use of marker-haplotypes in animal breeding scheme. *Genet. Sel. Evol.* 28. pp.:161-176.
69. MEUWISSEN, T.H. – Van Arendonk, J.A.M. (1992): Potential improvements in rate of genetic gain from marker-assisted selection in dairy cattle breeding schemes *Journal of Dairy Science.* 75 (6) pp.:1651-1659.
70. MONTGOMERY, G.W. – Crawford, A.M. – Penty, J.M. – Dodds, K.G. – Ede, A.J. – Henry, H.M. – Pierson, C.A. – Lord, E.A. – Galloway, S.M. – Schmack, A.E. – Sise, J.A. – Swarbrick, P.A. – Hanraham, V. – Buchanan, F.C. and Hill, D.F. (1993): The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature Genetics.* 4.pp.:410-414.
71. MONTGOMERY, G.W. - Lord, E.A. – Penty, J.M. – Dodds, K.G. – Broad, T.E. – Cambridge, L. – Sunden, S.L.F. – Stone, R.T. and Crawford, A.M. (1994): The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics.* 22.pp.:149-153.
72. MONGOMERY, G.W. - Hawker, H. (1987): Seasonal reproduction in ewes selected on seasonal changes in wool production. *Journal of Reprod. Fert.* 79. pp.: 207-213.
73. MONTGOMERY, G.W. – Kelly, R.W. – Davis, G.H. – Allison, A.J. (1985): Ovulation rate oestrus in Booroola genotype: some effect of age, season and nutrition. In: Land, R.B. and Robinson, D.W.(eds). *Genetics of reproduction in Sheep*, Butterworth, London. 24. pp.:237-242.
74. MONTGOMERY, G.W. – McNatty, K.P. – Davis, G.H. (1992): Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocr. Rev.* 13. pp.:309-328.
75. MORRIS, C.A. (1990): Theoretical and realised responses to selection for reproductive rate. In: *Proceedings of the IV. World Congress on Genetics Appliedto Livetock Production.* Edinbrough, Vol. 16. pp.:309-318.
76. MULLIS, K.B. – Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase chain reaction. In: Wu R. ed. *Metods in Enzymology* vol. 155, Academic Press, San Diego, CA. pp.:335-350.

77. MULSANT, P. – Lecerf, F. – Fabre, S. – Schilber, L. – Monget, P. – Lanneluc, I. – Pisselet, C. – Riquet, J. – Monniaux, D. – Callebaut, I. – Cribiu, E. – Thimonier, J. – Teyssier, J. – Bodin, L. – Cognie, Y. – Chitour, N. And Elsen, J.M. (2001): Mutation in bone morphogenic protein receptor-IB is associated with increase ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98.9.pp.:5104-5109.
78. NATARAJ, A.J. – Olivos – Glander, I. – Kusukawa, N. – Highsmith, W.W. JR. (1999): Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 20. pp.:1177-1185.
79. NATHANS, D. – Smith, H.O. (1975): Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annual Review in Biochemistry*. 44. pp.:273-293.
80. NGUYEN, T.C. – Elsen, J.M. – Cullen, P.R. (1992): Absence of evidence for linkage between Booroola gene and genetic markers at 11 sheep blood polymorphic loci. *Anim. Genet.* 23. pp.:525-527.
81. O'SHEA, T. – Obaidi, S.A.R. – Bindon, B.M. – Hillard, M.A. – Findlay, J.K. (1983): Ovarian activity in ewes vaccinated with an inhibin-enriched fraction from bovine follicular fluid. In: *Reproduction in Sheep*. Lindsay, D.R. – Pearce, D.T. eds. *Austr. Ac. of Scil, Canberra*, pp.:335-337.
82. OLDHAM, C.M. – Gary, S.J. – Poindron, P. – Bindon, B.M. (1984): Progeny testing for the „F” gene using pubertal ewe lambs. In: *Reproduction in sheep*. Lindsay, D.R. and Pearce, D.T. eds. *Australian Academic of Sci, Camberra*, pp.:260-261.
83. OSIKOWSKI, M. és Borys, B. (1980): The use of prolific sheep in vareous countries: Eastern Europe. In: *Prolific Sheep*. M. H. Fahmy (Ed.). CABI, Oxford, UK, pp.: 263-288.
84. OWENS, J.L. – Johnstone, P.D. and Davis, G.H. (1985): An independent statistical analysis of ovulation rate data used to segregate Booroola Merino genotypes. *N. Z. J. Agric. Res.*, 28. pp.:361-363.
85. PENNISI, E. (1998): Sifting through and making sense of genome sequences. *Science*, 280. pp.:1692-1693.
86. PIPER, L.R. – Bindon, B.M. (1982a). Genetic segregation for fecundity in Booroola Merinó sheep. In *Proc. of the World Cong. On Sheep and Meet Cattle Breeding*. 1. The Dunmore Press, Palmertson North, pp.:395-400.

87. PIPER, L.R. and Bindon, B.M. (1982b): The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale. in the Booroola Merino, Eds. LR Piper, BM Bindon, RD Nethery. Melbourne. Ed. CHIRO. pp.:9-20.
88. PIPER, L.R. – Bindon, B.M. – Atkins, K.D. – McGuirk, B.J. (1980): Genetic variation on ovulation rate in Merinó ewes aged 18-months. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. Melbourne 13.pp.:409-412.
89. PIPER, L.R. – Bindon, B.M. – Davis, G.H. (1984): The single gene inheritance of higher litter size of the Booroola Merino. In: The Genetics of Reproduction in Sheep. Eds. R.B. Land and D.W. Robinson, Butterworths, London, pp.:115-126.
90. PIPER, L.R. – Bindon, B.M. – Davis, G.H. (1985): The single gene inheritance of the high litter size of Booroola Merino, In Genetics of Reproduction in Sheep, R.B. Land, D.W. Robinson, esd.(London:Buterworth), pp.:115-125.
91. PIPER, L.R. – Bindon, B.M. – Davis, G.H. – Elsen, J.M. (1988): Control of litter size: Major genes and industry utilisation of the Booroola F gene. Proc. 3rd World Congr. Sheep and Beef Cattle Breed., Vol.2. pp.:589-609.
92. PIPER, L. – Ruvinsky, A. (1997): The Genetics of Sheep. CAB International. Cambridge. pp.:331.
93. PURVIS, J.W. – Piper, L.R. – Bindon, B.M. – Edey, T.M. – Curtis, Y, M. – Nethery, R.D. (1983): Further studies of testis size in crossbred Booroola rams. Proc. Austr. Soc. Repr. Biol. Vol. 15. (Abstract 34.)
94. REYNAUD, K. – Hanrahan, J.P. – Donovan, A. – Driancourt, M.A (1999): Markers of follicle function in Berclare-cross ewes differing widely in ovulation rate. Journal of Reproduction and Fertility 116. pp.:51-61.
95. RICORDEAU, G. (1982): Selection for reduced seasonability and post partum anoestrus. World Congress on Genetics of Applied Livestock Production. Madrid, pp.:338-347.
96. RUANE, J. – Colleau, J.J. (1996): Marker-assisted selection for a sex-limited character in a nucleus breeding population Journal of Dairy Science. 79.pp.:1666-1678.
97. RUSSEL, A.J.F. – Alexieva, A.A. – Elston, D.A. (1997): The effect of the Thoka gene for fecundity on lamb production from Cheviot ewes. Animal Science. 64. pp.:503-507.
98. SCOTT, R.S. – Burger, H.G. – Quigg, H. (1980): A simple and rapid in vitro bioassay for inhibin. Endocrinology. 107. pp.:1536-1542.

99. SHIMASAKI, S. – Zachow, R.J. – Li, D. – Kim, H. – Iemura, S. – Ueno, N. – Sampath, K. – Chang, R.J. – Erickson, G.F. (1999): S functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 96. pp.:7282-7287.
100. SIMM G. (1998): *Genetic Improvement of Cattle and Sheep.* Farming Press. Ipswich, United Kingdom., pp.:375.
101. SOUZA, C.H.J. – MacDougall, C. – Campbell, B.K. – McNeilly, A.S. and Baird, D.T. (2001): The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenic receptor type 1 B (BMPR1B) géne. *Journal of Endocrinology.* R1-R6.pp.:169.
102. SUTHERN, E.M. (1975): *Journal of Molecular Biology,* 98.pp.:503-517.
103. SVÁB, J. (1981): *Biometriai módszerek a kutatásban.* Mezőgazdasági Kiadó, pp.:117.
104. SZÁRAZ, A. (2002): *A szapora merinó tenyésztésének értékelése.* Tudományos Diákköri Dolgozat. Debrecen.
105. SZÉKELY, P. – Domanovszki, Á. – Utasi, J. (1990): *A Juhtenyésztés eredményei.* OMMI, Budapest.
106. TATE, M.L. – Manly, H.C. – Dodds, K.G. – Montgomery, G.W. (1992): Genetic linkage analysis between protein polymorphisms and the Fec^B major gene in sheep. *Animal Genetics.* 23. pp.:417-424.
107. THIMONIER, J. – Davis, G.H. – Fahmy, M.H. – Castonguay, F. – Fernandez-Abella, D. – Greff, J.C. – Hofmeyr, J.H. – Gotwine, E. – Bor, A. – Braw-Tal, R. – Haley, C.S. – Klewicz, J. – Gabryszuka, M. – Slowak, M. – Piper, L.R. – Bondon, B.M. – Veress, L. – Lengyel, A. – Pászthy, G. – Horn, P. – Visscher, A.H. – Wassmuth, R. – Young, L.D. (1991): The F gene in the world: use and research objectives. In: *Major gene for Reproduction in sheep* (ed. By J.M. Elsen, L. Bodin and J. Thimonier), pp.:3-13.
108. TURNER, H. (1982): *The Booroola Merino.* Proceeding of Workshop held at Armidale, NSW. 24-25. August 1980. Division of Animal Production, CSIRO, Australia.pp.: 1-8.
109. VERESS, L. (1991): *A juhtenyésztés fejlesztésének genetikai és tartástechnológiai kérdései.* Akadémiai doktori értekezés. Debrecen
110. VERESS, L. (1983): *Adatok a booroola merinó tenyésztési programjához.* Állattenyésztés és Takarmányozás. 32. 4. pp.:329-334.

111. VERESS, L. (1998): A szapora merinó hasznosítási lehetőségei. Egyetemi Kiadvány, Debrecen.
112. VERESS, L. – Horak, F. – Komlósi, I. – Jávör, A. – Magyar, K. (1988): Breeding possibilities of Booroola Merino in East-Europe. *Journal of Agricultural Science in Finland*. Helsinki, 60.k. 6.sz. pp.:591-596.
113. VERESS, L. – Lovas, L. – Radnai, L. (1979): *Acta Agr. Sci. Hung.* Budapest, 28. pp.:441-451.
114. VERESS, L. – Magyar, K. – Komlósi, I. – Horváth, Vné – Kovács, Z. (1995): Egy juhtenyésztési program és eddigi eredményei. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 44. 4. pp.:301-315.
115. VERESS, L. – Magyar, K. – Komlósi, I. – Jávör, A. (1998): Egy juhtenyésztési program és eddigi eredményei. *Debreceni Szemle*. 4. pp.:565-581.
116. VERESS, L. – Presa, J. – Magyar, K. – Végh, J. (1991): Vonaltenyésztés és ivadékvizsgálati eredmények a magyar booroola merinó tenyésztésében. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 40. 6. pp.:495-507.
117. VERESS, L. – Végh, J. – Horváth, Vné. (1987): A booroola merinó tenyésztési lehetőségei Magyarországon. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 36. 1. pp.:53-61.
118. WALKER, S.K. – Ponzoni, R.W. – Walkley, J.R.W. – Morbey, A.S.C. (1985): The effect of the „F” gene on male reproductive traits in Booroola x South Australian Merino rams. *Animal Reproduction Sciences*. 9. pp.:137-144.
119. WANG, D.G. – Fan, J-B. – Siao, C-J. (1998): Large-scale identification, mapping and genotyping of –nucleotid polymorphisms in the human genome. *Science*, 280. pp.:1077-1082.
120. WATSON, J.H. and Khattab, A.G.H. (1964): The effect of haemoglobin and potassium polymorphism on growth and wool production in Welsh Mountain sheep. *J. Agric. Sci.* 63. pp.:179-183.
121. WEAVER, R.F. – Hedrick, P.W. (2000): *Genetika*. Panem Könyvkiadó. Budapest. pp.:76.
122. WEIMANN, C. – Leyhe-Horn, B. – Gauly, M. – Erhardt, G. (2001): Suitability of microsatellites BM1329 and OarAE101 as markers for the introgression of the FecB locus into different sheep breeds. *Arch. Tierz. Dummerstorf*. 44.4.pp.:435-440.
123. WEISHET, H. (1979): The short lambing interval is a good sign of selection for high fertility. 29th Annual meeting of EAAP. Harrogate. S.6.5.

124. WILSON, T. – Wu, X.Y. – Juengel, J.L. – Ross, I.K. – Lumsden, J.M. – Lord, E.A. – Dodds, K.G. – Walling, G.A. – McEwan, J.C. – O’Cpnell, A.R. – McNeilly, K.P. and Montgomery, G.M. (2001): Highly Prolific Booroola Sheep Have a Mutation in the Intracellular Kinase Domain of Bone Morphogénetic Protein IB Receptor (ALK-6) that in Both Oocyte and Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*. 64.pp.:1225-1235.
125. WINNIER, G. – Blessing, M. – Labosky, P.A. – Hogan, B.L. (1995): Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*. 9. pp.:2105-2116.
126. ZHANG, W. – Smith, C. (1992): Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. *Theor. Appl. Genet.* 83: pp.:813-820.
127. ZSOLNAI, A. – Fésüs, L. (1996): Simultaneous analysis of bovine kappa-casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes. *Animal Genetics*, 3. pp.: 207-209.
128. ZSOLNAI, A. – Orbán, L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*, 7. pp: 1462-1468.
129. <http://www.thearkdb.org/cgi-bin/> WEB site

MELLÉKLET

1. melléklet. A juh (*Ovis aries*) BMPR-1B receptor mRNS szekvenciája (GénBank azonosító: AF312016). A mutáció helyét piros színnel jelöltem A sárgával jelölt szekvencia rész az PCR során alkalmazott reverse primer.

```
1 tttccgttg agctatgaca agagaggata caaaaagtta aacaagcaag cctgtcatac
61 gtagaagcaa acttccttga taacatgctt ttgcgaagtt caggaaaatt aagtgtggc
121 accaagaaag aggatggtga gactacagcc cccacccctc gtccaaagat cttgcgatgt
181 aaatgccacc accattgtcc agaagactcg gtcaacaata ttgcagcac agatggatat
241 tgtttcacga tgatagaaga agatgactct gggatgcctg tggcacttc tggatgtcta
301 ggactagaag gctcagattt tcagtgtcgg gacactccca ttcctcatca gagaagatcc
361 attgaatgct gcacagaacg gaatgaatgt aataaagatc tgcacccac acttcctcca
421 ctgaaaaaca gagattttgt tgacggacct atacaccaca aagctttact tatactgtg
481 actgtgtgta gttgtctt ggtcctcatc atttattct gttacttcag gtataaaaga
541 caagaagcca gacctcgga cagcattggg ttagaacagg acgaaactta cattcctct
601 ggagaatccc tgagagactt aattgagcag tcgcagagct caggagcgg atcaggcctc
661 cctctgctgg tccagaggac aatagcaaag caaattcaga tggtgaaaca gattggaaaa
721 ggtcgctatg gggaagttg gatgggaaag tggcgtggcg aaaaggtagc tgtgaaagt
781 ttcttacta cagaggaggc cagctggtc cgagagacag aaatatatca gacggtgtg
841 atgaggcatg aaaacatctt gggcttcatt gctgcagata tcaagggac ggggtcctg
901 acacaactgt acctaatac agattatcat gaaaatggtt cccttatga ttacctgaag
961 tccaccacc tagacactaa gtcgatgtg aagctagcct attccgcagt cagtggcctc
1021 tgcacttac aactgaaat ctttagcact caaggcaaac cagcaattgc ccatcgagat
1081 ctgaaaagta agaacatcct ggtgaagaaa aatggaactt gctgtatagc tgacctggg
1141 ttggctgta agttattag tgacacgaat gaagtgaca taccaccaa cactcgagtt
1201 ggcaccaagc gctacatgcc tccagaagtg ttgatgaga gctgaacag aatcacctt
1261 cagtcttaca tcatggcga catgtacagt ttggactca tccttggga gtcgctagg
1321 agatgtgtgt caggaggat agtgaagaa taccagctcc cctatcatga cctggtgcc
1381 agtgaccct cttacgagga catgagagag atcgtgtgta tcaagaagct gcggccctc
1441 tccccaacc ggtggagcag tgacgagtgt ctacggcaga tgggaaact catgacggaa
1501 tgctgggctc acaatcctgc ctcaagactg acagccctac gggtaagaa aaccctgcc
1561 aaaatgtcag agtccagga cattaagctc tgaggcaaga gtaagtgtct ct
```

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, **Dr. Jávor András** egyetemi docensnek és **Dr. Fésüs László** professzor úrnak a Ph.D. tevékenységem során nyújtott támogatásukért, a kísérleti feltételek biztosításáért.

Köszönetet mondok **Dr. Zsolnai Attila** tudományos munkatársnak a DNS vizsgálatok során nyújtott segítségéért és hogy szakmai ismeretekkel, hasznos tanácsaival segítette munkám elvégzését.

Köszönöm a herceghalmi **Állattenyésztési és Takarmányozási Kutató Intézet molekuláris genetikai laboratóriumában** dolgozó kollégák készséges segítségét.

Köszönöm az **Állattenyésztési és Takarmányozástani Tanszék** valamennyi dolgozójának munkámhoz nyújtott segítségét.

Megköszönöm az **Állattenyésztési Kísérleti Telep** dolgozóinak a mintavételek során nyújtott segítségüket.

Köszönettel és hálával tartozom **családomnak** mindazért, amellyel segítettek PhD munkám folyamán.