

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉSTUDOMÁNYI TANSZÉK

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: **Dr. Kovács András** MTA doktora

Témavezetők:

Dr. Jávor András C.Sc.
egyetemi tanár

Dr. Bősze Zsuzsanna Ph.D., D.Sc.
MTA doktora

**A genetikai távolság becslése cigája és zackel fajtakörbe tartozó
juhállományok között,
valamint
három nem klasszikus immungén kifejeződés és polimorfizmus vizsgálata
sertésben**

Készítette:

Bátoriné Kusza Szilvia
doktorjelölt

**Debrecen
2006**

**A genetikai távolság becslése cigája és zackel fajtakörbe tartozó
juhállományok között,
valamint
három nem klasszikus immungén kifejeződés és polimorfizmus vizsgálata
sertésben**

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

Írta: **Bátoriné Kusza Szilvia** doktorjelölt

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:	Dr. Kovács András	D.Sc.
Tagok:	Dr. Kukovics Sándor	C.Sc.
	Dr. Fenyvessy József	C.Sc.

A doktori szigorlat időpontja: 2006. június hó 23.

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat	Aláírás
.....
.....

A bíráló bizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:
Pótelnök:
Titkár:
Tagok:

Az értekezés védésének időpontja:

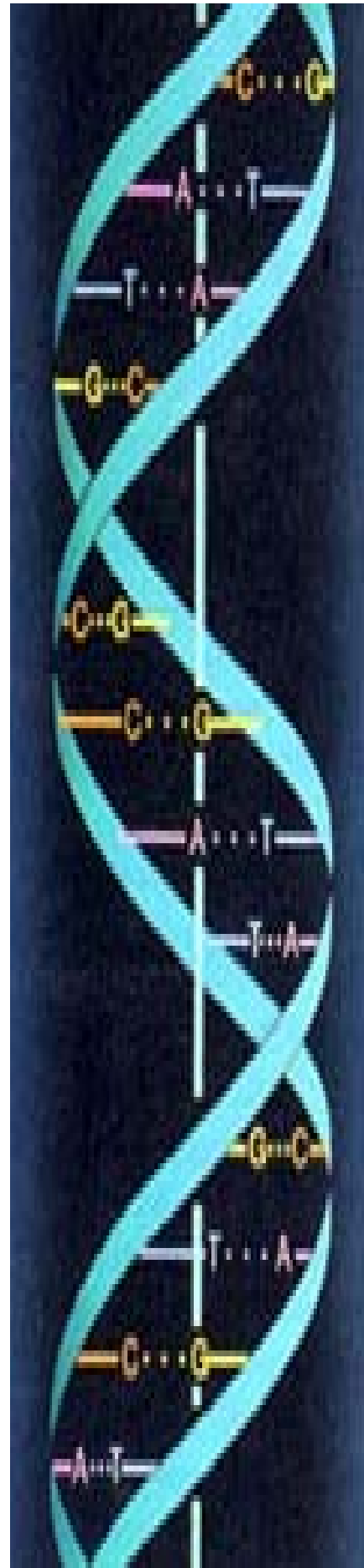
TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés.....	6
1.1. Bevezetés.....	7
1.2. Témafelvetés.....	9
1.3. Célok.....	12
2. Irodalmi áttekintés.....	13
2.1. A cigája jelentősége Magyarországon.....	14
2.1.1. A cigája hazánkba kerülése.....	17
2.2. Néhány cigája és zackel fajtakörbe tartozó fajta fenotipusos eltérésének bemutatása.....	18
2.3. A fajta létszáma, veszélyeztetettségi besorolása.....	30
2.4. A cigája állományok keresztezései.....	31
2.5. A cigája termékei.....	31
2.5.1. Tej.....	32
2.5.2. Hús.....	34
2.5.3. Gyapjú.....	35
2.6. Genetikai távolság vizsgálatok.....	35
2.6.1. A genetikai vizsgálatok „alapja”.....	36
2.6.2. Leggyakrabban alkalmazott módszerek bemutatása genetikai távolság meghatározásra különböző állományok között.....	38
2.6.2.1. Vércsoport és fehérje polimorfizmus vizsgálat.....	40
2.6.2.2. DNS hibridizáció.....	41
2.6.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR).....	42
2.6.2.4. Szekvenálás.....	44
2.6.2.5. Véletlenszerűen Amplifikált Polimorf DNS (RAPD).....	45
2.6.2.6. Amplifikált Fragment Hossz Polimorfizmus (AFLP).....	45
2.6.2.7. Restriktív Fragment Hossz Polimorfizmus (RFLP).....	46
2.6.2.8. Egyszerű Szekvenancia Hossz Polimorfizmusok (SSLPs).....	46
2.6.2.8.1. Miniszatellit (Variable number of tandem repeats, VNTR).....	47
2.6.2.8.2. Mikroszatellit (Simple Sequence repeats, SSR; Short Tandem Repeat, STR).....	47

2.6.2.8.2.1.	Cigája állományok genetikai távolság meghatározására vonatkozó vizsgálatok mikroszatellit markerek használatával.....	49
2.6.2.9.	A mtDNS vizsgálata.....	49
2.6.2.10.	Egyszerű Nukleotid Polimorfizmus (SNP).....	50
2.7.	Az immunrendszer és az MHC gének rövid, általános bemutatása.....	51
3.	A vizsgálatok anyaga és módszere.....	57
3.1.	A becsült genetikai távolság vizsgálat anyaga és módszere.....	58
3.1.1.	A genetikai távolság vizsgálat anyaga.....	58
3.1.2.	A mintavétel anyaga és módszere.....	60
3.1.2.1.	Vérmintavétel.....	60
3.1.2.2.	Gyapjúmintavétel.....	60
3.1.3.	A genomiális DNS izolálás anyag és módszere.....	60
3.1.3.1.	Genomiális DNS izolálása vérből.....	61
3.1.3.2.	Genomiális DNS izolálása hajhagymából.....	61
3.1.4.	Polimeráz lánreakció (PCR).....	62
3.1.5.	A mikroszatellit allélok meghatározása kapilláris-elektroforézissel.....	66
3.1.6.	A labor vizsgálatok után alkalmazott statisztikai módszerek.....	66
3.1.6.1.	Az adatok statisztikai értékelése során alkalmazott programok..	67
3.2.	A sertés nem klasszikus immungének vizsgálatának anyaga és módszere.....	68
3.2.1.	Génkifejeződés vizsgálat.....	68
3.2.1.1.	RNS vizsgálathoz szövetmintavétel.....	68
3.2.1.2.	RNS izolálás.....	68
3.2.1.3.	Primer tervezés, kiválasztás és génspecifitásuk ellenőrzése.....	69
3.2.1.4.	A reverz transzkriptáz reakció.....	72
3.2.1.5.	Abszolút kvantifikáció.....	73
3.2.1.6.	Relatív kvantifikáció.....	74
3.2.2.	Polimorfizmus vizsgálat.....	74
3.2.2.1.	Genomiális DNS izolálás.....	74
3.2.2.2.	SNP detektálás.....	76
3.2.2.3.	Adatelemzés.....	78

4. Vizsgálati eredmények és azok értékelése.....	79
4.1. A becsült genetikai távolság vizsgálat eredményei a cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállományok között	80
4.2. Az SLA-6, -7 és -8 gének vizsgálatának eredményei.....	92
4.2.1. A génexpresszió vizsgálat eredményei.....	92
4.2.2. A sertés nem klasszikus MHC I gének polimorfizmus vizsgálatának eredményei.....	107
5. Következtetések.....	111
5.1. Következtetések, új tudományos eredmények.....	112
6. Összefoglalás.....	116
Summary.....	120
7. A szakirodalom jegyzéke.....	123
8. Melléklet.....	139
Rövidítések jegyzéke.....	141
Ábrák jegyzéke.....	143
Táblázatok jegyzéke.....	145
Képek jegyzéke.....	146
Köszönetnyilvánítás.....	147
Nyilatkozatok.....	149

1. Bevezetés



1.1. Bevezetés

A biotechnológiai kutatások rendkívül intenzív fejlődése az 1970-es években indult meg, a DNS rekombináció alkalmazása révén. Ezáltal lehetőség nyílt az élő szervezetek genetikai anyagának egyik szervezetből másikba való átvitelére, fajidegen gének bejuttatására, a genetikai anyag módosítására. Az adott szervezettel számára idegen gének bejuttatásával a gazdasági állatokat intenzívebb termelésre, különleges minőségű, összetételű termék előállítására tudjuk készíteni. Így a biotechnológia révén beavatkozunk az élő szervezet normális működésébe a számunkra kedvező cél érdekében. Ez a cél a termelékenység növelése mellett, lehet a betegség rezisztencia fokozása vagy akár a xenotranszplantáció is, amelyek révén az orvostudományt szolgáljuk.

A biotechnológiai kutatások sok esetben az elméleti haszon mellett gazdasági haszonnal is járnak. Gyakran nagy, világszerte ismert cégek szponzorálják a kutatásokat, mivel a kapott „termékek” szabadalmaztathatóak. A nagyobb gazdasági haszon érdekében egyre több kísérlet folyik a tudományos mellett ipari céllal is, mind nagyobb tömegű, új termék előállítására törekszenek a laboratóriumok.

A biotechnológiai módszerek alkalmazásával az ember egyre inkább beavatkozik a természetes szelekciós folyamatokba, kiszorítja a hagyományos termelési módokat. Ma már csak azokat a fajtákat tartjuk meg a növénytermesztésben és az állattenyésztésben is, amelyek bizonyos tulajdonságaik által számunkra a legkedvezőbbek, így azonban a genetikai sokféleséget nagy mértékben lecsökkentjük. Pedig sok esetben az egyre inkább kiszoruló hagyományos fajták, az azokból készült termékek egészségesebbek, ízletesebbek, mint a manipulált, nagyobb hozamú fajtáké. Napjainkban egyre többen ismerik fel ezt, és egyre fontosabbá válik a termékek eredetvizsgálata. Ma még nem ismert veszélyeket hordoz az emberrel közvetlenül érintkezésbe kerülő génmanipulált termékek hatása az egészségre sem.

Világszerte egyre népszerűbb az ökológiai szempontokat érvényesítő biogazdálkodás. Egyre nő a biohús illetve más biotermékek iránti kereslet. Ezt kihasználva a magyar mezőgazdaság egyik kitörési pontja lehet a biogazdálkodás. A biotermékek iránt egyre nagyobb a fizetőképes kereslet. A magyar biotermékek 90 százaléka ma még az EU országokban kerül értékesítésre, aminek az az oka, hogy a hazai fogyasztók nem fizetik meg a 30-50 százalékkal magasabb árat. A Magyarországon is tenyésztett tejelő típusú

cigája jelentős szerepet kaphat a hazai juhtejtermelésben versenyző különböző genotípusok között.

Dolgozatomban két kutatási területen két háziállatfajjal végzett vizsgálataimat kívánom bemutatni. Az egyik, genetikai távolság meghatározás cigája és zackel fajtakörbe tartozó juh állományok között mikroszatellit markerek alkalmazásával. A másik az immunogenetika tudományágba tartozik. Ez a nem klasszikus fő (major) hisztokompatibilitási antigének (MHC) kifejeződésének és polimorfizmusának vizsgálata sertés fajban. A két téma igen távolinak tűnik egymástól, azonban ezzel jól szemléltetjük a biotechnológiai kutatások széles körű alkalmazásának lehetőségét.

1.2. Témafelvetés

A világon hazánk az első országok között volt ahol felismerték, hogy kulturális és szakmai szempontból is fontos feladat a háziállatfajták megmentése, a teljes genetikai variancia megőrzése és a különböző genotípusok szerepének, arányának beállítása. Ezt a törekvést a FAO és az Európai Állattenyésztők Szövetségében a magyar tagság, elsősorban Prof. Dr. Bodó Imre szorgalmazta. Hazánkban az előző évtizedekben szinte teljesen felszámolódtak a racka, cigája és cikta tenyészetek, s csak az utóbbi évtizedben kezdett el nőni újra a racka és a cigája állományok létszáma. A biológiai sokféleség fenntartásának előtérbe kerülésével, a környezetkímélő gazdálkodással tenyésztésük egyre inkább elterjed, az extenzív tartásnak ezek a fajták felelnek meg leginkább (OLÁH, 2002). Ma már nem tudjuk pontosan, hogy ezekben a fajtákban eredetileg milyen gének és milyen gyakorisággal fordultak elő, csak feltételezzük, hogy a mainál több gén volt jelen, így a gének további elvesztését is meg kell akadályoznunk (FÉSÜS, 1997a). Más irányú kötelezettségünk az őshonos fajták fenntartása és értékmérőinek, sajátosságainak javítása (VERESS és mtsai, 1995).

Az ENSZ Rio de Janeiro-i Környezet és Fejlődés Konferenciája 1992-ben a háziállatokat is a védendő biológiai értékek közé sorolta. A géntartalékok védelme hazánkban a mindenkori központi állattenyésztési irányítás (OTÁF, ÁTMI, OMMI) hatáskörébe tartozik. Az 1993-ban jóváhagyott, CXIV. Állattenyésztési Törvény 11. paragrafusa rendelkezik a háziállatokban meglévő biológiai sokféleség védelméről. A törvény kimondja, hogy azok a háziállatfajták, amelyek Magyarország természetföldrajzi környezetében alakultak ki, illetőleg tartásuknak, tenyésztésüknek hagyománya van nálunk, nemzeti értéket képeznek és mint ilyenek támogatandók (BODÓ, 2001).

A cigája hazánk területére az 1700-as években került. A posztógyárak igénye arra ösztönözte az erdélyi gazdákat, hogy a durva gyapjas curkánt a finomabb gyapjat termelő cigájára cseréljék (RODICZKY, 1904; cit.: GÁSPÁRDY, 2002). A cigáját új fajtaként először az 1896-ban Budapesten rendezett milleniumi állatkiállításon mutatták be a szakmai közönségnek (GÁSPÁRDY, 2001a). A 19-20. században a Kárpát-medencében alakult ki a hármashasznú -tejlő- hús-gyapjú- cigája (csókai) típus, melyet már korszerű kultúr fajtaként törzskönyveztek a két világháború között. A cigája sok változatát tenyésztik a kelet-közép európai országokban és tájegységekben. Ezek között jelentős különbségek vannak testméretükben, testsúlyukban, termelésükben és

színükben is. Ma Magyarországon kétféle cigáját különböztetünk meg, az őshonos és a tejtermelésre szelektált zombori változatot. Ezek között számos átmeneti típus van (KUKOVICS és mtsai., 2003). Nagy- Szerbia területén a bácska-, bánáti régiókban az extenzívebb csókai valamint a nagyobb testű, jobban tejelő zombori változatot tenyésztik. Az utóbbi hazai képviselője a Lédeci-féle állomány (DUNKA, 1997). Az erdélyi cigája dongásabb, viszonylag rövid lábú, a kovásznai változat barnás vörhenyes pofájú és lábú (GÁSPÁRDY, 2001a). Bulgáriában is két fő típusa van, az észak-nyugati és a dél-bulgáriai (DIMOV, 2000; cit.:KUKOVICS és JÁVOR, 2002a). Ma már a cigája fajtaváltozatok Dél-Kelet-Európában mindenhol megtalálhatóak. A különböző fajták illetve változataik közötti különbségekről szóló adatok a mai napig elsősorban morfológiai bélyegeken alapulnak. Korábban az őshonos és a tejelő változat közötti különbség kimutatására a fajta vércsoport és fehérje polimorfizmus rendszerét vizsgálták (FÉSÜS, 1974). Ma a genetikai távolság becslésére –jobb hatékonysága, nagyobb megbízhatósága miatt- a genetikai markerek (pl. mikroszatellit) használata terjedt el. A DNS mikroszatellit markereken alapuló vizsgálatok, melyek gyorsan, könnyen elvégezhetőek, jóval pontosabb információt adnak a becsült genetikai távolságok meghatározására a fajták között (BARKER és mtsai., 1997; MACHUGH és mtsai., 1997). Az utóbbi időben a juh és kecske fajták genetikai vizsgálata során főleg szarvasmarha mikroszatellit markereket használtak (VAIMANN és mtsai., 1994; PEPIN és mtsai., 1995; ELLEGREN és mtsai., 1997). A molekuláris genetikai módszerekkel nyert információk génmegőrzésben való közvetlen használata körül ma még nem egységes az álláspont. Eleinte azokat tekintették a legértékesebb fajtának, amely leginkább eltért markerek tekintetében a többitől. Ma azonban a megőrzendő állomány belső genetikai szerkezetét tartják a fontosabbnak (HIDAS, 2002). A molekuláris genetika területén a genomanalízisek, géntérképezés is segíti az egyedek azonosítását, genetikai szerkezetük jobb megismerését, egymástól való genetikai távolságuknak minél pontosabb feltárását (DOHY, 1999). A Föld sok országában folynak kutatások, az őshonosnak tekintett juh fajták eredetének, más fajtákkal való rokonságának meghatározására (Spanyolország - AVELLANET-TORRES, 2002; ARRANZ és mtsai., 1998,2001; Horvátország - BRADIC,2003, 2005; Szerbia - CINKULOV, 2004; Kína - LI és mtsai, 2004; Olaszország - PARISET és mtsai., 2003; Dél-Afrika - BUDURAM és mtsai., 2005).

Mint ahogy a bevezetőben is említettem, a biotechnológiai, genetikai kutatások célja a xenotranszplantáció is lehet. A szervátültetés gondolata különböző állatfajokból emberbe már régóta foglalkoztatja az emberiséget. Kezdetben elsősorban sertéssel próbálkoztak, azonban voltak kísérletek páviánok szívével és csimpánzok veséjével is emberi életek meghosszabbítására. Azonban nagyon fontos érv a sertés mellett, hogy annak a szerveinek a mérete hasonló az emberéhez és kevesebb közös kórokozójuk van az emberrel, mint a főemlősöknek.

Mind az állat mind a humán genetikai kutatások között nagy figyelmet kapnak és érdekelnék a xenotranszplantáció vizsgálatának eredményei. A kutatás során egyik fajtól a másikba irányuló szövetek vagy szervek átültetése során fellépő kilökődések okait, mechanizmusát vizsgálják. Az átültetett állati szerv, szövet sejtfelszíni azonosítói a recipiens (befogadó) immunrendszere számára ellenséget jelentenek, így azonnal megindul ellenük a védekezés. A hisztokompatibilitási antigének határozzák meg, hogy az átültetett szerv vagy szövet immunológiailag kompatibilis-e a recipiensevel. Amennyiben nagyon különbözik, az azonnali kilökődést kiváltó fő hisztokompatibilitási antigének lépnek működésbe (ezeket kódoló gének az MHC régióban találhatóak). Ha a kilökődést sikerülne is elkerülnünk nem tudjuk, hogy a rövidebb élettartamú állatok szervei mennyi ideig lennének használhatóak a hosszabb élettartamú ember szervezetében vagy mindig „cserélni” kellene-e őket. Illetve az állati horizontális helyzetű szív képes lenne-e a függőleges tartású emberben megfelelő erővel pumpálni? A xenotranszplantáció során szem előtt kell tartanunk azt is, hogy különböző fajok szervezett és összehangolt immunológiai működésébe avatkozunk be. Vannak fajok melyek számára egyes kórokozók elleni védekezés jelentéktelen, míg mások számára ugyanaz halálos kimenetelű. Számos állati vírus szerkezetileg, viselkedésében hasonlít az emberi vírusokra, és néhányról bebizonyosodott, hogy képes átkereszteződni emberekre is.

Nagyon sok betegség iránti fogékonyság összefüggésben van bizonyos MHC gének alléljával. Az MHC-géntermékek szerkezetének és a molekula funkciójának megismerése új terápiás próbálkozásokhoz vezetett (MHC-terápia), melynek során a betegségre jellemző MHC-molekula megfelelő részével történő immunizálással az adott MHC-allélre specifikus immunválaszt váltanak ki abban a reményben, hogy ez az autoantigén prezentálását megakadályozva fajlagosan állítja le az autoimmun betegséget kiváltó folyamatot (GERGELY, 2000). Az MHC génekről való szélesebbkörű ismeret sokban hozzájárulna a xenotranszplantáció során felmerülő akadályok leküzdésében.

1.3. Célok

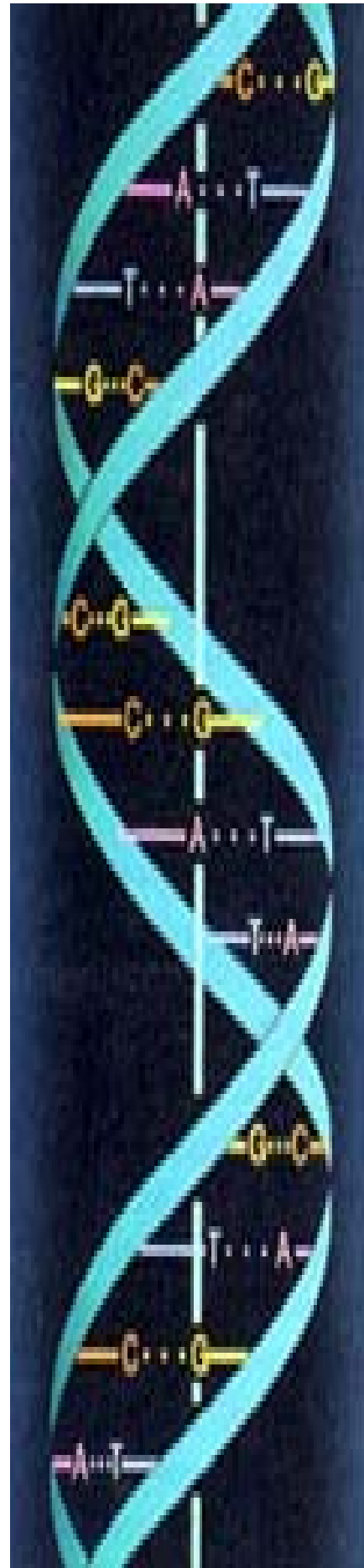
Dolgozatom genetikai távolság becslés részének céljai a következők voltak:

1. olyan mikroszatellit markerek kiválasztása amelyekkel a cigája és zackel fajtakörbe tartozó állományok genetikai távolság vizsgálata könnyen és pontosan elvégezhető;
2. a kiválasztott mikroszatellit markerekkel meghatározni a genetikai variabilitást, genetikai rokonságot, különbséget a vizsgálatba vont állományok között;
3. eredményeink összevetése mások vizsgálatának eredményeivel;
4. meghatározni, hogy a földrajzi elkülönülés idővel együtt jár-e genetikai elkülönüléssel.

A dolgozat immunogenetikai részében a következő célkitűzéseink voltak:

1. génspecifikus, eredményesen használható primerek tervezése a génkifejeződés és polimorfizmus vizsgálathoz;
2. az MHC Ib gének kifejeződésének vizsgálata különböző korú és ivarú sertések esetében mRNS szinten;
3. az MHC Ib gének polimorfizmus vizsgálata különböző fajtájú sertések bevonásával.

2. Irodalmi áttekintés



2.1. A cigája jelentősége Magyarországon

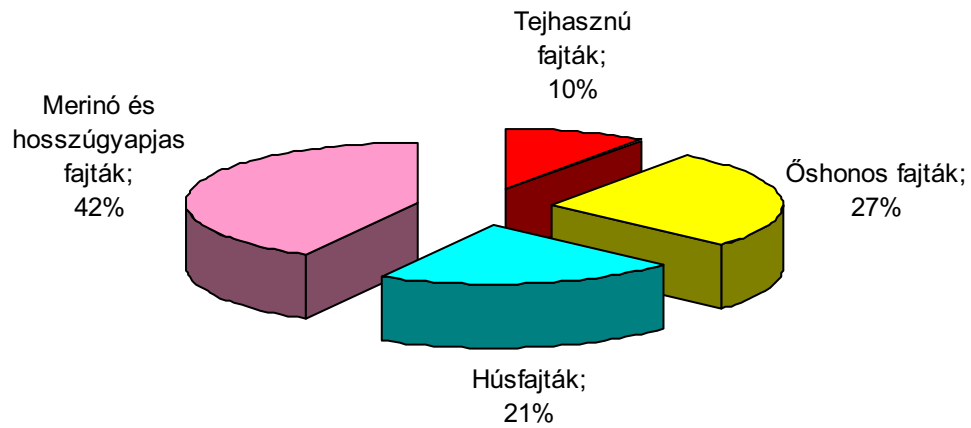
Magyarországon négy olyan, őshonos fajtaként nyilvántartott juh fajta létezik amelyet meg kell őriznünk. Ezek egyike a legősibb fajtának tekintett magyar racka, másik kettő – az őshonos cigája és a cikta- ugyan máshonnan került hozzánk, de az évszázadok alatt mindkettőt nálunk tenyésztették és nemesítették tovább (GÁSPÁRDY, 2001b).

A 18. század végétől kezdődően az őshonos állományokat a merinó juh háttérbe szorította, elsősorban a kiváló gyapjútermelése miatt. Már szinte teljesen felszámolódtak a hagyományos fajtákat tartalmazó állományok, amikor központi segítséggel, az állami génmegőrzési program keretében sikerült a megmaradt állományt fenntartani (BODÓ és mtsai, 2002).

A biodiverzitás jelentőségének, fenntartásának előtérbe kerülésével, valamint a környezetkímélő gazdálkodással a hagyományos juh fajták tenyésztése egyre inkább elterjed, mivel ezek a fajták felelnek meg leginkább az extenzív tartásnak (OLÁH, 2002). Az őshonos populációk általában nagyon kicsik, fenntartásuk a hagyományos tenyésztési módszerekkel nem mindig könnyű. Fontos, hogy az egyes fajtákban jelenleg meglévő géneket megőrizzük. Ma már nem tudjuk, hogy ezekben a fajtákban eredetileg milyen gének és milyen gyakorisággal fordultak elő, csak feltételezzük, hogy a mainál több gén volt jelen, így a gének további elvesztését meg kell akadályoznunk (FÉSÜS, 1997b).

A magyarországi törzskos nyilvántartásban szereplő tenyészkosok megoszlása fajtacsoportonként 2005-ben az alábbiak szerint alakult (1. ábra):

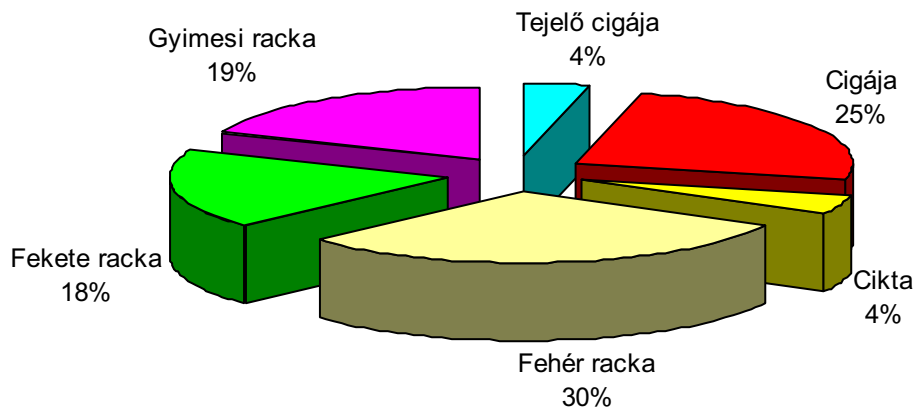
1. ábra: Törzskönyvi nyilvántartásban szereplő tenyészkosok fajtcsoportonkénti megoszlása



Forrás: Magyar Juhtenyésztő Szövetség, 2005

Őshonosként a törzskönyvi nyilvántartásban szereplő kosok fajtánkénti megoszlását a 2. ábra mutatja:

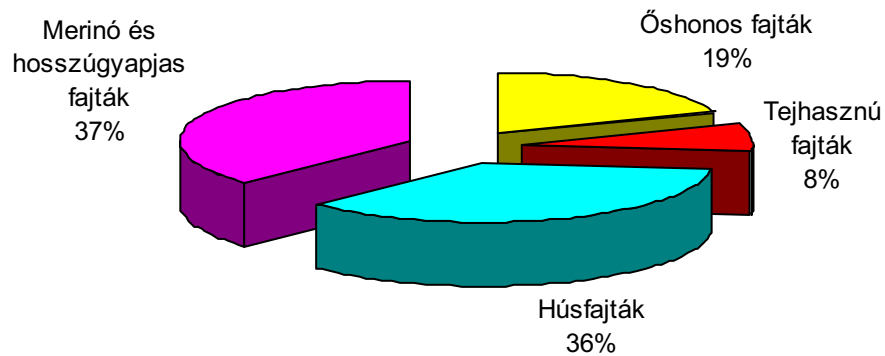
2. ábra: Őshonosként nyilvántartott tenyészkosok fajtánkénti megoszlása



Forrás: Magyar Juhtenyésztő Szövetség, 2005

A magyarországi törzskönyvi ellenőrzésben szereplő anyajuhok megoszlása fajtacsoportonként 2005-ben az alábbiak szerint alakult (3. ábra):

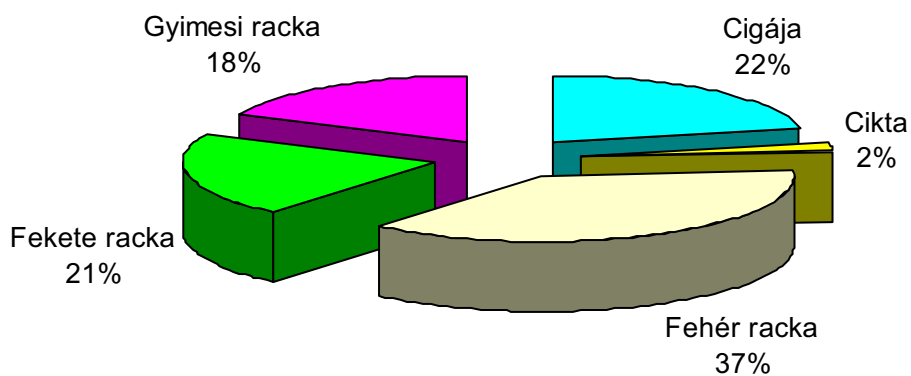
3. ábra: Törzskönyvi nyilvántartásban szereplő anyajuhok fajtacsoportonkénti megoszlása



Forrás: Magyar Juhtenyésztő Szövetség, 2005

Óshonosként nyilvántartott anyajuhok fajtánkénti megoszlását a 4. ábra mutatja:

4. ábra: Óshonosként nyilvántartott anyajuhok fajtánkénti megoszlása



Forrás: Magyar Juhtenyésztő Szövetség, 2005

2.1.1. A cigája hazánkba kerülése

A cigája régi önálló juh fajta, annak az ősi kis-ázsiai fajtakörnek a maradványa, amelyből több kultúrfajta is származik. Közvetetten a keleti vadjuhtól vagy arkaltól (*Ovis ammon orientalis*) származik (GÁSPÁRDY, 2000).

Az ősi cigája a Balkánról felhúzódott a Kárpátok északi hegyláncáig és eljutott a magyar Alföldre, sőt az akkori Magyarország északi területeire és Bohémiába is. Egy másik része a Fekete-tenger keleti partvidékén haladva Krímben és Dél-Ukrajnában érte el tenyésztőterületét (SCHANDL, 1955, cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a). Mivel a Kárpátokban a racka, az Alföldön a merinó vált uralkodóvá ezért nagyobb életteret nem tudott hódítani magának (DUNKA, 1997).

Hazánkba a fajta az 1700-as évekbe került, mivel a hazai posztógyárak igénye és Brassó gyapjúkereskedelme arra ösztönözte az erdélyi gazdákat, hogy durva gyapjas curkán (erdélyi racka) állományait finomabb gyapjat termelő cigájára cseréljék (RODICZKY, 1904; cit.: GÁSPÁRDY, 2002). A Dunántúlra a fajta egyedei bemutatás és kipróbálás céljából megrendeléssel és szállítással kerültek a 1800-as évek második felében. A fajtát az 1896-ban rendezett budapesti millenniumi állatkiállításon mutatták be először a nagyközönségnek (GÁSPÁRDY, 2001a,b).

Az első világháború alatt a hazai cigája állomány jelentősen csökkent, mivel tenyésztőterületei külföldre kerültek. Moldáviában a cigája uralkodó fajtává vált, Romániában és Szlovákiában a második legfontosabb fajta lett, hazánkban is mindig jelen volt a juhállományunkban (1-10 százalék között), azonban vezető fajtává sohasem vált, mivel a merinót és az itt levő rackát (curkánt és változatait) nem tudta kiszorítani (KUKOVICS és JÁVOR, 2001). A háború után a cigája tenyésztése szinte csak Bács-Bodrog és Csanád, illetve Pest vármegye déli részén maradt meg. A két világháború között kedvező tulajdonságai miatt a paraszti gazdaságokban mint fejősjuh kezdett terjedni (GÁSPÁRDY, 2002).

A cigája juhról az első magyar nyelvű tanulmányt 1885-ben Szentkirályi Ákos közölte a Mezőgazdasági Szemle XI. füzetében. Festetics Imre 1819-ben –a Mendel-i cikk előtt majdnem 50 évvel- megfogalmazott néhány genetikai törvényt a cigájára alapozva (BODÓ, 2001)

2.2. Néhány cigája és zackel fajtakörbe tartozó fajta fenotipusos eltéréseinek bemutatása

Jelentős különbségek vannak az egyes változatok között testméretben (1. táblázat), testsúlyban, termelésben, színben.

1. táblázat: Testméretbeni különbségek az egyes cigája és zackel fajtakörbe tartozó változatok között

Változat	Kifejlett kos		Kifejlett anya		Forrás
	Élősúly (kg)	Marmagasság (cm)	Élősúly (kg)	Marmagasság (cm)	
albán*	44	66	37	60	FAO, 2001
bolgár*	70-85	-	50-55	-	Dimov, 2000
cseh*	65-80	72-	40-45	60-67	Matlova, 2001
magyar őshonos*	70-85	75-80	50-55	60-65	Kukovics, 2000; Gáspárdy és mtsai, 2001
magyar tejelő*	100-140	90-100	75-90	75-80	Kukovics, 2000; Gáspárdy és mtsai, 2001
mongol*	72	72	53	66	FAO, 2001
oroszigája	50-100	-	40-60	-	VERESS és mtsai., 1982
román rozsdás*	75-80	-	50-55	-	Nagy, 2000
román cigája	53,2	-	37,9	-	VERESS és mtsai., 1982
román bánáti*	90-110	-	70-75	-	Padeanu, 2001
román kovásznai*	70	-	50	-	Padeanu, 2001
szlovák*	65-75	70-75	40-45	60-65	Gyarmathy, 2000
szerb csókai*	110-120	70-85	70-75	60-75	Major, 2000
szerb pvinicki (zombori)*	130-160	85-110	90-120	75-85	Major, 2000
török sakiz	-	-	45	-	VERESS és mtsai., 1982
ukrán azovi*	-	-	70-75	-	Okhatinova, 1983
ukrán krími*	80-90	-	42-50	-	Samoilenko és mtsai., 1978
görög kivircik	-	-	38	-	www.tiho-hannover.de, 1998

Forrás: * KUKOVICS és JÁVOR, 2002a

Románia

A cigája Romániában fekete, fehér, vörösbarna és szürke színváltozatban fordul elő. 1970-ben az egész juhállomány 33,3%-át tette ki (VERESS és mtsai., 1982). Az 1980-as évek közepén 2,5 millió cigája juhot számláltak Románia területén. Azonban mára ez a létszám drasztikusan lecsökkent, és ma körülbelül 1 millió egyedet becsülnek. Romániában a tenyésztési programok a tejtermelőkéesség fejlesztését célozzák mindegyik fajtában (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

Az erdélyi cigája (ősi típus) dongásabb, viszonylag rövid lábú, hosszabb testű hegyi juh. Az idők folyamán ez a változat a magyar Alföldön zömökebbé vált, magasságában, hosszúságában, farszélességében is nőtt, szélesebbé vált (GÁSPÁRDY, 2001a,b). Az anyák szarvatlanok, a kosok szarváltak (www.tiho-hannover.de).

A cigája név eredetét nem tudjuk pontosan. Magyar területeken a román kölcsönszónak tartott cigája néven említik, de léteznek mások is, mint a berke Háromszéken, a zombori juh Bánátban, az oláh juh Gömörben. A cigája szó (tigáie) románul rövid, finom, lágy gyapjút jelent, tehát a gyapjú tulajdonságra vonatkozik (GÁSPÁRDY, 2001a). Bánátban, és a Teleorman régiókban fekete (fejű) cigáját tartanak (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

1.kép: Fekete fejű cigája Teleorman régióból



Fotó: Padeanu, I. (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a)

A barnás vörhenyes pofájú és lábú kovásznai változathoz mintegy 5000 egyed tartanak Erdélyben és 30 000 egyed Kelet-Romániában. Ennek a román neve rugine (rozsdás). Ez ismeretlen arányban merinó gént hordoz (NAGY, 2000; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

2.kép: Kovásznai „rozsdás” cigája



Fotó: Padeanu, I. (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a)

Bulgária

Bulgária eltérő földrajzi fekvésével is magyarázható (síkságok, dombok, hegyek) az eltérő juhajták jelenléte. Míg a sík területeken leginkább tejelő fajták találhatók, mint a pleveni feketefejú juh, foltos fejű maritza juh, fehér maritza juh illetve ezek keresztezései. A hegyes, dombos vidékeken a cigája, karakachaska juh és más helyi fajták a legelterjedtebbek. Az 1950-es években szovjet cigája fajtákkal keresztezték a helyi hegyi juhokat, így egy új bolgár fajta alakult ki. Ennek két fő típusa van, az északnyugati és a dél-bulgáriai. Ezek teljesen fehérek, azonban a bolgár cigájának tarka és darus változatai is vannak (KUKOVICS és JÁVOR, 2001). Egyes tenyésztők szerint nem, mások szerint a pleveni feketefejú juh is a cigája fajtakörbe tartozik. Ennek a kiderítésére a vizsgálatunkban szerepel a pleveni feketefejú és a maritza juh is. Az kétségtelen, hogy a fekete fejű, lábú szarvatlan tejelő pleveni feketefejú juhnek van a legmagasabb tejhozama, 200-500 l (www.eurocon.net). A bolgár cigája létszáma az utóbbi évtizedekben jelentősen lecsökkent, és az állományok elsősorban a Rodope hegységben találhatóak (Rodope) (TENEVA, 2005). 1999-ben a cigája létszám 432 000 egyed volt, amelyek elsősorban az ország két részén oszlanak meg. Északnyugaton a staroplaninski, míg délen a rodopski cigája változatot tenyésztik (DIMOV, 2000; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

3.kép: Bolgár cigája kos



Fotó: Dimov, D. (KUKOVICS és JÁVOR, 2002b)

Szerbia és Montenegró

A mai Szerbia és Montenegró területén juhokat már a neolitikus korban is tartottak. A cigája fajtát kizárólag a Vajdaságban tenyésztik. A néha kékesbe hajló báránybundát a Délvidéken orgona színnek (jorgován) nevezik (GÁSPÁRDY, 2001). Kifejlett korra a fejük és lábaik színe fekete lesz, a test többi részén fehér a gyapjú színe. A bácska-, bánáti területen a csókai és a zombori változatot tenyésztik. A zombori változat nagyobb súlyú és jobban tejelő, ennek a hazai képviselői Cegléden a Lédeci Benő állományát képezik. A vajdasági cigája létszám nagyobb százalékát, mintegy 30 000 egyeddel, a zombori változat teszi ki, míg a csókai változat mintegy 8000 egyedet számlál (DUNKA, 1997; MAJOR, 2000; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

Szerbia és Montenegró területén a pramenka a fő tejelő típusú juh fajta, ami a zackel fajtakörbe tartozik (70-150 kg/laktáció) (www.fao.org).

4.kép: Szerb zombori cigája



Fotó: Cinkulov, M.

5.kép: Szerb csókai cigája



Fotó: Cinkulov, M.

6.kép: Svrjljska pramenka anyajuh



Fotó: Cinkulov, M.

7.kép: Svrjljska pramenka kos



Fotó: Cinkulov, M.

Oroszország, Ukrajna

Általában a cigája változatok feje és lába sötétebb színű, de az orosz- ukrán egyedek fehérek. A fehér cigája messziről könnyen összetéveszthető a merinóval a sűrű gyapja miatt, azonban közelebbről jól látszanak a merinó nyak ráncai, amelyek viszont hiányzanak a cigájánál (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

Albánia

Albániába szerb cigája állományokból kerültek be az első egyedek. Elsősorban az ország nyugati és középső területein fordulnak elő a cigája állományok. Pontos adatok a juhok létszámáról nincsenek, de mintegy 40 000 egyedre becsülik. A FAO (2001) adatai szerint a létszám növekvő tendenciájú. A gyapjú színe fehér, a fejen is. A kosok szarváltak, míg az anyák nem. Helyi nevük Cigaja (www.tiho-hannover.de).

Albániában a cigája fajtát a dombos illetve hegyes területeken tenyésztik és elsősorban keresztezésekhez használják a helyi fajták termelőképességének fokozása céljából. A fajtatiszta cigája állomány növekszik az utóbbi években, kosokat elsősorban Szerbia és Montenegróból importálnak (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

Szlovákia

Az 1700-as években került a fajta a mai Szlovákia területére, ahol elsősorban a hegyvidéki, dombos területeken ma is jelen van mintegy 120 000-es létszámmal. Helyi neve a fajtának. cernohubka, cigaja, tigeie, tsigai, tsygaja (<http://www.uvtip.sk>). A fejük, lábaik színe barna vagy fekete, a test többi része fehér. Nagyon ritkán az egész bunda színes (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

8.kép: Szlovák cigája anyajuhok



Fotó: Kukovics, S. (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a)

Görögország, Törökország

A kivircik elsősorban Törökország nyugati, észak-nyugati részén előforduló tej és húshasznú fajta. A cigája fajtakörbe tartozik. Több színváltozata van, igen hasonlít a karnobathoz és a cigájához. A kosok szarváltak, míg az anyák szarvatlanok (MASON, 1996). Észak-kelet Görögországban, Thrace régióban is megtalálható a kivircik fajta (helyi nevén: Thraki, Kivircik). Bundája színe fehér, de a fej körül és a lábon barna, fekete foltos (www.tiho-hannover.de). A tejtermelőképeség javítása céljából a fajtát kelet-frízzelel javították (SÖNMEZ, 1977).

A görögül chios, törökül sakiznak nevezett fajta tejelőképesége jó (120-180 kg) és a szaporasága is nagy (VERESS és mtsai., 1982).

A görög szigeteken chios néven tartott fajta neve sakiz Törökországban. Ez a fajta legnagyobb valószínűséggel a görög zackel és a török zsírfarkú karamán keresztezésével jött létre (www.fao.org). Közeli rokona az awassi fajta (VERESS és mtsai., 1995).

A gokceada a zackel fajtakörbe tartozó hármashasznosítású juh fajta, mely egész Törökországban tenyésztett. A bunda színe fehér, a szemek, orr és fülek környékén fekete foltokkal tarkított. A kosok szarváltak míg az anyák szarvatlanok (www.tiho-hannover.de).

Horvátország

Horvátországban mintegy 20 különböző juh fajtát tenyésztenek amelyeknek mintegy fele a hagyományos fajták körébe tartozik. Ezek azonban idegen fajták hatásait hordozzák (BRADIC, 2003). A horvát cigája, amelyet elsősorban észak-illetve közép Horvátországban tenyésztenek, jelentős mennyiségű merinó vért hordoz. Egy genetikai távolság vizsgálat eredményei szerint jelentősen eltér genetikai szerkezete a dubrovniki és krk juhoktól (BRADIC és mtsai., 2004). A gyapja színe fehér, azonban a lábon és a fejen fekete illetve barna.

9.kép: Horvát cigája anyajuhok bárányaikkal



Fotó: Kusza,Sz.

Magyarország

Ma hazánkban a Magyar Juhtenyésztő Szövetség és az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet kétféle cigáját különböztet meg, az egyik az őshonos (ún. génrezerv, termelésre irányuló szelekció nélkül), a másik a tejtermelésre szelektált változat (BODÓ, 1997; SÁFÁR, 2001). Azonban mégsem csak e két változat található az országban. Számos, egymástól testméretben, hasznosításban is különböző változat van jelen az állományainkban (KUKOVICS és mtsai., 2004).

A kifejlett anyák testsúlya és testméretei a 2. és 3. táblázatban láthatóak. A kosok nagyobbak, nehezebbek és ma már csak kis részük visel sötét színű, másfél körivet leíró szarvakat, így fennáll a szarvaltság elvesztésének veszélye. Az anyajuhok szarvatlanok, csak kis részüknek van sarló alakú ún. kecskeszarva.

2. táblázat: A cigája anyajuhok testméretei

Tulajdonság	Régi átlag	Jelenlegi őshonos átlag	Tejelő típus átlag
Testsúly, kg.	41,4	53,4	76,0
Marmagasság, cm.	65,0	67,5	73,8
Törzshossz, cm.	72,2	75,0	79,6
Mellkasmélység, cm.	35,3	35,1	34,8
Dongásság, cm.	24,1	24,3	25,0
Övméret, cm.	83,0	91,4	104,6
Farszélesség, cm.	18,1	24,4	28,7
Szárkörméret, cm.	-	8,5	10,1
Fejhossz, cm.	-	22,1	25,6
Fülhossz, cm.	-	13,9	20,4

Forrás: GÁSPÁRDY és mtsai, 2001

3. táblázat. A zombori- és a csókai cigája változat néhány fontos testmérete

Tulajdonságok	Zombori változat	Csókai változat
Marmagasság, cm	78,3	65,4
Mellkasmélység, cm	37,0	33,6
Törzshossz, cm	93,0	71,7
Szárkörméret, cm	8,9	8,1

Forrás: GÁSPÁRDY és mtsai, 1998

Őshonos cigája

10.kép: Magyar őshonos cigája kos



Fotó: Kukovics, S.
(KUKOVICS és JÁVOR, 2002a)

11.kép: Magyar őshonos cigája anyajuh



Fotó: Kukovics, S.
(KUKOVICS és JÁVOR, 2002a)

A fej középnagy, az anyáknál megnyúlt, a kosoknak rövidebb, szélesebb, durvább. A homlok domború, az orrhát az anyákon enyhén, a kosoknál kifejezettebben domború. Az anyák suták vagy sarló alakú szarvuk van, a kosok egyik része suta, másik részük másfél körivet leíró erős, csigás szarvat visel szorosan a fejhez simulva (VERESS és mtsai., 1995). Szürke a köröm és a szarvalt egyedek szarva is. Az ajkak közepes finomságúak. A szemek nagyok, sötétek és igen élénkek. A fülek közepesen hosszúak. A nyak közepesen izmolt és ráncmentes, a vállak jó kötésűek, a mar közepesen széles és izmolt. A hát és ágyék egyenes, aránylag hosszú és közepesen izmolt. A törzs a fiatal korban a jól táplált egyedeknél hosszú, mély és dongás. A has a kosoknál hengeres, anyáknál terjedelmesebb. A far enyhén lejtős, közepes hosszúságú, szélességű, izmoltságú, sokszor csapott. Csontozata erőteljes. A tőgye jól fejlett. A végtagok aránylag hosszúak és mérsékelten izmoltak. A fej és a lábak feketék, sötétbarnák vagy barnák. A bőr tömör, rugalmas, enyhén pigmentált vagy hússzínű (MUCSI, 1997). Ráncnélküli, csupán a bányások esetében találhatóak kisebb ráncok (IVANOV, 1951). A száj nyálkahártyája és a nyelv palaszürke. A bunda fehér, fűrtös szerkezetű, sok egyednél tűzdelt. A bányások színe homokszerű, sárgásbarna vagy sötétbarna, de

előbb-utóbb mindegyik bundája kifehéredik. A bunda csak a nyakat és a törzset fedi. Lenyúlik a lábtőig, illetve a csánkig, gyakran azonban csak az alkar feléig, illetve az alcomb közepéig. Egyes egyedeknél a homlokra is ráterjed a gyapjú, és a has közepén is található, de nem jellemzője a fajtának. A szőrzet színe a fejen és a lábvégeken barna, barnásfekete, fekete (MUCSI, 1997). Tenyésztési célja a fajta genetikai képességének megőrzése, illetve genetikai varianciájának fenntartása, a szilárd szervezete és nagy ellenállóképességének megtartása (GÁSPÁRDY, 2002). A törzskönybe kerülés feltételeit a 4. táblázatban mutatjuk be.

4. táblázat: Az őshonos cigája törzskönybe kerülésének feltételei

Törzskönybe kerülés feltételei	nőivar	hímivar
Életkor első elléskor, maximum (hó):	30	-
Egy napra jutó báránycori testsúly, minimum (g/nap):	150	200
Testsúly éves korban, minimum (kg):	35	45
Bírálati pont:	M	93

Forrás: <http://www.majusz.hu>

Tejelő cigája

12.kép: Magyar tejelő cigája kos



Fotó: Kukovics, S.
(KUKOVICS és JÁVOR, 2002a)

13.kép: Magyar tejelő cigája anyajuhok



Fotó: Kukovics, S.
(KUKOVICS és JÁVOR, 2002a)

A közepesnél nagyobb testű, ellenálló, edzett, igen élelmes fajta. A fej középnagy, a kosoknál aránylag rövidebb, szélesebb és durvább. A homlok domború, az orrhát domború, jellegzetes „kosorr” (RÓZSAHEGYI és IZSÁK, 2002). Az anyák szarvatlanok, a kosok szarváltak de lehetnek suták is. A fülek nagyok, hosszúak és lelógók. A nyak kevésbé izmolt, a mellkas mély, néha lapos, a hát hosszú a far rövid, esetenként csapott. A hát és ágyék egyenes, aránylag hosszú és közepesen izmolt. A far enyhén lejtős közepes hosszúságú szélességű, izmoltságú, sokszor csapott. A tőgy jól fejlett, szilárd illesztésű. A végtagok hosszúak és mérsékelten izmoltak. A fej és a lábak feketék vagy barnák. A bőr pigmentált, a száj nyálkahártyája és a nyelv palaszürke. A

bunda fehér, fűrtös szerkezetű, sok egyednél tűzdelt, de előfordul fekete színű is. A bárányok erős felszörzettel születnek, melynek színe fekete, sötétbarna, de kifehéredik. A szörzet színe a fejen és a lábvégeken barna, barnásfekete, fekete. Az átlagos alomnagyság 1,2-1,6. Jól tejel, a bárányválasztás után még 5-6 hónapig fejhető, és így 110-120 liter tejet ad (KUKOVICS, 2000). Tenyésztési célja a tejtermelés, a szaporaság, és a báránynevelő képesség javítása, miközben a szilárd szervezet és a nagy ellenállóképesség is megmarad. További cél a félintenzív tartási- takarmányozási feltételeknek megfelelő tejelő típus kialakítása, illetve folyamatos javítása. A törzskönyvbe kerülés feltételeit az 5. táblázatban mutatjuk be.

5. táblázat: A tejelő cigája törzskönyvbe kerülésének feltételei

Törzskönyvbe kerülés feltételei	nőivar	hímivar
Életkor első elléskor, maximum (hó):	30	-
Egy napra jutó báránykori testsúly, minimum (g/nap):	200	230
Testsúly éves korban, minimum (kg):	40	50
Tejtermelés első laktációban, minimum (kg):	50	-
Bírálati pont:	M	93

Forrás: <http://www.majusz.hu>

Az őshonos és tejelő változat gyapjútulajdonságaiban levő különbségeket a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat: A cigája anyák gyapjútermelési tulajdonságai

Tulajdonság	Őshonos cigája	Tejelő cigája
Nyírósúly, kg	2,8	4,4
Fürthosszúság, cm	7,2	10,7
Szálfinomság:	33,5	39,6
-lapockán	32,3	38,1
-faron	34,6	41,1
Medulláltság, %:	2,2	3,6
-lapockán	1,9	3,0
-faron	2,5	4,2
Pázmakiegyenlítetttség, %:	24,8	23,7
-lapockán	24,1	23,1
-faron	25,4	24,2
Íveltség, per 1 cm:	3,7	3,7
-lapockán	3,6	3,8
-faron	3,8	3,6
Bundakiegyenlítetttség, %:	94,8	92,9

Forrás: GÁSPÁRDY és mtsai, 2002

KUKOVICS és mtsai. (2004) a magyar cigája változatok testméretbeli eltéréseit vizsgálták. A következőket állapították meg:

- A magyar állomány tulajdonságaira főleg a Jugoszláviából származó cigáják voltak hatással.
- Sem az őshonos sem a tejelő cigája állományunk nem tekinthető egységesnek, számos változat található bennük.

Az előzőekben bemutatott eredmények is alátámasztják, hogy szükség volt vizsgálataink elvégzésére, hogy meg tudjuk határozni a genetikai különbségeket az eddig egy fajtába, fajtakörbe tartozó állományok között. Dr. Kukovics Sándor és Dr. Kristaq Kume vezetésével indult meg egy európai regionális program keretében vizsgálatunk. Ennek a programnak a célja volt, meghatározni Kelet -, Közép és Dél-Európában található helyi, sok esetben veszélyeztetett létszámú juhajták, állományok genetikai távolságát, és ezáltal elősegíteni génmegőrzésüket.

14.kép: Csókai cigája



Fotó: Kusza, Sz.

15.kép:Erdélyi rozsdás cigája (Jucu-Zsuku)



Fotó: Pál, G.

16.kép: Tejelő cigája



Fotó: Pál, G.

2.3. A fajta létszáma, veszélyeztetettségi besorolása

Jelenleg a fajta csak a Cseh Köztársaságban van veszélyeztetett létszámban (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a). Veszélyeztetett létszámról a FAO szerint akkor beszélünk, ha a megszületett nőivarú egyedek száma a fajtában 100 és 1000 között van, míg kritikus helyzetről akkor ha 100 alatti a nőivarú egyedek száma (FAO 2000).

A magyar és a vajdasági cigája létszáma is a veszélyeztetett kategóriában van, azonban ez a létszám megőrző tevékenységekkel még fenntartható. Ezek az állatok a nemzeti parkok, néhány gazdasági társaság és magán tenyésztő állományát alkotják.

Magyarországon, Szlovákiában, Albániában és Horvátországban az utóbbi években emelkedett az állomány létszáma, de Bulgáriában, Romániában, és Ukrajnában továbbra is csökken a létszám (DIMOV, 2000, GLAZKO, 2001, PADEANU, 2001; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

2.4. A cigája állományok keresztezései

Az albán cigáját Jugoszláviából származó cigájakkal keresztezték (www.tiho-hannover.de; KUME, 2000; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

Bulgáriába a második világháború után vitték be a cigáját, amit később orosz algyski- és priazovski cigájával kereszteztek (KUKOVICS és mtsai., 2004).

A volt Szovjetunió utódállamaiban angol fajtákat használtak keresztezésekben a cigája hústermelő képességének javítása céljából. Ennek eredményeként új vonalakat tenyésztettek ki, mint például az algyski-, priazovski-, azov-, transvolga cigáját (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

Jugoszláviában a zombori és a csókai cigáját suffolkkal kívánták keresztezni, azonban így a csókai cigája sűrített ellési hajlamát, a zomborinak a tejelőképességét rontanák (BODÓ és VERESS, 1997).

Horvátországba a 18., 19. században és a második világháború után jelentős mennyiségben használtak merinót a keresztezésekhez (BRADIC és mtsai., 2004).

Szlovákiába a hagyományosnak tekinthető változat Romániából került be (KUKOVICS és mtsai., 2004). Azonban az 1970-es évektől Németországból kelet-fríz, Franciaországból lacaune fajtákat használtak keresztezésükhöz (www.tiho-hannover.de, GYARMATHY, 2000; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

A kovásznai típusú román cigája hordoz merinó vért, azonban annak mennyisége nem ismert (PADEANU, 2001; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

2.5. A cigája termékei

A cigája fő terméke ma is a tej (OLÁH, 2002). Számos tényező befolyásolja a juhok termelőképességét, ezek közül néhány a következő: fajta, környezet, évjárat, kor, ivar, stb. (KUKOVICS és JÁVOR, 2002a). Általában elmondható, hogy az egyes termékek ára növekvő tendenciájú az utóbbi évtizedekben, azonban az egyes országok között különbségek vannak. Az árviszonyok hatottak a tenyésztési célkitűzésekre is (JÁVOR és mtsai., 1998).

2.5.1. Tej

A juh a többi állatfajhoz viszonyítva koncentráltabb tejet termel. A tej összetétele az 7. táblázatban látható. A juhtej csontfehér színű, kellemes szagú és ízű.

7. táblázat: Az anyatej és a tehén-, juh-, és kecsketej összetétele

Tejalkotó	Értékek			
	Anyatej, %	Tehéntej, %	Juhtej, %	Kecsquetej, %
Fehérje	1,0	3,3	6,0	3,6
Tejcukor	6,9	4,7	5,3	4,5
Ásványi anyag	0,2	0,7	1,0	0,8
Zsírtmentes szárazanyag	8,1	8,7	12,3	8,9
Zsír	4,4	3,7	7,0	4,1
Szárazanyag	12,5	12,4	19,3	13,0
Energia, kcal/100g	71	65	108	69

Forrás: SZAKÁLY és mtsai, 2001

Az egyes országok változatai között különbségek vannak a tejelőképességüket tekintve (8. táblázat).

8. táblázat: Különböző juhajték tejtermelőképessége

Fajta	Tej, (l)	Forrás
bolgár pleveny feketefejú	171,8	Tanev és Dimov, 1970
bolgár cigája	87	Stojanov, 1965
cseh cigája	152,3	Mikus, 1976
oroszigája	73,4	Tanev és Dimov, 1970
szerb cigája	98-132	Isakov, 1929
pramenka (Bosznia-Hercegovina)	70	Zdanovski, 1947
pramenka (Dubsko-Bosznia)	150	Zdanovski, 1947
román cigája	146	Tafta és mtsai, 1962
török sakiz	205	Sönmez és Wassmuth, 1964
török kivircik	56	Sönmez és Wassmuth, 1964

Forrás: VERESS és mtsai., 1982

Különböző juhajták kolosztrumának és tejének vizsgálati eredményeit a 9.táblázatban mutatjuk be.

9. táblázat: Különböző juhajták kolosztrumának és tejének szárazanyag-, fehérjetartalmának, fehérjefrakcióinak megoszlása

Kolosztrum

Fajta	száraz- anyag (g/100 g)	összes fehérje (g/100 g)	valódi fehérje (g/100 g)	savó- fehérje (g/100 g)	valódi savó- fehérje (g/100 g)	kazein (g/100 g)	hamu (g/100 g)
magyar fésűs- merinó	34,80	19,47	19,00	13,25	12,76	6,31	1,060
awassi	34,79	16,79	16,41	10,08	9,71	6,71	0,984
szarda	32,91	18,15	17,67	11,40	10,92	6,75	1,042
cigája	30,93	15,03	14,45	9,95	9,37	5,08	0,936
cikta	30,46	15,30	14,88	8,86	8,44	6,44	1,072
fekete racka	41,91	21,10	20,47	14,98	14,35	6,12	1,121
fehér racka	35,80	19,62	19,05	12,08	11,53	7,52	1,108
karakül	35,56	19,55	18,99	10,56	10,05	8,94	1,160
vadjuh	33,57	18,90	18,40	10,32	9,82	8,58	1,118

Tej

Fajta	száraz- anyag (g/100 g)	összes fehérje (g/100 g)	valódi fehérje (g/100 g)	savó- fehérje (g/100 g)	valódi savó- fehérje (g/100 g)	kazein (g/100 g)	hamu (g/100 g)
magyar fésűs- merinó	18,79	5,94	5,70	1,32	1,08	4,61	0,953
awassi	18,61	4,62	4,33	1,06	0,76	3,59	0,903
szarda	16,16	4,86	4,61	1,33	1,08	3,53	0,868
cigája	17,60	5,53	5,18	1,54	1,19	3,99	0,895
cikta	17,15	5,21	4,96	1,33	1,07	3,88	0,918
fekete racka	15,75	5,52	5,22	1,23	0,93	4,29	0,885
fehér racka	16,71	5,92	5,67	1,30	1,05	4,63	0,901
karakül	21,60	5,57	5,30	1,46	1,18	4,11	0,913

Forrás: CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002

A kolosztrumok vizsgálata során megállapították, hogy a cigája, cikta és szarda kolosztrumának szárazanyag tartalma a legkisebb és a fehér és a fekete racka kolosztrumának szárazanyag-tartalma a legnagyobb (9. táblázat). A cigája és karakül tejének a legnagyobb a savófehérje és valódi savófehérje tartalma. A kazeintartalma a legmagasabb a fehér racka, merinó, fekete racka tejének, míg legkisebb a szarda, awassi, cikta és cigája tejének (CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2002).

A legtöbb anyát fejjik Romániában, Szlovákiában, Bulgáriában, Albániában és Moldáviában (DIMOV, 2000.; FAO 2001.; GYARMATHY, 2000.; KUKOVICS és JÁVOR, 2001.; PADEANU, 2001.; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a). Csehországban korlátozott számban fejjik a cigáját (MATLOVA, 2001; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a). Magyarországon az őshonos változatnak legalább felét, míg a tejelő változatnak minden egyedét fejjik (KUKOVICS és JÁVOR, 2001.). Jugoszláviában általánosságban a zombori cigáját (Pvinicki típus) fejjik, de a csókai változatnak csak kis hányadát hasznosítják a tejtermelésben (MAJOR, 2000; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a).

Általában kézzel fejjik, de fejőgépet is használnak Szlovákiában, Magyarországon és Bulgáriában (DIMOV, 2000.; GYARMATHY, 2000.; KUKOVICS és mtsai, 2000; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a). A gépi fejés drága Romániában és Moldáviában, azonban a fejőgépek száma növekszik Romániában (PADEANU, 2001.; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a). A kézzel fejés munkalehetőség az emberek (juhász és családja) számára.

Az eredetileg Bulgáriában előállított kefir mellett számos más tejterméket lehet a cigája tejből készíteni: gomolyatúró, túró, feta sajt, joghurt és kaskaval sajt, stb. (DIMOV, 2000.; GYARMATHY, 2000.; KUKOVICS, 2000.; MAJOR, 2000.; NAGY, 2000.; cit.: KUKOVICS és JÁVOR, 2002a)

2.5.2. Hús

A cigája hízekonysága figyelemre méltó. Az ürüztetés terjedt el régebben, ma a bárányhízalás, bár a későn érő bárányok nem elégítik ki a korszerű igényeket. Húsát az egyik legjobb húsféleségnek tartják, különösen a Balkáni országokban kedvelik. A cigája húsa kiváló, porhanyós, jó íze és illata van, nem faggyú szagú. Régen a fekete fejjű cigája húsa rendkívül kedvelt volt a török szultánok konyháján. Még ma is a

hagyományoknak megfelelően fogyasztják ezt a húst a Balkán országokban (GÁSPÁRDY, 2000.).

Egy tanulmányban összehasonlították a román cigája és az erdélyi racka hústermelő képességét, tömeggyarapodását, hízekonyságát és mindenben a cigája bizonyult jobbnak (CALIN és mtsai, 2002).

A cigája báránnyok egyre jelentősebb részét értékesítik exportra, elsősorban olasz és más EU országok piacaira (pl. Görögország) (KUKOVICS és JÁVOR, 2001.)

2.5.3. Gyapjú

A juhtenyésztés célját régen a gyapjútermelés határozta meg, de ma a gyapjú értéke nagyon alacsony, melléktermékké vált. Régen a gyapjú értékesítéséből származó bevétel fedezte a téli takarmányozás költségeit, ma alig fedezi a nyírás és kezelés költségeit (FÉSÜS és mtsai, 2002).

A cigája gyapjából kevésbé finom textil, kötöttáru termékeket készítettek; és jó zsugorodási képességének köszönhetően durvább nemezt is készíthettek (a hadsereg számára, brassói bolyhos textil, stb.). A cigája gyapjú fűrtminőségének köszönhetően alkalmas gyapjútakarók készítésére is. A kalapkészítők is szívesen dolgoztak vele. Cigája gyapjú az alapanyaga az erdélyi rövid ujjú gyapjas kabátnak, harisnyának és nadrágnak. A 19. század első részében a szebeni kereskedőknek (Erdély) megvolt a saját gyapjúkihozatali normája a cigája gyapjúra vonatkozólag is (GÁSPÁRDY, 2000.).

2.6. Genetikai távolság vizsgálatok

Az elmúlt évtizedek során nagyszámú genetikai diverzitás vizsgálat indult az egész világon, különösen a házi állatok körében. Leginkább hagyományos fajták vagy egyedi fenotipusos bélyegeket hordozó fajokat választottak a vizsgálatok alanyául. A kiskérődzők (juh, kecske) genetikai diverzitás vizsgálata is gyakorivá vált, különösen azokban az országokban ahol jelentős a kecske- illetve juhtenyésztés. Leggyakrabban a vizsgálatokat vérből végzik, mikroszatellit markereket használva (FAO, 2004).

2.6.1. A genetikai vizsgálatok „alapja”

A gének egymás után, meghatározott sorrendben helyezkednek le a kromoszómán. Bázissorrendje határozza meg a tulajdonságokat kialakító fehérjék aminosavsorrendjét. Ha a bázissorrend megváltozik, a kódolt fehérje szerkezete, működése is változhat. A gének működése három formában nyilvánulhat meg: replikálódhat (a genetikai információ változatlanul kerül át egyik nemzedékről a másikra); a genetikai információt hordozza; mutációk következhetnek be (WEAVER és HEDRICK, 2000).

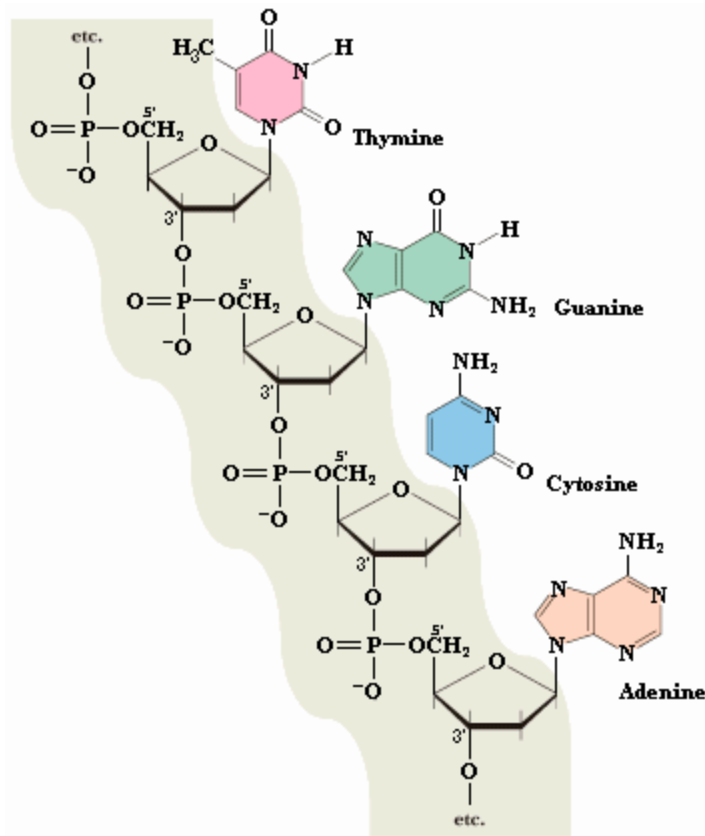
Háromféle géncsoportot különböztetünk meg: (1) proteint kódoló gének (strukturális gének), amelyek átíródnak a hírvivő (messenger) (mRNS) molekulába és ezután fehérjébe; (2) RNS-t meghatározó gének (strukturális gének), amelyek csak transzfer RNS-be (tRNS), vagy riboszómális RNS-be (rRNS) íródnak át és (3) szabályozó gének (regulátor gének) (KING és STANSFIELD, 1990).

Mivel a gének döntő többségét a DNS (dezoxi-ribonukleinsav) építi fel, a következőkben röviden, csak ezt mutatjuk be.

A DNS molekula tartalmazza a genetikai információt az eukariótákban. Két egymást kiegészítő (komplementer) láncból áll, amelyek jobbra csavarodó spirált alkotnak (5. ábra).

A DNS molekula gerincét két párhuzamosan futó cukorfoszfát lánc képezi, amelyben a cukor és foszfát egységeket foszfodiészter kötések kapcsolják össze. Ezen a két párhuzamos, de ellentétes irányba futó gerincen négyféle bázis található (adenin, timin, guanin, citozin). Az egyik láncon lévő adenin a másik láncon lévő timinhez két hidrogén kötéssel kapcsolódik, míg a citozin az guaninhoz három hidrogén kötéssel. Így az egyik lánc bázissorrendje meghatározza másik lánc bázissorrendjét (WEAVER és HEDRICK, 2000).

5. ábra: A DNS szerkezeti felépítése

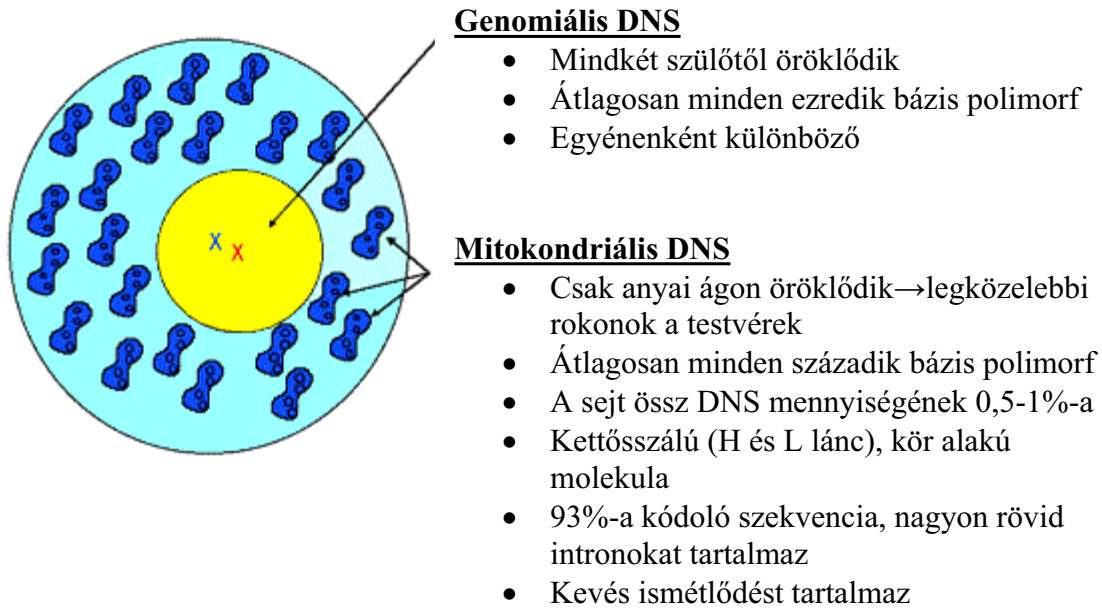


Forrás: GARRETT és GRISHAM, 1999.

Régen a DNS molekulának azt a részét nevezték génnek amely egy fehérje aminosav sorrendjét kódolta. Ma azonban tudjuk, hogy a DNS láncnak csak egy kis része kódol fehérjéket, másoknak szabályozó szerepe van, és vannak olyan szakaszok is amelyeknek még nem tudjuk a pontos szerepét (<http://bio.univet.hu>).

A DNS két típusát különböztetjük meg: genomiális DNS és mitokondriális DNS (6. ábra).

6. ábra: A DNS típusai



Forrás: <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july1999/dnaf1.htm>

2.6.2. Leggyakrabban alkalmazott módszerek bemutatása genetikai távolság meghatározásra különböző állományok között

Korábban a genetikai távolság vizsgálatok során bármilyen mérhető, látható tulajdonságot illetve fehérje markereket (vércsoport, antigének, enzimek különböző formái) használtak. Azonban a molekuláris genetika gyors fejlődése által ma már genetikai markereket alkalmaznak. A genetikai markerek előnyösebbek mint a fehérje markerek mivel nagyobb számban vannak jelen és változatosabbak. Azonban alkalmazhatóságuknak vannak feltételei:

- könnyű kimutathatóság,
- mutassanak polimorfizmust, legyen több alléljuk a vizsgált populációban,
- kodomináns módon öröklődjenek,
- technikailag könnyen kezelhetőek legyenek,
- minden laboratóriumban vizsgálhatóak legyenek,
- olcsó, gyorsan vizsgálhatóak legyenek,
- gyakori és véletlen eloszlásúak legyenek a kromoszómán belül (FÉSÜS, 1997).

LIU (1997) megfogalmazása szerint a DNS markerek a DNS lánc olyan speciális kis szakaszai, melyek eltérést (polimorfizmust) mutatnak szekvenciájukban az egyedek között az adott fajon, vagy fajtán belül. A marker lehet gén, a DNS egy kis szakasza ismeretlen funkcióval vagy akár egyszerűen egy bázispár.

A genetikai markerek kimutatására korábban hibridizációs módszereket, míg ma polimeráz láncreakciót (PCR) használunk.

A juh fajban leggyakrabban alkalmazott markerek genetikai távolság meghatározására:

- DNS ujjlenyomat vizsgálat,
- Véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS (RAPDs) (KANTANEN és mtsai., 1995; MATTHEWS és CRAWFORD, 1998),
- Restriktív fragmenthossz polimorfizmus (RFLPs) (PARSONS és mtsai., 1996),
- mtDNS vizsgálat (BRADIC és mtsai., 2005).
- Mikroszatellit (MOORE és mtsai., 1991; DIEZ-TASCON és mtsai., 2000; SHAY és mtsai., 2001; BUCHANAN és mtsai., 1994; FARID és mtsai., 2000; KAVAR és mtsai., 2002; ARRANZ és mtsai., 1998,2001; ALVAREZ és mtsai., 2004; GRIGALIUNAITE és mtsai., 2003; WALLING és mtsai., 2004; LI és mtsai., 2004; GÁSPÁRDY és mtsai., 2004; BUDURAM és mtsai., 2005; GLADYR és mtsai., 2005; BANABAZI és mtsai., 2005).

A következő alfejezetekben a leggyakrabban alkalmazott módszereket mutatjuk be röviden.

2.6.2.1. Vércsoport és fehérje polimorfizmus vizsgálat

Vércsoport és fehérje polimorfizmus vizsgálatokat széles körben az 1950'es években alkalmazták. Előnye, hogy gyors, olcsó és megbízható eredményt ad, viszont friss vér szükséges hozzá. Az őshonos és a tejlő cigája változatok közötti különbség kimutatására végeztek ilyen fajta vizsgálatokat (FÉSÜS, 1974; FÉSÜS és AL DABBAGH, 1991; ANTON és mtsai, 1999; GÁSPÁRDY és mtsai., 1998).

A vércsoportok és biokémiai polimorfizmusok exakt módon meghatározható kvalitatív bélyegek. Az állományok vizsgálata során a vércsoportok és biokémiai polimorfizmus gének gyakoriságát határozzák meg, majd ezek ismeretében az egyes genotípusok várt értékét, amit később összehasonlítanak a kapott értékekkel. A várt és kapott értékek összehasonlítása a populáció genetikai egyensúlyi állapotáról, vagy annak hiányáról ad információt. Kis populációk esetén veszélyt jelenthet a kis apaállat létszám, mivel génfrekvencia változásokat eredményezhet (FÉSÜS, 1997).

Az első immunogenetikai és biokémiai polimorfizmus vizsgálatok eredményei 1986-ban jelentek meg, majd újabb vizsgálatokra került sor a cikta állományban 1989-ben és a cigája állományban 1990-ben. A cigája fajtát vizsgálva hat felmérés készült, nagyjából évtizedenként. Megállapították, hogy a hemoglobin A allél (Hb^A) gyakorisága az alföldi cigája állományokban régebben nagyobb volt, és az őshonos állományokban gyakoribb mint a tejlő cigájában (FÉSÜS, 1974; FÉSÜS és AL DABBAGH, 1991; GÁSPÁRDY és mtsai., 1998).

Külföldön is zajlottak polimorfizmus vizsgálatok. Romániában vizsgálatok folytak az albumin típusok gyakoriságának meghatározására. Eredményeik szerint az Alb S allél domináns az Alb F felett (MARIAN és mtsai, 1980). A magyar állományban csak az Alb S allélt találták meg (FÉSÜS és ALDABBAGH, 1991). Cseh cigáják transzferrin változat vizsgálata során arra jutottak, hogy nagyon alacsony gyakorisággal, de a Tf K variáns csak a cigájában fordul elő (STRATIL, 1973). A szovjet állományok vizsgálata során öt transzferrin változatot írtak le, ezek közül a Tf C-nek volt a legnagyobb gyakorisága, míg a legkisebb a Tf E-nek (SPIRIDONOV, 1973).

A cigája populációk közötti különbségeket a hemoglobin allél gyakorisági értékekkel jellemezték (10. táblázat).

10. táblázat: A hemoglobin allél gyakorisága a különböző cigája populációkban

Szerző	HbA	HbB	Ország
Spiridonov, 1973	0.148	0.852	Szovjetunió
Lipecka-Tjankov, 1974	0.296	0.705	Lengyelország
Spiridonov-Mogoryan, 1976	0.148	0.852	Szovjetunió
Margetin, 1980	0.064	0.936	Csehszlovákia
Ivankovic és mtsai, 1985	0.010	0.990	Jugoszlávia
Zhabaliev-Bolotina, 1986	0.130	0.870	Szovjetunió
Fésüs-Al Dabbagh, 1991	0.0595	0.9405	Magyarország
Fésüs-Al Dabbagh, 1991	0.0163	0.9837	Magyarország

Forrás: KUKOVICS és JAVOR, 2002a

2.6.2.2. DNS hibridizáció

A DNS hibridizációt az 1960'as években fejlesztették ki és ez volt az első olyan módszer amellyel az eukarióta genomot vizsgálták és használták evolúciós vizsgálatokhoz. A hibridizációs technika nagy mennyiségű szekvenciabeli eltéréstől ad átlagos értéket (SIBLEY és AHLQUIST, 1990). Főemlősök, húsevők és madarak genetikai távolság meghatározása során is alkalmazták (O'BRIEN és mtsai 1985; SIBLEY és AHLQUIST, 1990).

A vizsgálat során nukleinsavakat használnak próbaként az azokkal komplementer, vagy homológ molekulák azonosítására. A DNS-t kisebb, körülbelül 500 kb hosszúságú szakaszokra tördelik, és az elegyet felforrallják a hidrogén kötések felbomlása érdekében, majd lehűtik 50 °C-ra, mivel a már ezen a hőmérsékleten a repetitív szekvenciák hibridizálnak, de a DNS még egyszálú marad. Ezt követően az elegyet átvezetik egy oszlopon, amelyen csak az egyszálú DNS megy át és ezeket megjelölik, majd jelöletlen DNS-t adnak hozzá (vagy ugyanabból a fajtól származik mint a minta, vagy másiktól). A keveréket napokig inkubálják, míg a hasonló szekvenciájú szálak hibridizálódnak. Majd újra oszlopra viszik a keveréket a kettős szálú láncok megkötése érdekében. Az oszlopot melegítik 2,5 fokként 60-90 °C tartományban. Minden hőmérséklet emelésnél lemosják a denaturált DNS szálakat és a kapott mennyiséget a hőmérséklet függvényében ábrázolják (<http://bio.univet.hu>).

2.6.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció jelenleg a genetikai vizsgálatok kiinduló pontja. A PCR technika megalkotása Mullis nevéhez fűződik. Ez a leghatékonyabb módja bizonyos DNS szakaszok milliós nagyságrendű felsokszorosításának (MULLIS és FALOONA, 1987). A leggyakrabban használt genetikai DNS markerek azonosítása, illetve kimutatása ezen technikán alapul.

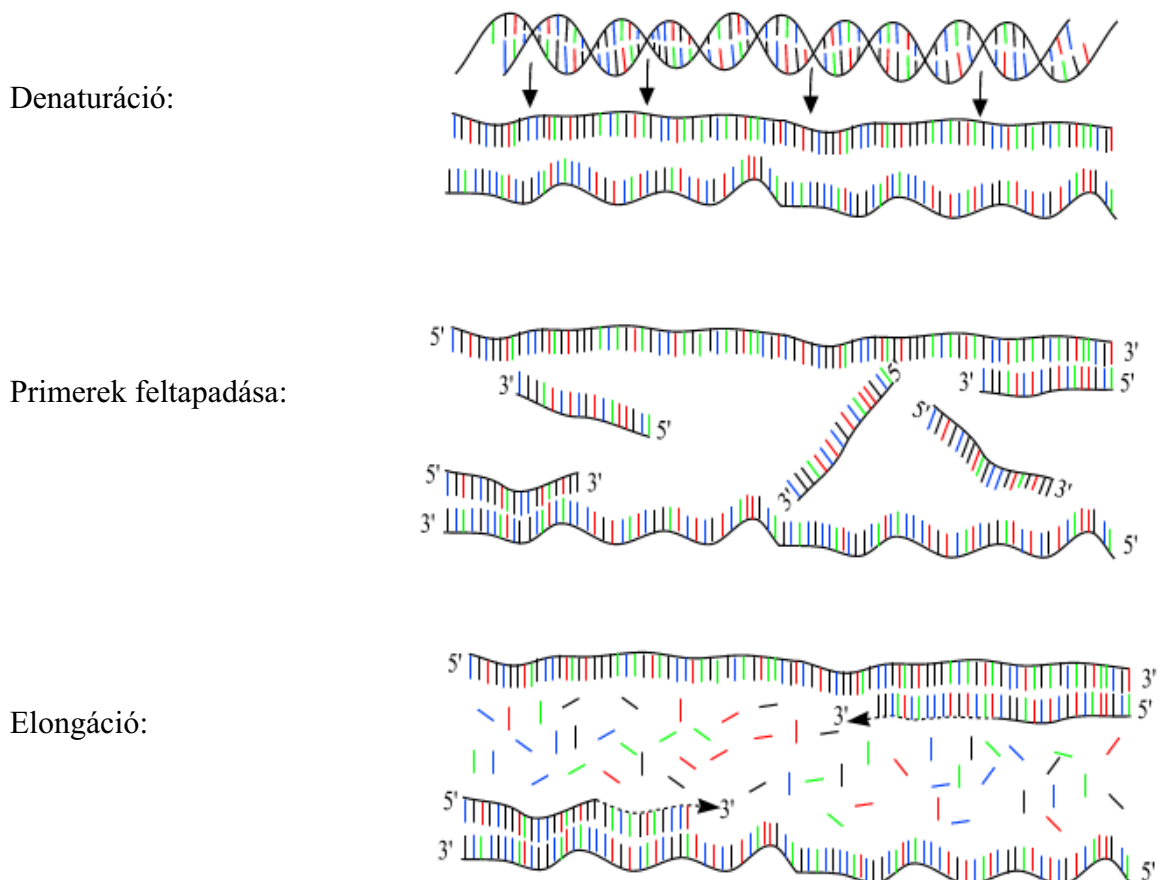
A PCR reakcióhoz a következő komponensekre van szükség:

1. templát, ami a kívánt sokszorosítandó része a DNS-nek;
2. nukleotidok (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),
3. egy primer pár (a sokszorosítani kívánt DNS szakasz végeinek komplementerei). A primerekkel szembeni követelmények:
 - 15-30 bp hosszúak legyenek;
 - Primer - dimer elkerülése (3' végek ne legyenek egymás komplementerei);
 - 3' végei G és C bázisokat tartalmazzanak (kötéserősség nagyobb, de a félretapadás lehetősége is nő);
 - GC tartalom 55%-nál ne legyen több;
 - Ne legyen másodlagos szerkezetük (DIEFFENBACH és mtsai, 1995).
4. hőstabil polimeráz enzim (leggyakrabban a *Thermus Aquaticus* baktérium által termelt Taq polimeráz)
5. egyéb kiegészítő, stabilizáló vegyszerek.

A PCR reakció három lépésből áll (7. ábra):

1. Denaturáció 92-96°C-on:
A kettős szálú DNS felbomlik.
2. Primerek feltapadása 35-75 °C-on:
A primerek feltapadnak a kettévált DNS szakasz velük komplementer szakaszához.
3. Elongáció 72 °C-on:
Megkezdődik az új szálak építése a polimeráz enzim segítségével.

7. ábra: A PCR reakció lépései:



Forrás:<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/pdf/seq.pdf>

A három lépés egy ciklust alkot, amelyet általában 30-40-szer ismételünk, a kívánt mennyiségű kópia szám elérése érdekében.

A PCR alkalmazásának előnyei:

- ☺ nagyfokú érzékenység;
- ☺ bármilyen mintából (vér, haj, toll, nyál) kivont DNS-t használhatunk;
- ☺ gyors;
- ☺ egyszerű.

Hátránya:

- ☹ érzékenysége olyan nagyfokú, hogy a minta esetleges szennyeződéseit is felerősítheti → téves eredményt kapunk (FÉSÜS és mtsai.,2000).

2.6.2.4. Szekvenálás

A szekvenálás során a DNS lánc bázissorrendjét határozzuk meg mutációk detektálása céljából.

Legelterjedtebb szekvenálási módok:

1. Maxam Gilbert féle szekvenálás

Egyszálú DNS-t adott bázisra jellemző helyen roncsolnak, majd ott a szálát el is vágják, és a kapott fragmentumokat gélelektroforézissel láthatóvá teszik.

2. Sanger féle szekvenálás

Didezoxinukleotidokat használ (hiányzik a nukleotid 3'-OH csoportja) a PCR reakció során. A polimeráz megkezd a láncépítést a primer szabad 3'-OH végénél, azonban mikor egy didezoxinukleotidot kapcsolna az épülő lánchoz a szintézis leáll mivel hiányzik a szabad 3'-OH végződés. Így különböző hosszúságú fragmentumok képződnek, amelyek gélelektroforézissel szétválaszthatóak (FÉSÜS és mtsai, 2000; <http://bio.univet.hu>)

A módszer előnyei:

- ☺ nagyon pontos eredményt ad;
- ☺ megbízható (SCHLÖTTERER, 2004).

A szekvenálás azonban rutinszerűen végzett populáció genetikai vizsgálatokban nem terjedt el, aminek az okai a következők:

- ☹ sokkal drágább még, mint más technikák;
- ☹ időigényes;
- ☹ a bázissorend megállapítása csak rövidebb, 500 bp-os szakaszokon lehetséges, így a vizsgálandó szakaszok hossza és száma is korlátozott (SCHLÖTTERER, 2004).

2.6.2.5. Véletlenszerűen Amplifikált Polimorf DNS (RAPD)

A módszert először WILLIAMS és mtsai (1990) írták le. Ma már széles körben elterjedt elsősorban növények genetikai diverzitás vizsgálatánál (KANTANEN és mtsai, 1995). Ezen módszer alkalmazása során rövid, 10-12 bp hosszú primereket használnak.

A vizsgálat elve az, hogy a rövid primerek több helyre kötődhetnek a genomban és az egymással szemben tapadt primerek adják a PCR terméket. Így a képződött termék függ a primerek hosszától, méretétől.

A RAPD előnyei:

- ☺ nincs szükség próbákra, sem információkra a szekvenciáról a primerek megtervezésénél;
- ☺ nincs blottolás, hibridizáció;
- ☺ elég kis mennyiségű DNS (10 ng/ reakció);
- ☺ könnyen automatizálható;
- ☺ polimorfizmus vizsgálatokhoz is alkalmazható (WILLIAMS és mtsai, 1990; LU és mtsai, 1996).
- ☺ olcsó (SCHLÖTTERER, 2004).

Hátrányai:

- ☹ nehéz analizálni, teljesen biztos, megbízható eredményt kapni;
- ☹ nehéz automatizálni;
- ☹ nehéz ismételni (SCHLÖTTERER, 2004).

2.6.2.6. Amplifikált Fragment Hossz Polimorfizmus (AFLP)

Az AFLP a RAPD változatának tekinthető. A genomikus DNS-hez restrikciós emésztés után adapter szekvenciákat illesztnek, amelyekhez a PCR reakció során primerek tapadnak és sokszorozítják az adapterrel rendelkező fragmentumokat (VOS és mtsai, 1995). Elsősorban növények diverzitás vizsgálatánál alkalmazott módszer.

2.6.2.7. Restriktációs Fragment Hossz Polimorfizmus (RFLP)

Az RFLP a leggyakrabban és legkönnyebben alkalmazott DNS marker (BOTSTEIN és mtsai., 1980). Alkalmazása során a DNS-t restriktációs enzimes kezelésnek vetjük alá. A restriktációs enzimek baktériumok által termelt enzimek amelyek meghatározott szekvenciát felismerve a DNS-t emésztik, vágják. Ez az enzim felismerő hely kb 4-6bp hosszú (DOWLING és mtsai, 1990). Így különböző hosszúságú fragmentumok keletkeznek, amelyek elkülöníthetők.

Az RFLP kimutatásra korábban Southern blot–ot használtak, mikor a DNS fragmentumokat hibridizációval azonosították (SOUTHERN, 1975). Ma azonban már a PCR reakció során sokszorosítjuk fel a restriktációs helyet tartalmazó DNS szakaszt, ezt emésztjük a megfelelő restriktációs enzimmel és a fragmentumok várt méretétől függő koncentrációjú, etidium bromidot tartalmazó agaróz gélen futtatva az eltérő hosszúságú fragmentumok az UV fény alatt láthatóvá válnak.

Az RFLP előnye:

- ☺ könnyen, sok minta vizsgálható (AQUADRO és mtsai., 1992).

Az RFLP hátránya:

- ☹ a vizsgált minták csak két genotípusba sorolhatóak (ARCHIBALD és HALEY, 1993);
- ☹ alacsony a PIC (Polymorphic Information Content); heterozigotitás érték (GANAI és YADAV, 2003).

2.6.2.8. Egyszerű Szekvencia Hossz Polimorfizmusok (SSLPs)

A szatellit szó arra utal, hogy az eukarióták genomjában bizonyos bázisok többször egymás után ismétlődnek. Az ismétlődések hossza szerint megkülönböztetünk mikro- és miniszatelliteket (GOLDSTEIN és SCHLÖTTERER, 1999).

2.6.2.8.1. Miniszatellit (Variable number of tandem repeats, VNTR)

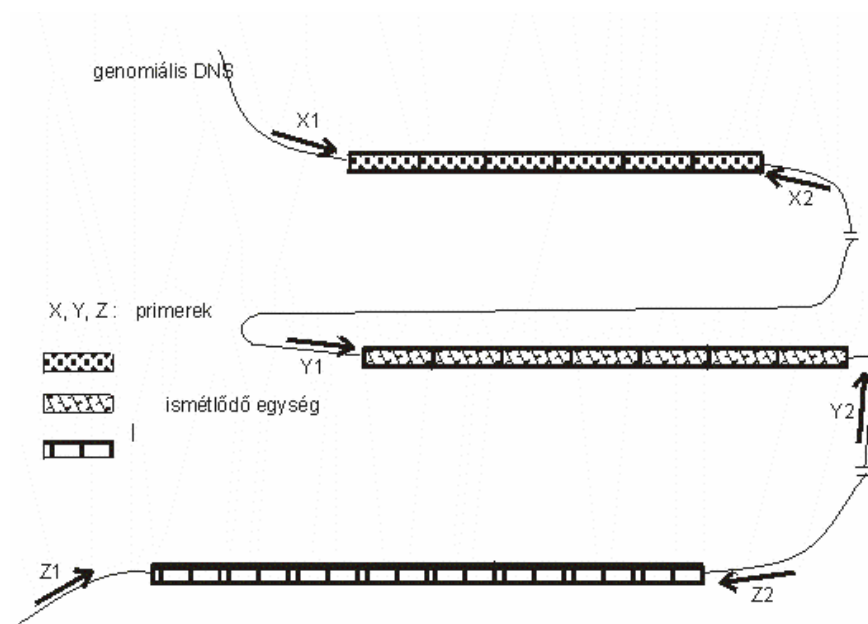
Az ismétlődő egységek 10-100 bázisból állnak (JEFFREYS és mtsai.,1985).

A genomban nem szóródnak szét egyenletesen, hanem legfőképpen a kromoszómák végein találhatóak (BROWN, 2002).

2.6.2.8.2. Mikroszatellit (Simple Sequence Repeats, SSR; Short Tandem Repeat, STR)

A mikroszatellit a genomban elszórtan elhelyezkedő egy, kettő, három vagy négy bázispár ismétlődésből álló, általában 50-300 bp hosszú szekvencia részletek elsősorban a nem kódoló régióban helyezkednek el (BUDURAM és mtsai., 2005) (8. ábra).

8. ábra: Mikroszatellit marker



Forrás: FÉSÜS és mtsai., 2000

A mikroszatellitek használatának előnyei:

- ☺ sűrűn, szétszórtan helyezkenek el a genomban;
- ☺ nagyfokú variabilitással rendelkeznek, sokallélos rendszerek;
- ☺ nagyfokú heterozigotitással rendelkeznek (GEORGES és mtsai., 1989; JEFFREYS és mtsai., 1985; SCHLÖTTERER, 2004);
- ☺ kodominánsan öröklődnek;
- ☺ viszonylag könnyű detektálni őket (BEAUMONT és BRUFORD, 1999; SHLÖTTERER, 2004);
- ☺ kis mennyiségű DNS templát elegendő (10-100 ng/μl);
- ☺ elég rövid ahhoz, hogy könnyen, gyorsan, pontosan amplifikálható legyen PCR-rel, amelyhez a DNS-t sokféle mintából nyerhetjük (vér, haj, nyál, bőr) (HEYEN és mtsai, 1997; LUIKART és mtsai, 1999);
- ☺ az egyes allélok mérete nagy pontossággal meghatározható (1bp).

Azonban van néhány hátrányuk is:

- ☹ néhány organizmusban nehéz őket izolálni (BEAUMONT és BRUFORD, 1999);
- ☹ bizonyos típusú mintáknál (pl.: nyál, haj, fekália) a mikroszatellit vizsgálat nehézkes (GERLOFF és mtsai, 1995; TABERLET és mtsai, 1996; GAGNEUX és mtsai, 1997);
- ☹ magas a mutációs ráta (SCHLÖTTERER, 2004);
- ☹ sok esetben nehéz automatizálni (SCHLÖTTERER, 2004);
- ☹ a különböző módszereket alkalmazó laborok eredményeinek egyesítése nehézkes (BEAUMONT és BRUFORD, 1999; SCHLÖTTERER, 2004).

A mikroszatellit markerek használata jelenleg a legelterjedtebb a populáció vizsgálatok körében. Szarvasmarha (MACHUGH és mtsai, 1997; HANOTTE és mtsai, 2000,2002; HANSLIK és mtsai, 2000; BARENDSE és mtsai, 1994; MOORE et al, 1994; VAIMAN és mtsai, 1994; BURNS és mtsai, 1995, GLOWATZKI-MULLIS és mtsai, 1995; STONE és mtsai, 1995; USHA és mtsai,1995; HEYEN és mtsai, 1997; KAPPES és mtsai, 1997), kecske (CHENYAMBUGA, 2002; GANAI és mtsai., 2003; JANDUROVA és mtsai., 2004; SAITBEKOVA és mtsai, 1999), ló (BOTHÁ, 2001);

KAKOI és mtsai., 2001), szamár (IVANKOVIC és mtsai., 2002) és juh (BUCHANAN és mtsai., 1994; CRAWFORD és LITTLEJOHN, 1998; PARSONS és mtsai., 1996; MARKLUND és mtsai., 1994; GLOWATZKI és MULLIS és mtsai., 1995; ARRANZ és mtsai., 1998; ZAJC és mtsai., 1997; ROONEY és mtsai., 1999; HEDRICK és mtsai., 2001; GOUDET és KELLER, 2002; GÁSPÁRDY és mtsai., 2004) fajban is világszerte folynak genetikai diverzitás vizsgálatok mikroszatelliteket használva.

2.6.2.8.2.1. Cigája állományok genetikai távolság meghatározására vonatkozó vizsgálatok mikroszatellit markerek használatával

Magyarország

GÁSPÁRDY és mtsai. (2004) 8 mikroszatellit marker segítségével 5 állomány (Jákotpuszta- őshonos (hegyi), Kardoskút- őshonos (alföldi), Akasztó- őshonos (alföldi), Makó- őshonos (alföldi), Cegléd- tejelő) genetikai távolságát határozta meg. Eredményeik szerint a tejelő változat lényegesen különbözik a többitől. A hegyi tájfajtaéhoz tartozó jákotpusztai állomány is jelentősen eltér az alföldi tájfajtaéhoz tartozó többi állománytól. Megállapították, hogy a földrajzi elkülönülés együtt jár genetikai elkülönüléssel.

Szerbia-Montenegró

CINKULOV (2003, 2004) előzetes eredményei szerint a két szerb cigája típus külön fajtának tekinthető, mivel genetikailag távol állnak egymástól. Vizsgálatait 23 mikroszatellittel végezte el, populációnként 50-50 egyed bevonásával.

Horvátország

BRADIC és mtsai. (2004) eredményei szerint a horvát cigája genetikailag teljesen különbözik az általa vizsgált Krk és Dubrovnik fajtáktól.

2.6.2.9. A mtDNS vizsgálata

A mitokondrium egy önálló genommal rendelkező, sejtenként néhány ezer példányban előforduló, a szervezet energia ellátásáért felelős sejtalkotórész. A mitokondriális

genomhoz nem kapcsolódnak hisztonok, egyéb fehérjék, amelyek védenék a mutagén hatásoktól. A D-loop régióban, amely a leghosszabb nem kódoló szakasz a mitokondrium genomjában bekövetkező mutációk gyorsan rögzülhetnek a genomban, így ennek vizsgálata evolúciós óraként alkalmazható. mtDNS-t használt a juh faj eredetének vizsgálatához HIENDLEDER és mtsai, 1998, 2002.

Az állati szervezetek mitokondriuma egy 15-20 Kb hosszú cirkuláris molekula. A gerincesek mitokondriuma 22 tRNS-t, 2rRNS-t és 13mRNS-t kódoló géneket tartalmaz (VENETIANER, 1998).

2.6.2.10. Egyszerű nukleotid polimorfizmus (SNP)

A DNS mikrosorozat (microarray) vagy chip-ek használata elterjedt a gén kifejeződés vizsgálatoknál, egyszerű nukleotid polimorfizmusok (SNP) kimutatásánál vagy DNS szekvenciák különbségének meghatározásánál különböző genotípusok között (WANG és mtsai, 1998). A mikrosorozat vizsgálat lehetővé teszi ezres nagyságrendű paraméterek egyszerű vizsgálatát egyetlen kísérletben (TEMPLIN és mtsai, 2002). A vizsgálat elve a Southern blot hibridizálási eljárás fordítottja. Ebben az esetben a próbát kötik szilárd hordozóhoz (FÉSÜS és mtsai., 2000).

Előnyei:

- ☺ alacsony mutációs ráta;
- ☺ könnyű tipizálni;
- ☺ különböző laborok eredményeinek összehasonlítása könnyű (SCHLÖTTERER, 2004).

A jövőben ez a módszer nagyobb szerephez juthat, azonban ma még a használata széles körben megfizethetetlen (SCHLÖTTERER, 2004; BUDURAM és mtsai., 2005). Egy példa a hatékonyságára: Hét-kilencszáz a genomban egyenletesen elszórt nukleotid variáció kimutatása azonos valószínűséggel vezet a keresett tulajdonsággal kapcsolt mutáció kimutatására mintha háromszáz-négyszáz mikroszatellit lókusszal végeznénk a kísérletet (FÉSÜS és mtsai., 2000).

2.7. Az immunrendszer és az MHC gének rövid, általános bemutatása

Az immunrendszerünk fő feladata a számára veszélyeztető kórokozók felderítése, felismerése és válaszreakció végrehajtása. Tágabb értelemben fő feladata az, hogy különbséget tegyen a saját és idegen struktúrák között (GERGELY, 1998).

Az immunrendszer két típusát különböztetjük meg (JAKAB, 2003):

1. veleszületett (natív) vagy természetes (11. táblázat)

Ez az ősi forma. A természetes akadályokon (pl. bőr) átjutó kórokozók a természetes immunrendszer sejtjeivel (fagociták, dendritikus sejtek, természetes ölő sejtek (NK-sejtek)) találkoznak.

2. szerzett (adaptív) (11. táblázat)

Az antigének elleni immunválasz több nap illetve hét elteltével kezdődik el, mivel a T és B sejtek megjelenéséhez ennyi idő szükséges. Ismételt fertőzés esetén a válaszadó képesség jelentősen javul (van memória).

11. táblázat: A veleszületett és szerzett immunitás közti főbb különbségek:

Jellemző	Természetes immunitás	Szerzett immunitás
Kialakulás	Ősi	Gerinceseknél alakult ki
Aktiváláshoz szükséges idő	Azonnal aktiválódik	Napok, hetek múlva
Válaszadás ismételt fertőzés esetén	Nincs memória	Van memória
Védelem átvihető képessége	Nem vihető másik egyedbe	Átvihető specifikus sejtekkel, ellenanyagokkal egyik egyedből a másikba
Felismert struktúra	Szénhidrát, lipid	Főként fehérje

Az immunológia kutatásban talán legfontosabb az MHC (Major Histocompatibility Complex- Fő Hisztokompatibilitási Komplex) gének feladatának tisztázása. Az MHC gének a szerv illetve szövetátültetések hatásainak tanulmányozása során kerültek előtérbe, amikor is felfigyeltek arra, hogy egy fajba tartozó egyedek közötti allotranszplantáció során bekövetkező szerv illetve szövetkilökődés az azok elleni immunválasz következménye. Az azonban nyilvánvaló volt, hogy ez nem lehet az MHC gének természetes funkciója mivel természetes körülmények között a graftkilökődésre nem kerülhet sor (RAJNAVÖLGYI és GERGELY, 1998).

Mai tudásunk szerint a klasszikus MHC molekulák legfőbb feladata az antigének lebontása során keletkező peptidek megkötése és bemutatása a T sejtek számára. Az MHC molekulákat kódoló gének száma, illetve azok polimorfizmusa befolyásolhatja a T sejt receptorok (TCR) által való felismerést. A különböző allelikus változatok eltérő szekvenciájú peptidek megkötésére képesek. Így az eltérő MHC allélok különböző módon teremthetnek közvetlen kapcsolatot a TCR-rel (GERGELY, 1998).

Az MHC fehérjékre nagyfokú polimorfizmus jellemző. Gyakran egy – egy génnek 50-100 allélja is van. Az allélok a mendeli öröklésmint szerint öröklődnek (PETRÁNYI és GYÓDI, 2005). Az MHC gének teljes hiányával járó betegség emberben nincsen, mivel a gének által kódolt fehérjék annyira fontosak, hogy azok hiánya esetén a magzat elpusztul. Régóta felfigyeltek arra, hogy számos betegség iránti fogékonyság összefüggésben van elsősorban a klasszikus MHC gének bizonyos alléljaival, mára több mint 5000 betegséggel találtak összefüggést (malária, tuberkolózis, trópusi láz, hepatitisz, AIDS) (TROWSDALE, 2005; TRATHERNE és mtsai., 2006).

Az MHC –n belül három domént különböztetünk meg, az MHC I , MHC II és MHC III. Az MHC I molekulák a szervezet szinte minden sejtjének felszínén megtalálható MHC I glikoproteinek szintéziséért felelősek. Az MHC II gének elsősorban az immunrendszer működésében résztvevő sejtek (B-limfociták, makrofágok, dendritikus sejtek) felszínén jelennek meg (RENARD és mtsai., 2003). Az MHC III régió különböző szerkezetű géneket tartalmaz, melyek közül sok a természetes immunrendszer sejtjeit kódolja (citokinek, nem immunsejtek (CYP-21, HSP70), komplement gének) (HURT és mtsai., 2003).

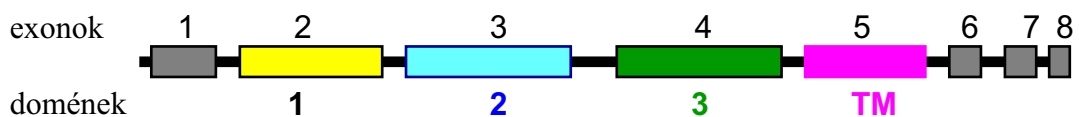
Az I és II domén közti legfőbb különbségeket az 12. táblázatban mutatjuk be.

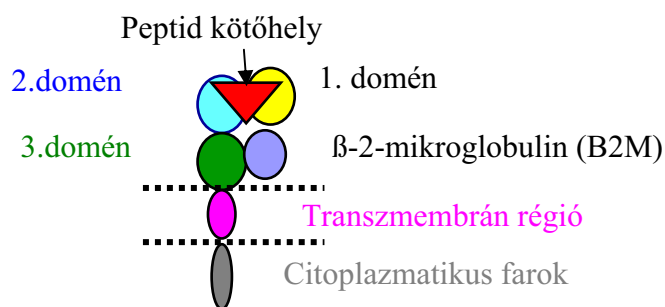
12. táblázat: Az MHC I és MHC II gének és membránfehérjék közti legfőbb különbségek

Jellemző	MHC I	MHC II
Gének megjelenése	Szinte minden sejt felszinen	Immunrendszer működésében résztvevő sejtek felszínén
Antigén prezentáció	T _C (citotoxikus) sejtek felé	T _H (segítő) sejtek felé
Megkötni képes peptidek mérete	8-10 aminosav	9-25 aminosav
Szerkezeti felépülés	2 α -lánc (ehhez kapcsolódik β -2-mikroglobulin)	α és β -lánc
Antigén bemutatás útja	Endogen, citoplazmatikus	Exogén, endoszómális

Az MHC I géneknek szerkezete emberben, sertésben és egérben is hasonló. Egy rövid szignálpeptideket kódoló első exont, α 1; α 2 és α 3 doménokat kódoló három exont, a transzmembránt kódoló 5. exont és a citoplazmatikus farok régiót, 3' UTR szakaszt kódoló utolsó 3 exont tartalmazzák (9. ábra).

9. ábra: MHC I gének szerkezeti felépítése





Forrás: Rogel-Gaillard C., 2006.

Az MHC I gének további két csoportra oszthatóak. A klasszikus MHC I (Ia) és nem klasszikus MHC I (Ib) gének csoportja. KLEIN és FIGUEROA (1986) és HOWARD (1987) véleménye szerint a nem klasszikus gének egyfajta pszeudogének vagy az azzá válás útján haladnak. Egyesek szerint viszont a törzsfejlődés során ezekre azért volt szükség, hogy a klasszikus MHC gének nagyfokú polimorfizmusa kialakulhasson, más teóriák szerint azonban ezek a törzsfejlődés zsákutcái. Legutolsó vizsgálati eredmények alapján, ezek a molekulák igen fontosak az antigén prezentáció folyamatában, kiegészítik az MHC I illetve II csoportba tartozó molekulák működését, és speciális funkciói vannak (RAJNAVÖLGYI és GERGELY, 1998).

Emberben és sertésben is három gén található a klasszikus és nem klasszikus MHC I gének csoportjában. A klasszikus géneket tekintve ezek a HLA (Human Leucocyte Antigen) -A, -B és -C emberben és SLA (Swine Leucocyte Antigen) -1, -2 és -3 sertésben, míg a nem klasszikus gének esetén ezek a HLA -E, -F és -G emberben és SLA -6, -7 és -8 sertésben. A HLA gének a 6. kromoszómán találhatóak, míg a SLA gének a 7. kromoszómán. Az SLA régió klasszikus géneket tartalmazó szakasza 307.078 nukleotidot, míg a nem klasszikus géneket tartalmazó része 158.063 nukleotidot tartalmaz (RENARD és mtsai., 2001, CHARDON és mtsai., 2001).

A klasszikus Ia gének, a CD 8+ limfociták számára mutatják be az antigének lebontásából származó peptideket, ezek igen polimorfak és nincsen szövet specikus kifejeződésük. Szerkezeti felépítésük konzervatív (SIMOND és mtsai., 2005).

Ezzel szemben a nem klasszikus Ib gének kevésbé polimorfak, szövet specifikus kifejeződésük van emberi fajban és a pontos szerepe nem mindnek ismert (CLEMENTS és mtsai., 2005).

Az MHC Ib gének pontos funkciója mind a mai napig ismeretlen (KNAPP és mtsai., 1998). A humán Ib gének közül is legtöbb információnk az HLA-G-ről van. Ez a 6. kromoszóma rövid karján található kb. 230 kb távolságra a HLA-A és 100 kb távolságra a HLA-F- géntől. A HLA-G homológját nem találták meg sem egérben sem az emberi fajhoz filogenetikailag közel álló emlősök között. A HLA-G kifejeződése szövetspecifikus. A méhlepényben a klasszikus MHC I és II molekulák nem fejeződnek ki, míg a nem klasszikus HLA-G és HLA-E igen (HVIID és mtsai., 2003). 15 HLA-G allélt azonosítottak a mai napig 0 alléllal együtt (HLA-G*0105N). Az HLA-G génnek igen fontos szerepe van az immuntolerancia kialakításában a terhesség folyamán (CAROSELLA és mtsai., 2005). A terhesség zavartalan lefolyásához szükséges, hogy a magzat számára kedvező immunológiai környezet alakuljon ki az anya szervezetében. Az anya számára a magzat immunológiai szempontból idegen anyag, ezért először a magzati antigéneket az anya immunrendszerének fel kell ismernie, amelyben fontos szerepet játszik a HLA-G gén. Ezen gén izoformái alakítják ki a lokális immunológiai környezetet (SZEKERES-BARTHÓ, 2005).

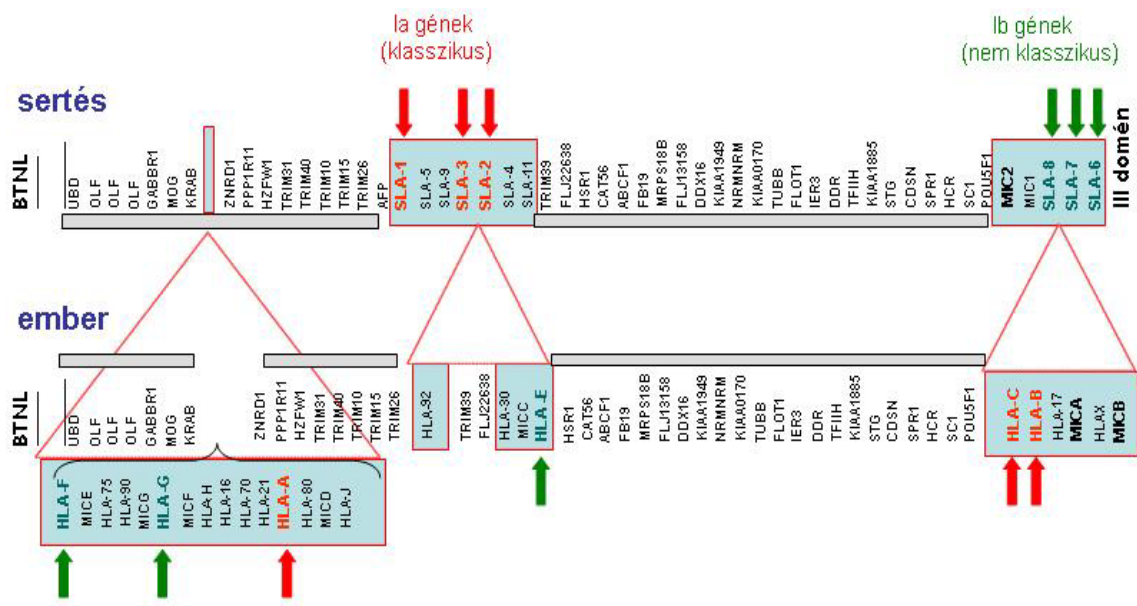
Az HLA-E gének átírása szinte minden emberi sejtben kimutatható, de a fehérje sejt felszíni megjelenése erősen korlátozott. Ismert funkciója, hogy a NK sejtek aktivitását növeli (STEVENS és mtsai., 2001).

Az HLA-F génről annyit tudunk, hogy csak a magzati májban jelenik meg (RAJNAVÖLGYI és GERGELY, 1998).

A filogenetikai vizsgálatok eredményei szerint a HLA-A, -G, -H lókuszok egyértelműen elkülöníthetőek a HLA-B, -C, -E, és -F lókuszoktól (MESSER és mtsai., 1992).

A 10. ábrán bemutatjuk az MHC régió Ia és Ib géneket tartalmazó szakaszának összehasonlító térképét sertés és emberi fajban. Sertésben az Ib és Ia gének is egymáshoz közel helyezkednek el, az SLA-3 az SLA-1 és SLA-2 gének között találhatóak. Emberben viszont az HLA-F és -G -hez közel található az HLA-A amely a nem klasszikus gének közé tartozik. Látható, hogy nincs analógia a gének elhelyezkedését tekintve.

10. ábra: Az MHC I régió összehasonlító térképe sertés és ember esetében



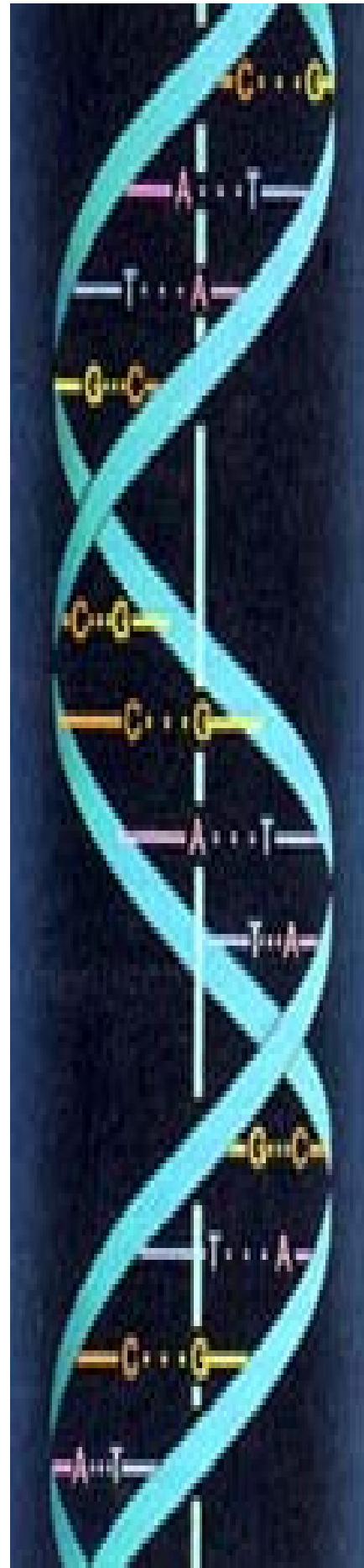
Forrás: Rogel-Gaillard C., 2006

Az emberi és sertés MHC Ib gének között nincsen ortológ kapcsolat sem szekvenciájuk sem pozíciójuk alapján (CHARDON és mtsai., 2000).

CREW és mtsai (2004) szerint az SLA-6, -7, -8 gének kifejeződése szövetspecifikus. 11 különböző mintát (agy, szív, bél, vese, máj, tüdő, izom, lép, here, csecsemőmirigy, peripheriás vér mononuclearis sejtek) vizsgáltak reverze-transzkriptáz PCR módszerrel. Eredményeik szerint az SLA-6 kifejeződött mindegyik általuk vizsgált mintában, míg az SLA-8 az agy kivételével mindegyikben és az SLA-7 gén kifejeződése volt leginkább szövetspecifikus. Mások eredményei szerint az SLA-8 kifejeződése a legerősebb a méhlepényben és valószínűleg ez a gén homológja az HLA-G -nek (SMITH és mtsai., 2005). Az SLA-6 lépben való kifejeződésének mértékéből arra következtetnek, hogy az HLA-E génhez lehet hasonló, azonban ezt még kijelenteni nem lehet, mivel további funkcionális vizsgálatokat igényel (KOLLER és mtsai., 1988).

SIMOND és mtsai (2005) 8 lókuszt polimorfizmusát vizsgálták a westran és nagy fehér sertés fajtákban. Az SLA-1, -2, -3, -6 lókuszon is új allélokat azonosítottak, azonban az SLA-6 lókuszt nagyon alacsony fokú polimorfizmust mutatott. Az SLA-6 2., 3. exonját vizsgálva ugyancsak alacsony fokú polimorfizmust találtak a yucatan fajtában is (SMITH és mtsai, 2005).

3. A vizsgálatok anyaga és módszere



3.1. A becsült genetikai távolság vizsgálat anyaga és módszere

3.1.1. A genetikai távolság vizsgálat anyaga

A vizsgálatokat a European Regional Focal Point for Animal Genetic Resources nevű szervezet által támogatott „Possible way of conservation the multipurpose Tsigai and other indigenous sheep breeds in Central-, Eastern and Balkan countries” című projekt keretében végeztük el. A Magyarország és Albánia által koordinált program keretében, a témavezetői (Dr. Kukovics Sándor, Kr. Kristaq Kume) szervezésében került sor a minták begyűjtésére a különböző országok állományyaiból. A gyapjú illetve vérminták begyűjtése 2004-ben kezdődött meg, mivel a nagyszámú és sok országra kiterjedő mintavétel hosszú előzetes előkészítést igényelt (13. táblázat). A genetikai diverzitás vizsgálatok során minimum 25 mintára van szükség populációnként, azonban a pontosabb eredmény érdekében a minél nagyobb elemszámra kell törekedni (FAO, 1998; PEREZ-ENCISO, 2003). Szervezők által kidolgozott mintavételi rend szerint fajtánként (fajtaváltozatonként) 40-40 egyedtől tervezték a gyapjúminták vételét, amiben 200-400 gyapjúszál és azokon gyapjúhagyma volt.

A gyapjúmintákat 8 ország juhállományyaiból gyűjtötték be. A 7 magyar cigájaállomány mellett 3 importból származó állományra is kiterjesztettük a vizsgálatokat (Pál Gábor egyéni vállalkozó zombori tejelő, erdélyi rozsdás és a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Állattenyésztési Tanüzem és Kísérleti Terén található csókai cigája állomány) de ezek esetében vérmintákra alapoztuk munkánkat. Az utóbbi 253, az előbbi 1253 egyedtől vett mintákat jelentett. A 7 magyar cigájaállomány kiválasztása KUKOVICS és mtsai. (2004) vizsgálati eredményei alapján történt. A külföldi országokban a szükséges gyapjúmintákat a programban résztvevő kutatók vették le és gyűjtötték be, az előre meghatározott rendben. A mintákat (13. táblázat) Dr. Kukovics Sándor (Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Herceghalom) gyűjtötte össze és ezeket adta át vizsgálatra a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Állattenyésztés- és Takarmányozástani Tanszék Állat molekuláris genetikai laborjának vizsgálat céljából. A vizsgálatok a DE-ATC Állattenyésztés- és Takarmányozástani Tanszék Állat molekuláris genetikai laborjában és a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Paprika Géntérképezési laborjában történtek.

Az 13. táblázatban bemutatjuk a vizsgálatba vont állományokat, azok elemszámát, a vizsgálat során használt rövidítésüket.

13. táblázat: A genetikai távolság meghatározáshoz vizsgált állományok és azok jellemzői

Ország	Állomány	Fajtakör	Elem- szám	Rövidítés
Magyarország	Hagyományos (őshonos)	cigája	53	HU-SMA-AC
			40	HU-KMKK-AC
			39	HU-KMNP-AC
			53	HU-SZIC-AC
	Csókai Zombori tejelő	cigája	45	HU-MRD-TAC
			125	HU-DE-CSC
			77	HU-PG-ZC
			39	HU-LB-TCZ
Románia	Rozsdás (Jucu-Zsuku)	cigája	42	HU-OJ-TC
			51	HU-PG-TRC
			40	RO-RUDA
Románia	Román ruda	zackel	40	RO-RUDA
	Tordai rozsdás	cigája	40	RO-RUST-TS
Albánia	Albán cigája	cigája	39	AL-TS
	Albán ruda	zackel	37	AL-RUDA
	Bardhoke	zackel	31	AL-BARDH
Bulgária	Foltos fejű maritza	zackel	39	BU-PFMAR
	Pleveni fekete fejű juh	zackel	35	BU-PLBH
	Rodopski cigája	cigája	30	BU-ROD-TS
	Staroplaninski cigája	cigája	42	BU-STAR-TS
	Fehér fejű maritza	zackel	41	BU-WFMAR
Horvátország	Horvát cigája	cigája	50	CR-TS
Törökország	Sakiz	zackel	49	TR-SAKIZ
	Gokceada	zackel	42	TR-GOKCE
	Kivircik (Marmara régió)	cigája	46	TR-KIV-MAR
	Kivircik (Trakya régió)	cigája	53	TR-KIV-TRA
Szlovákia	Handel	cigája	25	SL-HAN-TS
	Jugat	cigája	22	SL-JUG-TS
	Kamo	cigája	19	SL-KAO-TS
	Sirig	cigája	22	SL-SIR-TS
	Vojin	cigája	5	SL-VOJN-TS
	Jurbis	cigája	24	SL-JUR-TS
	Kamendin	cigája	16	SL-KAM-TS
	Olymp	cigája	5	SL-OLYM-TS
	Ondrej	cigája	16	SL-OND-TS
	Rybar	cigája	16	SL-RYB-TS
	Vancouver	cigája	15	SL-VAN-TS
Brend	cigája	10	SL-BREN-TS	
Szerbia és Montenegró	Zombori tejelő	cigája	41	SM-ZP-TS
	Csókai	cigája	12	SM-CS-TS
	Svrljiska zackel pramenka	zackel	48	SM-SVR-PR
	Krivovirska zackel pramenka	zackel	32	SM-KRI-PR

3.1.2. A mintavétel anyaga és módszere

3.1.2.1. Vérmintavétel

Szükséges eszközök:

5 ml-es EDTA véralvadásgátlót tartalmazó műanyag vércsövek
fecskendő
egyszer használatos injekciós tű

Módszer

Egyedenként 2,5-3,0 ml vér az állatok torkolati vénájából (vena jugularis) lett véve, és azonnal EDTA véralvadásgátlót tartalmazó vérminta vevő csövekbe került. Állatonként új injekciós tűt használva, a keresztszennyezések elkerülése céljából. A mintákat a vizsgálat megkezdéséig -20°C-on tároltuk.

3.1.2.2. Gyapjűmintavétel

Szükséges eszközök

Nylon vagy papírzacskó

Módszer

A gyapjű minták vétele tépéssel történt, annak érdekében, hogy a hajhagymák a szálak végén minél nagyobb számban épen megmaradjanak. Az egyes állatoktól származó gyapjűcsomók megszámozott nylon- vagy papírzacskóba kerültek. A minták szállítása a laborig, illetve tárolásuk szobahőmérsékleten történt.

3.1.3. A genomiális DNS izolálás anyag és módszere

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

3.1.3.1. Genomiális DNS izolálása vérből (ZSOLNAI és ORBÁN, 1999)

Szükséges vegyszerek:

- vérmosó 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 desztillált vízzel felöntjük, majd autoklávban 110°C-on sterilizzük)

Módszer:

50 µl vérmosó oldatot adagoltunk 1,5ml-es eppendorf csövekbe, majd 50 µl vérmintát mostunk bele. Az elegyet vortex segítségével összekevertük, majd 2 percig centrifugáltuk 1200 fordulat/perc sebességgel. A felülúszó elegyet leborítottuk a pelletről, majd újra 50 µl vérmosó oldatot adagoltunk minden mintához, vortexelés és centrifugálás következett. Ezt a lépést még egyszer megismételtük. Miután harmadjára is leöntöttük a felülúszó elegyet, a pellethez 100µl lízis puffert és 4,0µl proteináz K enzimet tartalmazó elegyet adtunk. Vortex segítségével a pelletet eltávolítottuk az eppendorf cső aljáról és 56°C-on 60 percig, majd 94°C-on 10 percig inkubáltuk a mintákat.

Az így nyert genomiális DNS minákat -20°C-on tároltuk a további vizsgálatig.

3.1.3.2. Genomiális DNS izolálása hajhagymából (FAO/IAEA, 2004):

Szükséges vegyszerek:

- puffer (250µl Tween 20 + 5ml 10XPCR puffer MgCl₂ nélkül + 5ml MgCl₂ (25mM) + desztillált víz 50ml re kiegészítve)
- Lízis puffer (100µl puffer + 0,5µl proteináz K (20mg/ml))

Módszer:

1,5ml-es eppendorf csövekbe 3-10db hajhagymát vágunk ügyelve arra, hogy a hagyma felett maximum 0,5 cm hajszál legyen. A levágott hagymákhoz adtuk az előre elkészített lízis puffert, majd 60 percig 60 °C-on és 20 percig 95 °C inkubáltuk őket.

Az így nyert genomiális DNS minákat -20°C-on tároltuk a további vizsgálatig.

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

3.1.4. Polimeráz láncreakció (PCR)

Szükséges vegyszerek:

PCR elegy:

- desztillált víz
- 10x puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1% Triton X-100) (Promega, Medison, USA)
- 2,5 mM MgCl₂ (Promega, Medison, USA)
- 0,2 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia Biotech, USA)
- 0,5 U Taq DNS polimeráz (Promega, Medison, USA)
- 20-100 μ M genomiális DNS
- 160 nM fluoreszcens jelölt forward primer
200 nM jelöletlen reverz primer

Mivel a mikroszatellitek igen variabilis markerek, már kis genetikai különbség kimutatására is alkalmasak. Azonban új mikroszatellit izolálása egy fajban idő és pénzigényes folyamat ezért mi is már azonosított markereket használtunk vizsgálatunkhoz. A mikroszatellit markerek kiválasztása során a következő szempontokat vettük figyelembe (14. táblázat):

- ✓ minél polimorfabbak legyenek;
- ✓ vizsgálatuk a könnyű legyen; az United States Department of Agriculture (USDA) és Australian Gene Mapping Web Site szerint (<http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/JILL.HTM>, <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>);
- ✓ több fajban is megtalálhatóak legyenek (BARKER és mtsai., 2001);
- ✓ szakirodalmak és kollegáim véleménye;
- ✓ Food and Agricultural Organization (FAO) és az International Society for Animal Genetics (ISAG) ajánlása.

14. táblázat: Az alkalmazott primerek, főbb jellemzőikkel

Kromo- szóma	Név	Hossz (bp)	Jelölés	Forward primer szekvencia (5'-3')	Reverse primer szekvencia (5'-3')	Forrás
1	BM6506	184-212	JOE	GCACGTGGTAAAG AGATGGC	AGCAACTTGAGCA TGGCAC	BISHOP és mtsai, 1994
2	OarFCB20	92-118	NED	AAATGTGTTTAAAG ATCCATAACAGTG	GGAAAACCCCAT ATATACCTATAC	BUCHANAN és CRAWFORD, 1992
4	MAF70	128-175	FAM	GCAGGACTCTACG GGGCCTTGC	CACGGAGTCACAA AGAGTCAGACC	CRAWFORD és mtsai, 1992
5	MCM527	150-185	FAM	GTCCATTGCCTCA AATCAATTC	AAACCACTTGACT ACTCCCCAA	HULME és mtsai, 1994
8	INRA127	181-215	JOE	CTACAGCTCTGAT GAGAACC	CGTTTCTCAAAC TTCATTGCC	VAIMAN és mtsai, 1994
9	ILSTS11	180-296	JOE	GCTTGCTACATGG AAAGTGC	CTAAAATGCAGAG CCCTACC	BREZINSKY és mtsai, 1993
12	TGLA53	114-143	FAM	CAGCAGACAGCTG CAAGAGTTAGC	CTTTCAGAAAATAG TTTGCATTTCATGC AG	CRAWFORD és mtsai, 1995
14	TGLA357	113-154	FAM	GCAGAGTCTGAGT TTAAACTTCTCTA ACACC	GAGGGCAAAAAG GTTTGGGGTGTAT GG	GEORGES és MASSEY, 1992
15	MAF65	116-140	FAM	AAAGGCCAGAGTA TGCAATTAGGAG	CCACTCCTCCTGA GAATATAACATG	BUCHANAN és mtsai, 1992a
17	OarCP49	88-140	NED	CAGACACGGCCTTA GCAACTAAACGC	GTGGGGATGAATA TTCCCTTCATAAGG	EDE és mtsai, 1995
19	OarAE119	98-160	FAM	CTCAGCAAATGGT TCCTGGGCACC	TTTTATAGTGAGG TGACCACCTTGATG	PENTY és mtsai, 1993
21	OarCP20	88-195	NED	GATCCCCCTGGAGG AGGAAACCGG	GGCATTTCATGGC TTTAGCAGG	EDE és mtsai, 1995

22	BM1314	136-176	FAM	TTCCTCCTCTTCTC TCCAAAC	ATCTCAAACGCCA GTGTGG	BISHOP és mtsai, 1994
23	MAF35	104-122	NED	AGTTACAAATGCA AGCATCATACCTG	TCAAGAAATTTGG AGCACAAATTCCTGG	SWARBRICK és mtsai, 1991
25	MCMA7	228-270	JOE	ATCAGTCCTTCAC AAGGTTG	CCTGTTGCTATGT CATGTTG	BEH és mtsai, 2000
26	CSSM43	237-273	JOE	AAAACCTCTGGGAA CTTGAAAACTA	GTTACAAATTTAA GAGACAGAGTT	MOORE és mtsai, 1994

Módszer:

PCR reakciókhoz ABI 9700, ABI2700 és MJ Research Thermocycler programozható PCR készülékeket (DNA Thermal Cycler) használtunk.

A vegyszerek bemérése steril fülke alatt történt.

17.kép: Vegyszerek bemérése steril fülke alatt



Fotó: Árnási M.

PCR kondíciók:

<u>Kezdő denaturáció</u>	94 °C	3 perc	} 35 ciklus
Denaturáció	92 °C	1 perc	
Primerek kapcsolódása	60 °C	1 perc	
<u>Elongáció</u>	72 °C	1 perc	
Záró szakasz	72 °C	7 perc	

A PCR vizsgálatok minél gyorsabb elvégzéséhez törekedtünk multiplex reakciókat kialakítani, ahol lehetett (15. táblázat). Ha több genomrészlet vizsgálatát végezzük egyszerre, akkor multiplex PCR reakcióról beszélünk (EDWARDS és GIBBS, 1994).

Ebben az esetben a PCR csőben egy mintában több különböző lókuszra specifikus primerpár használunk egy időben. Ezzel csökkenthetjük a vizsgálat költségét, illetve idejét.

15. táblázat: Multiplex reakciók kialakítása

Multiplex	Mikroszatellit
1	BM6506, BM1314
2	MCM527, MAF35, CSSM43
3	INRA127, TGLA357
4	ILSTS11, MAF65
5	TGLA53, MCMA7

3.1.5. A mikroszatellit allélok meghatározása kapilláris-elektroforézissel

Szükséges vegyszerek:

- Belső standard (jelölés: ROX; MBK)
- Formamid
- PCR termék

Módszer:

0.5µl PCR termékhez 10µl belső standardet tartalmazó formamidot adtunk. Az elegyet 85 °C-on 3 percig inkubáltuk, majd azonnal jégre tettük 2-3 percre, az analizátorba való helyezés előtt. Az allélok detektálása és vizsgálata ABI PRISM 3100 Genetic Analyzerrel történt, 36 cm-es kapillárisokat használva. Az adatok gyűjtése a GeneScan software (Applied Biosystems) segítségével történt. Az adatok értékelése a Genographer programmal történt.

3.1.6. A labor vizsgálatok után alkalmazott statisztikai módszerek

A GeneScan software által kapott adatok a Genographer software segítségével lettek kiértékelve. Az allélok méretének meghatározása, leolvasása szemmel történt, majd a leolvasott értékek Excell táblázatba kerültek.

3.1.6.1. Az adatok statisztikai értékelése során alkalmazott programok

- POPULATIONS (<http://www.pge.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations>)

A Nei féle standard genetikai távolság (D_S) és a minimum genetikai távolság (D_M) (NEI, 1987) meghatározásához a POPULATION verzió1.2.28. (LANGELLA, 1999) programot használtuk.

- GENEPOP (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>)

GENEPOP program segítségével a lókuszonkénti allélszámok, a várt (H_{exp}) és tényleges (H_{obs}) heterozigotizációs értékeket határoztuk meg. Ennek a programnak a használata, annyiban kissé nehézkes, hogy az allélok mérete helyett egy sorszámot ad az egyes alléloknak, így az eredmények leolvasása során nézni kell mind az eredeti táblázatot, az allélméretekkel, mind pedig a kapott átkódolt táblázatot.

- MICROSAT (<http://hpgl.stanford.edu/projects/microsats>)

Ez a program kissé nehezen kiismerhető, több száz oldalas outputja van. Vizsgálataink során a populáció specifikus allélok meghatározása során alkalmaztuk.

- PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>)

A távolság mátrix file-ok szöveg file-ba való konvertálása után a PHYLIP (Phylogeny Inference Package) software verzió 3.57c (FELSENSTEIN, 1995) NEIGHBOR programját használtuk. A filogenikus fák létrehozása során az UPGMA algoritmus bizonyult szemléletesebbnek, pontosabbnak. A fák grafikus ábrázolására a DRAWTREE és a DRAWGRAM programok kerültek felhasználásra.

- A populációs adatok értékeléséhez az ARLEQUIN verzió2.0 (SCHNEIDER és mtsai., 2000) programot is használtuk a Hardy Weinberg egyensúly meghatározásához.

3.2. A sertés nem klasszikus immungének vizsgálatának anyaga és módszere

3.2.1. Génkifejeződés vizsgálat

3.2.1.1. RNS vizsgálatához szövetmintavétel

Szükséges eszközök

- 1,8 ml kriocső (NUNC, Franciaország)
- DNáz mentes csipeszek, ollók
- Steril borotva pengék

Módszer

Vágás után közvetlenül, steril körülményeket között végeztük a mintavételt. A kivágott és apróra vágott minta darabokat azonnal kriocsőbe helyeztük és folyékony nitrogén tartályba helyeztük a -80 °C-os hűtőbe tárolás előtt, ahol a minták a felhasználásig voltak.

A következő minták vétele történt felnőtt kocától és kantól:

hosszú hátizom, combizom, aorta, szív, rekeszizom, lép, csecsemőmirigy, méh, vese, petefészek, here, Peyer plakk, mellékhere, epésbél, éhbél, csípőbél, hasnyálmirigy, máj, tüdő, bőr, kismedence körüli ideg, mellékvese, lapocka tájéki ideg, mandula, agy, ín, fül porc, lábfej porc, orr porc, orr nyálkahártya, farok zsír, nyaki zsír, háti zsír

100 napos magzatokból a következő mintákat vettük:

hosszú hátizom, combizom, aorta, szív, rekeszizom, lép, csecsemőmirigy, vese, petefészek, here, mellékhere, epésbél, éhbél, csípőbél, hasnyálmirigy, tüdő, bőr, kismedence körüli ideg, agy, orr porc, lábfej porc, fül porc, köldökzsinór, méhlepény

3.2.1.2. RNS izolálás

Szükséges vegyszerek

- zsíros, rostos és általános szövetekben történő RNS izoláláshoz kit (QIAGEN EASY Lipid, Fibrous, Classical kit, Franciaország)
- RNáz mentes DNáz szet (QIAGEN, Franciaország)
- RNáz mentes desztillált víz

Módszer

A teljes RNS izolálása során a kitben található útmutatást követtük. Az útmutatóban javasolt DNáz kezelést elvégeztük a felnőtt kocából származó zsíros szöveti minták kivételével mindenhol. A kapott teljes RNS minőségének ellenőrzése után, -20 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.2.1.3. Primer tervezés, kiválasztás és génspecifitásuk ellenőrzése

A primer tervezés során a Primer Express és Primer 3 primer tervező programokkal és kézzel terveztük a lehetséges primer párokat.

PCR elegyhez szükséges vegyszerek:

- desztillált víz
- 10 X puffer (100 mM Tris-HCl pH: 8,3; 500 mM KCl) (Promega, USA)
- 1,5 mM $MgCl_2$ (Promega, USA)
- 200 μ M dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen, USA)
- 0,035 U Taq DNS polimeráz (Promega, USA)
- Vörös krezol (LREG, Franciaország)
- 20-100 ng cDNS
- 100 nM forward primer
- 100 nM reverz primer

Módszer

A PCR reakciót 15 μ l-es végtérfogatra állítottuk össze. A PCR körülmények a következők voltak:

94 °C	60 másodperc	} 35X
94 °C	20 másodperc	
60 °C	15 másodperc	
60 °C	90 másodperc	
4 °C	∞	

PCR termék tisztításához szükséges vegyszerek

- Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (membránhoz kötő folyadék, membrán mosó folyadék, nukleáz mentes víz) (Promega, USA)
- 60 µl PCR termék

Módszer

A tisztítás véghezvitele során a gyártó által megadott lépéseket követtük.

Ligáláshoz szükséges vegyszerek

- pGEM-T vektor system (pGEM-T vektor 1,2 µg, T4 DNS ligáz 100U, 2X puffer) (Promega, USA)
- desztillált víz
- 2,5 µg DNS fragmentum

Módszer

A ligálási reakcióelegyet 10 µl –re készítettük el a kitben található útmutató szerint. A ligálás egy éjszakán át történt 4 °C-on.

Elektroporáláshoz szükséges vegyszerek

- elektrokompetens baktérium (LREG, Franciaország)
- ampicillin (100 mg/ml)
- LB medium (6 g/l glükóz, 10 g/l tryptone, 5 g/l élesztőgomba) (Invitrogen, USA)
- IPTG (izopropil-tiogalaktozidáz) + X-gal (5-bromo -4-chloro-3-indoyl-β-D galaktozid) (200mg/ml)
- ligált termék

Módszer

1 µl ligált terméket 30 µl baktériumba vittünk és az egészet küvettában (Eurogentec, Belgium) Elektroporator 2510 (Eppendorf) típusú készülékkel transzformáltuk. A transzformált baktériumokat 1 ml ampicillin tartalmú LB agar médiumba pipettáztuk. Majd rázva 37 °C-on 30-45 percig tartó inkubálás következett. Ampicillin, X-gal+IPTG tartalmú LB agar táptalajra 100 µl terméket cseppentettünk, amit azonnal egyenletesen

elosztottunk rajta, és 37°C-on egy éjszakán át inkubáltunk. A táptalajokban csak a plazmival rendelkező baktériumok szaporodásának biztosítására az ampicillint, míg a β-galaktoszidáz aktivitásának kimutatására az X-gal-t és IPTG-t használtuk. A plazmidba sikeresen beépített inszert jelenlétét a fehér klónok jelenléte mutatta.

Plazmid DNS izoláláshoz szükséges vegyszerek

- SNAP Mini Prep Kit (Resuspension buffer (reszuspenziós puffer), Lysis Buffer (lízis puffer), Precipitation Salt (kicsapó só), Binding buffer (kötő puffer), Wash buffer (mosó puffer), 4X Final Wash (mosó puffer), TE buffer (Tris-EDTA puffer), RNase A) (Invitrogen, USA)

Módszer

A plazmid DNS izoláláshoz előzőleg 3 ml ampicillint tartalmazó folyékony LB oldatba fehér telepet helyeztünk és egy éjszakán át ráztunk 37°C-on. Másnap ezt használva a SNAP Mini Prep kit utasításait követve izoláltunk plazmid DNS-t.

Plazmid DNS szekvenálásához szükséges vegyszerek

- DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Sequencing reagent premix (szekvenálási reagens mix), Control DNA (kontroll DNS), Loading solution (futtató puffer), Ammonium acetate buffer (ammonium acetát puffer)) (Amersham, USA)
- 150 ng plazmid DNS
- desztillált víz
- 10 nM reverze és /vagy forward primer

Módszer

A szekvenálási PCR reakcióhoz a DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham, Egyesült Királyság) utasításait követtük. A PCR reakció lépései:

94 °C	20 másodperc	}	35 X
50 °C	15 másodperc		
60 °C	90 másodperc		
4 °C	∞		

A kicsapáshoz (precipitáció) szükséges vegyszerek

- 3M nátrium-acetát (pH 4,6)
- 95% alkohol
- 75% alkohol

Módszer

A PCR termék mennyiségétől függően 1/10 arányban 3M os nátrium acetátot adtunk a termékhez, majd 80 µl 95%-os alkoholt. Pipettával óvatosan összekevertük az elegyet, majd 15 percig 4 °C-on, 12000 rpm sebességen lecentrifugáltuk. Az alkoholt eltávolítottuk a pelletről, majd 100 µl 75 %-os alkoholt adtunk hozzá. Ezt újra centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on, 12000 rpm sebességgel. Az alkoholt eltávolítottuk a pelletről, majd a szekvenálási reakció előtt 20 µl desztillált vízben visszaoldottuk.

A szekvenáláshoz MegaBACE (Amersham, Egyesült Királyság) típusú kapilláris szekvenálót használtunk.

Adatelemzés

A termék szekvenáltatása után BLASTN program (ALTSCHUL és mtsai., 1990) segítségével ellenőriztük a szekvenciák génspecifitását és kiválasztottuk a legmegfelelőbb primer párt génenként.

3.2.1.4. A reverz transzkriptáz reakció

Szükséges vegyszerek

- 10 pmol/µl oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen, USA,)
- RNáz mentes víz (LREG, Franciaország)
- DEPC kezelt víz (Invitrogen, USA)
- 5 X RT puffer (Invitrogen, USA)
- DTT (ditiotreitól) (Fermentas, Németország)
- 10mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen, USA)
- RNase OUT (Invitrogen, USA)
- Superscript II (Invitrogen, USA)

Módszer

2,5 µg teljes RNS-t hez adtunk 1 µl 10 pmol/µl koncentrációjú oligo dT primert és ezt kiegészítettük RNáz mentes vízzel 12 µl-re. Az elegyet 10 percig 70°C-on inkubáltuk, majd 5 percre jégre helyeztük és óvatosan lecentrifugáltuk. Mintánként 4 µl 5X RT puffer, 2µl DTT, 1 µl 10 mM koncentrációjú dNTP mix, 0,5 µl RNáz OUT és 1 µl Superscript II enzim hozzáadásával az elegyet szobahőmérsékleten tartottuk 5 percig, majd 42 °C-on és 85 °C-on inkubáltuk az enzim aktivitás leállítása céljából. Ezt a lépést követően 30 µl DEPC kezelt vizet adtunk a mintáinkhoz és -20 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.2.1.5. Abszolút kvantifikáció

Szükséges vegyszerek:

- SYBR Green Master Mix (ABI, USA)
- 200 nM, 400 nM, 600 nM forward primer (MWG, Németország)
200 nM, 400 nM, 600 nM reverz primer
- desztillált víz
- 7 ng cDNS
- plazmid DNS

Módszer

A legjobb primer koncentrációk meghatározásához 10⁶ molekula számú pDNS-t, 10 µl 2 X Master Mixet (ABI, USA), 200nM, 400nM, 600nM reverz és forward primereket használtunk és az elegyet kiegészítettük desztillált vízzel 20 µl-re. A plate-t zárófoliával lezártuk, és 1 percig 12000 rpm fordulatszámon a falon levő cseppek elmozdítására lecentrifugáltuk. A PCR reakciót ABI 7900 típusú gépen végeztük el. Az eredményeket az SDS 2.1. szoftver segítségével kaptuk meg. A reakció körülmények a következők:

50 °C	2 perc	} 40 X
95 °C	10 perc	
95 °C	0:15 perc	
60 °C	1 perc	
95 °C	0:15 perc	
60 °C	0:15 perc	

A PCR hatékonyságok, standard görbék és a legjobb cDNS koncentráció meghatározásához is a fent leírt módszert alkalmaztuk.

3.2.1.6. Relatív kvantifikáció

A relatív kvantifikáció során a következő módszert alkalmaztuk :

- Adataink normalizálása referencia génnel :

$$\Delta Ct = CT_{GOI} - CT_{Gref}$$

Ahol, CT az a ciklus szám ahol a felszaporított mennyiségű templát eléri a fix küszöbértéket

CT_{GOI} az általunk vizsgált gén Ct értéke

CT_{Gref} a referenciaként használt gén Ct értéke

- A normalizált adatokat összehasonlítottuk a kalibrátor segítségével (ez a mi esetünkben lehet a gén vagy minta) :

$$\Delta \Delta Ct = (CT_{GOI} - CT_{Gref})_{kondíció} - (CT_{GOI} - CT_{Gref})_{kalibrátor}$$

- A relatív kvantifikáció során használt képlet:

$$2^{-\Delta \Delta Ct}$$

3.2.2. Polimorfizmus vizsgálat

3.2.2.1. Genomiális DNS izolálás

Szükséges eszközök, vegyszerek

- Genisol Maxi Prep Kit (Lysis buffer (lízis puffer), Digestion buffer (emésztő puffer), RNase A, Precipitation buffer (kicsapó puffer), DNA buffer (DNS puffer)) (ABgene, Egyesült Királyság)

Vizsgálatunkhoz különböző európai és kínai sertésfajtákat használtunk (16. táblázat).

16. táblázat: Az SLA Ib gének polimorfizmus vizsgálata során használt fajták

Eredet	Vizsgált állományok	Egyedi azonosító szám
Európa	nagy fehér sertés dd (H04/H04)	E1 369
Melim program (Melanoma hordozó Libechov törpesertés)		
1 keresztezés	Melim duroc F1 (MelimXduroc) F1 (MelimXduroc)	60143 51176 81015 81016
2. keresztezés	Melim duroc F1 (MelimXduroc) duroc BC (F1Xduroc) BC (F1Xduroc)	310 270 79 10831 31044 31045
Kína	guizou dawei bama meishan erhua lian xiang laiwu yimeng min lantang wuzhi shan	4 2 3 1 2 1 2 1 1 2 2

Munkánk kezdeteként egy egyed vizsgálatát végeztük el fajtánként, illetve csoportonként. Dolgozatomban ennek eredményeit mutatjuk be.

Módszer

A limfocita minták vétele évekkorábban történt. A genomiális DNS kivonásáig -80 °C-on műszalmában tárolódtak. Az izolálás során a Genisol Maxi Prep kit (ABgene, Egyesült Királyság) –et használtuk, és a gyártó utasításait követtük. A kivont DNS-t 4 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.2.2.2. SNP detektálás

- *PCR reakcióhoz szükséges vegyszerek*
 - desztillált víz
 - 10 X puffer (100 mM Tris-HCl pH: 8,3; 500 mM KCl) (Promega, USA)
 - 2,5 mM $MgCl_2$ (Promega, USA)
 - 200 μ M dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen, USA)
 - 0,035 U Taq DNS polimeráz (Promega, USA)
 - vörös krezol (LREG, Franciaország)
 - 10 ng DNS
 - 100 nM forward primer
 - 100 nM reverz primer

PCR körülmények:

	94 °C	60 másodperc	}	35X
	94 °C	20 másodperc		
SLA-6	65 °C	15 másodperc		
SLA-7	58 °C	15 másodperc		
SLA-8	62 °C	15 másodperc		
	60 °C	90 másodperc		
	4 °C	∞		

Módszer

A genomiális DNS-eket használva a PCR reakcióhoz szükséges vegyszerekkel a fent megadott körülmények mellett elvégeztük az amplifikálást.

- *Elektroforézishez szükséges vegyszerek*
 - 1 X TAE puffer (Tris-Base, EDTA, desztillált víz, ecetsav)
 - 0,5 mg/ml etidium bromid
 - 2 %-os QA agaróz (Qbiogene, USA)

Módszer

Az amplifikált termékek ellenőrzésére minden esetben 2 %-os etidium bromidot tartalmazó agaróz gélt használtunk. 4 g agaróz porhoz 200 ml 1 X TAE puffert adtunk. Mikrohullámú sütőben az elegyet felforrósítottuk, és kiöntöttük fésűvel ellátott géltálcára. Mikor a gél kihült, eltávolítottuk a fésűt és a zsebekbe helyeztük a mintáinkat. A gél nagyságától függően 20-60 percig futtattuk a mintákat 120 V-on. Majd UV fény alatt ellenőriztük az eredményeinket.

- *PCR termék tisztításához szükséges vegyszer*
 - Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Membran Binding Solution (membránhoz kötő folyadék), Membrane Wash Solution (membrán mosó folyadék), Nuclease free water (nukleáz mentes víz)) (Promega, USA)
 - 60 µl PCR termék

Módszer

A tisztítás véghezvitele során a gyártó által megadott lépéseket követtük.

- *A szekvenálási PCR reakcióhoz szükséges vegyszerek*
 - 20-30 ng tisztított PCR termék
 - 10 nM forward primer
10 nM reverz primer
 - szekvenálási reagens mix (Amersham, Egyesült Királyság)
 - desztillált víz

Módszer

A szekvenálást mindkét irányban elvégeztük, így a szükséges vegyszerek bemérése során a minták egyik feléhez a forward míg a másik feléhez a reverz primereket adtuk.

A PCR reakció körülményei:

94 °C	20 másodperc	} 35 X
50 °C	15 másodperc	
60 °C	90 másodperc	
4 °C	∞	

- *A kicsapáshoz (precipitáció) szükséges vegyszerek*
 - 3M nátrium-acetát (pH 4,6)
 - 95% alkohol
 - 75% alkohol

Módszer

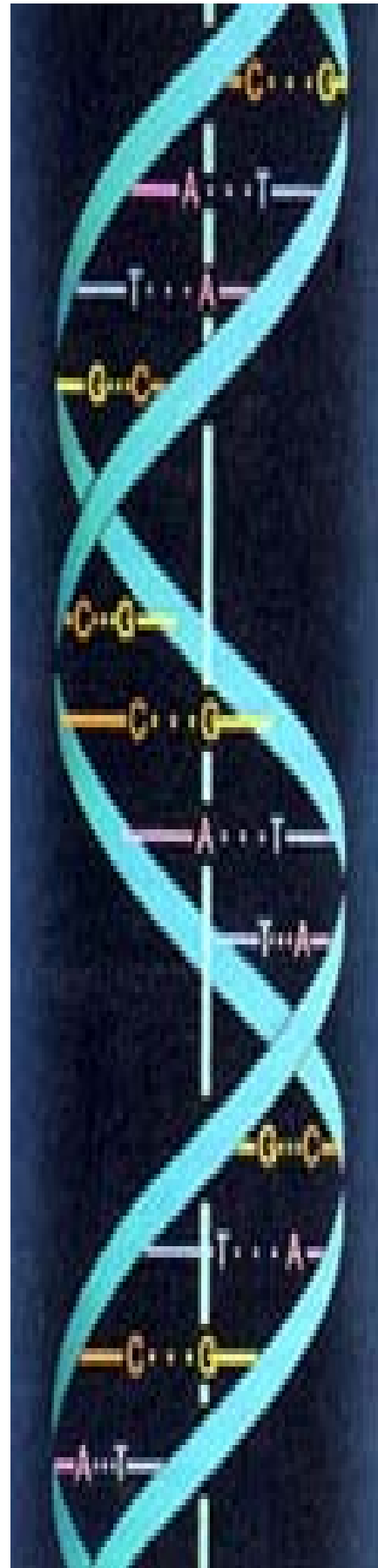
A PCR termék mennyiségétől függően 1/10 arányban 3M os nátrium acetátot adtunk a termékhez, majd 80 µl 95%-os alkoholt. Pipettával óvatosan összekevertük az elegyet, majd 15 percig 4 °C-on, 12000 rpm sebességen lecentrifugáltuk. Az alkoholt eltávolítottuk a pelletről, majd 100 µl 75 %-os alkoholt adtunk hozzá. Ezt újra centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on, 12000 rpm fordulatszámom. Az alkoholt eltávolítottuk a pelletről, majd a szekvenálási reakció előtt 20 µl desztillált vízben visszaoldottuk.

- A szekvenáláshoz MegaBACE (Amersham, Egyesült Királyság) típusú kapillárisos szekvenálót használtunk.

3.2.2.3. Adatelemzés

A szekvenálás után a kapott szekvenciákat a NovoSNP 2.0.3. program (WECKX és mtsai., 2005) segítségével elemeztük.

4. Vizsgálati eredmények és azok értékelése



4.1. A becsült genetikai távolság vizsgálat eredményei a cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállományok között

A 8 országban található, 41 cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállományra kiterjedő genetikai távolság vizsgálatunkat mikroszatellit markerek segítségével végeztük el.

A vizsgált 16 lókuszon összesen 384 allélt határoztunk meg. A legkevesebb allélt (11) a MAF35 lókuszon, míg a legtöbbet (35) a MAF70 lókuszon azonosítottuk. Az átlagos lókuszonkénti allélszám 4.1 (MAF35) és 10.4 (MAF70) között változott.(17. táblázat).

A genetikai kapcsolatok meghatározásával foglalkozó tanulmányok egyik legfontosabb része a heterozigotizáció meghatározása. A populáción belüli heterogenitás jellemzésére leggyakrabban a heterozigóták arányát adják meg.

A beltenyésztés, a hosszú időn át történő vérfriesség nélküli tenyésztés különösen a kis egyedszámú populációkban jelentősen csökkentheti a genetikai variabilitás szintjét, és alacsony heterozigotizációs értéket ad. A várt heterozigotizációs értéket (H_{exp}) az allélfrekvencia értékekből számoljuk Hardy-Weinberg egyensúlyt feltételezve. A kapott heterozigotizációs érték (H_{obs}) pedig a tényleges heterozigóták aránya a vizsgált állományokban.

Az átlagos várt heterozigotizációs érték a 16 lókuszon 0,716. A legalacsonyabb értéket (0,614) a BM6506, míg a legmagasabb értéket (0,812) a BM1314 lókusz esetén kaptuk. Az összes marker esetén a várt heterozigotizációs érték magasabb mint a kapott heterozigotizációs érték. A átlagos kapott heterozigotizációs érték az összes vizsgált lókuszra 0,525. A legalacsonyabb értéket a MAF65 (0,3190), míg a legmagasabb értéket a BM1314 lókusz esetén kaptuk.

Az átlagos állományonkénti kapott heterozigotizációs érték 0,356-0,629 között, míg a várt 0,640-0,843 között változott. Az összes vizsgált populáció kevésbé heterozigóta mint ahogy azt vártuk. A heterozigóták hiánya a legmagasabbnak a szerb zombori állományban (SM-ZP-TS), míg legalacsonyabbnak az egyik magyar hagyományos állományban (HU-SMA-AC) bizonyult. A becsült beltenyésztettség alapján az összes vizsgált populációban tartani lehet a beltenyésztéses leromlástól, de leginkább a szerb zombori állományban (52,7%), míg legkevésbé a horvát cigája állományban (12,8%)

(18. táblázat). A multilókusz Fst értékek azt mutatják, hogy a teljes genetikai variancia 16%-a a populációk közötti különbségekből adódik, míg a fennmaradó 84% az egyedek közötti különbség eredménye. Az átlagos állományonkénti allélszám alapján a legdiverzebb állomány a magyar csókai állomány, HU-DE-CSC (8.8), míg a legkevésbé diverz a szerb zombori, SM-ZP-TS (2.3) (18. táblázat).

17. táblázat: A vizsgált lókuszok főbb jellemzői

Lókusz neve	Hossz (bp)	Azonosított Lókuszonkénti		H_{obs}	H_{exp}	F_{is}
		allélok száma	átlagos allélszám			
MAF35	104-122	11	4,1	0,494	0,623	0,207
CSSM43	237-273	26	8,7	0,509	0,795	0,361
MCM527	150-185	20	7,1	0,540	0,750	0,281
TGLA53	114-143	24	8,2	0,634	0,788	0,196
MCMA7	228-270	31	8,0	0,622	0,750	0,171
OarFCB20	92-118	22	6,6	0,407	0,687	0,408
TGLA357	113-154	27	7,9	0,584	0,767	0,238
INRA127	181-215	31	6,2	0,605	0,677	0,106
MAF70	128-175	35	10,4	0,423	0,794	0,468
MAF65	116-140	18	5,6	0,319	0,674	0,526
ILSTS11	180-296	23	6,1	0,600	0,713	0,158
OarCP20	88-195	17	5,1	0,500	0,677	0,262
OarCP49	88-140	28	5,6	0,619	0,681	0,092
BM1314	136-176	32	8,6	0,644	0,812	0,207
BM6506	184-212	21	5,0	0,554	0,614	0,097
OarAE119	98-160	18	4,7	0,352	0,645	0,455
Átlag		24	6,8	0,525	0,716	0,264

18. táblázat: Az állományokban azonosított allélok száma, heterozigotitási értékek és a becsült beltenyésztettség értékei

Populáció	Azonosított allélok száma	Populációnkénti átlagos allélszám	H_{obs}	H_{exp}	F_{is}
HU-DE-CS	140	8,8	0,518	0,746	0,305
HU-PG-ZC	130	8,1	0,500	0,759	0,341
HU-PG-TRC	130	8,1	0,594	0,766	0,225
HU-LB-TCZ	115	7,2	0,552	0,694	0,205
HU-SMA-AC	126	7,9	0,629	0,745	0,156
HU-OJ-TC	129	8,1	0,613	0,771	0,205
HU-KMKK-AC	129	8,1	0,597	0,770	0,225
HU-KMNP-AC	107	6,7	0,584	0,718	0,192
HU-SZIC-AC	118	7,4	0,542	0,767	0,291
HU-MRD-TAC	106	6,6	0,506	0,724	0,299
AL-TS	130	8,1	0,528	0,739	0,285
AL-RUDA	117	7,3	0,500	0,761	0,343
AL-BARDH	107	6,7	0,525	0,747	0,297
CR-TS	107	6,7	0,594	0,682	0,128
TR-SAKIZ	95	5,9	0,436	0,640	0,319
TR-KIV-MAR	100	6,3	0,486	0,678	0,282
TR-KIV-TRA	130	8,1	0,483	0,772	0,374
TR-GOKCE	100	6,3	0,503	0,772	0,349
RO-RUST-TS	128	8,0	0,577	0,787	0,267
RO-RUDA	118	7,4	0,504	0,768	0,343
SM-ZP-TS	36	2,3	0,356	0,753	0,527
SM-CS-TS	85	5,3	0,512	0,765	0,330
SM-SVR-PR	91	5,7	0,392	0,716	0,452
SM-KRI-PR	98	6,1	0,416	0,728	0,428
BU-STAR-TS	115	7,2	0,458	0,726	0,366
BU-ROD-TS	100	6,3	0,520	0,735	0,290
BU-PLBH	121	7,6	0,490	0,798	0,376
BU-PFMAR	124	7,8	0,577	0,769	0,246
BU-WFMAR	138	8,6	0,568	0,787	0,275
SL-OND-TS	112	7,0	0,574	0,835	0,313
SL-KAM-TS	104	6,5	0,552	0,806	0,315
SL-KAO-TS	110	6,9	0,461	0,751	0,386
SL-SIR-TS	127	7,9	0,487	0,805	0,395
SL-VAN-TS	79	4,9	0,513	0,780	0,342
SL-HAN-TS	123	7,7	0,537	0,812	0,339
SL-JUR-TS	110	6,9	0,561	0,761	0,263
SL-JUG	120	7,6	0,582	0,804	0,276

SL-OLYM-TS	50	3,1	0,439	0,843	0,480
SL-RYB-TS	84	5,3	0,560	0,741	0,244
SL-BREN-TS	90	5,6	0,583	0,781	0,253
SL-VOJN-TS	50	3,1	0,613	0,812	0,245
Átlag	108,02	6,75	0,525	0,759	0,308

A különböző állományokban vizsgált egyedszám és az állományokban azonosított allélok száma között közepes korrelációt ($r= 0.499$) határoztunk meg 5 %-os hibahatár mellett.

Egy állomány amelyben a gén és genotípusok gyakorisága nemzedékről nemzedékre állandó Hardy-Weinberg egyensúlyban van. Minden vizsgált populáció minden lókuszra nézve eltér a Hardy-Weinberg egyensúlytól (HWE). Az eltérést három szignifikancia szinten határoztuk meg ($P<0,05$; $P<0,01$ és $P<0,001$). Az összes vizsgált lókusz eltér a HWE-től a TR-KIV-TRA állományban. A MAF35, MAF 65, MAF70, CSSM43, TGLA53, TGLA357, BM1314, OarCP20 és OarFCB20 lókuszok esetén $P<0,001$; a MCMA7, INRA127, OarCP49 és BM6506 $P<0,01$ míg a MCM527, ILSTS11 és OarAE119 $P<0,05$ szinten. A SL-OLYM-TS állományban a CSSM 43, TGLA53 és MCM527 lókuszokon, míg a SL-VOJN.TS állományban a MAF 70 lókuszon ($P<0,05$) állapítottunk meg eltérést a HWE-től (19. táblázat).

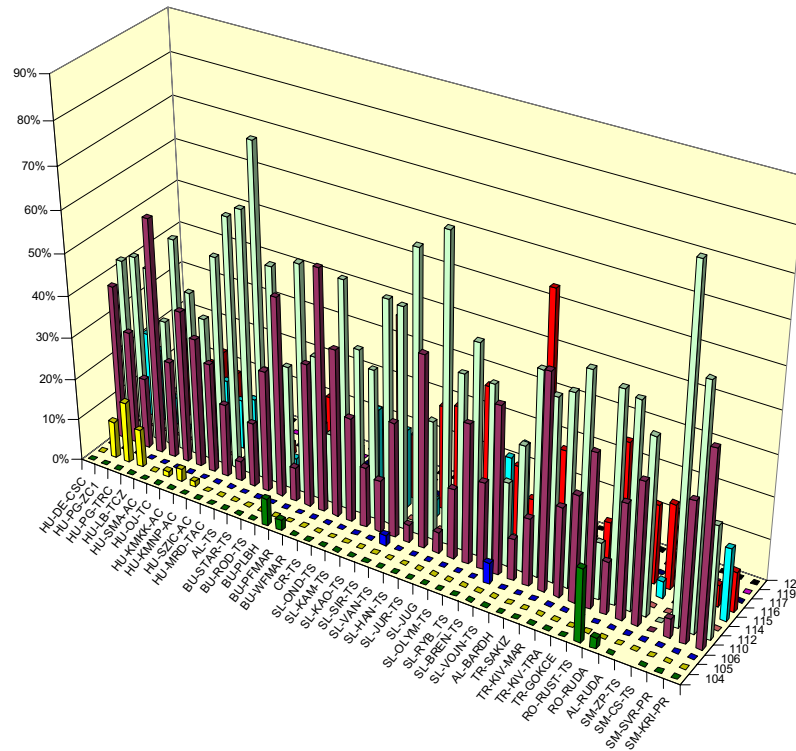
19. táblázat: A vizsgált állományok Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérése

	MAF35	CSSM43	MCM527	TGLA53	MCMA7	OarFCB20	TGLA357	INRA127	MAF70	MAF65	ILSTS11	OarCP20	OarCP49	BM1314	BM6506	OarAE119
HU-DE-CSC	***	*	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
HU-PG-ZC	**	**	***	**	***	***	***	***	***	***	**	***	***	***	***	***
HU-PG-TRC	**	**	***	**	***	***	*	***	***	***	*	***	***	***	***	***
HU-LB-TCZ	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
HU-SMA-AC	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
HU-OJ-TC	*	*	***	*	***	*	*	***	***	***	*	***	*	***	*	***
HU-KMKK-AC	***	***	***	*	***	*	*	***	***	***	*	***	*	***	*	***
HU-KMNP-AC	***	***	***	*	***	*	*	***	***	***	*	***	*	***	*	***
HU-SZIC-AC	***	***	***	*	***	*	*	***	***	***	*	***	*	***	*	***
HU-MRD-TAC	***	***	***	**	***	***	**	***	***	***	**	***	**	***	**	***
AL-TS	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
BU-STAR-TS	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
BU-ROD-TS	*	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
BU-PLBH	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***
BU-PFMR	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
BU-WFMR	**	**	***	**	***	***	**	***	***	***	**	***	***	***	***	***
CR-TS	***	***	***	*	***	***	**	***	***	***	**	*	***	***	***	***
SL-OND-TS	***	***	***	**	***	***	**	***	***	***	**	***	***	***	***	***
SL-KAM-TS	*	*	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-KAO-TS	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-SIR-TS	*	*	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-VAN-TS	***	***	***	**	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-HAN-TS	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-JUR-TS	**	*	***	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-JUG	*	*	***	*	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-OLYM-TS	***	***	***	*	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-RYB-TS	***	***	***	*	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-BREN-TS	***	***	***	*	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SL-VOJN-TS	***	***	***	*	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
AL-BARDH	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
TR-SAKIZ	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
TR-KIV-MAR	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
TR-KIV-TRA	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
TR-GOKCE	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	*	***	***	***	*	***
RO-RUST-TS	**	**	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	*	***
RO-RUDA	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	*	***
AL-RUDA	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	*	***	***	***	*	***
SM-ZP-TS	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SM-CS-TS	***	***	***	*	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SM-SVR-PR	***	***	***	*	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***	*	***
SM-KRI-PR	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***

*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001

Az egyes lókuszokon előforduló allélok gyakorisága között a különböző populációkban igen nagy különbséget találtunk. A nagy elemszám miatt a legkevesebb allélszámmal rendelkező MAF 35 lókusz allélgyakorisági értékeit mutatjuk be a 41 populációban (11. ábra).

11. ábra: A MAF 35 lókusz allélgyakorisági értékei a vizsgált 41 populációban



A vizsgált lókuszokon 50 állományspecifikus allélt határoztunk meg 26 állományban. Ezen allélok megóvása különösen nagy figyelmet kíván, mivel csak bizonyos állományokban vannak jelen. A CSSM43 és MAF65 lókuszokon nem azonosítottunk ilyen allélokat. TGLA357 és OarCP49 markereket találtuk leginformatívabb, mivel azokban 8 illetve 7 állományspecifikus allélt határoztunk meg (20. táblázat). A következő vizsgált állományokban a zárójelben jelöltük a specifikus allélok számát: HU-KMCK-AC (2), HU-PG-ZC (2), HU-LB, TCZ (1), HU-SZIC-AC (1), HU-SMA-AC (5), HU-DE-CSC (3), HU-OJ-TC (1) BU-STAR-TS (4), BU-ROD-TS (1), BU-PFMAR (1), BU-WFMAR (5), BU-PLBH (3), RO-RUST-TS (2), RO-RUDA (1), AL-TS (1), AL-RUDA (1), AL-BARDH (2), SL-HAN-TS (1), SL-VAN-TS (1), SL-JUR-

TS (3), SL-RYB-TS (1), SL-SIR-TS (1), TR-KIV-TRA (3), SM-CS-TS (2), SM-KRI-PR (1), SM-SVR-PR (1).

20. táblázat: Állomány specifikus allélok

Lókusz	Allél	Gyakoriságok (%)	Állomány
MAF35	119	3.6	AL-BARDH
	114		TR-KIV-TRA
	122		TR-KIV-TRA
MCM527	176	2.5	HU-PG-ZC
	150		BU-STAR-TS
	159		BU-WFMAR
	182		RO-RUST-TS
TGLA53	143	2.5	AL-TS
MCMA7	231	1.9	HU-SMA-AC
	228		HU-SMA-AC
	259		BU-WFMAR
	270		SM-CS-T
OarFCB20	115	2.0	BU-PLBH
	107		SL-HAN-TS
	111		RO-RUST-TS
	99		AL-RUDA
TGLA357	148	2.1	HU-LB-TCZ
	146		HU-SMA-AC
	153		HU-SMA-AC
	143		HU-SMA-AC
	154		HU-OJ-TC
	118		HU-KMKK-AC
	130		SL-JUR-TS
	136		AL-BARDH
INRA127	215	1.7	HU-SZIC-AC
	209		SL-VAN-TS
MAF70	128	1.6	BU-STAR-TS
	173		BU-WFMAR
	131		BU-WFMAR
ILSTS11	180	2.4	HU-DE-CSC
	188		HU-DE-CSC
	238		HU-PG-ZC
	296		BU-STAR-TS
OarCP20	189	3.2	SM-KRI-PR
OarCP49	97	1.9	HU-DE-CSC
	107		BU-STAR-TS
	120		BU-ROD-TS
	124		BU-PLBH
	89		BU-PLBH
	88		RO-RUDA
	140	SM-CS-TS	

BM1314	136	1.8	HU-KMKK-AC
	175		SL-JUR-TS
	174		SL-RYB-TS
BM6506	184	2.4	BU-PFMAR
	185		BU-WFMAR
	212		SM-SVR-PR
OarAE119	156	2.7	SL-SIR-TS
	125		SL-JUR-TS
	128		TR-KIV-TRA

A vizsgált állományok közötti genetikai kapcsolat meghatározásához genetikai távolság mátrixot készítettünk a Nei féle standard genetikai távolság (D_S) és minimum genetikai távolság (D_M) értékek alapján. Azonban jobbnak láttuk a minimum genetikai távolság értékek alapján kapott mátrix használatát (1.melléklet). Ha a mátrixban szereplő érték 0,05-nél kevesebb a populációk közötti különbség elhanyagolható, míg a 0,25-nél nagyobb értékek nagy genetikai különbözőséget jelentenek.

A legnagyobb távolságot a szerb zombori SM-ZP-TS és két szlovák illetve a török sakiz állomány között találtuk (SL-VOJN-TS - 0.356, TR-SAKIZ - 0.315, SL-RYB-TS - 0.306).

A magyar állományokat vizsgálva azt találtuk, hogy a HU-LB-TCZ és HU-KMKK-AC (0.175), HU-KMNP-AC (0.194) illetve a HU-PG-TRC és HU-KMKK-AC (0.148), HU-KMNP-AC (0.166) állományok vannak a legtávolabbi rokonságban egymással. A Kőrös-Maros Nemzeti parkhoz tartozó két állomány (HU-KMKK-AC, HU-KMNP-AC) (0.028), illetve a HU-SMA-AC (Magyar Juhtenyésztő Szövetség (MAJUSZ) által őshonosként nyilvántartott) és a HU-OJ-TC (MAJUSZ által tejelőként nyilvántartott) állományok (0.034) közötti genetikai különbség elhanyagolható eredményeink szerint. A makó-rákosi állományt (HU-MRD-TAC) a tejelő és a hagyományos változat közötti átmeneti típusúnak tekintik. Vizsgálati eredményeink alapján a hagyományos HU-SZIC-AC állománnyal (0.045) van csekély mértékű genetikai különbözősége és közel azonos mértékben különbözik az összes többi vizsgált állománytól.

A vizsgálatba bevont bolgár állományok genetikailag közel vannak egymáshoz. Legsorosabb kapcsolatot a két cigája változat (BU-STAR-TS és BU-ROD-TS (0.053)) illetve a két maritza változat (BU-PFMAR és BU-WFMAR (0.056)) között találtunk. A

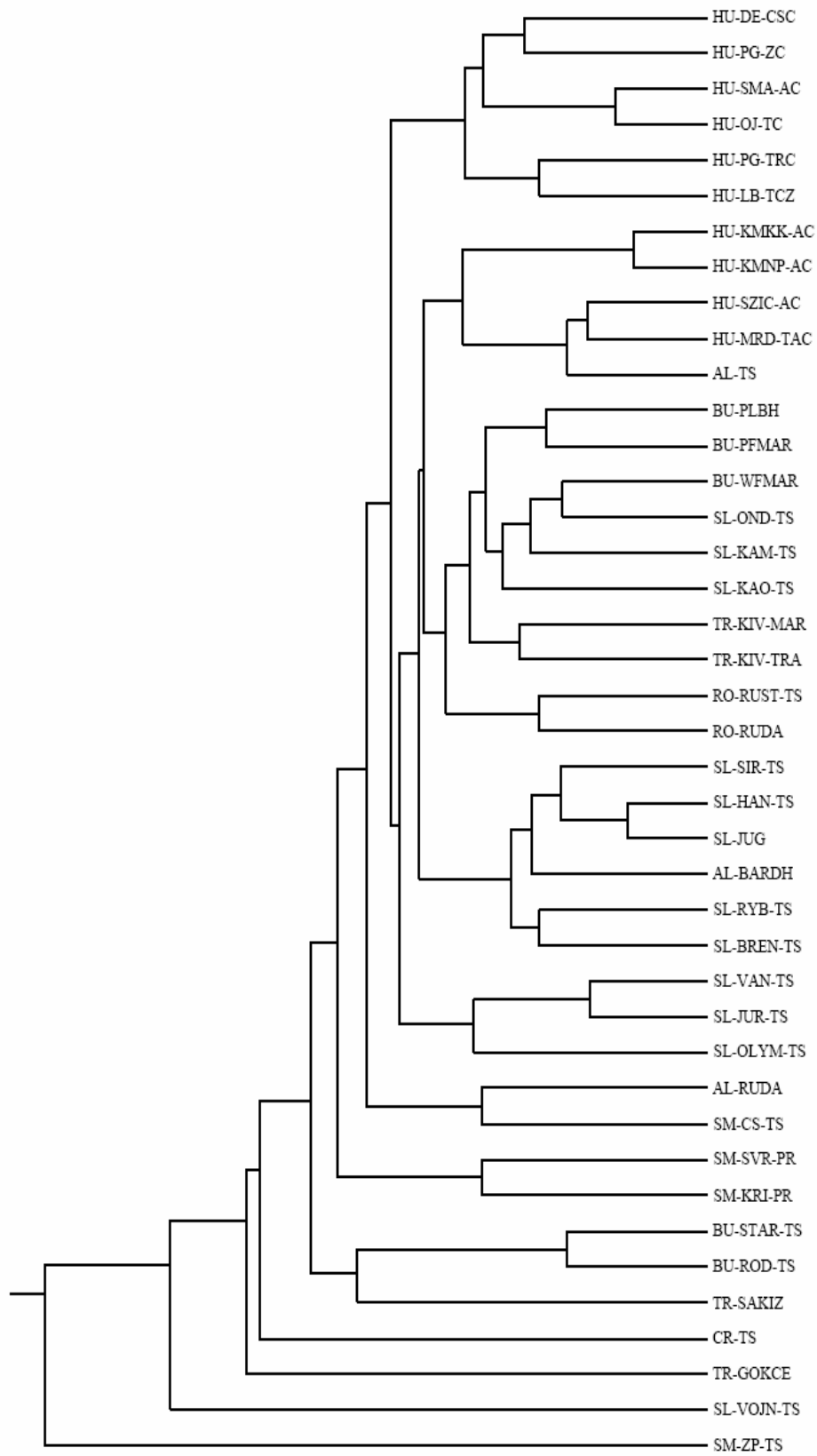
pleveni feketefejú juh (BU-PLBH) a foltos fejű maritza juhhoz (BU-PFMAR) áll legközelebb (0.0618) és legtávolabb a rodopski cigájától (BU-ROD-TS) van (0.087).

A szlovák SL-VOJN-TS állomány igen elkülönül az összes többi vizsgált szlovák állománytól. Véleményünk szerint ez az eredmény nem magyarázható az alacsony vizsgált (5 db) egyedszámmal, mivel más állományoknál, ahol hasonlóan alacsony elemszámmal dolgoztunk, nem ilyen meglepő eredményt kaptunk. A vizsgált 12 szlovák állomány közül elhanyagolható a különbség a SL-JUG és SL-HAN-TS (0.03) illetve a SL-JUG és SL-JUR-TS (0.042) állományok között.

A vizsgált albán, török és szerb állományok jelentősen elkülönülnek egymástól. A vizsgálatba vont két román állomány (RO-RUDA, RO-RUST-TS) genetikailag hasonló (0.065), míg az albán és román ruda (RO-RUDA és AL-RUDA) állományok közötti kapcsolat sem sokkal nagyobb mértékű, de nem elhanyagolható (0.087). A két-két régióból származó török kivircik állomány (TR-KIV-MAR, TR-KIV-TRA) és szerb pramenka állomány (SM-SVR-PR, SM-KRI-PR) közötti genetikai különbség is közepes mértékű (0.072 és 0.086). A horvát cigája (CR-TS) és a szerb zombori (SM-ZP-TS) állomány genetikailag igen elkülönül a többi 39 vizsgálatba bevont állománytól.

A vizsgált állományok genetikai kapcsolatát a genetikai különbség (D_M) adatokból UPGMA algoritmussal szerkesztett filogenetikus fán mutatjuk be (12. ábra).

12. ábra: UPGMA algoritmus alapján szerkesztett fa



A filogenetikai fa alapján elmondhatjuk, hogy a fa fő struktúrája összefüggésben van a vizsgált állományok földrajzi elhelyezkedésével, még akkor is, ha néhány esetben ez az eredmény szemben áll az előzőleg várttal. A két szerb pramenka állomány (SM-KRI-PR és SM-SVR-PR) amelyek kizárólag a volt Jugoszlávia területén tenyésztett fajta elkülönül a szerb tejelő (zombori vagy pivnicki) cigájától (SM-ZP-TS). Eredményeink szerint a szerb csókai cigája (SM-CS-TS) áll legközelebbi rokonságban az albán ruda (AL-RUDA) fajtaival, ami azt jelentheti, hogy az előbbi változatot importálhatták Albániába. Egy korábbi tanulmányban (CINKULOV és mtsai., 2003), a két szerb cigája változatot összehasonlítva, megállapították, hogy a tejelő zombori és a csókai változat két külön fajtának tekinthető. Ezt a vizsgálatot 23 mikroszatellit használatával végezték el 50-50 egyedet vizsgálva.

A horvát cigája teljesen elkülönül a többi cigája állománytól. Ezt a fajtát a szerb cigájáktól származó hatások érthették.

A két bolgár cigája állomány (BU-STAR-TS és BU-ROD-TS) igen közeli rokonságban van és ők együtt közel állnak a török sakiz fajtaéhoz (TR-SAKIZ) amely a zackel típusba tartozik.

A fa egyik ágán az SL-JUR-TS és SL-VAN-TS állományok találhatóak, amelyek genetikailag közel egymáshoz és a SL-OLYM-TS állományhoz. A fa másik ágát alkotják az SL-JUG és SL-HAN-TS illetve az SL-RYB-TS és SL-BREN-TS állományok. Az SL-SIR-TS pedig az SL-JUG és SL-HAN-TS állományokkal van legszorosabb kapcsolatban. Ezekhez áll közel az albán bardhoke juh (AL-BARDH), amely a zackel típusba tartozik. Ezekről távolabb található még egy szlovák állományokat tartalmazó csoport. Ebbe tartozik a SL-KAO-TS, SL-KAM-TS és a SL-OND-TS állományok. Az utóbbihoz áll legközelebb a bolgár fehér fejű maritza (BU-WFMAR), amely két állomány tudomásunk szerint nem volt kapcsolatban egymással a multban. A SL-VOJN-TS állomány teljesen elkülönül nemcsak a többi vizsgált szlovák hanem az összes vizsgált állománytól.

A bolgár állományok vizsgálata során azt találtuk, hogy a pleveni feketefejű juh (BU-PLBH) a foltos fejű maritzával (BU-PFMAR) van a legközelebbi rokonságban annak ellenére, hogy eddig a két fajtát egymástól igen távolinak tartották. A két bolgár cigája típus (rodopski cigája és staroplaninski cigája, BU-ROD-TS és BU-STAR-TS) eredményeink szerint távol van a többi bolgár állománytól, azonban legközelebbi

rokonságban a török sakiz (TR-SAKIZ) állománnyal vannak. A bolgár cigáják kialakítása során szovjet cigájákat használtak.

A kivircik juhok a cigája fajta közeli rokonaként tartják számon. A két török régióból származó (Trakya és Marmara) kivircik állomány (TR-KIV-TRA és TR-KIV-MAR) egyértelműen közeli rokonságban állnak egymással és a filogenetikai fán egy rokonsági csoportba tartoznak a bolgár feketefejű juhval (BU-PLBH), a két bolgár maritza juhval (foltos fejű maritza (BU-PFMAR), fehér fejű maritza (BU-WFMAR)) és meglepetésre három szlovák cigája állománnyal (SL-KAO-TS, SL-KAM és SL-OND-TS).

A román állományok vizsgálata során azt az eredményt kaptuk, hogy a román ruda (RO-RUDA) a román rozsdás cigájával van legközelebbi rokonságban (rozsdás cigája Tordáról – RO-RUST-TS), ami azt jelenti, hogy lehetett közös ősök, de a keresztezések eredményeként mára morfológiailag teljesen eltérnek egymástól.

A különböző magyar cigája állományok két ágon csoportosulnak. Az egyik ágon két alágat különböztethetünk meg, ahol is a két Kőrös-Maros Nemzeti Parkból származó őshonos állományok (HU-KMKK-AC és HU-KMNP-AC) és a HU-SZIC-AC őshonos törzstenyészet a makó-rákosi tenyészet (HU-MRD-TAC) található. Ez utóbbi eddigi feltételezés szerint átmenetet képez az őshonos és a tejelő típusok között (Kukovics és mtsai., 2004). Ezekkel az állományokkal közeli rokonságban az albán cigája (AL-TS) áll. A másik magyar tenyészeteket tartalmazó ág ugyancsak két-két tenyészeteket tartalmazó alágakra bontható. A soltszentimrei (HU-SMA-AC) és az akasztói (HU-OJ-TC) állomány áll közeli rokonságban egymással, holott az előbbi az őshonos, míg az utóbbi a tejelők között szerepel a hivatalos nyilvántartás szerint. A rozsdás cigáját (HU-PG-TRC) amely merinóval keresztezve alakult ki a ceglédi tejelő (HU-LB-TCZ), a Csókáról importált állományt (HU-DE-CSC) egy másik tejelő (HU-PG-ZC) állománnyal találtuk legközelebbinek. Magyarországon a ceglédi állományt (HU-LB-TCZ) tekintik a legtipikusabb tejelő állományként, amelyet az utóbbi 15 évben szerb (zombori és csókai) kosokkal fejlesztettek.

4.2. Az SLA-6, -7 és -8 gének vizsgálatának eredményei

4.2.1. A génexpresszió vizsgálat eredményei

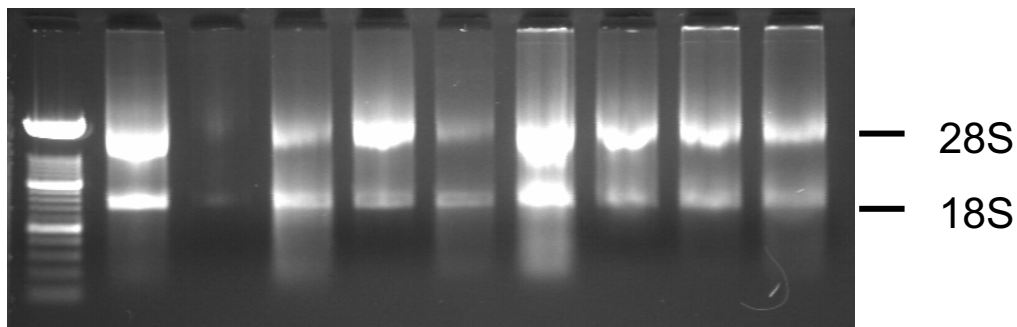
A génkifejeződés vizsgálat tényleges eredményei előtt bemutatjuk, a vizsgálat nehézkes és időigényes előzményeit. Kutatásunk során kvantitatív real-time PCR vizsgálatot végeztünk, amihez megfelelő minőségű és mennyiségű cDNS-re és biztosan génspecifikus primerekre volt szükségünk. A teljes RNS izolálása a különböző szövetmintákból, minőségének, mennyiségének ellenőrzése, cDNS-sé írása időigényes folyamat volt. Emellett több primerpárt is terveztünk, majd több lépéses vizsgálat során megerősítettük azok génspecifikus voltát.

A teljes RNS mennyiségének és minőségének ellenőrzése

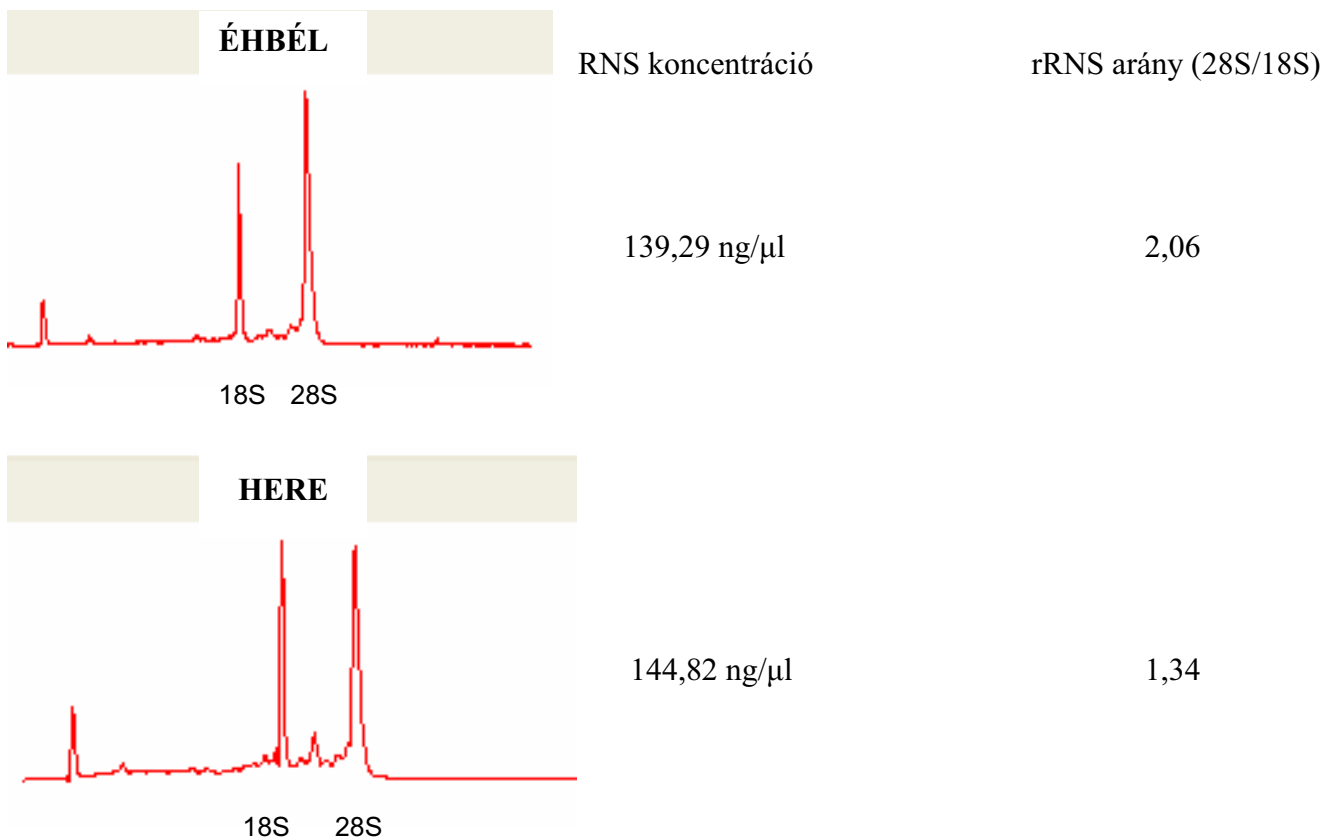
A kivont teljes RNS mennyiségi meghatározásához minden esetben NanoDrop készüléket használtunk. Ezután a minőségi meghatározás következett. A minőség ellenőrzésére 1 %-os agaróz gélen való elektroforézis vizsgálatot (20 perc 120 V), majd a pontosabb vizsgálat érdekében RNA 6000 Nano chip-pel a Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies, USA) készüléket használtunk (13. ábra). Nem minden esetben kaptuk a legkedvezőbb 1,6-1,8 rRNS arányt, azonban mivel néhány minta korlátozott mennyiségben állt rendelkezésünkre és a kvantitatív RT-PCR vizsgálat nem kívánja a legjobb minőségű templátot (szemben a microarray vizsgálatokkal) elvégeztük a vizsgálatot a gyengébb minőségű mintákkal is. Nem kaptunk eltérő eredményt ezekkel a mintákkal mint az ismétléséhez használt de már jó minőségű minta esetén. A felnőtt állatok esetében majdnem az összes minta vizsgálatát ismételni tudtuk (igaz, eltérő neműek), a magzati minták ismétlésére is törekedtünk.

13. ábra: A teljes RNS minőségének ellenőrzése

- Etidium-bromiddal festett agaróz gélen (1%):



- Bioanalyzer Agilent készüléssel:

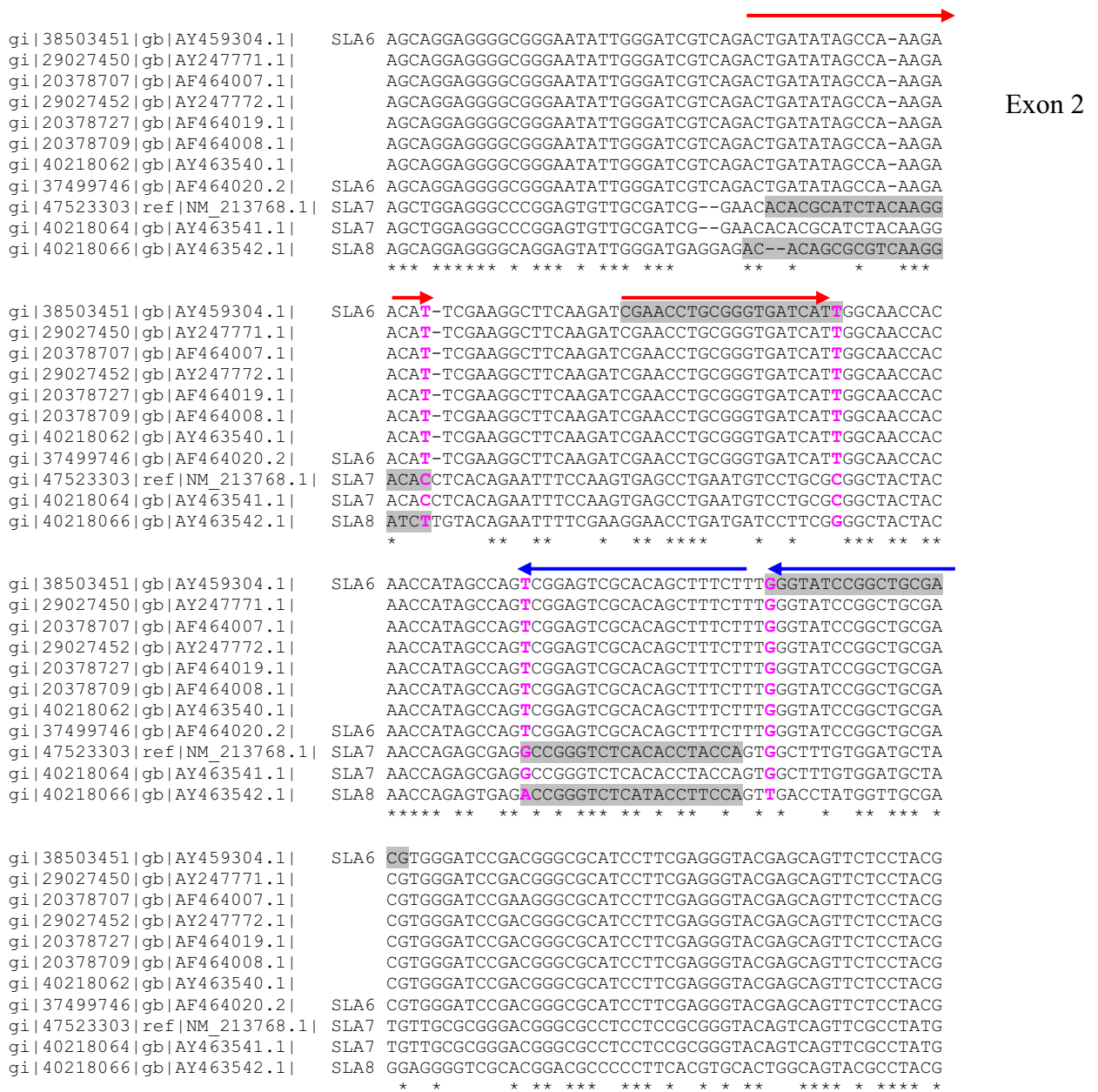


Primer tervezés, kiválasztás és génspecifitásuk ellenőrzése

Az MHC Ib gének esetén Primer Express és Primer 3 primer tervező programokkal és kézzel terveztük a lehetséges primer párokat. Azonban ez nem volt könnyű, mivel igen nagyfokú a szekvenciák homológiája. A kézzel való tervezés során arra törekedtünk, hogy a primerek kiválasztásának alapvető kritériumai mellett a primerek 3'-as végei

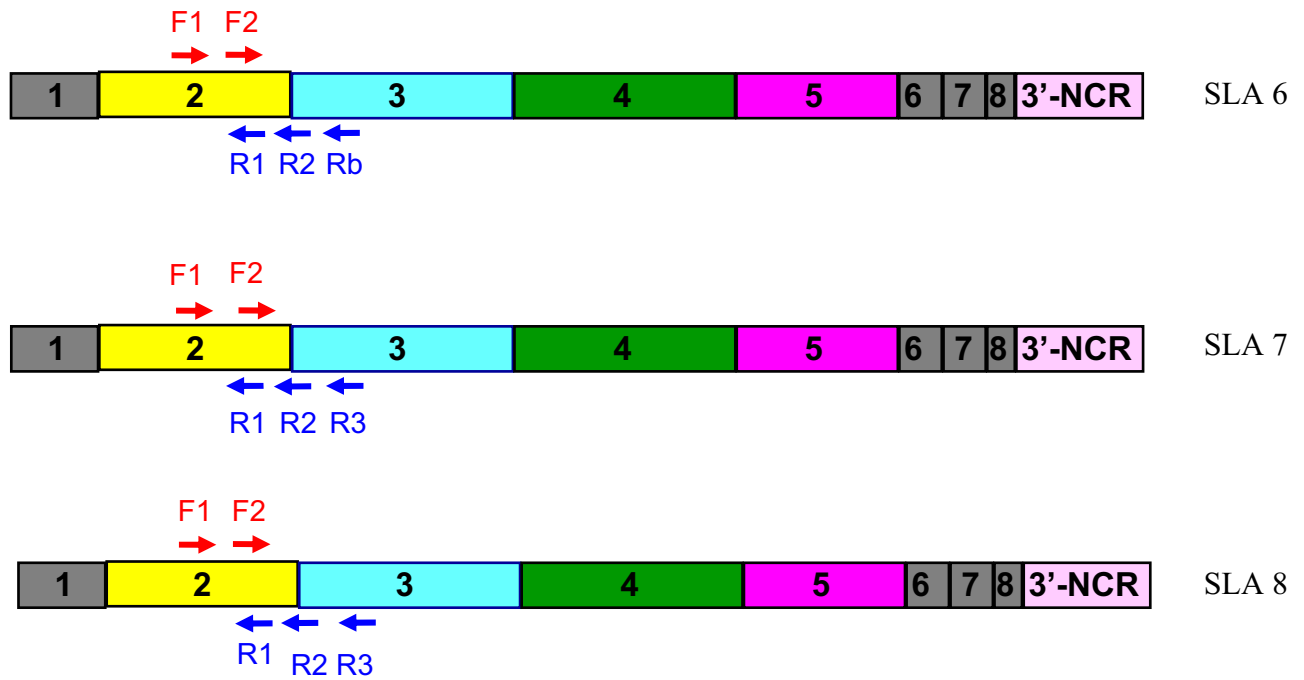
génspecifikusak legyenek (14. ábra). Az SLA- 1 gén esetén is a kritériumok hasonlóak voltak, itt azonban forward primert az 5 exonba és reverz primert az 5 és 6 exon közé terveztünk. Ennek az volt az oka, mivel sem programot használva sem kézzel nem sikerült olyan helyre primert tervezni, ami a génspecifitás mellett a többi kritériumnak is eleget tett volna.

14. ábra: Az SLA-6, -7 és -8 mRNS szekvencia összehasonlítása és jelölve bennük a kiválasztásra került primerek (piros nyíl jelöli a forward primereket, kék nyíl jelöli a reverz primereket, szürke háttérben a primerek)



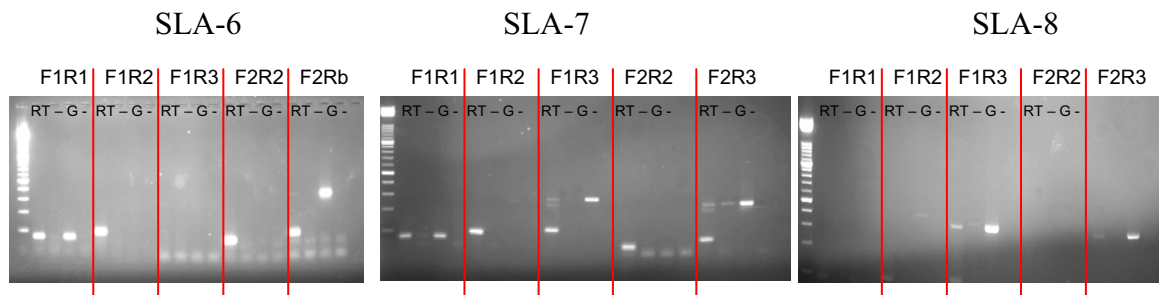
A géneken különböző helyekre terveztünk forward és reverz primereket az MHC Ib gének esetén (15. ábra).

15. ábra: Az általunk tervezett primerek pozíciói



A tervezés után teszteltük az összes primer pár lehetőséget klasszikus PCR reakcióval (16. ábra).

16. ábra: Az összes vizsgált primer pár amplifikálásának eredménye



Primer pár	Pozíció	Méret (bp)	Primer pár	Pozíció	Méret (bp)	Primer pár	Pozíció	Méret (bp)
Sla6_F1 Sla6_R1	Exon2 Exon2	73	Sla7_F1 Sla7_R1	Exon2 Exon2	73	Sla8_F1 Sla8_R1	Exon2 Exon2	73
Sla6_F1 Sla6_R2	Exon 2 Exon 2/3	98	Sla7_F1 Sla7_R2	Exon 2 Exon 2/3	98	Sla8_F1 Sla8_R2	Exon 2 Exon 2/3	98
Sla6_F1 Sla6_R3	Exon 2 Exon 3	122	Sla7_F1 Sla7_R3	Exon 2 Exon 3	122	Sla8_F1 Sla8_R3	Exon 2 Exon 3	122
Sla6_F2 Sla6_R2	Exon 2 Exon 2/3	61	Sla7_F2 Sla7_R2	Exon 2 Exon 2/3	61	Sla8_F2 Sla8_R2	Exon 2 Exon 2/3	61
Sla6_F2 Sla6_Rb	Exon 2 Exon 3	81	Sla7_F2 Sla7_R3	Exon 2 Exon 3	85	Sla8_F2 Sla8_R3	Exon 2 Exon 3	85

A megfelelő terméket amplifikált primerpárokat tovább szelektáltuk az Anyag és módszer fejezetben leírtak szerint. Legmegfelelőbbnek a következő primer párokat találtuk (21. táblázat).

21. táblázat: A génkifejeződés vizsgálat során használt primer párok

Név	Primer szekvencia	Méret (bp)
sla6_F2 sla6_Rb	CGAACCTGCGGGTGATCATT CGTCGCAGCCGGATACCC	81
sla7_F1 sla7_R2	ACACGCATCTACAAGGACAC TGGTAGGTGTGAGACCCGGC	98
sla8_F1 sla8_R2	ACACAGCGCGCCAAGGATCT TGGAAGGTATGAGACCCCGGT	98
sla1_e5_F1 sla1_e56_R2	CATCATTGTTGGCCTGGTTC CCTTTTTCACCTGAGCGC	89

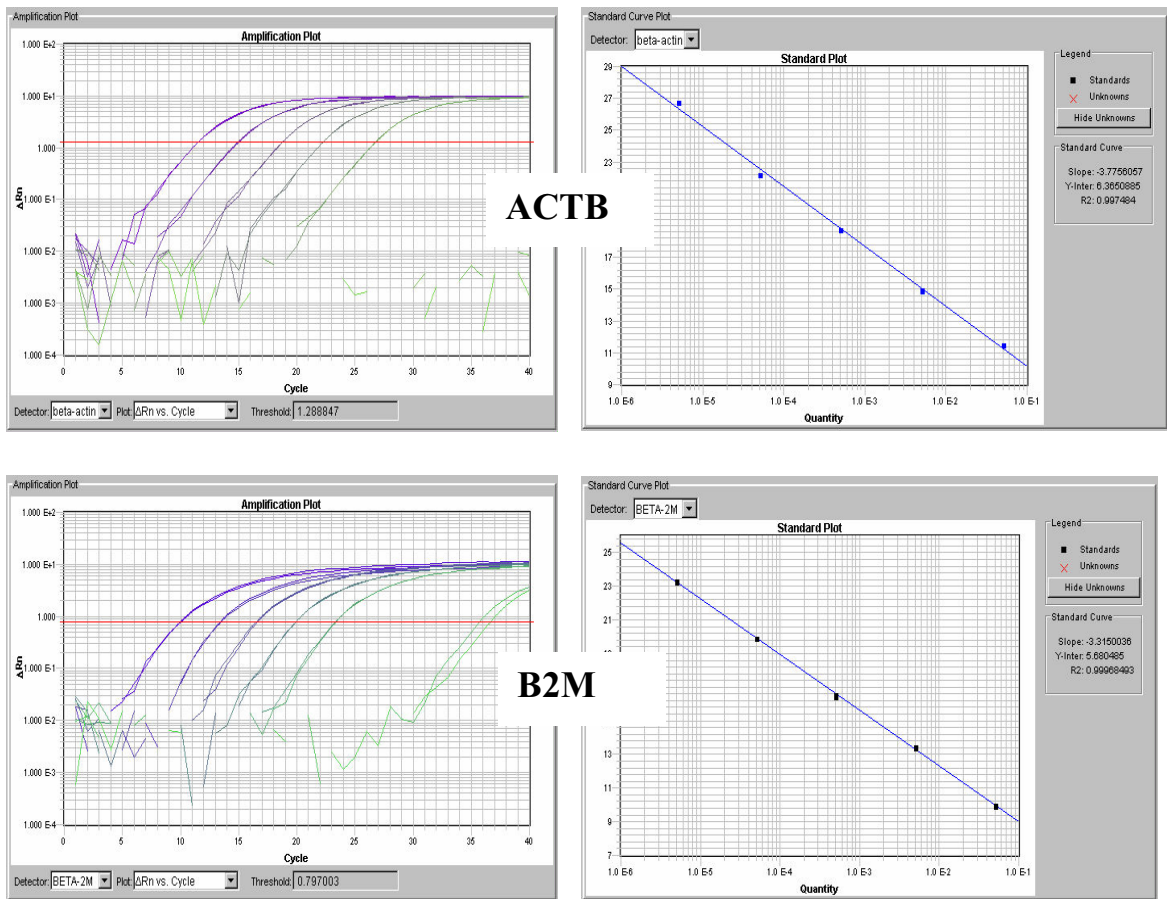
Abszolút kvantifikáció

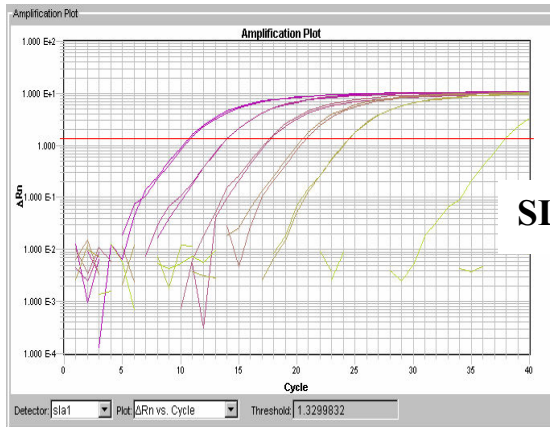
A PCR hatékonyságának, a standard görbék és a legjobb cDNS koncentráció meghatározásához alkalmaztuk az abszolút kvantifikációt (22. táblázat, 17. ábra). Az SLA-6 esetén 200 nM, az SLA-7, SLA-1 esetén a 400 nM, az SLA-8 és B2M esetén a 600 nM primer koncentrációkat alkalmaztuk.

22. táblázat: A két kiválasztott háztartási génre és a vizsgált SLA génekre a PCR hatákonyságának mutatója (korrelációs koefficiens)

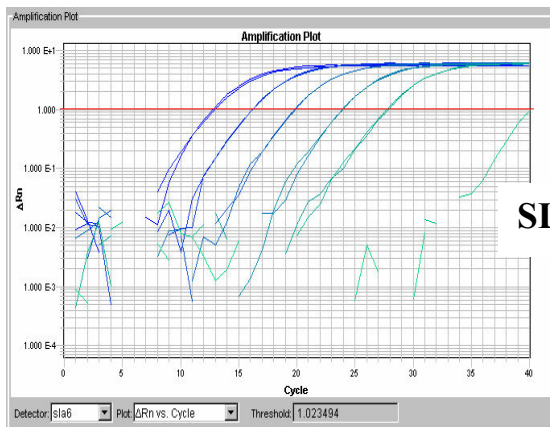
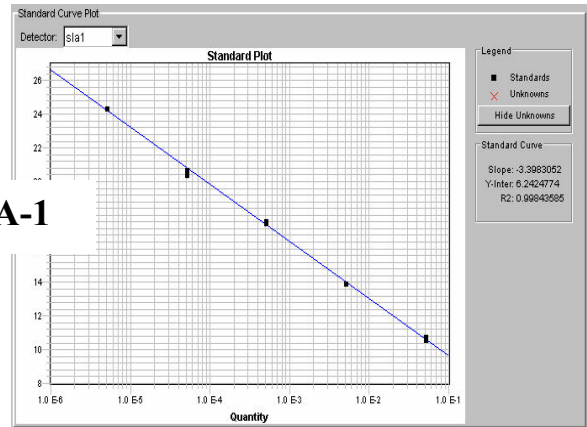
Név	R ²
ACTB	0,997
B2M	0,999
SLA-1	0,998
SLA-6	0,998
SLA-7	0,978
SLA-8	0,999

17. ábra: A β -aktin (ACTB) és β 2-mikroglobulin (B2M) háztartási gének és a MHC Ib illetve az SLA-1 gén hígítási és standard görbéi

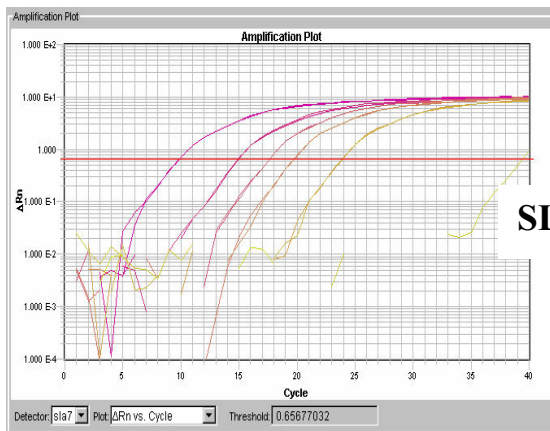
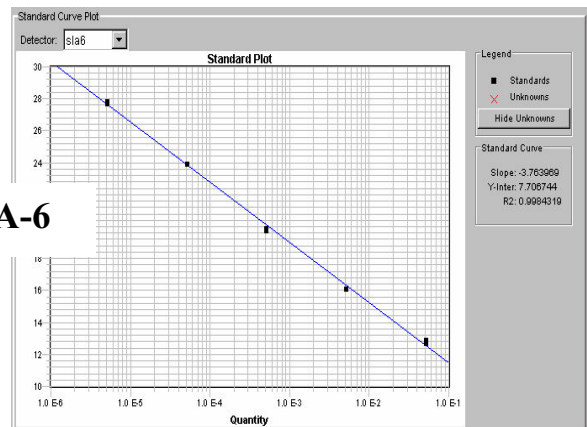




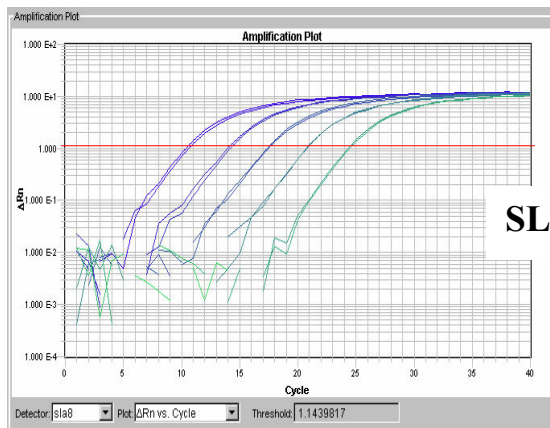
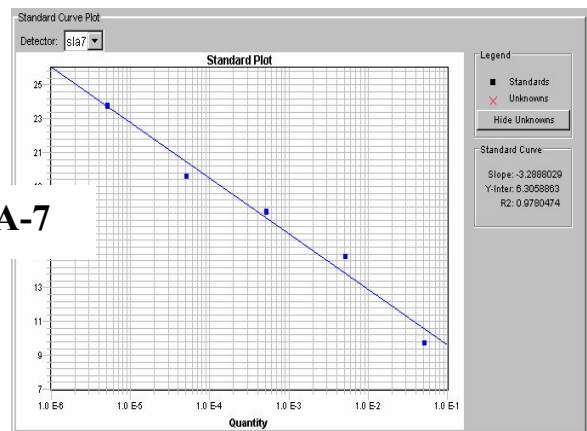
SLA-1



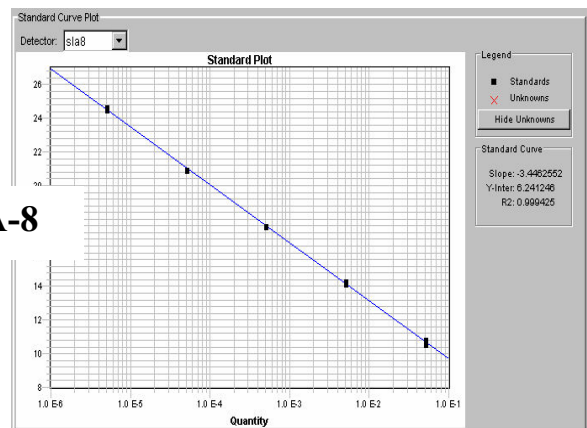
SLA-6



SLA-7



SLA-8



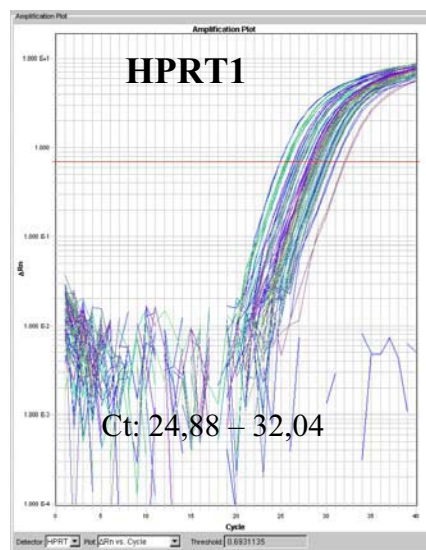
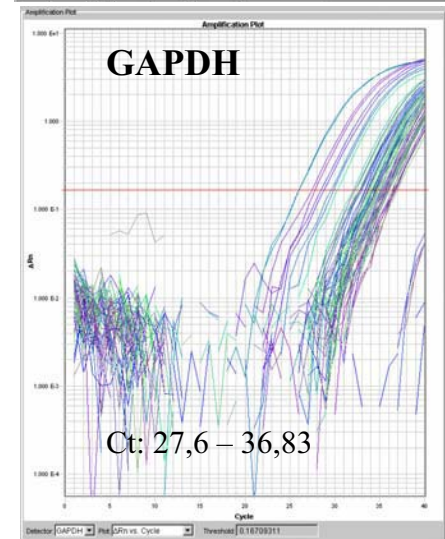
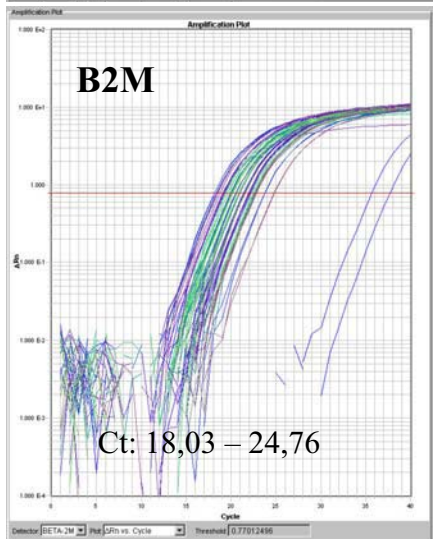
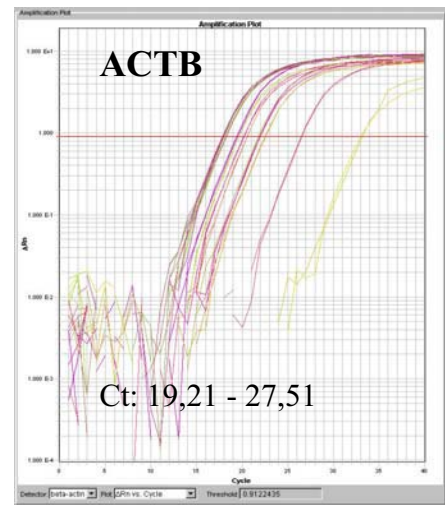
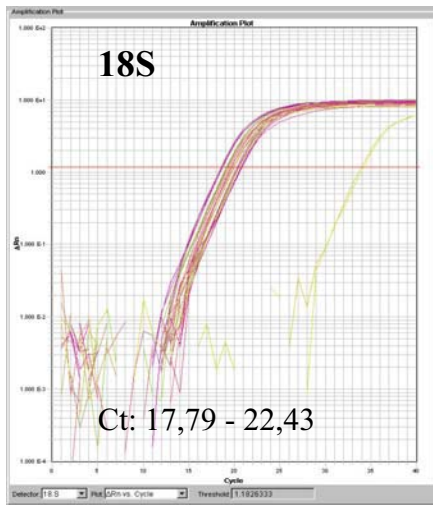
Háztartási gének kiválasztásának módja

A relatív kvantifikáció során az adatok normalizálásához elengedhetelen a megfelelő háztartási gének kiválasztása. Ez igen nehéz feladat mivel ezeknek a géneknek a kifejeződése azonos minden típusú szövetben és sejtben, mindenféle kísérleti körülmények között és különböző fiziológiai állapotban is. A következő géneket vizsgáltuk:

- ✓ Béta – aktin (ACTB);
- ✓ Béta - 2 mikroglobulin (B2M);
- ✓ 18S rRNA;
- ✓ Glicerinaldehyd – 3 - foszfát dehidrogenáz (GAPDH);
- ✓ Hipoxantin guanin foszforibozil transzferáz (HPRT1) (18. ábra).

Az 5 gén vizsgált szöveteinkben való kifejeződése és egymáshoz való korrelációja alapján az ACTB és B2M –t választottuk ki, azonban ténylegesen csak a B2M –t használtuk adataink normalizálása során költség- és időtakarékosági szempontokból.

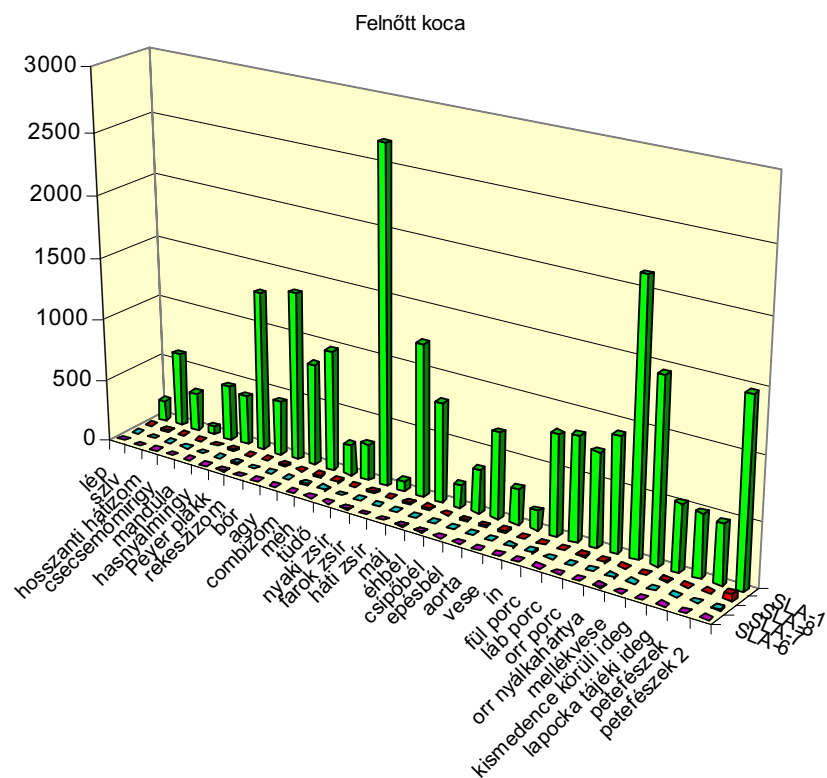
18. ábra: A háztartási géneként vizsgált lehetőségek abszolút kvantifikációjának eredménye



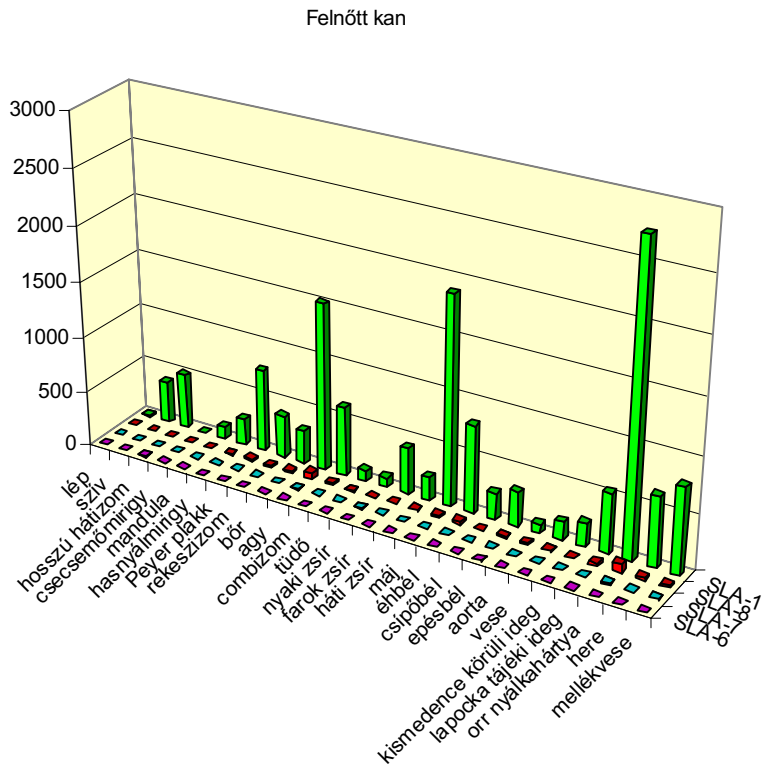
A tényleges géneexpresszió vizsgálat eredménye

Mind a klasszikus SLA-1, mind a három nem klasszikus MHC I gén (SLA-6, SLA-7, SLA-8) minden vizsgált szövetben kifejeződött. Az SLA-1 gén kifejeződése minden szövetben többszöröse volt a nem klasszikus génekének (19. ábra, 20. ábra, 21. ábra). A kifejeződés mértékbeli különbségében sok esetben száz-, illetve ezerszeres különbségek vannak, ezért van, hogy a 19., 20. és 21. ábrákon a MHC Ib gének kifejeződésében nem látjuk a különbségeket.

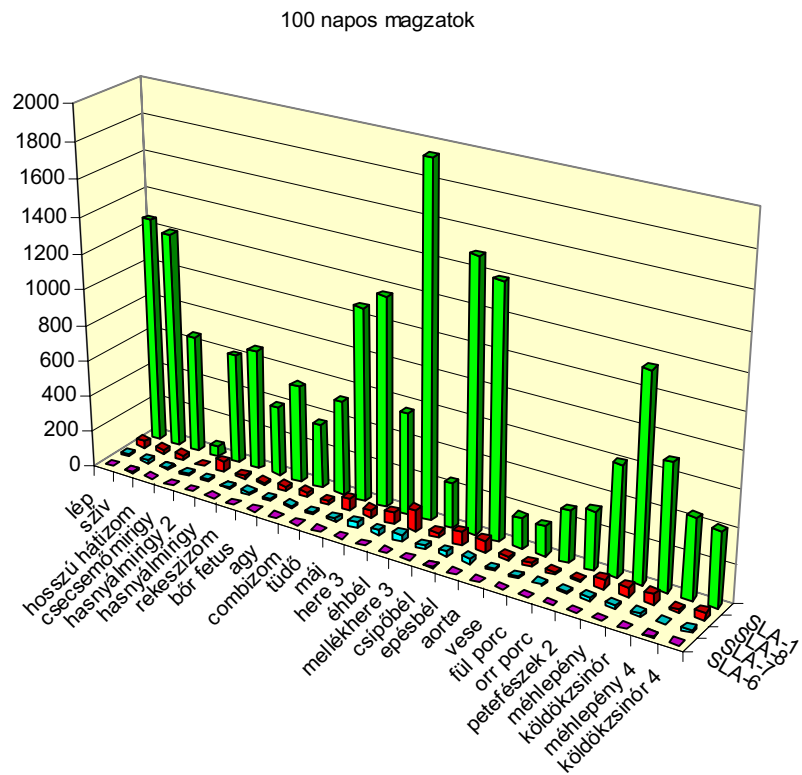
19. ábra: Az SLA-1, SLA-6, SLA-7, SLA-8 gének kifejeződése felnőtt koca különböző szöveteiben



20. ábra: Az SLA-1, SLA-6, SLA-7, SLA-8 gének kifejeződése felnőtt kan különböző szöveiteiben



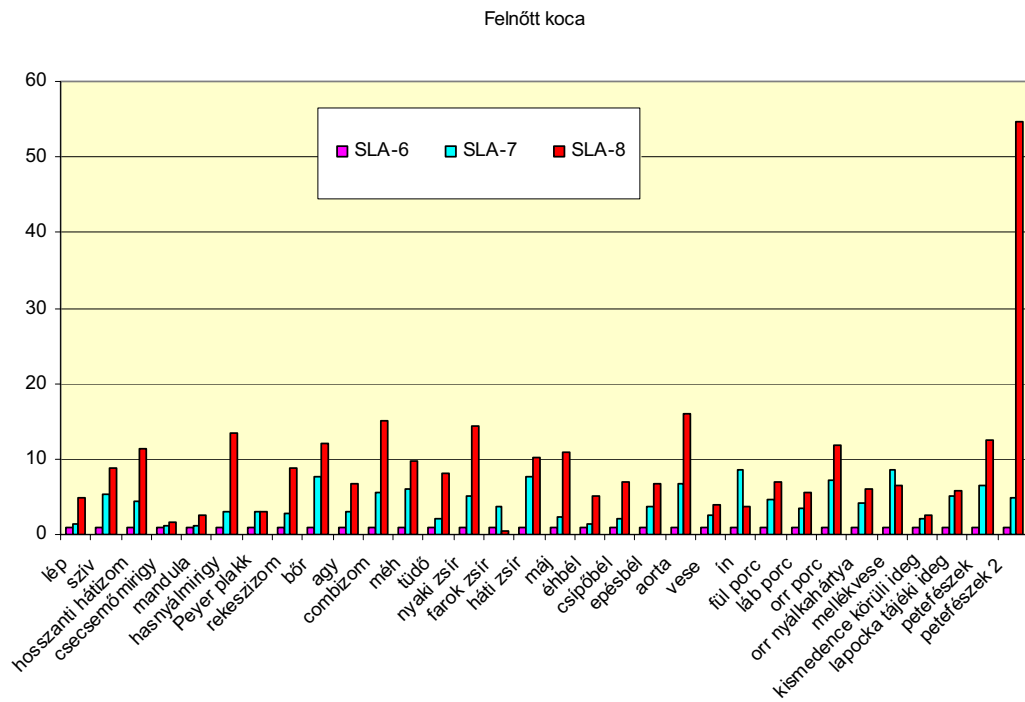
21. ábra: Az SLA-1, SLA-6, SLA-7, SLA-8 gének kifejeződése 100 napos magzatok különböző szöveteiben



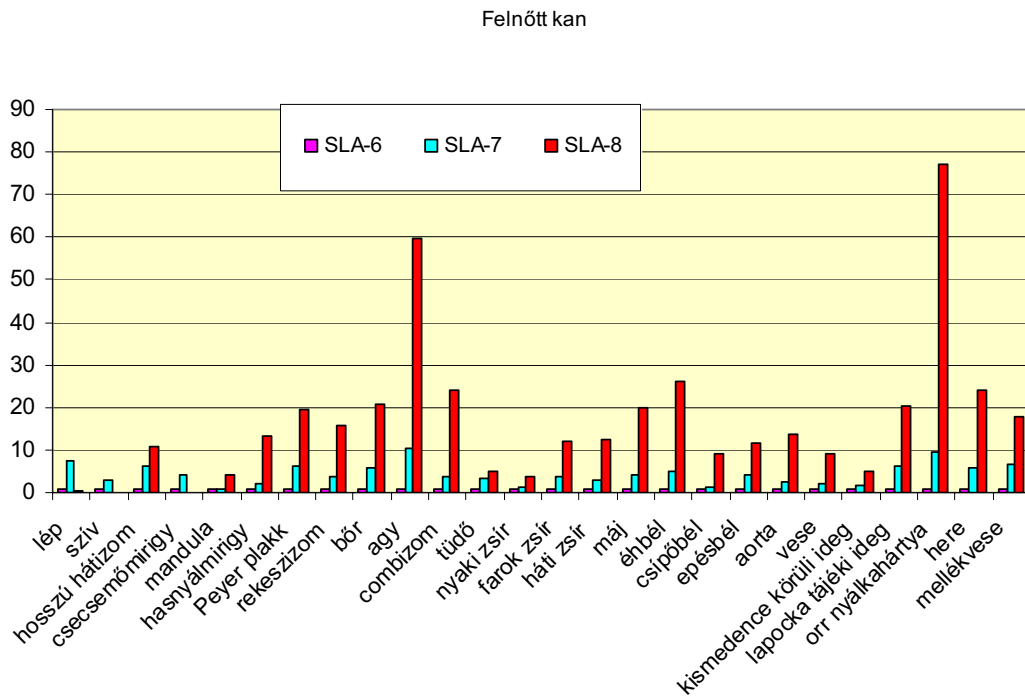
Az SLA-1 gén kifejeződésének szintjét a csecsemőmirigyben találtuk a legalacsonyabbnak minden esetben.

A nem klasszikus gének kifejeződésének összehasonlítása céljából készítettük az 22., 23., 24. ábrákat.

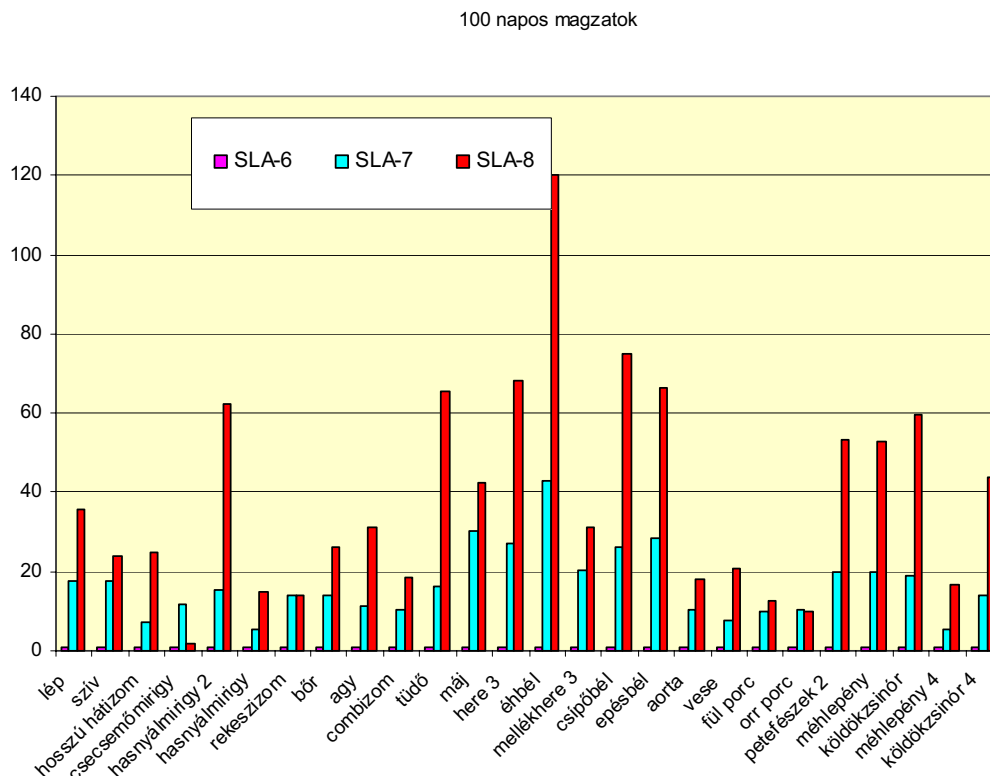
22. ábra: SLA-6, SLA-7 és SLA-8 gének kifejeződésének szintje felnőtt koca különböző szöveteiben



23. ábra: SLA-6, SLA-7 és SLA-8 gének kifejeződésének szintje felnőtt kan különböző szöveteiben



24. ábra: SLA-6, SLA-7 és SLA-8 gének kifejeződésének szintje 100 napos magzatok különböző szöveteiben



Ahogy a fenti ábrákon is látható a nem klasszikus MHC I gének expresszálódtak minden vizsgált szövetben. Ez ellentétben volt CREW és mtsai (2004) eredményeivel akik szerint az SLA-6 kifejeződött a 11 általuk vizsgált minta mindegyikében, az SLA-8 az agy kivételével mindegyikben és az SLA-7 gén kifejeződése volt leginkább szövetspecifikus. Szinte minden mintában legerősebben az SLA-8 fejeződött ki a három gén közül, majd az SLA-7, és leggyengébben az SLA-6, azonban az is kifejeződött. A csecsemőmirigyben legnagyobb mértékben az SLA-7 gén termelődött a felnőtt kanban és a magzati mintában, míg felnőtt kocában a mindhárom gén expressziója nagyon alacsony szintű. A felnőtt kocában az ín, farok zsír, mellékvese esetén az SLA-7 kifejeződése volt erősebb. A magzati minták esetében, egyik előbb felsorolt mintából sem tudunk, míg a felnőtt kan esetében, csak a farok zsír és a mellékveséből tudunk mintát gyűjteni, azonban ott az SLA-8 kifejeződése az erősebb. A kanból származó lép és szív mintákban az SLA-7 fejeződött ki legerősebben.

Mindegyik nem klasszikus MHC I gén kifejeződött az összes általunk vizsgált szövetben mRNS szinten kvantitatív - reverz transzkriptáz-PCR módszert alkalmazva.

4.2.2. A sertés nem klasszikus MHC I gének polimorfizmus vizsgálatának eredményei

A polimorfizmus vizsgálatunkat is a génspecifikus primerek tervezésével és annak bizonyításával kezdtük. A primereket a Primer 3 programmal terveztük mindhárom gén esetében. Célunk a teljes 2. exon amplifikálása volt, mivel az a legpolimorfabb régió az emberi fajban, és ezt feltételeztük sertés esetében is (25. ábra).

25. ábra: Az általunk tervezett és használt primerek pozíciója



A primerek génspecifitásának bizonyítását ugyanolyan lépéseket követve végeztük mint az előző vizsgálatban. A primerek szekvenciáját és az amplikon méretét az 23. táblázatban mutatjuk be.

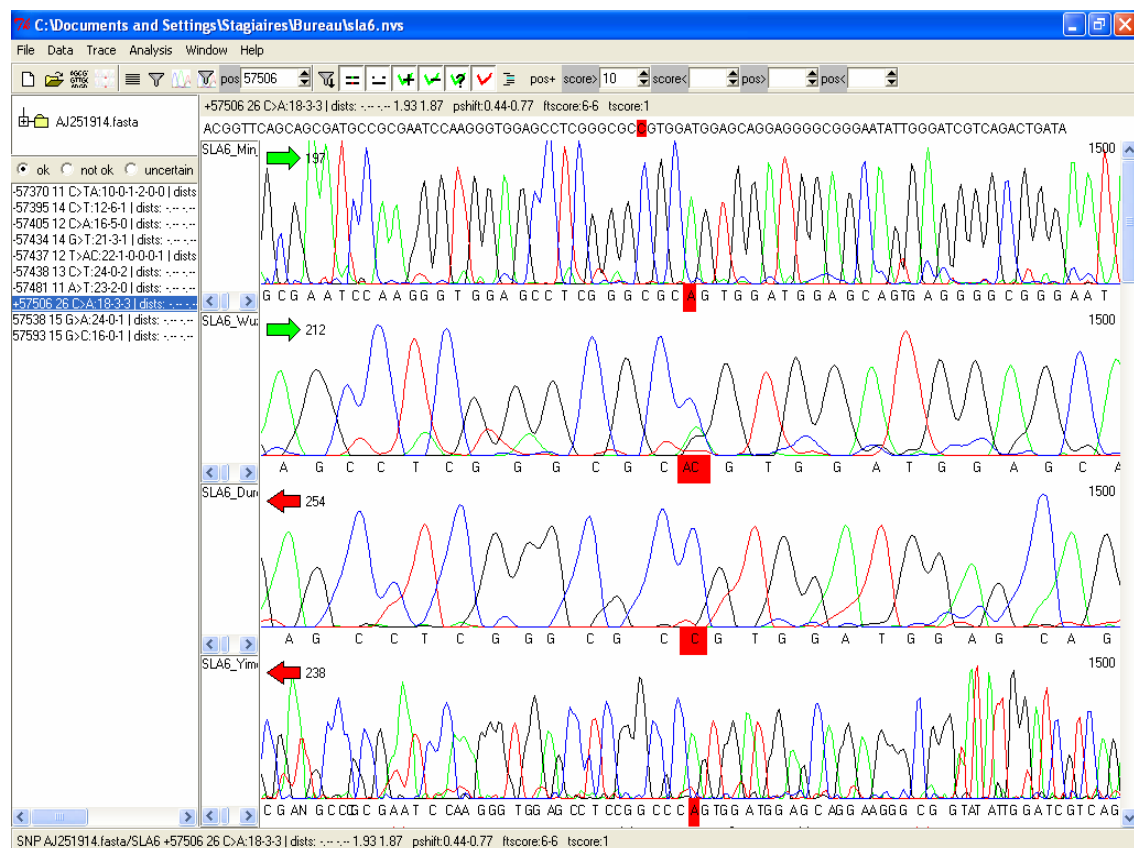
23. táblázat: A polimorfizmus vizsgálat során használt primereink

Név	Primer szekvencia	Méret (bp)
sla6_exon2_F1	CTCACCTCCTTCTCCCTTCC	389
sla6_exon2_R1	GTAAGGGGGTGCAGGAACTT	
sla7_exon2_F1	CCGTCTCATGCTCTCTTCGT	398
sla7_exon2_R1	AGGATGGTCGTGACCTGGAT	
sla8_exon2_F1	GAGGGAAGGGTCTCAACCTC	354
sla8_exon2_R1	GTGGGAGATGGGGGAGACTA	

A polimorfizmus vizsgálat tényleges eredményei

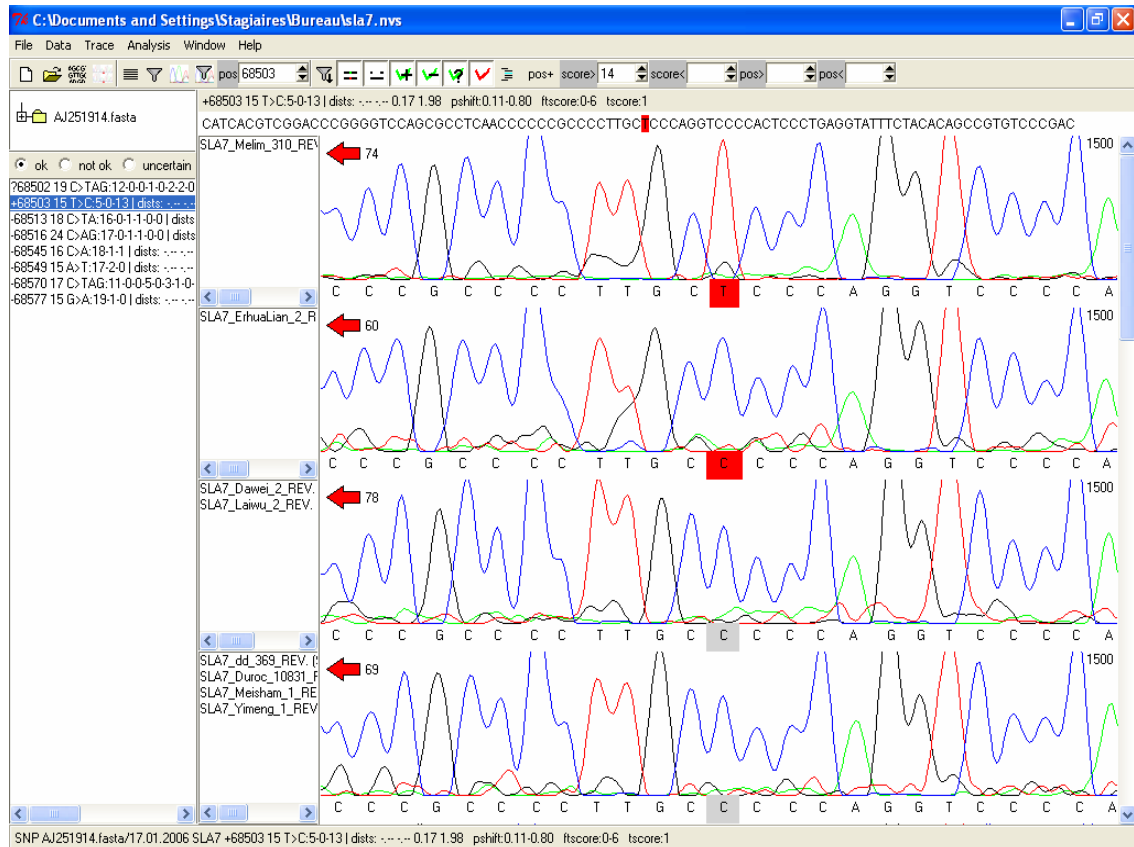
Az SLA-6 gén esetében egy nem konzervatív mutációt találtunk a 2. exonban, az 529. pozícióban. A citozin helyett adenin nukleotid található, ami aminosav változást is okoz, a prolin helyett glutamin kódolódik. Ez a pontmutáció azért is érdekes, mert két α -hélix lánc találkozásánál helyezkedik el. A mutációt a következő kínai fajtákban detektáltuk: guizou, lantang, min, yimeng, wuzhi shan, xiang, dawei (26. ábra).

26. ábra: Az SLA-6 gén 2. exonjában azonosított új allél



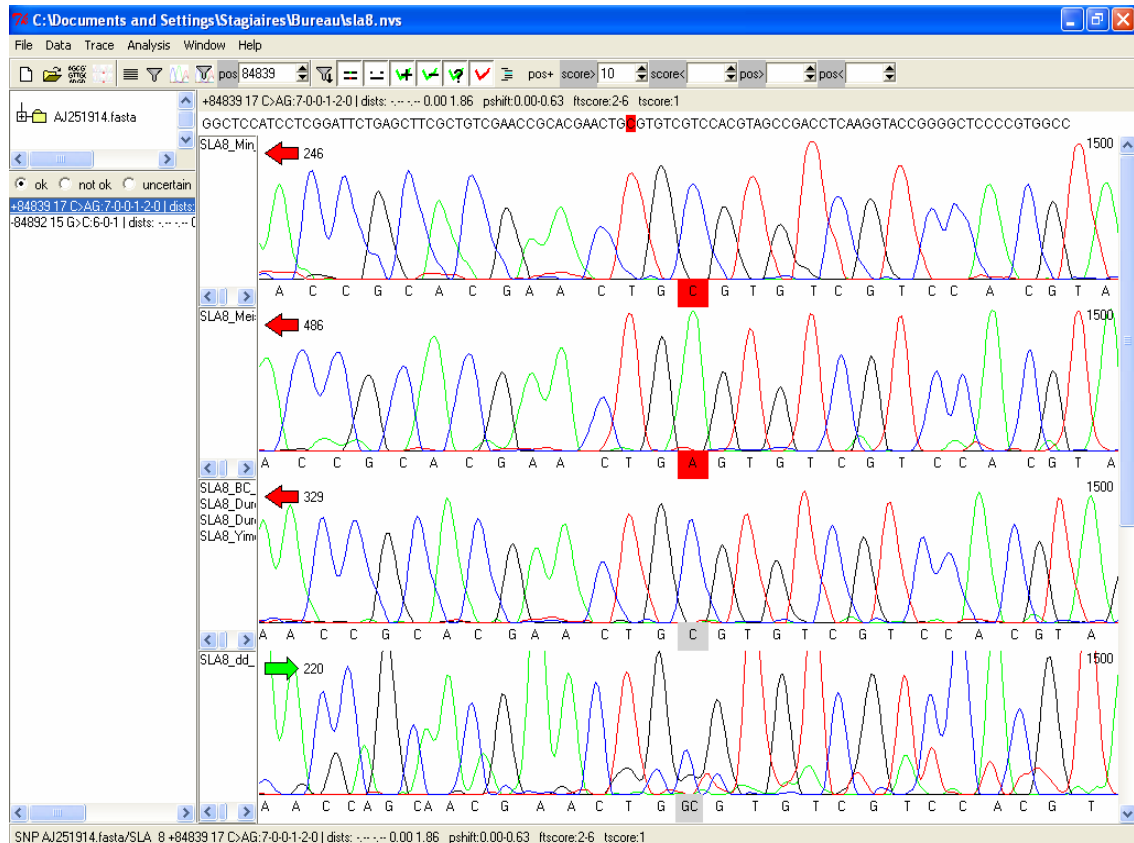
Az SLA-7 gén esetében is detektáltunk egy új allélt, azonban ez az 1 intronban helyezkedik el, és egy timin citozin cserélődés van, a 371 pozícióban (27. ábra).

27. ábra: Az SLA-7 gén 1 intronjában azonosított új allél



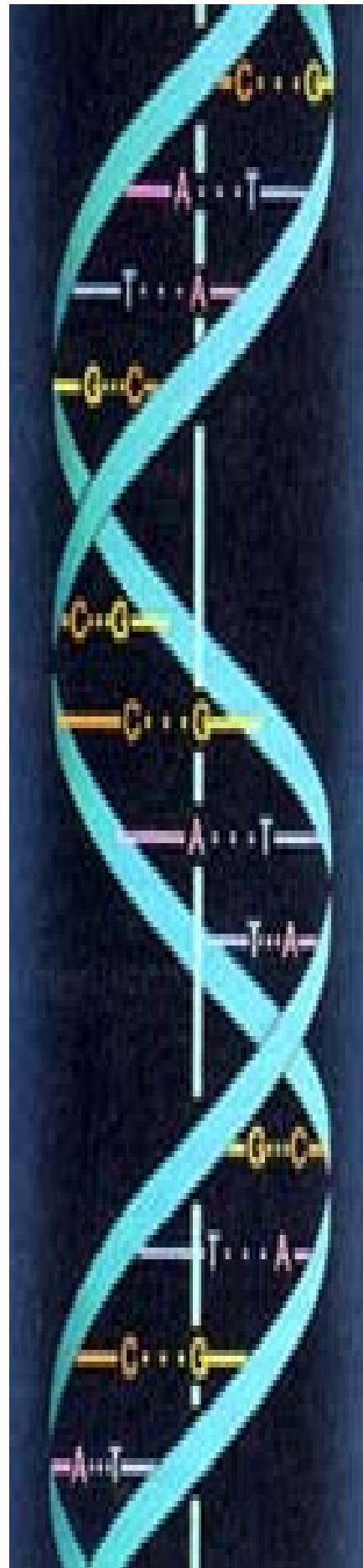
Az SLA-8 gén 2. exonjában, a 383. pozícióban egy citozin adenin változást azonosítottunk. Ez egy konzervatív mutáció, tehát nem okoz aminosav változást. Ezt a kínai laiwu és meishan és az európai nagy fehér sertésben detektáltuk (28. ábra).

28. ábra: Az SLA-8 gén 2. exonjában azonosított új allél



Polimorfizmus vizsgálatunk eredményeként megerősíthetjük, hogy az SLA-6,-7,-8 gének a nem klasszikus gének csoportjába tartoznak, mivel csupán egy új allélt azonosítottunk génenként, ami igen alacsony szintű polimorfizmust jelent, és ez a nem klasszikus gének sajátossága. Azonban hangsúlyoznunk kell, hogy ezidáig egy egyedet vizsgáltunk meg minden fajtában, így nem jelenthetjük még ki, hogy ezek az újonnan azonosított allélok az adott fajtákra jellemzőek. Ezen vizsgálati rész folytatását tervezzük, minél több egyed illetve új fajták bevonásával.

5. Következtetések



5.1. Következtetések, új tudományos eredmények

Dolgozatom témáját tekintve, két részre osztható. Az elsőben cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállományok közötti genetikai távolság becslést végeztünk 16 mikroszatellit marker használatával. A dolgozat másik részében a nem klasszikus MHC I gének polimorfizmusát vizsgáltuk DNS szinten és expresszióját mRNA szinten kvantitatív real-time PCR módszert alkalmazva különböző európai és kínai sertés fajtákban.

Dolgozatom 41 cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállomány genetikai távolság becslésének következtetései és egyben új tudományos eredményei a következők:

1. Megállapítottuk, hogy a különböző szakirodalmi forrásokból származó ajánlásokkal az általunk kiválasztott 20 különböző kromoszómán elhelyezkedő mikroszatellit markerből 16-ot használva könnyen, gyorsan végezhetjük el a genetikai távolság vizsgálatot a cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállományokban.
2. Alátámasztottuk, a korábban végzett fenotípusos és vérbiokémiai polimorfizmus vizsgálat eredményein alapuló genetikai különbségeket a magyar cigája állományok között.
3. Megállapítottuk, hogy a genetikai különbözőség *elhanyagolható*:
 - a Kőrös-Maros Nemzeti Park tulajdonában álló két állomány (HU-KMKK-AC, HU-KMNP-AC);
 - az őshonosként jegyzett soltszentimrei (HU-SMA-AC) és a tejelőként nyilvántartott akasztói (HU-OJ-TC) állományok;
 - az őshonosként nyilvántartott csanádpalotai (HU-SZIC-AC) és a hovatarozása tekintetében vitatott makó-rákosi (HU-MRD-TAC) állományok;
 - a szlovák handel (SL-HAN-TS) és jugat (SL-JUG-TS); az jurbis (SL-JUR-TS) és jugat (SL-JUG-TS) illetve az vancover (SL-VAN-TS) és jurbis (SL-JUR-TS) állományok között.

4. Megállapítottuk, hogy a genetikai különbség *nagyon kismértékű*:
- a két szerb pramenka állomány (SM-SVR-PR, SM-KRI-PR),
 - a két török régióból származó kivircik állomány (TR-KIV-TRA, TR-KIV-MAR);
 - a két bolgár cigája állomány (BU-STAR-TS, BU-ROD-TS);
 - a két bolgár maritza állomány (BU-PFMAR, BU-WFMAR);
 - a román és albán ruda állományok (RO-RUDA, AL-RUDA);
 - az albán cigája (AL-TS) és a csanádpalotai (HU-SZIC-AC) illetve a makó-rákosi (HU-MRD-TAC) állományok között.
5. Megállapítottuk, hogy a genetikai különbözőség *igen nagy mértékű*:
- a szerb zombori állomány (SM-ZP-TS) és az összes többi vizsgált állomány között. Ezzel megerősítettük Cinkulov (2003) eredményeit, aki a szerb csókai és zombori állomány különbözőségét vizsgálta, és megállapította, hogy olyan nagymértékű a genetikai elkülönülés közöttük, hogy két önálló fajtának tekinthetők.
6. Eredményeink szerint nem erősíthetjük meg Draganescu (2003) határozott véleményét, miszerint a cigája juh fajta a román ruda fajtából alakult ki. Azt azonban megállapítottuk, hogy néhány vizsgált cigája állomány genetikai rokonságban van vele (RO-RUST-TS, TR-KIV-TRA, SL-HAN-TS, BU-WFMAR, BU-PFMAR).

Dolgozatom SLA Ib gének kifejeződésének és polimorfizmus vizsgálatának következtetései a következők:

➤ A génexpresszió vizsgálat eredményei

1. Megállapítottuk, hogy az általunk tervezett primerek génspecifikusak, és az általunk választott belső referencia gének alkalmasak a kvantitatív RT-PCR vizsgálatra munkánk során;
2. Megállapítottuk, hogy az SLA-6, -7, -8 gének mRNS szinten expresszálódtak az összes általunk vizsgált felnőtt és magzati szövetmintákban;
3. Megállapítottuk, hogy a klasszikus SLA-1 gén termelődése a legmagasabb minden vizsgált szövetben, sok esetben több száz ill. ezerszerese az SLA Ib génekének;
4. Megállapítottuk, hogy a nem klasszikus gének között az SLA-8 gén kifejeződése a legerősebb, majd az SLA-7 és végül leggyengébb az SLA-6 termelődése. Ezen sorrend alól a csecsemőmirigy kivétel, mivel abban legerősebben az SLA-7 gén fejeződött ki.

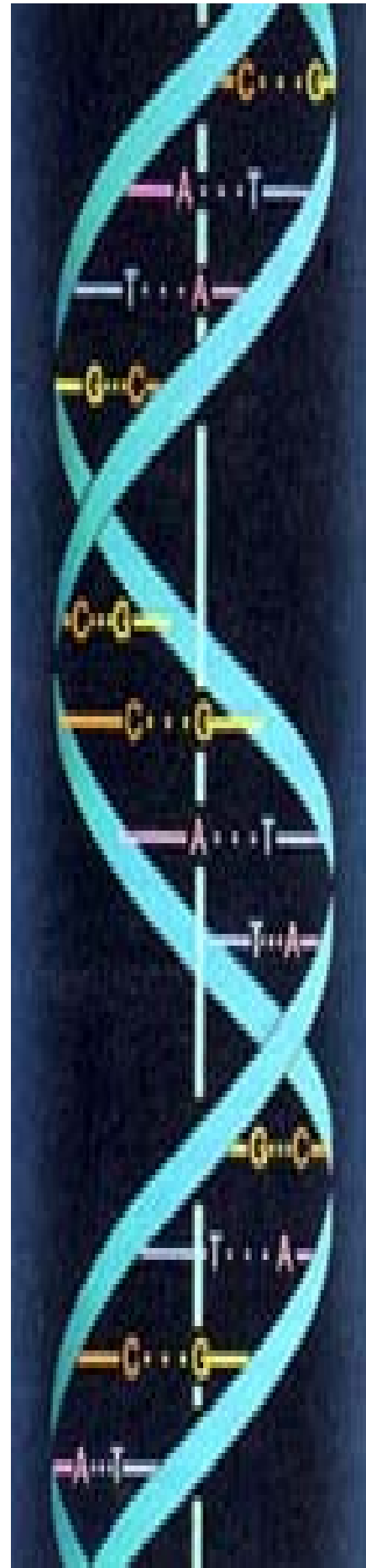
➤ A polimorfizmus vizsgálat eredményei

1. Megállapítottuk, hogy polimorfizmus vizsgálatához tervezett primereink is génspecifikusak és alkalmasak a munkánkhoz;
2. Mindegyik SLA Ib gén esetében egy-egy új allélt azonosítottunk:

SLA-6	1 nem konzervatív mutáció a 2 exonban (c529a), P99Q
SLA-7	1 mutáció az 1 intronban (c371t)
SLA-8	1 konzervatív mutáció a 2 exonban (c383a)

3. Megállapítottuk, hogy az SLA-6, -7, -8 gének nagyon alacsony szintű polimorfizmussal rendelkeznek;
4. Megerősítettük ezen gének nem klasszikus gén besorolását.

6. Összefoglalás



Dolgozatom első részében 8 kelet, közép és dél-európai országban található cigája illetve zackel fajtakörbe tartozó juhállomány közötti genetikai kapcsolatot kívántuk meghatározni.

A világon hazánk a legelső országok között volt, ahol felismerték, hogy kulturális, és szakmai szempontból is jelentős feladat a géntartalékok átmentése a háziállatfajtákban, a teljes genetikai variancia megőrzése és a különböző genotípusok helyének, szerepének, arányának beállítása. További cél, hogy a fajta értékmérőit újra felismerjük és hagyományos módszerekkel kihasználjuk (VERESS és mtsai, 1996). Kukovics és Kume egy kérdőíves felméréssel gyűjtött információt a közép-, kelet- és dél-európai helyi juhajták küllemi jegyeiről, termelési jellemzőiről (tej, gyapjú, hús, szaporaság). Az elmúlt 100 év során a különböző keresztezések, környezeti hatások megváltoztatták ezeket a típusokat, fajtákat. Az albán és horvát cigája kialakítása során leginkább a szerb cigáját, míg a bolgár cigája változatokhoz a szovjet cigáját használták. Romániát tekinthetjük a legnagyobb cigája tenyésztőnek, mivel több mint másfél millió különböző cigája típusba tartozó egyedük van. Elsősorban a Balkán országokba exportálnak belőlük. Szlovákiában a cigája juh a második legjelentősebb juhajtá, amely elsősorban Erdélyből származik. Míg nem volt információ ezen változatok, fajták genetikai kapcsolatáról, nem lehetett megkezdeni génjeik védelmét. Vizsgálatunkhoz Albániából, Bulgáriából, Horvátországból, Szerbia és Montenegróból, Romániából, Szlovákiából, Törökországból és Magyarországról gyűjtöttünk vér illetve gyapjúmintákat. Összesen 41 állományból 1506 egyed vizsgálatát végeztük el 16 mikroszatellit marker használatával.

A vizsgált 10 magyar állományból öt tenyészet egyedei képviselik a Magyar Juhtenyésztő Szövetség által elfogadott nyilvántartás szerinti őshonos állományt, a Kőrös-Maros Nemzeti Park két állománya (HU-KMKK-AC, HU-KMNP-AC), egy soltszentimrei állomány (HU-SMA-AC), egy csanádpalotai állomány (HU-SZICS-AC) illetve egy makó-rákosi állomány (HU-MRDJ-TAC), amelyet morfológiai jegyek alapján az őshonos és tejelő változat közti átmenetként említik. Három tenyészet (HU-PG-ZC, HU-OJ-TC, HU-LB-TCZ) egyedei a tejelő cigája besorolásba tartoznak. Vizsgálati eredményeink alátámasztják a testméretbeli és a vér biokémiai polimorfizmus vizsgálatokban tapasztalt cigája változatok közötti eltéréseket (KUKOVICS és JÁVOR, 2001, 2002a). A két őshonosként nyilvántartott nemzeti parki állomány közelsége nem okozott meglepetést, annál inkább a rozsdás cigája (HU-PG-

TRC) és a ceglédi tejelő állomány (HU-LB-TCZ) illetve a csókai (HU-DE-CSC) és a zombori (HU-PG-ZC) állomány közti közelség.

Draganescu (2003) véleménye szerint a román ruda fajtából alakult ki a cigája juh. Ezt az álláspontot eredményeink nem támasztották alá, de azt igen, hogy egyes állományokkal közeli rokonságban van. A román rozsdás cigájával (RO-RUST-TS) a legszorosabb a kapcsolata, illetve néhány szlovák cigájával (SL-OND-TS, SL-KAM-TS, SL-KAO-TS), bolgár fajtákkal (BU-PLBH, BU-WFMAR, BU-PFMAR) és a török kivircik (TR-KIV-TRA, TR-KIV-MAR) juhval. A bolgár cigája típusok (BU-STAR-TS, BU-ROD-TS) genetikailag elkülönültek a többi állománytól, legközelebbi rokonságban a török sakiz (TR-SAKIZ) állománnyal találtuk.

Gyarmathy (2000) véleménye szerint (cit.:KUKOVICS és JÁVOR, 2002a), az összes szlovák cigája típus közös eredetre vezethető vissza. Azonban az általunk vizsgálatba vont 12 szlovák cigája változat között igen nagy különbözőségeket találtunk, aminek magyarázata lehet, hogy különböző tenyésztési programok révén sokféle fajtából származó keresztési partnert használtak.

Az albán ruda (AL-RUDA) állományt nem találtuk szoros rokonságban a román ruda (RO-RUDA) fajtával, eredményeink szerint a szerb csókai állományhoz (SM-CS-TS) áll közel. A bardhoke juh ugyancsak elkülönül a többi vizsgált állománytól, de legközelebb mégis a szlovák cigájához áll (SL-SIR-TS, SL-HAN-TS, SL-JUG). Ez a fajta zackel fajtakörbe tartozik. Az albán cigája (AL-TS) genetikai szerkezetét tekintve egyértelműen a magyar őshonosként nyilvántartott állományokhoz (HU-MRD-TAC, HU-SZIC-AC) hasonló, azonban ez meglepő eredmény, mivel nem ismert semmilyen kapcsolat köztük a múltban.

A két szerb pramenka (SM-KRI-PR, SM-SVR-PR) állomány egyértelműen közeli rokonságban áll egymással, míg a zombori (SM-ZP-TS) és a csókai (SM-CS-TS) cigája állományok genetikai háttere különböző. Ez alátámasztja Cinkulov és mtsai. (2003) eredményét, akik szerint a szerb zombori és csókai típusok genetikailag annyira távol állnak egymástól, hogy két külön fajtának tekinthetők.

A horvát cigáját (CR-TS) élesen elkülönültnek találtuk, a többi vizsgált állománytól, pedig a szerb tejelő cigáját (SM-ZP-TS) használták kialakítása során.

Eredményeink szerint néhány magyar őshonos cigája típust használva megőrizhetjük az albán cigája genetikai értékeit. A két Szerbiából Magyarországra importált cigája típust pedig mint vérfrissítés lehet használni a magyar cigája állományokban. A beltenyésztéses leromlás elkerülése miatt elsősorban Szerbia-Montenegróból tudunk

megbízható származású tenyészállatot behozni, amelyek küllemükben is a legkevésbé befolyásolják a hazai őshonos állományt. Néhány tenyészkest már importáltunk is az elmúlt 10 évben vérfrissítés céljából. Romániából hegyi típusú tenyészállatokat tudnánk behozni, azonban itt a származás igazolása körül gondok merülhetnek fel (GÁSPÁRDY és mtsai, 2001b).

Dolgozatom kisebbik felét képező részében mRNS szinten a nem klasszikus MHC I gének kifejeződését, míg DNS szinten polimorfizmusukat vizsgáltuk. Mindkét esetben génspecifikus primereket terveztünk. A génkifejeződés tanulmányozása azért volt fontos, mivel az emberi nem klasszikus gének szövetspecifitást mutatnak, egyes gének csak bizonyos szövetekben fejeződnek ki (pl.: HLA-G csak a méhlepényben). 33 különböző szövetmintát vizsgáltunk felnőtt kocából illetve kanból, majd 100 napos embrióból is 24 különböző szövetmintát gyűjtöttünk. Ezek alapján azt az eredményt kaptuk, hogy mind a három SLA Ib gén illetve az SLA-1 gén is kifejeződött mindegyik szövetben, azonban a klasszikus MHC I gén kifejeződése sokkal erősebb (több száz, illetve egyes esetekben több ezerszerese). Az Ib gének között az SLA-8 génekifejeződése erősebb mint az SLA-7 géne és leggyengébben az SLA-6 gén fejeződött ki. Ez alól kivétel a timusz, ahol a klasszikus SLA-1 után a nem klasszikus SLA-7 gén expressziója volt a legerősebb. A polimorfizmus vizsgálatok első eredményeit európai és kínai sertés fajták tanulmányozásával kezdtük. Szekvenálás után a szekvenciák elemzését a NovoSNP 2.0.3 programmal végeztük el. Eredményeink megerősítik, hogy ezen gének a nem klasszikus gének csoportjába tartoznak, mivel nem polimorfak, génenként egy új pontmutációt sikerült detektálnunk. Az SLA-6 gén esetén egy nem konzervatív mutációt találtunk az 529 pozícióban, ahol citozin/adenin helyettesítés történik és így prolin/glutamin aminosav csere is bekövetkezik, az SLA-8 gén esetén pedig a 383 pozícióban egy konzervatív mutációt detektáltunk, ahol citozin helyett adenin található. Az SLA-7 esetén a mutáció az 1 intronban található a 371 pozícióban.

SUMMARY

In first part of my thesis, genetic difference was studied among Tsigai and Zackel populations in eight Eastern-, Central and Southern European countries.

Hungary is one of the first countries on the world where the preservation of domestic animal species is recognized, the conservation of the entire genetic variance, and the regulation of function and relation of different genotypes is a very important task in cultural and technical aspects too. More aim is to identify again the traits of breed and to exploit it with traditional methods (VERESS, 1996). As a result of our study we confirmed the genetic difference –which is based on previous results of phenotype and blood biochemistic polymorphism research- among populations (KUKOVICS and JÁVOR, 2001, 2002a). Kukovics and Kume (2004) had a questionnaire about phenotypic and production traits of traditional sheep breeds in Central-, Eastern- and Southern- European countries (milk, wool, meat, fecundity). During the last 100 ys different crossing, environment effects changed these type of sheeps. Serbian Tsigai was used for Albanian and Croatian Tsigai breeding. Soviet Tsigai was used for developing Bulgarian Tsigai. Rumania is considered as a biggest Tsigai breeder country, since 1,5 million individuals are breed. Mainly they are exported sheeps into the Balcan countries. Tsigai is the second most important sheep breed in Slovakia, which is originated mainly from Transilvania. Until there was no information about genetic difference, relation of these breeds, variates, it was not able to preserv their genes.

Blood and wool samples were collected to our study from Albania, Bulgaria, Croatia, Serbia and Montenegro, Rumania, Slovakia, Turkey and Hungary. Altogether 1506 individuals from 41 flocks were examined using 16 microsatellite markers.

Among examined ten Hungarian populations five populations are autochthonous flocks based on Hungarian Sheep Breeders Association's registration: two populations owned by Kőrös-Maros National Park (HU-KMKK-AC, HU-KMNP-AC), one population from Soltszentimre (HU-SMA-AC), one population from Csanádpalota (HU-SZICS-AC) and one population from Makó-Rákos (HU-MRDJ-TAC), which is considered as a transitional type between autochthonous and milking type based on their morphology. Three flocks are milking type Tsigai (HU-PG-ZC, HU-OJ-TC, HU-LB-TCZ). Our results confirmed the genetic difference – which based on previous results of phenotype and blood biochemistic polymorphism research (KUKOVICS and JÁVOR, 2001,

2002a) - among Hungarian Tsigai populations. It was no surprise that two flocks which are registered as autochthonous populations are close to each other, however it was surprise that rusty Tsigai (HU-PG-TRC) with Milking flock in Cegléd (HU-LB-TCZ) and Cokanski (HU-DE-CSC) with Zomborski (HU-PG-ZC) populations.

According to Draganescu's (2003) strong opinion Tsigai breed was originated from Rumanian Ruda. This state was not confirmed by our results, but we could confirm that it has close relation with some populations, like Rumanian Rusty Tsigai (RO-RUST-TS), a few Slovakian populations (SL-OND-TS, SL-KAM-TS, SL-KAO-TS), Bulgarian breeds (BU-PLBH, BU-WFMAR, BU-PFMAR) and Turkish Kivircik (TR-KIV-TRA, TR-KIV-MAR). Bulgarian Tsigai populations (BU-STAR-TS, BU-ROD-TS) were separated genetically from other examined populations, and they were closest relation with Turkish Sakiz (TR-SAKIZ).

According to Gyarmathy (2000) (cit.:KUKOVICS and JÁVOR, 2002a), all Slovakian Tsigai types have the same origin. However there were big genetic difference among examined 12 Slovakian populations, which might be the result of different breeding programs using exotic breeds of sheep.

The genetic difference was very low but not negligible between Albanian Ruda (AL-RUDA) and Rumanian Ruda (RO-RUDA), but AL-RUDA was closer relation to Serbian Cokanski population (SM-CS-TS). Bardhoke breed was separated from other examined breeds, it had the closest relation to three Slovakian types (SL-SIR-TS, SL-HAN-TS, SL-JUG). Bardhoke is belong to Zackel type. Genetic structure of Albanian Tsigai (AL-TS) was similar to Hungarian autochthonous populations (HU-MRD-TAC, HU-SZIC-AC), however it was surprise because there was no information about their relation in the past.

Genetic difference was at moderately level between two Serbian Pramenka populations (SM-KRI-PR, SM-SVR-PR), and Serbian Zomborski Tsigai (SM-ZP-TS), it was highly differentiated from Cokanski Tsigai (SM-CS-TS). We confirmed the result of Cinkulov et al (2003), who studied the genetic difference between Serbian Cokanski and Zomborski, and determined that the genetic difference between these two populations is so extended, that these can be regarded as two separate breeds.

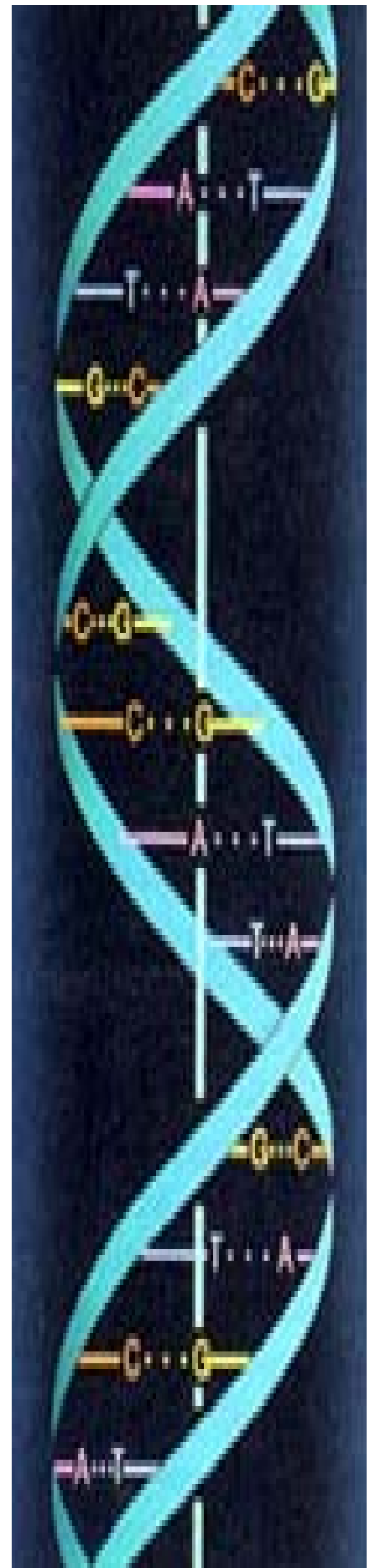
Croatian Tsigai was separated (CR-TS) from other populations, however Serbian Milking Tsigai (SM-ZP-TS) was used for developing this breed.

Our results suggest that several Hungarian autochthonous Tsigai variants are suitable for preserving the Albanian Tsigai sheep. Furthermore, two Tsigai variants imported

into Hungary from Serbia might also be used as blood refreshment in various Hungarian Tsigai flocks. We are able to import known originated rams only from Serbia and Montenegro to avoid inbreeding depression, because these populations have the least influence for Hungarian autochthonous populations' phenotype. Several rams were already imported during the last 10ys. Mountain type rams could be imported from Rumania, however it could be problem with certify of origin (GÁSPÁRDY et al, 2001b).

Second part of my thesis were study of expression of non-classical MHC I genes in pig on mRNA level, and their polymorphism on DNA level. Genespecific primers were designed in both cases. It was important to study gene expression of non-classical genes in pig since non-classical genes in human have tissue specific expression (e.g.: HLA-G only in placenta). From adult sow and boar 33 distinct tissue samples, from 100 days fetuses 24 distinct tissue samples were collected. According to our results both three SLA Ib gene and SLA-1 gene were expressed in each examined tissue, however expression of classical MHC I gene was much more stronger (hundred, thousand fold in several case). Among Ib genes, expression of SLA-8 was stronger than SLA-7 and SLA-6 had the lowest expression level. Thymus was exception, because expression of SLA-7 was the strongest after classical SLA-1. European and Chinese pig breeds were used for polymorphism study at the beginning. After sequencing NovoSNP 2.0.3 program was used for sequence analysis. Our results confirm, that these genes are belong to the group of non-classical genes, as we have identified only one new allele per a gene, which means really low level polymorphism and this is the main character of non-classical genes. In case of SLA-6 gene one non conservative mutation was detected at 529 position. There is a cytosine/adenine substitution, which causes proline/glutamine aminoacid substitution. In case of SLA-8 gene on conservative mutation was identified at 383 position. There is a cytosine adenine substitution. In case of SLA-7 one new SNP was detected inside of intron 1 at 371 position.

7. A szakirodalom jegyzéke



1. Altschul, S.F.- Gish, W.- Miller, W.- Myers, E.W.- Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-10.
2. Alvarez, I.- Royo, L.J.- Fernandez, I.- Gutierrez-Gomez, J.P.- Goyache F. (2004): Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. *J. Animal Sci.* 82: 2246-2252.
3. Anton, I.- Zsolnai, A.- Fésüs, L.- Kukovics, S.- Molnár, A. (1999): Survey of β -lactoglobulin and α_{s1} -casein polymorphisms in Hungarian dairy sheep breeds and crosses on DNA level *Arch. für Tierzucht, Dummerstorf* 42. 4. 387-392.
4. Aquadro, C.F.- Jennings, R.M.- Bland, M.M.- Laurie, C.C.- Langley, C.H. (1992): Patterns of naturally occurring restriction map variation, dopa decarboxylase activity variation and linkage disequilibrium in the *Ddc* gene region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 132: 443-452.
5. Archibald, A.- Haley, C. (1993): Mapping the complex genomes of animals and man. *Outlook on Agriculture*, 22:79-84.
6. Arranz, J.J.-Bayon, Y.-San Primitivo, F.(1998): Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim. Genet.* 29:435-440.
7. Arranz, J.J.- Bayon, Y.- San Primitivo, F. (2001): Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genet.Sel.Evol.* 33:529-542.
8. Avellanet Torres, R. (2002): szóbeli közlés
9. Banabazi, M.H.- Miraei Ashtiani, S.R.- Esmaelkhanian, S. (2005): Phylogenetic relationship and divergence time between two Iranian Kordi sheep populations using microsatellite markers. EAAP-56th Annual Meeting, Uppsala. 101.
10. Barendse, W.- Armitage, S.M.- Kossarek, L.M.- Shalom, A.- Kirkpatrick, B.W.- Ryan, A.M.- Clayton, D.- Li, L.- Neibergs, H.L.- Zhang, N.- Grosse, W.M.- Weiss, J.- Creighton, P.- McCarthy, F.- Ron, M.- Teale, A.J.- Fries, R.- McGraw, R.A.- Moore, S.S.- Georges, M.- Soller, M.- Womack, J.E.- Hetzel, D.J.S. (1994): A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 6:227-235.
11. Barker, J.S.F.- Moore, S.S.- Hetzel, D.J.S.- Evans, D.- Tan, S.G.- Byrne, K. (1997): Genetic diversity of Asian water buffalo: microsatellite variation and a comparison with protein coding loci. *Anim. Genet.* 28:103-15.

12. Barker, J.S.F.- Tan, S.G.- Moore, S.S.- Mukherjee, T.K.- Matheson, J.L.- Selvara, O.S. (2001): Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (*Capra hircus*). *J. Anim. Breed. Gen.* 118:213-233.
13. Beaumont, M.A.- Bruford, M.W. (1999): Microsatellites in conservation genetics. In *Microsatellites: Evolution and Application*. (D.B. Goldstein-C.Schlotterer, Eds.) Oxford University Press, New York, 165-183.
14. Beh, K.J.- Riffkin, C.D.- Davies, K.P.- di Ienno, K.L.- Maddox, J.F. (2000): Dinucleotide repeat polymorphism at the ovine McMA7, McMA10, McMA13, McMA16, McMA17, McMA27, McMA29, McMA42, McMA47 and McMA49 loci. *Anim. Genet.* 31:228-229.
15. Bishop, M.D.- Kappes, S.M.- Keele, J.W.- Stone, R.T.- Sunden, S.L.F.- Hawkins, G.A.- Solinas Toldo, S.- Fries, R.- Grosz, M.D.- Yoo, J.- Beattie, C.W. (1994): A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136:619-639.
16. Bodó, I. (1997): Ami ránk maradt, az megvan. *Állattenyésztők Lapja*.4:6.
17. Bodó, I., Veress, L. (1997): Cigájatenyésztés Jugoszláviában. *Magyar Állattenyésztők Lapja*. 3:7.
18. Bodó, I. (2001): Régi magyar háziállatfajtáink. *Magyar Tudomány*, 5.
19. Bodó, I.; Komlósi, I.; Mihók, S.; Szabó, P.; Jávora, A.; Béri, B. (2002): Genetic Resources and Their Management in Hungary. In: 7th World Congress applied to Livestock Production, 19th-23th August, Montpellier, France
20. Botha, K. (2001): The genetics relationship of seven horse breeds in South Africa using DNA markers. MSc thesis, South Africa
21. Botstein, D.- White, R.L.- Skolnick, M.- Davis, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Gen.* 32:314-331.
22. Bradic, M. (2003): szóbeli közlés
23. Bradic, M.- Pavic, V.- Mioc, B.- Safner, T. (2004): Genetic difference of some sheep breeds in the Republic of Croatia. EAAP-55th Annual meeting, Bled.
24. Bradic, M.- Mioc, B.- Pavic, V.- Barac, Z. (2005): Pairwise comparison of mtDNA in two Croatian sheep population. EAAP-56th Annual Meeting, Uppsala. 97.
25. Brezinsky, L.- Kemp, S.J.- Teale, A.J. (1993): 5 polymorphic bovine microsatellites (ILSTS010-014). *Anim. Genet.* 24:75-76.

26. Brown, T.A. (2002): *Genomes 2*. Bios, 2nd edition, Hardback, ISBN 1859962289
27. Buchanan, F.C.- Swarbrick, P.A.- Crawford, A.M. (1992). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF 65 locus. *Anim. Genet.* 23:85.
28. Buchanan, F.C., Crawford, A.M. (1992). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF 214 locus. *Anim. Genet.* 23:394.
29. Buchanan, F.C.- Adams, L.J.- Littlejohn, R.B.- Maddox, J.F.- Crawford A.M. (1994): Determination of Evolutionary Relationships among Sheep Breeds Using Microsatellites. *Genomics.* 22:397-403.
30. Buduram P.- van Wyck J.B.- Kotze A. (2005): Genetic characterization of indigenous Southern African sheep breeds using DNA markers. EAAP-56th Annual Meeting, Uppsala. 96.
31. Burns, B.M.- Taylor, J.F.- Herring, K.L.- Herring, A.D.- Holder, M.T.- Collins, J.S.- Guerra, T.M.- Sanders, J.O.- Davis, S.K. (1995): Bovine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the TEXAN11, TEXAN12, TEXAN13, TEXAN14 and TEXAN15 loci. *Anim. Genet.* 26:201-213.
32. Calin, I.- Livia, V.- Raducuta, I.- Vlad, I. (2002): Cercetari Comparative Privind Potentialul de Crestere si Ingrasare a Tineretului Ovin Tigaie si Turcana. In: Stiinte procese si tehnologii agroalimentare, 31st October –1st November, Sibiu, 425-430.
33. Carosella, E.D.- Moreau, P.- Le Maoult, J.- Le Discorde, M.- Dausset, J.- Rouas- Freiss, N. (2005): HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. In: *Advances in Immunology*. (szerk.: Frederick W.Alt)
34. Chardon, P.- Renard, C.- Rogel-Gaillard, C.- Vaiman, M. (2000): The porcine Major Histocompatibility Complex and related paralogous regions: a review. *Genet.Sel.Evol.* 32:109-128.
35. Chardon, P.- Rogel-Gaillard, C.- Cattolico, L.- Duprat, S.- Vaiman, M.- Renard, C. (2001): Sequence of the swine major histocompatibility complex region containing all non-classical class I genes. *Tissue Antigens.* 57:55-65.
36. Chenyambuga, S.W. (2002): Genetic characterisation of indigeneous goat populations of Sub-Saharan Africa using microsattelite DNA markers. PhD-thesis. Sokoine Univ. Agric. 194.

37. Cinkulov, M.- Krajinovic, M.- Pihler, I. (2003): Phenotypic differences between two types of Tsigai breed of sheep. *Lucrai stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*, Timisoara, Románia
38. Cinkulov, M. (2004): szóbeli közlés
39. Clements, C.S.- Kjer-Nielsen, L.- Kostenko, L.- Hoare, H.L.- Dunstone, M.A.- Moses, E.- Freed, K.- Brooks, A.G.- Rossjohn, J.- McCluskey, J. (2005): Crystal structure of HLA-G: A non-classical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 102:3360-3365.
40. Crawford, A.M.- Swarbrick, P.A.- Buchanan, F.C. (1992): Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF70 locus. *Anim. Genet.* 23:185-185
41. Crawford, A.M.- Dodds, K.G.- Ede, A.J.- Pierson, C.A.- Montgomery, G.W.- Garmonsway, H.G.- Beattie, A.E.- Davies, K.- Maddox, J.F. (1995): An autosomal genetic Linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140:703-724.
42. Crawford, A.M.- Littlejohn, R.P. (1998): The use of DNA markers in deciding conservation priorities in sheep and other livestock. *Animal Genetic Resources Information.* 23:21-26.
43. Crew, M.D.- Phanavanh, B.- Garcia-Borges, C.N. (2004): Sequence and mRNA expression of non classical SLA class I genes SLA-7 and SLA-8. *Immunogenetics.* 56:111-114.
44. Csapó, J.- Csapóné Kiss, Zs. (2002): *Élelmiszer kémia.* Mezőgazda Kiadó. Budapest.
45. Dieffenbach, C.W.- Lowe, T.M.J.- Dveksler, G.S. (1995): General concepts for PCR primer design. In *PCR primer. A laboratory manual.* CSH, 133-142.
46. Diez-Tascon, C.- Littlejohn, R.P.- Almeida, P.A.R.- Crawford, A.M. (2000): Genetic variation within the merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Anim. Genet.* 31:243-251.
47. Dohy, J. (1999): *Genetika állattenyésztőknek.* Mezőgazda Kiadó. 59-95.
48. Dowling, T.E.- Moritz, C.- Palmer, J.D. (1990): Nucleic acids II: restriction site analysis. In: *Molecular Systematics.* DM. Hillis and C. Moritz (eds).Sunderland, Mass:Sinauer Associates, 250-317.
49. Draganescu, C. 2003. Romanian strategy for a sustainable management of farm animal genetic resources. Institute of Biology and Animal Nutrition, Balotesti, Ministry of Agriculture, Forestry, Waters and Environment, Bucuresti, Romania, ISBN 973-0-03425-7.

50. Dunka, B. (1997): A cigája és a cikta. *Állattenyésztők Lapja*.7:7.
51. Ede, A.J.- Pierson, C.A.- Crawford, A.M. (1995): Ovine microsatellites at the OarCP9, OarCP16, OarCP20, OarCP21, OarCP23 and OarCP26 loci. *Anim. Genet.* 26:128-129.
52. Edwards, M.C.- Gibbs, R.A. (1994): Multiplex PCR: advantages, development, and applications. [Review]. *PCR Methods & Applications.* 3:S65-S75.
53. Ellegren, H.- Moore, S.- Robinson, N.- Byrne, K.- Ward, W.- Sheldon, B.C. (1997): Microsatellite evolution –a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Mol. Biol. Evol.* 14:854-860.
54. FAO Handbook of laboratory Exercise (2004): FAO/IAEA Inter-regional Training Course on Molecular Methods in Livestock Genetics and Breeding. Seibersdorf. Austria.18.
55. Farid, A.- O'Reilly, E.- Dollard, C.- Kelsey, C.R. (2000): Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Can. J. Anim. Sci.* 80:9-17.
56. Felsenstein, J. (1995): PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Univ. Washington. USA.
57. Fésüs, L. (1974): A juh vércsoportjai I. Az első hazai vizsgálatok eredménye. *Állattenyésztés.* 5:83-88
58. Fésüs, L., Al Dabbagh, A. (1991): Investigations of blood groups and biochemical polymorphisms in gene-reserve populations of Cikta and Cigaja breeds /A génrezerv cigája és cikta állományok vércsoport és biokémiai polimorfizmus vizsgálatának eredményei. *Állattenyésztés és Takarmányozás.* 40. 5:411-416.
59. Fésüs, L.(1997a): Óshonos fajták fenntartása. *Állattenyésztők Lapja.* 2:9.
60. Fésüs, L. (1997b): Markerekkel végzett szelekció háziállatokban. *Állattenyésztés és Takarmányozás.* 46:289-293.
61. Fésüs, L.- Komlósi, I.- Varga, L.- Zsolnai, A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft. Budapest.
62. Fésüs, L.- Sáfár, L.- Hajduk, P.- Székely, P. (2002): A merinó a magyarországi juhtenyésztésben. *Magyar Állattenyésztők Lapja.*7:6.
63. Gagneux, P.- Boesch, C.- Woodruff, D.S. (1997): Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Mol. Ecol.* 6:861-868.

64. Ganai, N.A.- Yadav, B.R. (2003): Parentage determination in three breeds of Indian goat using heterologous microsatellite markers. IAEA-CN. 110/32:120-121.
65. Garrett, R.H.- Grisham, C.M. (1999): Biochemistry, Saunders College Publishing
66. Gáspárdy, A.– Eszes, F.– Bodó, I. (1998): Useful ancient sheep breeds in Danubian Region. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 47. 3:203-207
67. Gáspárdy, A. (2000): A cigája vagy berke. In: “Eleven örökség”, (szerk.: I. Bodó); Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, ISBN 963 502 720 6.60-62.
68. Gáspárdy, A. (2001a): A cigája. *Magyar Állattenyésztők Lapja*. 29:7.
69. Gáspárdy, A. (2001b): Őshonos magyar juhajták. *Mezőhír*. 10.
70. Gáspárdy, A.- Eszes, F.- Bodó, I.- Koppány, G.- Keszthelyi, T.- Márton, F. (2001): A cigája (berke) juhajtá hazai változatainak alkattani összehasonlító vizsgálata. 50:33-42 .
71. Gáspárdy, A. (2002): Cigája (Berke). In: *Génmegőrzés; kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről* (szerk.: Jávora, A.- Mihók, S.) Debrecen, 2002. október 16; 153-161.
72. Gáspárdy, A.- Anton, I.- Megyerné Nagy, J.- Fésüs, L.- Eszes, F.- Komlósi, I. (2004): Hazai cigája állományok biokémiai- és DNS polimorfizmusokra alapozott összehasonlító vizsgálata. Előadás. *Agrártermelés 8211; Harmóniában a természettel, XXX. Óvári Tudományos Napok, NYME Mosonmagyaróvár, október 7, ISSN 0237-9902, 35.*
73. Georges, M.- Leqarre, A.S.- Castelli, M.- Hanset, R.- Vassart, G. (1989): DNA fingerprint in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 47:127-131.
74. Georges, M.- Massey, J. (1992): Polymorphic DNA markers in bovidae (World Intellectual Property Org., Geneva) WO Publication No 92/13102
75. Gergely, J. (1998): Antigén felismerés és jelátvitel. *Természet Világa*. 129.11:482-486.
76. Gergely, J. (2000): Mit várhatunk a 21. században? *Természet Világa* I.különszám.
77. Gerloff, U.- Schlötterer, C.- Rassmann, C.- Rambold, I.- Hohmann, G.- Frith, B. (1995): Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites)

- from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Mol. Ecol.* 4:515-518.
78. Gladyr, E.- Zinovieva, N.- Müller, M.- Brem, G. (2005): Investigation of the Russian sheep breeds using DNA microsatellites. EAAP. EAAP-56th Annual Meeting, Uppsala. 100.
79. Glowatzki-Mullis, M.L.- Gaillard, C.- Wigger, G.- Fries R. (1995): Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim Genet* 26:7-12.
80. Goldstein, D.B.- Schlötterer, C.(1999): *Microsatellites*. Oxford University Press
81. Goudet, J.- Keller, L., (2002): The correlation between inbreeding and fitness: does allele size matter? *Trends in Ecology & Evolution.* 17:201-202.
82. Grigaliunaite, I.- Tapio, M.- Viinalass, H.- Grislis, Z.- Kantanen, J.- Miceikiene, I. (2003): Microsatellite variation in the baltic sheep breeds. *Veterinarija ir zootechnika.* 21:66-73.
83. Hanotte, O.- Tawah, C.L.- Bradley, D.G.- Okomo, M.- Verjee, Y.- Ochieng, J.W.- Rege, J.E.O. (2000): Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-Saharan African cattle breeds. *Mol. Ecol.* 9:387-396.
84. Hanotte, O.- Bradley, D.G.- Ochieng, J.W.- Verjee, H.E.W.- Rege, J.E.O. (2002): African Pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science* 296:336-339.
85. Hanslik, S.- Harr, B.- Brem, G.- Schlötterer, C. (2000): Microsatellite data analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. *Anim. Genet.* 31:31-38.
86. Hedrick, P.W.- Kim, T.J.- Parker, K.M. (2001): Parasite resistance and genetic variation in the endangered Gila topminnow. *Anim. Conserv.* 4:103-109.
87. Heyen, D.W.- Beever, J.E.- Da Y.- Evert, R.E.- Green, C.- Bates, S.R.E.- Ziegler, J.S.- Lewin, H.A. (1997): Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim. Genet.* 28:21-27.
88. Hidas, A.(2002): DNS markerek vizsgálata a baromfi állományok génmegőrzésében. In: *Génmegőrzés; Kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről.* 207-214.
89. Hiendleder, D.W.- Mainz, K.- Plante, Y.- Lewaiski, H. (1998): Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different

- ancestral maternal sources: No evidence for contribution from Urial and Argali. *J. Hered.* 89:113-120.
90. Hiendleder, S.- Kaup, B.- Wassmuth, R.- Janke, A. (2002): Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 269:893-904.
 91. Howard, J.C. (1987): MHC organization in the rat: evolutionary considerations. in *Evolution and vertebrate immunity.* (szerk.:G.Klesoe- D.H.Schulze) University of Texas Press, Austin. 397-427.
 92. Hulme, D.J.- Silk, J.P.- Redwin, J.M.- Barendse, W.- Beh, K.J. (1994): Ten polymorphic ovine microsatellites. *Anim. Genet.* 25:434-435.
 93. Hurt P.- Walter, L.- Sudbrak, R.- Klages, S.- Müller, I.- Shiina, T.- Inoko, H.- Lehrach, H.- Günther, E.- Reinhardt, R.- Himmelbauer, H. (2003): The Genomic Sequence and Comparative Analysis of the Rat Major Histocompatibility Complex. *Genome Res.* 631-639.
 94. Hviid, T.V.F.- Hylenius, S.- Rorbye, C.- Nielsen, L.D. (2003): HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics.* 55:63-79.
 95. Ivankovic, A.- Kavar, T.- Caput, P.- Mioc, B.- Pavic, V.- Dovc, P. (2002): Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region. *Anim. Genet.* 33:169-177.
 96. Ivanov, M.F. (1951): *Juhtenyésztés.* Mezőgazda Kiadó, Budapest. 163.
 97. Jakab, G. (2003): Autoimmun folyamatok a központi idegrendszerben. *Focus Medicine.* 4:3-6.
 98. Jandurova, O.M.- Kott, T.- Kottova, B.- Czernekova, V. (2004): Seven microsatellite markers useful for determining genetic variability in White and Brown Short-Haired goat breeds. *Small Rum. Res.* 52:271-274.
 99. Jávör, A.- Kukovics, S.- Nábrádi, A.- Molnár, Gy.- Molnár, B.- Molnár, A.- Ábrahám, M. (1998): Present state of Hungarian sheep breeding Sheep and Goat Production in Central and Eastern European Countries Workshop, *Proceedings RUE technical Series 50.* FAO Roma, 1998. 107-119.
 100. Jeffreys, A.J.- Wilson, V.- Thein, S.L. (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature.* 314:67-73.

101. Kakoi, H.- Nagata, S.- Kurosawa, M. (2001): DNA typing with 17 microsatellites for parentage verification of racehorses in Japan. *Anim. Sci.* 72:453-460.
102. Kantanen, J.- Vilkki, J.- Elo, K.- Maki-Tanila, A. (1995): Random Amplified Polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation: *Anim. Genet.*25:315-320.
103. Kappes, S.M.- Keele, J.W.- Stone, R.T.- McGraw, R.A.- Sonstegard, T.S.- Smith, T.P.L.- Lopez-Corrales, N.L.- Beatie, C.W. (1997): A second generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res* 7:235-249.
104. Kavar, T.- Kompan, D.- Dovic, P. (2002): Genetic differentiation among Istrian Pramenka, Bovska sheep and Jezersko Solcavska sheep. *Zb. Biotech. Fak. Univ. Ljubljana. Kmet. Zootechn.* 80:193-201.
105. King, R.C.- Stansfield W.D. (1990): *A Dictionary of Genetics.* Oxford University press. New York-Oxford.
106. Klein, J.- Figueroa, F. (1986): Evolution of the major histocompatibility complex. *CRC Crit. Rev. Immunolog.* 6:395-386.
107. Knapp, L.A.- Cadavid, L.F.- Watkins, D.I. (1998): The MHC-E locus is the most well conserved of all known primate class I histocompatibility genes. *The American Association of Immunologists.*
108. Koller, B.H.- Geraghty, D.E.- Shimizu, Y.- Demars, R.- Orr, H.T. (1988): HLA-E A novel class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J.Immunology.* 141:897.
109. Kukovics, S. (2000): Tejelő cigája. In: "Tenyésztési és fajtahasználati útmutató" (szerk.: Jávor, A.- Fésüs, L.). 81-82.
110. Kukovics, S.- Jávor, A.(2001): Prospects for small ruminant production and consumption in Eastern Europe. In: *Proceedings of 52th Annual Meeting of European Association for Animal Production.* Budapest. Hungary 26-29 August; *Book of Proceedings.* 7. 103-147.
111. Kukovics, S.- Jávor, A. (2002a):A cigája juh és jövője. In: *Génmegőrzés; kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről* (szerk.:Jávor, A.-Mihók, S.) Debrecen, 2002.október 16; 103-147.
112. Kukovics, S.- Jávor, A. (2002b): *The Tsigai sheep,* CAB International, London.1-36.

113. Kukovics, S.- Molnár, A.- Jávör, A.- Gáspárdi, A.- Dani, Z.(2003): A hazai cigája juhállományok változatai és termelési különbségei. Magyar Juhászat. Magyar Mezőgazdaság melléklet.6:2-6.
114. Kukovics, S.- Molnár, A.- Jávör, A.- Gáspárdi, A.- Dani, Z.(2004): A hazai cigája juhállományok változatai és termelési különbségei. 1. Közlemény. Állattenyésztés és Takarmányozás. 53: 515-528.
115. Langella, O. (1999): Populations. A software to calculate distances and create trees.
116. Li, X.L.- Gong, Y.F.- Zhang, J.W.- Liu, Z.Z.- Valentini, A. (2004): Study on polymorphism of microsatellites DNA of six Chinese indigenous sheep breeds. Yi Chuan Xue Bao. 31: 1203-1210.
117. Liu, B.H. (1997): Statistical Genomics: linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press.USA. Florida. 62-83.
118. Lu, J.- Knox, M.R.- Ambrose, M.J.- Brown, J.K.M.- Ellis, T.H.N. (1996): Comparative analysis of genetic diversity in peas assessed by RFLP and PCR-based methods. Theor. Appl. Genet. 93:1103-1111.
119. Luikart, G.- Biju, M.P.- Ertugrul, O.- Zagdsuren, Y.- Maudet, C.- Taberlet, P. (1999): Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). Anim. Genet. 30:431-438.
120. MacHugh, D.E.- Shriver, M.D.- Loftus, R.T.- Cunningham, P.- Bradley, D.G. (1997): Microsatellite DNA variation and evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle. Genetics 146.1071-86.
121. Magyar Juhtenyésztő Szövetség (2005): 6. Időszaki tájékoztató. Budapest. Magyar Juhtenyésztő Szövetség.
122. Marian, P.- Iozon, D.- Zaharescu, M.- Petrut, T. (1980): Serum albumin polymorphism in Tsigai and Transylvanian Merino sheep. 304-310.
123. Marklund, S.- Ellegren, H.- Eriksson, S.- Sandberg, K.- Andersson, L. (1994): Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. Anim. Genet. 25:19-23.
124. Mason, I.L. (1996): A World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties. Fourth Edition. C.A.B International. 273.
125. Matthews, G.D.- Crawford, A.M. (1998): Cloning, sequencing and linkage mapping of the NRAMP1 gene of sheep and deer. Anim. Genet. 29:1-6.

126. Messer, G.- Zemmour, J.- Orr, H.T.- Parham, P.- Weiss, E.H.- Girdlestone, J. (1992): HLA-J,A 2nd inactivated class I HLA gene related to HLA-G and HLA-A implications for the evolution of the HLA-A related genes. *J. Immunol.* 148:4043-4053.
127. Moore, S.S.- Sargeant, L.L.- King, T.J.- Mattick, J.S.- Georges, M.- Hetzel, D.J. (1991): The conservation of dinucleotide microstellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics.* 10:654-660.
128. Moore, S.S.- Byrne, K.- Berger, K.T.- Barendse, W.- McCarthy, F.- Womack, J.E.- Hetzel, D.J.S. (1994): Characterization of 65 microsatellites. *Mamm. Genome* 5:84-90.
129. Mucsi, I. (1997): *Juhtenyésztés és –tartás.* Mezőgazda Kiadó. Budapest. 48.
130. Mullis, K.B.- Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase chain reaction. In: Wu R. ed. *Methods in Enzymology* vol. 155, Academic Press, San Diego, CA. 335-350.
131. Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, New York
132. O'Brien, S.J.- Nash, W.G.- Wildt, D.E.- Bush, M.E.- Benveniste, R.E. (1985): A molecular solution to the riddle of the giant panada's phylogeny. *Nature* 317:140-144.
133. Oláh, J. (2002): A hortobágyi rackajuh. *Magyar Állattenyésztők Lapja.* 9:12-13.
134. Pariset, L.- Savarese, M.C.- Capuccio, I.- Valentini, A. (2003): Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. *J. Anim. Breed. Genet.* 120:425–432.
135. Parsons, Y.M.- Cooper, D.L.W.- Piper, L.R. (1996): Genetic variation in Australian Merino sheep. *Anim. Genet.* 27:223-228.
136. Penty, J.M.- Henry, H.M.- Ede, A.J.- Crawford, A.M. (1993): Ovine microsatellites at the OarAE16, OarAE54, OarAE57, OarAE119 and OarAE129 loci. *Anim. Genet.* 24:219.
137. Pepin, L.- Amigues, Y.- Lepingle, A.- Berthier, J.- Bensaid, A.- Vaiman, D. (1995): Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus*, *Capra hircus* and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *J. Hered.* 74:53-61.

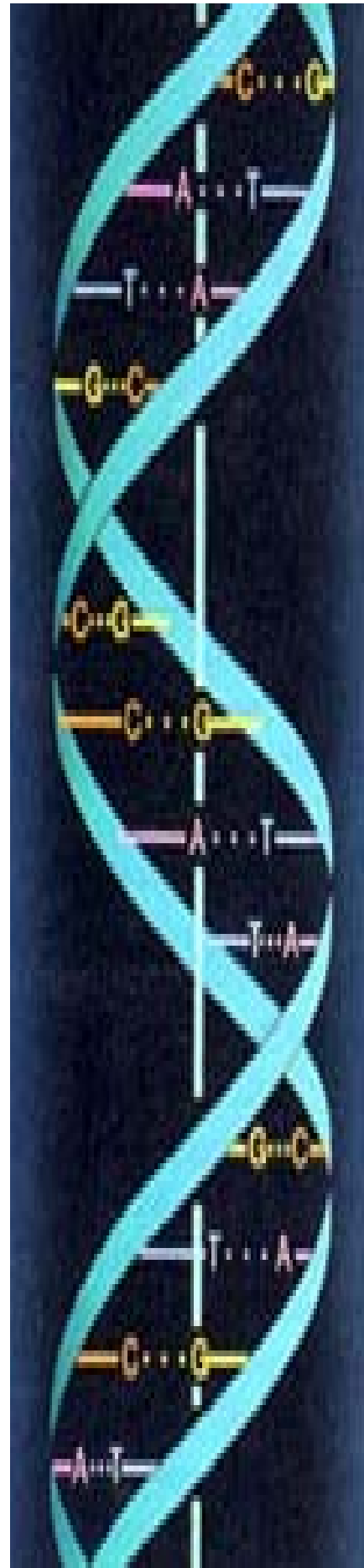
138. Perez-Enciso, M. (2003): szóbeli közlés
139. Petrányi, Gy.- Gyódi, É. (2005): A fő hisztokompatibilitási rendszer (MHC) molekuláris genetikai szerepe a „saját és idegen” felismerésben és jelentősége a fajfejlődésben. Magyar tudomány. 6:659.
140. Rajnavölgyi, É.-Gergely, J. (1998): Antigénfelismerés II. A T-sejtek antigénfelismerésének szerkezeti alapjai. In : Immunbiológia. (szerk: Gergely J- Erdei A.) Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest.
141. Renard, C.- Vaiman, M.- Chiannikulchai, N.- Cattolico, L.- Robert, C.- Chardon, P. (2001): Sequence of the pig major histocompatibility region containing the classical class I genes. Immunogenetics. 53:490-500.
142. Renard, C.- Chardon, P.- Vaiman, M. (2003): The phylogenetic history of the MHC class I gene families in pig, including a fossil gene predating mammalian radiation. J.Mol.Evol. 57:420-434.
143. Rogel-Gaillard, C. (2006): nem publikált
144. Rooney, A.P.- Honeycutt, R.L.- Davis, S.K.- Derr, J.N. (1999): Evaluating a putative bottleneck in a population of bowhead whales from patterns of microsatellite diversity and genetic disequilibria. J. Mol. Biol. 48:682-690.
145. Rózsahegyi, P.- Izsák, M. (2002): A juhtenyésztésről általában. Agro Napló. 3:120-123.
146. Sáfár, L. (2001): Törzskönyvezett juhajták. Magyar Állattenyésztők Lapja. 29:4-5.
147. Saitbekova, N.- Gaillard, C.- Obexer-Ruff, G.- Dolf, G. (1999): Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. Anim. Genet. 30:36-41.
148. Schandl, J. (1955): Juhtenyésztés, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
149. Schlötterer, C. (2004): The evolution of molecular markers- just a matter of fashion? Nature reviews. 5:63-69.
150. Schneider, S.- Roessli, D.- Excoffier, L. (2000) Arlequin: A software for population genetic data. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
151. Shay, T.- Berghmans, S.- Segers, K.- Meyers, S.- Womack J. (2001): Fine-mapping and construction of a bovine contig spanning a 4.6 centimorgan interval containing the CLPG locus. Mamm. Genome 12:141-149.

152. Sibley, C.G.- Ahlquist, J.E. (1990): Phylogeny and classification of birds: A study in molecular evolution. Yale University Press, New Haven and London.
153. Simond, L.J.-H.- Hawthorne, W.J.- Walters, S.N.- Patel, A.T.- Smith, D.M.- O'Connell, P.J.- Moran, C. (2005): Characterization of the swine major histocompatibility complex alleles at eight loci in Westran pigs. *Xenotransplantation*.12:303-307.
154. Smith, D.M.- Martens, G.W.- Ho, C.S.- Asbury, J.M. (2005): DNA sequence based typing of swine leukocyte antigens in Yucatan Miniature Pigs. *Xenotransplantation*.12:481-488.
155. Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
156. Sönmez, R. (1977): Comparison of milk yield and prolificacy between native sheep and Ostfriz crossbreeds in Turkey. 28. Jahrestagung der EVT, Brüssel
157. Spiridonov, V.I. (1973): Genetic polymorphism of blood proteins and erythrocyte potassium in locally bred Tsigai sheep. In: *Trudy*. 113: 93-95.
158. Stevens, J.- Joly, E.- Trowsdale, J.- Butcher, G.W. (2001): Peptide binding characteristics of the non-classical class Ib MHC molecule HLA-E assessed by a recombinant random peptide approach. *BMC Immunology*. 2:5.
159. Stone, R.T.- Pulido, J.C.- Duyk, G.M.- Kappes, S.M.- Keele, J.W.- Beatie, C.W. (1995): A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite. *Mamm Genome* 6:714.
160. Stratil, A. (1973): Two new sheep transferrin variants and the effect of neuraminidase. In: *Animal-Blood-Groups-and-Biochemical-Genetics*. 4:153-159.
161. Swarbrick, P.A.- Buchanan, F.C.- Crawford, A.M. (1991): Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF35 locus. *Anim. Genet.* 22:369-370.
162. Szakály, S.- Csapó, J.- Császár, G.- Fenyvessy, J.- Iváncsics, J.- Jávör, A.- Kis, L.-, Kukovics, S.- Novák, Á.- Óbert, G.- Schaffer, B.- Szakály, Z.- Széles, Gy.- Ujhelyi, S.- Unger, A.- Zsinkó, M. (2001): *Tejgazdaságtan*. (szerk.: Szakály, S.) Dinasztia Kiadó, Budapest.
163. Szekeres-Barthó, J. (2005): A terhesség immunogenomikai vonatkozásai. *Magyar Tudomány*. 50.6.

164. Taberlet, P.- Griffin, S.- Goossens, B.- Questiau, S.- Manceau, V.- Escaravage, N.- Waits, L.P. (1996): Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24:3189-3194.
165. Templin, M.F.- Stoll, D.- Schrenk, M.- Traub, P.C.- Vöhringer, C.F.- Joos, T.O. (2002): Protein microarray technology. *Trends in Biotechnology* 20:160-166.
166. Teneva, A. (2005): szóbeli közlés
167. Traherne, J.A.- Horton, R.- Roberts, A.N.- Miretti, M.M.- Hurler, M.E.- Stewart, C.A.- Ashurst, J.L.- Atrazhev, A.M.- Coggill, P.- Palmer, S.- Almeida, J.- Sims, S.- Wilming, L.G.- Rogers, J.- de Jong, P.J.- Carrington, M.- Elliott, J.F.- Sawcer, S.- Todd, J.A.- Trowsdale, J.- Beck, S. (2006): Genetic Analysis of Completely Sequenced Disease-Associated MHC Haplotypes Identifies Shuffling of Segments in Recent Human History. *PLoS Genet.* 2: 9
168. Trowsdale, J. (2005): HLA genomics in the third millennium. *Current Opinion in Immunology.* 17:1-7.
169. Usha, A.P.- Simpson, S.P.- Williams, J.L. (1995): Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Anim Genet* 26:155-161.
170. Vaiman, D.- Mercier, D.- Moazami-Goudarzi, K.- Eggen, A.- Ciampolini, R.- Lepingle, A.- Velmala, R.- Kaukinen, J.- Varvio, S.L.- Martin, P.- Levéziel, H.- Guérin, G. (1994): A set of 99 cattle microsatellite: characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mamm. Genome* 5:288-297.
171. Venetianer, P. (1998): Az emberi mitokondriumok genetikája. *Természet világa.* 11:486-488.
172. Veress, L.- Jankowski S.T., Schwark H.J. (1982): *Juhtenyésztők kézikönyve.* Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
173. Veress, L.- Bedő, S.- Lovas, L.- Mucsi, I.- Lengyel, A.- Zomborszky, Z. (1995): *Juhtenyésztés. Állattenyésztés 1. Szarvasmarha, juh, ló.* (szerk.: Horn Péter). Mezőgazda Kiadó. Budapest
174. Veress, L. (1996): Mit tud a cigája Erdélyben és itthon? *Magyar Mezőgazdaság.* 42:19.
175. Vos, P.- Hogers, R.- Bleeker, M.- Reijans, M.- Van de Lee, T.- Hornes, M.- Frijters, A.- Pot, J.- Peleman, J.- Kuiper, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

176. Walling, G.A.- Wilson, A.D.- Mcteit, B.L.- Bishop, S.C. (2004): Increased heterozygosity and allele variants are seen in Texel compared to Suffolk sheep. *Heredity*. 92:102-109.
177. Wang, D.- Fan, J.- Siao, C.- Berno, A.- Young, P.- Sapolsky, R.- Ghandour, G.- Perkins, N.- Winchester, E.- Spencer, J. (1998): Large-scale identification, mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genom. *Science*. 280:1077-1082.
178. Weaver, R.F.- Hedrick P.W. (2000): *Genetika*. Panem Könyvkiadó, Budapest.
179. Weckx, S.- Del-Favero, J.- Rademakers, R.- Claes, L.- Cruts, M.- De Jonghe, P.- Van Broeckhoven, C.- De Rijk, P. (2005): novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. *Genome Res*. 15:436-442.
180. Williams, J.G.K.- Kubelik, A.R.- Livak, K.J.- Rafalski, J.A.- Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 18: 6531.
181. Zajc, I.- Mellersh, C.S.- Sampson, J. (1997): Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. *Mamm. Genome* 8:182-185.
182. Zsolnai, A.- Orbán, L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*. 7:1462-1468.
183. <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/pdf/seq.pdf>
184. <http://bio.univet.hu>
185. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
186. <http://hpgl.stanford.edu/projects/microsats>
187. <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>
188. <http://www.eurocon.net>
189. <http://www.fao.org/dad-is/>, 1998, 2000,2001,2004
190. <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july1999/dnaf1.htm>
191. <http://www.majusz.hu>
192. <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>
193. <http://www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo/populations>
194. <http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/JILL.HTM>
195. http://www.tiho-hannover.de/einricht/zucht/eaap/groups/s7_7.htm
196. <http://www.uvtip.sk/english/saas/vuzv/breeds/13/25/3521.htm>

8. Melléklet



RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	adenin
ACTB	β -aktin
AFLP	Amplifikált Fragment Hossz Polimorfizmus
B2M	β -2-mikroglobulin
C	citozin
D_M	minimum genetikai távolság
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleozid trifoszfátok
D_S	standard genetikai távolság
DTT	ditiotreitol
FAO	az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete (Food and Agricultural Organization)
F_{is}	beltenyésztettségi együttható
G	guanin
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
H_{exp}	várt heterozigotizációs érték
HLA	humán leukocita antigén
H_{obs}	kapott heterozigotizációs érték
HPRT1	hipoxantin guanin foszforibozil transzferáz
HWE	Hardy-Weinberg egyensúly
IPTG	izopropil-tiogalaktozidáz
ISAG	Nemzetközi Állatgenetikai Társaság (International Society for Animal Genetics)
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
MHC Ia	klasszikus MHC I gének
MHC Ib	nem klasszikus MHC I gének
mRNS	hírvivő vagy messenger RNS
tRNS	transzfer RNS
mtDNS	mitokondriális DNS
NK sejtek	természetes ölősejtek
PCR	polimeráz láncreakció
R^2	korrelációs koefficiens

RAPD	Véletlenszerűen Amplifikált Polimorf DNS
RFLP	Restrikciós Fragment Hossz Polimorfizmus
RNS	ribonukleinsav
rRNS	riboszómális RNS
RT-PCR	reverz transzkriptáz PCR, real-time PCR
SLA	sértés leukocita antigén
SNP	Egyszerű Nukleotid Polimorfizmus
SSLPs	Egyszerű Szekvencia Hossz Polimorfizmusok
SSR	Egyszerű Szekvencia Ismétlődés (mikroszatellit)
STR	Rövid Tandem Ismétlődés (mikroszatellit)
T	timin
T _C sejtek	citotoxikus T sejtek
TCR	T sejt receptorok
T _H sejtek	segítő T sejtek
USDA	amerikai mezőgazdasági tárca (United States Department of Agriculture)
VNTR	Különböző Számú Tandem Ismétlődés (miniszatellit)

ÁBRÁK JEGYZÉKE

- 1.ábra: Törzskönyvi nyilvántartásban szereplő tenyészkosok fajtacsoportonkénti megoszlása
- 2.ábra: Őshonosként nyilvántartott tenyészkosok fajtánkénti megoszlása
- 3.ábra: Törzskönyvi nyilvántartásban szereplő anyajuhok fajtacsoportonkénti megoszlása
- 4.ábra: Őshonosként nyilvántartott anyajuhok fajtánkénti megoszlása
- 5.ábra: A DNS szerkezeti felépítése
- 6.ábra: A DNS típusai
- 7.ábra: A PCR reakció lépései
- 8.ábra: Mikroszatellit marker
- 9.ábra: MHC I gének szerkezeti felépítése
- 10.ábra: Az MHC I régió összehasonlító térképe sertés és ember esetében
- 11.ábra: A MAF 35 lókuszt allélgyakorisági értékei a vizsgált 41 populációban
- 12.ábra: UPGMA algoritmus alapján szerkesztett fa
- 13.ábra: A teljes RNS minőségének ellenőrzése
- 14.ábra: Az SLA-6,-7 és -8 mRNS szekvencia összehasonlítása és jelölve bennük a kiválasztásra került primerek
- 15.ábra: Az általunk tervezett primerek pozíciói
- 16.ábra: Az összes vizsgált primer pár amplifikálásának eredménye
- 17.ábra: Az ACTB és B2M háztartási gének és a MHC Ib illetve az SLA-1 gén hígítási és standard görbéi
- 18.ábra: A háztartási géneként vizsgált lehetőségek abszolút kvantifikációjának eredménye
- 19.ábra: Az SLA-1, SLA-6, SLA-7, SLA-8 gének kifejeződése felnőtt koca különböző szöveteiben
- 20.ábra: Az SLA-1, SLA-6, SLA-7, SLA-8 gének kifejeződése felnőtt kan különböző szöveteiben
- 21.ábra: Az SLA-1, SLA-6, SLA-7, SLA-8 gének kifejeződése 100 napos magzatok különböző szöveteiben
- 22.ábra: Az SLA-6, SLA-7 és SLA-8 gének kifejeződésének szintje felnőtt koca különböző szöveteiben

23.ábra: Az SLA-6, SLA-7 és SLA-8 gének kifejeződésének szintje felnőtt kan különböző szöveteiben

24.ábra: Az SLA-6, SLA-7 és SLA-8 gének kifejeződésének szintje 100 napos magzatok különböző szöveteiben

25.ábra: Az általunk tervezett és használt primerek pozíciója

26.ábra: Az SLA-6 gén 2 exonjában azonosított új allél

27.ábra: Az SLA-7 gén 1 intronjában azonosított új allél

28.ábra: Az SLA-8 gén 2 exonjában azonosított új allél

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

- 1.táblázat: Testméretbeni különbségek az egyes cigája és zackel fajtakörbe tartozó változatok között
- 2.táblázat: A cigája anyajuhok testméretei
- 3.táblázat: A zombori- és csókai cigája változat néhány fontos testmérete
- 4.táblázat: Az őshonos cigája törzskönyvbe kerülésének feltételei
- 5.táblázat: A tejelő cigája törzskönyvbe kerülésének feltételei
- 6.táblázat: A cigája anyák gyapjútermelési tulajdonságai
- 7.táblázat: Az anyatej és tehén-, juh-, és kecsketej összetétele
- 8.táblázat: Különböző juhfajták tejtermelőképesége
- 9.táblázat: Különböző juhfajták kolosztrumának és tejének szárazanyag-, fehérjetartalmának, fehérjefrakcióinak megoszlása
- 10.táblázat: A hemoglobin allél gyakorisága a különböző cigája populációkban
- 11.táblázat: A veleszületett és szerzett immunitás közti főbb különbségek
- 12.táblázat: Az MHC I és MHC II gének és membránfehérjék közti legfőbb különbségek
- 13.táblázat: A genetikai távolság meghatározásához vizsgált állományok és azok jellemzői
- 14.táblázat: Az alkalmazott primerek, főbb jellemzőikkel
- 15.táblázat: Multiplex reakciók kialakítása
- 16.táblázat: Az SLA Ib gének polimorfizmus vizsgálata során használt fajták
- 17.táblázat: A vizsgált lókuszok főbb jellemzői
- 18.táblázat: Az állományokban azonosított allélok száma, heterozigotitási értékek és a becsült beltenyésztettség értékei
- 19.táblázat: A vizsgált állományok HWE-től való eltérése
- 20.táblázat: Állomány specifikus allélok
- 21.táblázat: A génkifejeződés vizsgálat során használt primer párok
- 22.táblázat: A két kiválasztott háztartási génre és a vizsgált SLA génekre a PCR hatékonyságának mutatója (korrelációs koefficiens)
- 23.táblázat: A polimorfizmus vizsgálat során használt primereink

KÉPEK JEGYZÉKE

- 1.kép: Fekete fejű cigája Teleorman régióból (fotó: Padenau, I.)
- 2.kép: Kovásznai „rozsdás” cigája (fotó: Padeanu, I.)
- 3.kép: Bolgár cigája kos (fotó: Kukovics, S.)
- 4.kép: Szerb zombori cigája (fotó: Cinkulov, M.)
- 5.kép: Szerb csókai cigája (fotó: Cinkulov, M.)
- 6.kép: Svrljiska pramenka anyajuh (fotó: Cinkulov, M.)
- 7.kép: Svrljiska pramenka kos (fotó: Cinkulov, M.)
- 8.kép: Szlovák cigája anyajuhok (fotó: Kukovics, S.)
- 9.kép: Horvát cigája anyajuhok bárányaikkal (fotó: Kusza. Sz.)
- 10.kép: Magyar őshonos cigája kos (fotó: Kukovics, S.)
- 11.kép: Magyar őshonos cigája anyajuh (fotó: Kukovics, S.)
- 12.kép: Magyar tejelő cigája kos (fotó: Kukovics, S.)
- 13.kép: Magyar tejelő cigája anyajuhok (fotó: Kukovics, S.)
- 14.kép: Csókai cigája (fotó: Kusza, Sz.)
- 15.kép: Erdélyi rozsdás cigája (zsukui) (fotó: Pál, G.)
- 16.kép: Tejelő cigája (fotó: Pál, G.)
- 17.kép: Vegyszerek bemérése steril fülke alatt (fotó: Árnyasi, M.)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, **Dr. Jávora András** egyetemi tanárnak és **Dr. Bősze Zsuzsanna** intézet igazgatónak a Ph.D. hallgatói tevékenységem során nyújtott mindennemű támogatásukért, szakmai segítségükért, a vizsgálatomhoz szükséges feltételek biztosításáért. Köszönöm **Dr. Claire Rogel-Gaillard** -nak a francia Országos Mezőgazdasági Kutatóintézetben (INRA) töltött ösztöndíjam alatti témavezetői segítségét.

Köszönetet mondok **Dr. Kukovics Sándor** egyetemi magántanárnak, akitől ugyancsak rengeteg segítséget kaptam Ph.D. tevékenységem során, és akinek vezetésével indult meg az a program, amelynek keretében a juhállományok genetikai távolság vizsgálatát végeztük el.

Köszönöm a gödöllői **Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Géntechnológiai laborjában** (Dr.Baranyi Mária, Dr.Hiripi László, Bender Balázs, Bodrogi Lilla, Ana Paula Catunda Lemos, Harsányi Ibolya Anna) és **Paprika Géntérképezési csoportjában** (Dr.Nagy István, Dr.Sasvári Zsuzsanna, Stágel Anikó) dolgozó kollégák segítségét. Köszönettel tartozom a **francia Országos Mezőgazdasági Kutatóintézet (INRA)** különböző laborjaiban dolgozók segítségét (**INRA-LREG**: Dr.Patrick Chardon, Dr.Christine Renard, Dr.Laurence Flori, Jean- Claude Save, Celine Urien, Angélique Teillaud, Florian Rambow; **INRA-PICT**: Jean-Christophe Helbling, Dr.Claudia Bevilacqua, Emmanuelle Zalachas, Dr.Sophie Pollet; **INRA-LGBC**: Dr.Sead Chadi-Taourit, Dr.Mathieu Gautier; **INRA-UEPSD**: Dr.Jean-Pierre Furet; **INRA-BDR**: Dr.Eric Pailhoux).

Köszönöm a **Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Állattenyésztéstudományi Tanszék** (jogelőd: Állattenyésztés és Takarmányozástani Tanszék) valamennyi dolgozójának, **Teremi Júliának** és **Pál Gábornak** a munkámhoz nyújtott segítségét.

Köszönettel és hálával tartozom **Családomnak** és **Barátaimnak** mivel mindenkor mellettem álltak és segítettek PhD munkám során.

A disszertációm genetikai távolság becslés része a European Regional Focal Point in Animal Genetic Resources project '*Possible way of conservation the multipurpose Tsigai and other indigenous sheep breeds in Central-, Eastern European- and Balkan countries*' keretében, míg az immungének vizsgálata a *Marie Curie Early Stage Research Training Fellowship* of the European Community's Sixth Framework Programme (MEST-CT-2004-504854) támogatásával jött létre.

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Mezőgazdaságtudományi Karán az Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem MTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2006. július 21.

.....
a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Bátoriné Kusza Szilvia doktorjelölt 2002–2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javasoljuk.

Debrecen, 2006. július 21.

.....
Dr. Jávor András C.Sc.
egyetemi tanár

.....
Dr. Bősze Zsuzsanna D.Sc.
MTA doktora