

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 Jávör András
mezőgazdaság-tudomány kandidátusa

Dr. h.c. Fésüs László
MTA doktora

„DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI”

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

Készítette:
Árnyasi Mariann
doktorjelölt

Debrecen
2003.

1. BEVEZETÉS

A juhtenyésztés gazdaságosságát az egy anyajuhra jutó éves realizált bárányszaporulat alapvetően meghatározza. A hazai merinó állomány szaporaságának növelésére irányuló törekvések közül kiemelendő a szapora merinó fajta létrehozása. A tenyésztők célja az volt, hogy a magyar merinónál szaporább, sűrítve ellethető fajtát hozzanak létre, mely a heterózis hatás kiaknázására irányuló, vágóbárány előállítást célzó keresztezésekben anyai partnerként alkalmazható. A magyar merinó x booroola merinó alapon létrehozott szapora merinó 1992-ben kapott fajtaelismerést. A fajta nagy értéke a booroola mutáció hordozásában rejlik, keresztezési konstrukcióban való felhasználása a gyakorlatban azonban mégsem terjedt el. Ennek egyik oka az, hogy a FecB mutációt hordozók azonosítására rendelkezésre álló és alkalmazott módszer rendkívül idő és munkaigényes volt. Ez a módszer gyakorlatban történő hatékony alkalmazását meggátolta.

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

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Ovulációs ráta vizsgálatok

A marker genotípus és ovulációs ráta közötti hatásvizsgálat elvégzéséhez a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum kismacsi állattenyésztési kísérleti telepén tenyésztett szapora merinó állomány nőivarú egyedeinek ovulációs ráta (OR) adatait gyűjtöttem 1998-2001 között. Az ovulációs ráta mérését minden esetben ősszel, a fő tenyészszezonban végeztük, ivarzásszinkronizáló szerek alkalmazása nélkül. Vizsgálataimhoz az 1998-ban tenyésztésben álló anyajuhok korábbi években, hasonló módon mért ovulációs ráta adatait is felhasználtam.

Marker genotípus vizsgálatok

A marker vizsgálatok egy juh (OarAE101) és egy szarvasmarha (BM1329) mikroszatellit lókuszra irányultak. A PhD munkám megkezdésekor a rendelkezésre álló irodalmi adatok szerint ezek voltak a FecB lókuszhoz legközelebb lokalizált ismert markerek.

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, valamint a már nem élő, de mélyhűtött szaporítóanyaggal rendelkező tenyészkosok, összesen 407 (n=407) egyed genotípus vizsgálatát végeztem el.

A mutációt hordozó és nem hordozó állományokban előforduló mikroszatellit allélok gyakorisági értékeinek összehasonlításához, a Fec^B allélt nem hordozó kontroll állományként két **magyar merinó tenyészetből** származó, véletlenszerűen kiválogatott, összesen 46 (n=46) egyed marker genotípusát határoztam meg.

A markervizsgálatokhoz szükséges genomiális DNS-t a magyar merinó esetében vérmintából, a szapora merinó esetében vér és ondó mintákból tisztítottam.

A mikroszatellit allélok azonosítását ABI PRISM 310 Genetic Analyzer segítségével végeztem. Az adatbegyűjtéshez az ABI PRISM 310 Data Collection Software-t használtam. Az adatok értékelését a Genotyper programmal végeztem.

Direkt génteszt vizsgálatok

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

BMPR-1B receptorban bekövetkezett pontmutáció - amely maga a FecB mutáció - kimutatását ACRS (ACRS – amplifikációval létrehozott restriktációs hasítóhely) módszerrel végeztem.

A booroola mutációra vonatkozóan a nemzetközi irodalom alapján az alábbi jelöléseket alkalmaztam:

- FecB gén vad típusú allélja: +, vagy Fec^+
- mutáns allél: B, vagy Fec^B

Statisztikai vizsgálatok

Mind a marker genotípus, mind a direkt génteszt alapján meghatározott genotípus ovulációs rátára való hatásának vizsgálatához többváltozós varianciaanalízist végeztem. A vizsgálatához az úgynevezett REML (Restricted Maximum Likelihood) módszert használtam. A számításokhoz a Mixed Model Least-Squares and Maximum Likelihood Computer Programme PC-2 statisztikai programcsomagot használtam. Fix hatásként a kor, az ovulációs ráta mérés kori életkor és a marker genotípusok szerepeltek az egyenletben.

A vizsgált fajták esetében a marker allélok gyakorisága közötti különbség statisztikai igazolásához, továbbá a marker genotípusok FecB genotípuson belüli eloszlásának vizsgálatához χ^2 próbát végeztem.

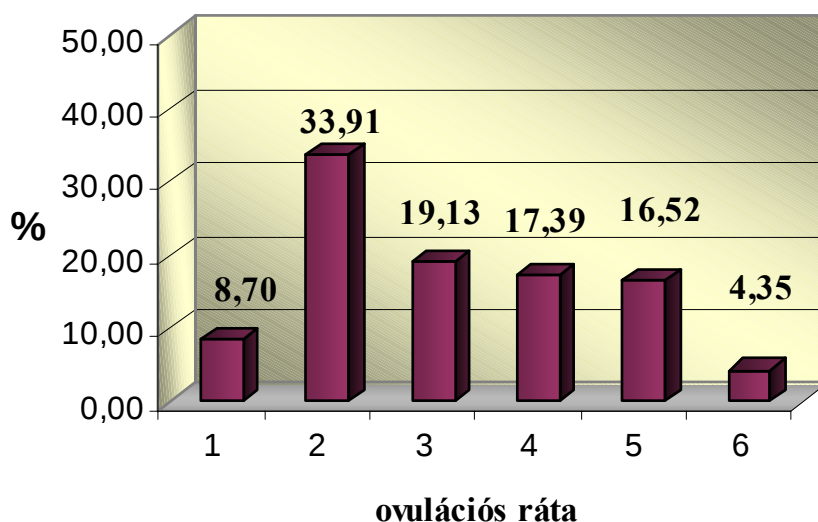
A markerek polimorfizmus információ tartalmának vizsgálatához PIC (Polymorphic Information Content) értéket számoltam.

3. EREDMÉNYEK

Ovulációs ráta vizsgálatok eredménye

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 méréskori 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.

A 64 anya OR értékeinek megoszlása az 1. ábrán látható. Az ovulációs ráta számtani átlag értéke a vizsgált anyák esetében 3,12. Az ábra adataiból leolvasható, hogy az OR eredmények 8,69%-a adott egyes ovulációs számot. Igen magas aránnyal (33,91%) fordult elő a kettes ovuláció. Az eredmények közül 57,39% volt 3-as, vagy ennél magasabb ovulációs szám, és ebből mintegy 40% esett a mutáció hordozására utaló 3-as érték felé.



1. ábra: A szapora merinó anyajuhok ovulációs ráta értékeinek nagyság szerinti megoszlása

Marker vizsgálatok eredménye

A marker vizsgálatok során kapott allélgyakorisági értékek jelentősen eltértek a szapora merinó és a magyar merinó állomány esetében (1., 2. táblázat).

A χ^2 próba eredménye alapján a két populáció allélgyakorisági értékei szignifikánsan különböznek bizonyultak $P < 0,1\%$ hibaszázalék mellett.

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 merinóban volt kimutatható. Ez arra utal, hogy az utóbbiak feltehetően a booroola oldalról kerülhettek a szapora merinó fajtába.

A BM1329 mikroszatellit esetén is 6 allélt azonosítottam, melyek közül 4 (158, 160, 162, 170) szintén előfordult mindkét fajtában, a 164-es allél azonban csak a szapora merinóban volt kimutatható. Valószínűsíthető, hogy ez az allél is booroola eredetű. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy booroola merinó kosnál is sikerült a 164-es allélt azonosítanom.

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 kapcsolatosan öröklődtek a Fec^B alléllal, hiszen a tenyésztők a booroola mutáció elterjesztésére, homozigóta állomány kialakítására törekedtek. A vizsgált tenyészkosok 51%-a ezekre az allélokra homozigóta genotípusú.

1. 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

2. 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

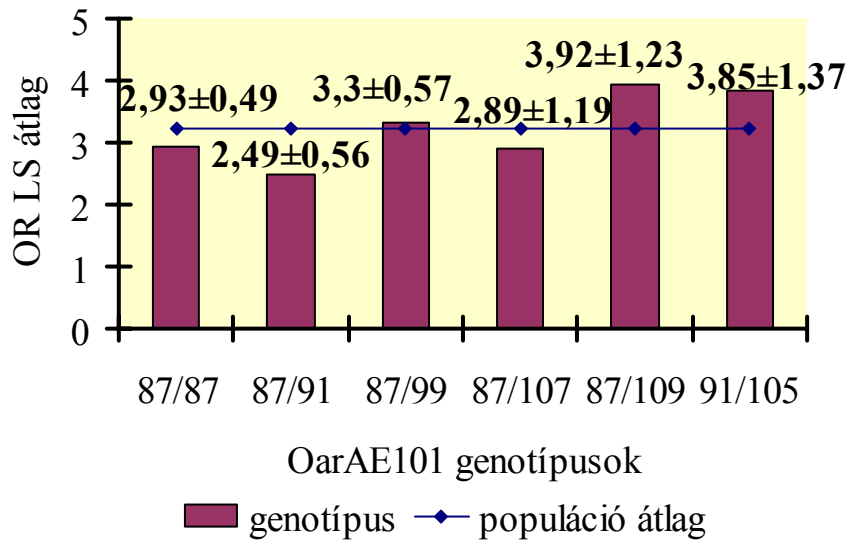
** az 1998-2003-között a debreceni szapora merinó állományban tartott tenyészegyedek

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

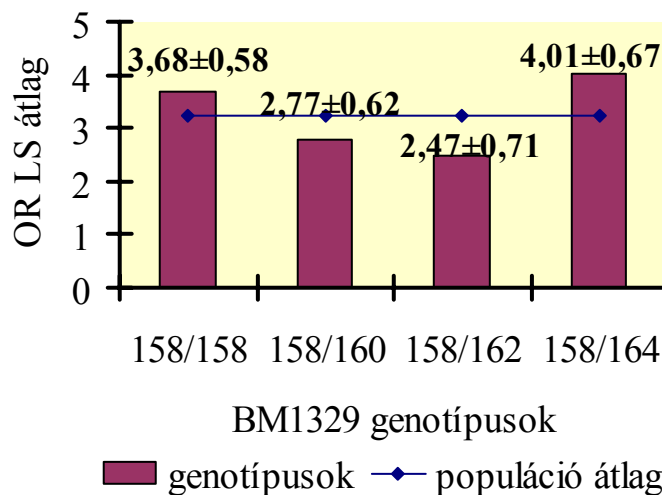
A marker genotípus és ovulációs ráta varianciaanalízis eredménye alapján az OarAE101 genotípus nem volt szignifikáns hatással az ovulációs rátára, míg a BM1329 genotípus szignifikánsan befolyásolta a levált petesejtek számát.

Az OarAE101 marker esetében 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 (2. ábra). Ebbe a genotípusba tartozó egyedek 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 családonként változik. A fellépő rekombináció eredményeként vannak olyan egyedek, amelyeknél a +, és vannak olyanok, amelyeknél a B alléllal öröklődnek kapcsoltan az említett mikroszatellit allélok.

A BM1329-es mikroszatellit marker genotípusokat tekintve 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 (3. ábra).



2. ábra: Az anyajuhok ovulációs ráta átlagának alakulása az OarAE101 genotípus függvényében



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 $SzD_{p<5\%} = 0,79$

3. 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 a kapcsoltság egyes családokban megváltozott, mivel olyan genotípusokban is előfordul (olyan allélkombinációban), ahol a csoport legkisebb négyzetes OR átlaga alapján egyértelműen nem hordozónak bizonyult.

A kapcsoltság megváltozását igazolja az állományban előforduló rekombináció a két marker lókuszt között. A hím és nőivarban összesen 80 informatív meiózis azonosítottam, melyből 13 esetben fordult elő rekombináció, ami 16,25%-os előfordulást jelent.

Az informatív meiózisok 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-, másokra heterozigóta genotípusú volt. Ezt támasztják alá az egyes markerekre számított PIC érték is, mely a marker-informatív családok előfordulásának gyakoriságát mutatja ($PIC_{BM1329}=0,436$, $PIC_{OarAE101}=0,385$).

Direkt génteszt vizsgálat eredményei

A FecB 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 booroola mutációt hordozók azonosításához.

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

A FecB genotípus és az ovulációs ráta varianciaanalízis vizsgálata a várakozásnak megfelelő eredményt adott. A FecB genotípus $P<0,001$ valószínűségi szinten szignifikánsan befolyásolta az ovulációs rátát. 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 (3. táblázat).

3. 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 $SzD_{P<0,1\%} = 1,024$

Eredményeim alapján a Fec^B allél egyszeri jelenléte 0,89-el növelte a levált petesejtek számát a mutációt nem hordozókhoz képest. Amennyiben az egyed mindkét allélra homozigóta volt, akkor a legkisebb négyzetes OR átlag 2,27-el múlta felül a nemhordozók ovulációs teljesítményét.

A direkt génteszt eredménye a nőivarban

A jelenlegi nőivarú állomány (n=138) 37,41%-a BB homozigóta, 43,88%-a B+ heterozigóta és 18,71%-a homozigóta ++ genotípusúnak bizonyult a direkt génteszt vizsgálatok alapján. A hordozók az állományban összesen 81,29%-ot tesznek ki.

A direkt génteszt eredménye a hímivarban

Összesen 49 tenyészkos booroola genotípusát határoztam meg. A kosok $FecB$ genotípus szerinti megoszlása az 4. 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.

4. 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 kétféle szövetmintából (vér és ondó) is elvégeztem 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.

A direkt génteszt és a markervizsgálatok eredményeinek összehasonlítása

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

A χ^2 próba eredményeként a marker genotípusok FecB genotípus csoportokon belüli eloszlása szignifikánsnak bizonyult $P < 0,1\%$ -os megbízhatósági szinten.

A genotípus megoszlások szerint 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 marker allélra a homozigóta genotípusú egyedek között egyaránt előfordultak B⁺ heterozigóta és ++ homozigóta egyedek is. A BB genotípusú egyedek 88,2%-a az OarAE101 markerre 87/87 homozigóta, a BM1329-es markerre pedig 77,6%-a 158/158 homozigóta, 17,7%-a pedig 158/164-es genotípusú (5. táblázat).

A magyar merinóban legnagyobb arányban megtalálható mikroszatellit allélok (91-es 0,78; a 160-as allél 0,435 gyakorisággal) azok, amelyek elsősorban a vad típusú booroola alléllal öröklődtek kapcsolatosan a szapora merinó állományban. 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. 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. táblázat: A FecB genotípusokon belüli marker genotípusok eloszlása a szapora merinó állományban (n=egyedszám, a zárójelben szereplő érték a marker genotípus gyakorisága a FecB genotípuson belül)

OarAE10 1 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 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. 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. 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.

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 *FecB* genotípusát 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. A génteszt eredménye szerint a vizsgált 4 kos közül csak egy bizonyult homozigótának, a többi egyszerűen hordozta a *Fec^B* allélt, ellentétben az új-zélandi tenyésztők becslésével, mely szerint valamennyi kos homozigóta formában hordozza a *Fec^B* allélt.

1988-1993 között ivadékvizsgált kosok esetében a csengerben tenyésztett, booroola mutációt nem hordozó magyar merinó anyajuhok párosításából született leányutódok ovulációs ráta értékét vették figyelembe. A leányutódok OR értékét 6 hónapos korban, PMSG-val való kezelést követően határozták meg. Az így kapott eredmény alapján becsülték a tenyészkosok genotípusát. A vizsgált 11 kos közül 5 esetben 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 esetben azonban

túlbecsülték. Homozigótának értékelték az egyedeket, 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.

További 10 tenyészkos feltételezett genotípus eredménye is a rendelkezésemre állt. Ezen egyedek $FecB$ genotípusát a kosok leányutódainak PMSG kezelés nélkül meghatározott ovulációs rátája, illetve a szülők genotípusa alapján határozták meg a tenyésztők. A 10 tenyészkos közül 8 esetben jól becsülték a genotípust. A másik két esetben viszont egy nemhordozót 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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Ovulációs ráta vizsgálatok

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 az egyes mikroszatellit marker allélok előfordulása jelentősen eltért, és a különbség $P < 0,1\%$ hibaszázalék mellett szignifikánsnak bizonyult.

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

A marker genotípus és az ovulációs ráta közötti varianciaanalízis eredménye alapján az OarAE101 mikroszatellit lókusz 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 mutációt hordozónak minősültek.

- Esetükben a kapcsoltság családonként változik.

A BM1329 mikroszatellit marker szignifikánsan befolyásolta az ovulációs ráta alakulását.

- Az eredmények arra utalnak, 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 a vad típusú Fec^+ alléllal kapcsolt.
- A kapcsoltsági viszonyok megváltozását igazolják a rekombinációs esetek vizsgálatának eredményei. Az állományban előforduló, összesen 80 informatív meiózisból 13 volt rekombináns, ami 16,25%-os előfordulást jelent.

A marker genotípusok $FecB$ genotípus csoportokon belüli eloszlása szignifikáns volt $P < 0,1\%$ mellett, vagyis az eloszlás nem a véletlennek köszönhető, a marker genotípusok eloszlása a booroola genotípustól függően változik. A marker genotípus eloszlások a $FecB$ genotípus csoportokon belül a csak marker és ovulációs ráta eredmények alapján tett feltételezéseimet támasztották alá, miszerint:

- A szapora merinó állományban legnagyobb arányban a 87-es, valamint a 158-as és 164-es allélok öröklődnek kapcsoltan a booroola alléllal.
- A vad típusú Fec^+ allél elsősorban a 91-es, valamint a 160 és 162-es marker allélokhöz kapcsolt.
- A mikroszatellit markerekre vonatkozóan összességében megállapítható, hogy a vizsgált szapora merinó állományban populáció szinten egyértelmű kapcsoltsági viszony nem mutatható ki a marker allél és a Fec^B allél között. Ez csak családi szinten határozható meg.

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 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 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.

Természetesen ++ és B+ egyedek jelentősebb arányú jelenlétének oka lehet még a hibás származás, vagy esetleg a kis egyedszám miatt, egyéb tulajdonságai alapján (sűrítve ellethetőség, szarvatlanság, nagyobb

súlygyarapodás) értékesebbnek bizonyult nemhordozó egyedek állományban tartása.

- Az ismételt vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy az általam alkalmazott, külföldi szakirodalomból átvett direkt génteszt módszer segítségével teljes bizonyossággal határozható meg az egyed FecB genotípusa, mind vér, mind ondó minta esetén.

5. 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 nyomkövetésére.
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 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%.
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.

6. 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 megtudtam határozni. Így a jövőben, mesterséges termékenyítéssel a biztosan homozigóta BB genotípusú egyedek használatát tudom javasolni.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

1./ Lektorált tudományos közlemények:

Árnyasi M. - Zsolnai A. - Fésűs L. - Jávor A. - Lengyel A. - Pászthy Gy.: Molekuláris genetika vizsgálatok a debreceni szapora és a kaposvári booroola merinó állományban. Tiszántúli Mg. Tud. Napok, Debrecen, 1999. okt. 28-29. 99-103.p.

Árnyasi M.: Molekuláris genetikai vizsgálatok a gazdasági állatfajok termelési eredményeinek javítása érdekében. Agrártudományi Közlemények, Debrecen. 2001. 1. 92-96. p.

Árnyasi M. – A, Zsolnai – A, Jávor – L, Fésűs – Gabriella, N. Dankó – K, Magyar - J, Dohy: Possibility of MAS for FecB gene in the Hungarian Prolific Merino sheep. Prospect for the 3rd Millenium Agriculture Symposium, Oct. 25-27, 2001, Cluj- Napoca, Vol.:55-56, 108-112.

Novotni-Dankó, G. – **Árnyasi, M.:** Szaporodásbiológiai folyamatok és genetikai háttér ellenőrzése a szapora merinó juhajtánál. Innováció, a tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumban. Nemzetközi konferencia, Debrecen, 2002. április 11-12. 26-30.p.

2./ Konferencia előadások és posztterek:

Árnyasi M.: A tenyésztési munka hatékonyságának növelési lehetőségei molekuláris genetika módszerekkel. V. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely, 1999. március 11. 204-207.p.

Árnyasi M. - Zsolnai A. - Fésűs L. - Jávor A. - Lengyel A. - Pászty Gy.: A FecB lokuszhoz kapcsolt OarAE101 és BM329 mikroszatellit markerek vizsgálata hazai szapora merinó és booroola állományokban. Poszter. XLI. Georgikon Napok, Keszthely, 1999. szeptember 23-24. 193-196.p.

Árnyasi M. - Zsolnai A. - Fésűs L. - Jávor A.: A FecB lokuszhoz kapcsolt OarAE101 és BM1329 mikroszatellit marker allélok gyakorisága a debreceni szapora merinó állományban. Állattenyésztés és Takarmányozás, 1999. Vol. 48. 6. 708-710.p.

M. Árnysai - A. Zsolnai - L. Fésűs - A. Jávor: Survey of allele occurrences of DNA marker-loci used in the selection of the Hungarian Prolific Merino sheep. 27th International Conference on Animal Genetics. Minneapolis. July 22-26. 2000. p. 23.

M. Árnysai - A. Zsolnai - L. Fésűs - A. Jávor: Using of DNA markers in the selection of the Hungarian Prolific Merino sheep. EAAP - 51th Annual Meeting. 21-24. August 2000. p.12.

Novotniné-Dankó, G. – **Árnysai, M.** (2003): Szapora merinó: múlt, jelen, jövő. Az állattenyésztés szolgálatában, Tudományos ülés. 2003. szeptember 11. Debrecen. p.123-133.

Árnysai, M. – Zsolnai, A. – Fésűs, L. – Jávor, A. (2003): Importance of discovery of FecB gene in the breeding of Hungarian Prolific Merino. International Symposium Prospects for the Agriculture of the 3rd Millennium. October 9-11, 2003 Cluj-Napoca, Romania. In press.

3./ Ismeretterjesztő cikkek:

Árnysai M. - Jávor A.: Angol szabályok, avagy már megint túlszárnyaltuk őket. Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 9. 8. 2000. Budapest. 12-14.p

Jávor A. – **Árnysai M.** – Kukovics S.: Feladatok a juhtenyésztés genetikai fejlesztésében. Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 9. 8. 2002. Budapest. 7-8. p.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉN KÍVÜLI PUBLIKÁCIÓK

1. Könyv, könyvrészlet:

Molnár Gy. - Várszegi Zs. - **Árnysai M.** - Jávor A.: A bárány, mint végtermék. in: Tenyésztési- és Fajtahasználási útmutató. Szerkesztette: Jávor A. - Fésűs L. Debrecen - Szikszó - Herceghalom. 2000.107-129.p.

2./ Lektorált tudományos közlemények:

A. Jávor – S. Kukovics – A. Nábrádi – Zs. Várszegi – **M. Árnysai** – Gy. Molnár: The fat and protein content of the sheep milk under different conditions. Options méditerranéennes. Serie A: Séminaires Méditerranéennes. CIHEAM/FAO, Zaragoza, 2000. No: 43., 69-74.p.

A. Nábrádi – A. Jávor – S. Kukovics – Gy. Molnár – **M. Árnysai** – Zs. Várszegi: Economic necessity for developing the milk sector. Options méditerranéennes. Serie A: Séminaires Méditerranéennes. CIHEAM/FAO, Zaragoza, 2000. 43. 75-78.p.

3. Konferencia előadások és poszterek:

Molnár Gy. - Jávor A. - Várszegi Zs. - **Árnysai M.** - Kukovics S.: A bárányok húsmínőségének javítási lehetőségei az Európai Unió csatlakozás jegyében. XXVII. Óvári Tudományos Napok. I. Kötet. Mosonmagyaróvár, 1998. 111-116. p.

Jávor A. - Nábrádi A. - Madai H. - Várszegi Zs. - **Árnysai M.** - Molnár Gy.: Piac- és árérzékenység a juhászatban. XXVII. Óvári Tudományos Napok. II. k. Mosonmagyaróvár, 1998. 423-428. p.

Molnár Gy. - Jávor A. - **Árnysai M.** - Rózsáné Várszegi Zs. - Harcsa A.: Különböző juhajták húsmínősége. Szeged, IV. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia. 2000. 27-28.p.

4./ Ismeretterjesztő cikkek:

Várszegi Zs. - Molnár A. - Molnár Gy. - Jávor A. - **Árnysai M.** - Rózsa S. - Gaál S.: Miért is van szükség a minőség javítására? Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 1998. Vol.7. No.6. 4-5. p.

Jávor A. - Nábrádi A. - Madai H. - Várszegi Zs. - **Árnysai M.** - Molnár Gy.: Piac- és árérzékenység a juhászatban. Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 1998. Vol.7. No.7. 3-4. p.

Jávor A. - Nábrádi A. - Madai H. - Molnár Gy. - Várszegi Zs. - **Árnyasi M.**: A tejágazat fejlesztésének gazdasági szükségessége. Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 1998. Vol.7. No.7. 5. p.

Jávor A. - **Árnyasi M.** - Várszegi Zs. - Molnár Gy.: Juhtejtermelés és beltartalom. Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 1998. Vol.7. No.8. 4-5. p.

Jávor A. - Nábrádi A. - Fenyvessy J. - Molnár Gy. - **Árnyasi M.** - Várszegi Zs.: A versenyképes minőség. Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 1998. Vol.7. No.8. 6-7. p.

Árnyasi M. - Várszegi Zs.: Konferencia Görögországban. Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 1998. Vol.7. No.11. 4-5.p.

Árnyasi M.: Kevi Juhfesztivál Túrkevén. Magyar Juhászat + Kecsketenyésztés. A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 1999. Vol.8. No.6. 6.p.