



Szent István Egyetem

**ŐSHONOS MAGYAR TYÚKÁLLOMÁNYOK GENETIKAI DIVERZITÁSÁNAK
VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ MOLEKULÁRIS GENETIKAI MARKEREK
SEGÍTSÉGÉVEL**

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

Bodzsár Nóra

Gödöllő

2012

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Hidas András
tudományos főmunkatárs, a mezőgazdaság-tudomány kandidátusa
Kisállattenyésztési Kutatóintézet és Génmegőrzési Koordinációs Központ
Genetikai és Szaporodásbiológiai Kutatócsoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

1.1. Bevezetés, a téma jelentősége

A köztenyésztésben (köztermesztésben) lévő növény- és állatfajták száma rohamosan csökken a nemesítői munka, a szaporító – és tenyészanyag forgalmazás világszerte megfigyelhető koncentrációja miatt. Egyre nehezebb az olyan fajtákhoz, genotípusokhoz hozzáférni, amelyek kiszorultak az árutermelésből. Ez azért okoz nagy problémát, mivel a nemesítés alatt álló genotípusok génkészlete a homogenizálási törekvés miatt folyamatosan szűkül, variabilitása csökken. A génkészlet beszűkülése miatt azonban egyre nehezebb a genetikai előrehaladást biztosítani, tenyészcél váltani, vagy módosítani, annak ugyanis alapvető feltétele az állományon belüli változatosság megléte. Ennek híján természetesen egy idő után nincs mit kiválasztani, megszűnik a nemesítő mozgástere.

A ritka, különleges genotípusok szerepe nagyban felértékelődhet, ami az európai baromfitenyésztés fejlődésében is megfigyelhető. Az olcsó tömegáru mellett egyre növekvő az igény a speciális minőséget nyújtó, különleges technológiával (szabadtartásos, ökológiai, márkázott, organikus stb.) előállított baromfi termékek iránt. Ezek természetesen gyökeresen eltérő technológiai feltételeket, ezért alapvetően más genotípusokat is igényelnek, mint az iparszerű, zárt rendszerekre nemesített fajták. Lévén ezek a technológiák jelentősen befolyásoltak a természetes környezet által, az új genotípusok közül is leginkább a helyi, még fellelhető fajták alkalmazkodhatnak hozzá a legkönnyebben (CRAWFORD 1990).

Manapság nagyon kevés specializálódott tyúkállomány adja a különböző kereskedelmi tenyésztő programok bázisát, így további jelentősége lehet a régi fajtáknak az agrár-környezetvédelmi programban, mint a hazai környezethez adaptálódott genotípusoknak. Szükség van tehát a ritka genotípusokra, mivel a domináló fajták számos olyan génváltozatot nélkülöznek, amelyek fontosak lennének, és a kiveszöbben lévő fajtákban jelen vannak. Ilyenek a különböző minőségi jellegek, betegség rezisztencia gének és számos más tulajdonság.

A génmegőrzést szolgáló tenyésztés egyik fő feladata a ritka allélok megőrzése, ami igen nehéz feladat, mert a genetikai állomány túlnyomó része nem fejeződik ki fenotípusosan. A molekuláris genetikai markerek jó lehetőséget nyújtanak a genetikai összehasonlításokhoz a különböző tyúkfajtákban, illetve segítséget adnak a génbanki állományok tenyész kiválasztásában.

1. 2. Célkitűzések

Munkám során kitűzött célok:

- 6 hazai őshonos tyúkfajta 9 populációjának eredet vizsgálata mitokondriális DNS alapján
- tyúkfajtáink genetikai diverzitásának vizsgálata, összehasonlítása kereskedelmi, illetve más európai országok őshonos genotípusaival mikroszatellit markerek alapján
- annak bizonyítása molekuláris genetikai úton, hogy az azonos színű fedett és kopasznyakú állományok nem csupán egymás változatai, hanem önálló fajták
- az azonos fajtához tartozó, ám hosszú időn keresztül (30-40 év) Magyarország különböző tenyészetekben fenntartott fajták molekuláris genetikai összehasonlítása
- őshonos magyar tyúkfajtáink genetikai diverzitásának további vizsgálata pontmutációk segítségével

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokban hat őshonos magyar tyúkfajta vett részt: sárga, fehér, kendermagos magyar, valamint a fekete, fehér és kendermagos erdélyi kopasznyakú fajták. Az állományokat Magyarország három különböző területén, 30-40 éve zárt populációkban tartották. Mosonmagyaróváron a sárga magyart, Hódmezővásárhelyen a fedett és kopasznyakú kendermagost, Gödöllőn pedig mind a hat vizsgált fajtát. Összesen tehát 9 magyar őshonos populáció genetikai analízisét végeztem el.

2. 1. Őshonos tyúkfajtáink eredetének vizsgálata mitokondriális DNS alapján

Őshonos magyar tyúkfajtáink származásának genetikai vizsgálatához a tyúk mitokondriális genom szekvenciapolimorf részét, a D-loop régió 530 bp hosszú szakaszát vizsgáltam.

Meghatároztam a genetikai diverzitást leíró statisztikákat, úgy mint a hasító helyek (*S*) és haplotípusok (*Ht*) számát valamint a haplotípus (*Hd*) és nukleotid (π) diverzitást.

A magyar mintákban előforduló haplotípusok kapcsolatát "median-joining" hálózattal vizsgáltam, ami kifejezetten alkalmas az egymástól viszonylag kis genetikai távolságra lévő egyedek, haplotípusok összehasonlítására. Kiváltképp arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a ma élő őshonos magyar tyúkfajták egy vagy több őstől származtathatóak-e. Ehhez segítségül használtam kilenc mtDNS referencia szekvenciát (*LIUAI-LIUII*), melyek jól reprezentálják a különböző domesztikált tyúkfajták haplocsoportjait.

Az NCBI génbankban található összes valamely haplotípushoz annotált D-loop szekvenciát letöltöttem és ehhez hasonlítottam a magyar állományokban azonosított haplotípusokat.

2. 2. Őshonos tyúkfajtáink genetikai diverzitásának vizsgálata mikroszatellit markerekkel

Populációnként 30-30, összesen 270 állat szárnyvénájából gyűjtöttem vérmintát. Az egyedeket 29, az AVIANDIV projektből kiválasztott mikroszatellit markerrel genotipizáltam hét multiplex PCR reakcióban.

A markerek hasznosságát, polimorfizmus információ tartalmát a PIC (Polymorphic Information Content) értékekkel mértem.

Populáción belüli genetikai diverzitás mérése céljából meghatároztam az allélfrekvenciákat, az allélszámok átlagát, a várt és tényleges heterozigotizást, nemcsak állományokra, hanem lókuszokra nézve is. Populációk genetikai változatosságát, differenciáltságát a Wright féle fixációs indexekkel (F_{IT} , F_{ST} , F_{IS}) jellemeztem. Az egyes magyar populációkat páronként (F_{ST}) is összehasonlítottam, melyből meghatároztam a REYNOLDS (1983) féle genetikai távolságokat, majd azt dendrogramon szemléltettem.

Őshonos tyúkfajtáink osztályozását a STRUCTURE szoftverrel (PRITCHARD et al. 2000) végeztem el, mely az egyedek allél mintázatait hasonlítja össze páronként 50.000 iterációban, és sorolja a genotípusokat azonos, illetve különböző csoportokba mindenféle előfeltételezés nélkül (20000 burn-in lépést követően). Minden egyes K-értéknél (K=csoportok száma) 100 futást indítottam, majd azokat páronként összevettem hasonlósági indexeik alapján. Ha az érték 0,95 felett van, azonosnak tekinthetők. Az EVANNO módszert (2005) alkalmaztam a legvalószínűbb csoportosítás meghatározására, mely a STRUCTURE által generált valószínűségi értékeken alapuló delta K érték számítását jelenti.

A rokonsági kapcsolatok vizsgálatára az úgynevezett Marker Estimated Kinship (MEK) módszert alkalmaztam. A rokonsági értékek kalkulációját EDING és MEUWISSEN (2001) számításai alapján végeztem el, majd az értékeket kontúrbrázolással és dendrogramon is ábrázoltam, így vizualizálva a populációk közti hasonlóságot. Rokonsági értékeik (MEK) alapján őshonos magyar fajtáinkat összehasonlítottam 9 kereskedelmi, illetve 9, más európai országokból származó őshonos állománnyal is, melyek széleskörűen reprezentálják Európában a tyúk faj genetikai diverzitását. A magyar populációk, a kereskedelmi vonalak és az európai helyi fajták közötti rokonságot egy filogenetikai hálózattal szemléltettem.

Az egyes magyar populációk relatív genetikai diverzitását, fontosságát határoztam meg (számszerűsítettem) a „core set” és „safe set” analízisekkel. A core set analízis során arra kerestem a választ, hogy a kilenc magyar tyúkállomány összdiverzitásának kialakításában milyen mértékben vesznek részt az azt alkotó egyes magyar populációk. A safe set analízis esetében két különböző szettet alakítottam ki, egyet a kilenc kereskedelmi (safe set1), egy másikat a kilenc egyéb európai őshonos (safe set2) állományból. Azt vizsgáltam, hogy a számunkra kitüntetett fajták – jelen esetben a két safe set – összdiverzitásához milyen mértékben járulnak hozzá az egyes magyar populációk.

2.3. Őshonos tyúkfajtáink genetikai diverzitásának vizsgálata pontmutációk alapján

A pontmutációk vizsgálatokor igyekeztem olyan géneket választani, melyek irodalmi adatok alapján nagy változatosságot mutatnak, és fontos biológiai funkciókat töltenek be. Ezek a HSP90, PIT54 és GHRL gének.

A vizsgálatok eszközéül a legnagyobb teljesítményű direkt szekvenálást választottam, melyhez összeállítottam egy 96 mintából álló panelt, ami a kilenc őshonos magyar, két fehér brojler és egy barna tojó hibrid fajta 8-8 egyedét tartalmazta.

A kiválasztott gének polimorfizmust mutató szakaszaira specifikus primereket terveztem, és a megfelelő primer tapadási hőmérséklet alkalmazásával felamplifikáltam a PCR terméket. Ezt

követően kerültek szekvenálásra a minták, majd a kapott szekvenciák jól olvasható részeiben azonosítottam a pontmutációkat.

Az elemzés során meghatároztam a lókuszonkénti allélgyakoriságokat, az állományokra vonatkozó alap diverzitásértékeket, így a várt és tényleges heterozigotitást, valamint a populáción belüli beltenyésztettség koefficiensét.

A populációk differenciáltságát a Wright féle fixációs indexekkel jellemeztem mind a magyar, mind a kereskedelmi fajtákra nézve. A populációk közötti Reynolds genetikai távolságok számítását követően azokat kladogram formájában.

Az allélgyakoriságokat génenként, az alap diverzitásmutatókat és egyéb populációgenetikai számításokat – a detektált SNP-k és a vizsgált egyedek kis számának köszönhetően – a három génre vonatkozóan végeztem el.

3. EREDMÉNYEK

3. 1. A mitokondriális DNS vizsgálatok eredményei

A 74 szekvenciában talált 17 polimorf lokusz 11 haplotípust (*HIC1-HIC11*, GQ258689-GQ258699) definiált. Minden nukleotid csere tranzíció volt, kivéve egy C/A transzverziót.

A legtöbb haplotípust ($n=5$) és a legnagyobb diverzitást a kendermagos erdélyi kopasznyakú gödöllői populációjában találtam. Ezzel szemben egyetlen haplotípust azonosítottam a fehér erdélyi kopasznyakú fajtában, és annak összes mintája a teljes populációban leggyakoribb, *HIC1* haplotípusba tartozott. A *HIC8* haplotípust kizárólag a két sárga magyar fajtában találtam meg, míg a *HIC6* és *HIC7* csak a mosonmagyaróvári sárga magyar populációban fordult elő. A *HIC10* haplotípust egyetlen fekete erdélyi kopasznyakú egyedben detektáltam, míg a *HIC4* a fehér erdélyi kopasznyakú kivételével minden kopasznyakú fajtában mutatkozott.

Az NCBI génbankban található összes valamely haplotípushoz annotált D-loop szekvencia és a magyar állományokban azonosított haplotípusok összehasonlítása során három szekvencia (*HIC3*, *HIC8*, *HIC9*) csak a magyar fajtákban fordult elő, és mind közel vannak az Európában leggyakoribb haplotípushoz (*LIUE1*).

A magyar mintákban előforduló haplotípusok kapcsolatának median-joining hálózattal való vizsgálata során megállapítottam, hogy az őshonos magyar tyúkfajták három különböző haplocsoportba tartoznak. Az egyedül a fekete erdélyi kopasznyakú fajtában előforduló *HIC10* elkülönül a *HIC11* haplotípus által reprezentált csoporttól, illetve a *HIC1* centrumú haplocsoporttól. Ez utóbbtól csak egy-egy mutációs különbséggel tér el az azonos haplocsoportba tartozó 8 kisebb reprezentáltságú haplotípus (*HIC2-HIC9*).

A magyar őshonos állományok haplotípusait összevetve referencia szekvenciákkal azt tapasztaltam, hogy azok három, már korábban leírt referencia szekvencia köré csoportosulnak: *LIUA1*, *LIUB1* és *LIUE1*. A *LIUE1* szekvencia azonos a magyar mintákban előforduló leggyakoribb, *HIC1* haplotípussal. A *LIUA1* referencia haplotípus és a *HIC10* magyar szekvencia csupán egy mutációban (1 bp) térnek el egymástól, és csak a fekete erdélyi kopasznyakú fajtában találtam meg. A *HIC11* magyar haplotípust pedig 9 állatban azonosítottam, melyben a *LIUB1* referencia szekvenciához képest csupán 1 bp a differencia.

A *HIC10* és *HIC11* haplotípusokat újra összevettem az NCBI génbankban található D-loop szekvenciákkal, és 100% egyezést mutattak a Délkelet-Ázsiából származó haplotípusokkal.

3. 2. A mikroszatellit alapú populációgenetikai vizsgálatok eredményei

A magyar fajtákban összesen 168 allélt azonosítottam a 29 mikroszatellit marker alapján (köztük 5 lókuszon 6 privát allél). Az allélszámok átlaga 2,9 és 4,2 között változott. Ennek megfelelően alakultak a várt heterozigotizációs értékek, melytől a tényleges heterozigotizáció némileg eltért (nem szignifikáns). Az F_{IS} (beltenyésztettségi koefficiens) meglehetősen alacsony értékei is ezt támasztják alá.

A heterozigoták többségének, avagy hiányának kimutatására alkalmazott F-statisztika eredményei azt mutatják, hogy mind lókuszonként az összes populációra nézve, mind pedig az összes lókuszon és állományra nézve szép számmal fordulnak elő heterozigóta egyedek a magyar őshonos populációkban. A genetikai különbség (F_{ST}) a magyar őshonos tyúkfajták között 21 % volt, ami magas értéknek számít a tyúk fajban.

A páronkénti F_{ST} értékeket, és az azokból számolt Reynolds féle genetikai távolságokat tekintve megállapítható, hogy legközelebb a két kendermagos magyar állomány volt, legtávolabb pedig a sárga magyar mosonmagyaróvári populációja és a fekete erdélyi kopasznyakú került egymástól. A párhuzamos állományok, azaz a két sárga magyar, valamint a fedett és kopasznyakú kendermagosok genetikai távolsága (páronkénti F_{ST} értékei is) viszonylag kicsi, ám előfordult, hogy teljesen különböző fajtáknál kisebb genetikai távolságokat kaptam. A genetikai távolságok alapján felállított dendrogramon is egyértelműen látszik, hogy az azonos, de különböző tenyészetekből származó (párhuzamos) fajták viszonylag közel helyezkednek el egymáshoz, és hogy a fedett és kopasznyakú állományok világosan elkülönülnek egymástól. Ezt csupán a fehér magyar és a fehér erdélyi kopasznyakú fajták feltűnő közelsége zavarja meg.

A kilenc magyar állomány közötti rokonsági fok (Marker Estimated Kinship) minden esetben alacsonyabbnak bizonyult az állományon belülinél, ami tulajdonképpen egy beltenyésztettségi mutatóként is felfogható. Ez alapján a leginkább beltenyésztett populációk a fekete és fehér erdélyi kopasznyakú fajták. Az eredmények kontúrábrázolása, és a felállított dendrogram jól mutatják, hogy a fedett és kopasznyakú fehér fajták között milyen nagy a hasonlóság.

Tyúkfajtáink klaszteranalízise során azt tapasztaltam, hogy a két sárga magyar populáció már a legalacsonyabb csoportosításnál elvált a többitől és az analízis végéig együtt maradtak, képtelen volt különbséget tenni köztük a program. Az Evanno módszer szerint a legvalószínűbb csoportosítás a $K=5$. Itt figyelhető meg a két sárga magyar, a fedett és kopasznyakú fehérek, valamint az azonos fajták különböző tenyészetének együtt való csoportosulása is.

A magyar őshonos tyúkállományok kereskedelmi és európai helyi fajtákkal való összehasonlítása során azt tapasztaltam, hogy mind a populációk közötti, mind az azokon belüli genetikai variáció értéke legkisebb a magyar fajtáknál volt. Rokonsági kapcsolatok tekintetében a

magyar állományok világosan elhatárolódtak az európai populációktól, kivéve a lengyel fajtát, és inkább a kereskedelmi vonalokhoz helyezkednek el közelebb. A fedett és kopasznyakú magyar állományok egymástól való elkülönülése itt is szépen megfigyelhető, mely alól ismét kivételt képez a fedett és kopasznyakú fehér fajták közelsége. Az egyes magyar őshonos tyúkállományok genetikai diverzitásának hozzájárulását vizsgálva a magyar (core set), illetve a kereskedelmi (safe set1) és európai helyi fajtákhoz (safe set2) megemlítendő, hogy legkevésbé, vagy egyáltalán nem járult hozzá egyik szett diverzitásához sem a fekete erdélyi kopasznyakú fajta. Összehasonlítva a két kitüntetett (*safe*) szettet, bár nem volt számottevő a különbség, az esetek többségében a magyar fajták jobban hozzájárultak az európai őshonosok diverzitásához, mint a kereskedelmiekéhez. Tehát a vizsgált paraméterek tekintetében jobban hasonlítanak a magyar fajták az intenzív vonalokhoz.

3.3. Pontmutációk vizsgálati eredményei

Tekintve, hogy a legtöbb populációban, főleg a GHRL gén esetében az értékelhető mintaszám csökkent, az egyes populációgenetikai elemzéseket a három génre nézve együttesen végeztem. Összesen 22 SNP lókuszt azonosítottam, ami figyelembe véve a kimutatott kapcsoltságokat, 17 variábilis lókuszt eredményezett. Megjegyzendő, hogy a vizsgált mintaszám növelése pontosabb képet nyújtana a vizsgált állományokról.

A 12 populációban három privát allélt találtam az elemzés során. Közülük kettőt csak a magyar populációkban azonosítottam, egyiket a fehér magyarban, másikat a sárga magyar mosonmagyaróvári populációjában.

A várt és tényleges heterozigotizáció értékei között – az összes magyar populációra és lókuszt nézve – alig volt némi különbség, a beltenyésztettségi koefficiens (F_{IS}) átlagértéke szintén a magyar tyúkfajtákat nézve, meglehetősen alacsony volt, akár csak a három intenzív vonal esetében. Nem úgy a Wright féle fixációs indexek tekintetében, hiszen míg a magyar állományok differenciáltsága hasonlóan a mikroszatellit eredményekhez meglehetősen nagy (21%), a kereskedelmi vonalak értéke csupán 6% volt.

A Reynolds féle rokonsági koefficiens alapján készített kladogramon jól kivehető, hogy a két sárga magyar állomány együtt nagyon elkülönült a többitől. Ugyanez látszik a fekete kopasznyakú esetében önmagában. A fedett és kopasznyakú fehér populációk ismét nagyfokú rokonságról tettek tanúbizonyságot. A kopasznyakú fajták itt is szépen elhatárolódtak a fedett nyakúaktól, kivéve ismét a fehér kopasznyakú, és a hódmezővásárhelyi fedett és kopasznyakú állományok nagyobb rokonsága figyelhető meg. Érdekes megfigyelés, hogy a fehér brojlerek, és a barna tojó hibrid állomány a kendermagos magyar és kopasznyakú tenyészetekkel csoportosultak.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. A mitokondriális DNS vizsgálatokból levonható következtetések

Az őshonos magyar tyúkfajták eredetét mitokondriális DNS alapján még nem vizsgálták. A munka során azt tapasztaltam, hogy a kilenc populációból egyetlen volt a fehér erdélyi kopasznyakú fajta, mely monomorfnak bizonyult egyetlen haplotípussal (*HIC1*). Ez megegyezik a mikroszatellit markerek alapján kapott eredménnyel, miszerint legkevesebb az allélszámok átlaga ebben az állományban. Ez valószínűleg a genetikai drift és a beltenyésztettség okozta haplotípus veszteség, genetikai beszűkülés következménye.

A haplotípus diverzitás (π) hasonlóan alakult a különböző Európából, a Közel-Keletről és Délkelet-, Kelet-Ázsiából származó tyúkfajtáknál mért értékekhez (LIU et al. 2006).

Tekintve, hogy a génbanki adatbázis nem fedi le az őshonos tyúk fajták jelentős részét, a magyar fajtákban azonosított egyedi haplotípusok (*HIC3*, *HIC8*, *HIC9*), nem feltétlenül jelentik új mutációk jelenlétét. A környező országok (Kelet-Európa) őshonos fajtáiból származó új minták összehasonlításával lehetne biztosabb következtetést levonni.

Ahhoz, hogy megválaszoljam a kérdést, honnan származtathatók a magyar őshonos tyúkfajták, kilenc referencia szekvenciát vontam be a vizsgálatba (LIU et al. 2006). A szekvenciák nagy része (*HIC1-HIC9*) a *LIUE1* haplotípus által reprezentált csoportba tartozott, ami feltehetőleg az Indiai-szubkontinensről származik, míg a *HIC10* szekvencia a *LIUA1*, a *HIC11* pedig a *LIUB1* haplotípusokkal alkotott külön csoportokat, melyeket Délkelet-Ázsiában, Kínában és Japánban találtak.

Összegezve, a magyar őshonos tyúkfajtákban talált haplotípusok 86%-a ($n=64$) egy olyan haplocsoportba tartozik, mely az Indiai-szubkontinensről származik (LIU et al. 2006). Feltehetőleg a Közel-Keleten át, a Földközi- és Fekete-tengeren keresztül jutott el Magyarországra (WINKLER 1921, BAKOSS 1931). A kelet genetikai hatását a IX. század végén hozták be a Kárpát-medencébe magyar hódítók. Ázsiából, ezáltal a délkelet-ázsiai eredet két maternális vonalát meghatározva (LIU et al. 2006). A másik felvetés, hogy a keleti haplotípusok korábban, a VI. század környékén kerültek ide az avarokkal, melyet azok sírjaiban található tyúk maradványok támasztanak alá (MATOLCSI 1975). Egyéb kelet-európai fajták, illetve ősi maradványok vizsgálata mélyebb betekintést adhat az őshonos magyar tyúkfajták eredetét és történelmét illetően.

4. 2. A mikroszatellit markerek alapján elvégzett vizsgálatokból levonható következtetések

A tényleges heterozigotitás meglehetősen hasonló volt a várthoz, következésképpen a beltenyésztettségi koefficienseknél sincs szignifikáns különbség, azaz a populációk közel vannak a Hardy-Weinberg egyensúly állapotához. Ez alapján az őshonos magyar tyúkfajták tenyésztési módszere megfelelőnek mondható, miszerint a genetikai variancia maximalizálva van fenotípusos válogatás alapján, a kakasokat pedig forgatják a családok között (SZALAY 2002).

A populációnkénti allélszámok átlaga, akárcsak a tényleges heterozigotitás és az F_{IS} értékek hasonló tartományba esnek egy korábbi, 65 tyúk populációt tanulmányozó munkában leírt eredményekhez (GRANEVITZE et al. 2007).

Az egyes magyar állományok genetikai diverzitásának hozzájárulása a teljes, kilenc populáció egészére nézve más eredményeket adott, mint a heterozigotitási és F_{IS} értékek. Míg a kendermagos magyar hódmezővásárhelyi állománya mutatta a legmagasabb várt heterozigotitást és átlag allélszámot, addig a második legkisebb értéket kaptam a magyar („core”) szetthez való diverzitás hozzájárulás tekintetében. Ez azt mutatja, hogy az említett populáció ugyan egy diverz állomány, azonban jelentős az „átfedés”, azaz nagy a rokonság a többi magyar fajttal. Ezzel szemben a kendermagos erdélyi kopasznyakú gödöllői populációja, amely a legnagyobb mértékben járult hozzá a magyar fajták diverzitásához, mégis csak közepes mértékű heterozigotitást és F_{IS} értékeket produkált. A magas diverzitás hozzájárulás érték a más fajtákkal való kisfokú rokonságnak tulajdonítható. Ezek az eredmények híven tükrözik, hogy a fajták közötti rokonsági kapcsolatoknak mekkora szerepe van a diverzitás vizsgálatokban.

Az azonos, ám az ország különböző tenyészetekben fenntartott fajtnál (párhuzamos populációk) kalkulált páronkénti F_{ST} értékek így a Reynolds féle genetikai távolságok is általában véve alacsonyabbak, mint a teljesen különböző fajták között, ami magas genetikai hasonlóságot jelent. Habár a kapott hasonlóságok nem voltak olyan mértékűek, mint az várható lett volna egyszerűen csak azon tény alapján, miszerint ezek azonos fajták, csupán évek óta külön, zárt tenyészetekben tartották fenn őket az ország egyéb területein. Ezt alátámasztják mind a rokonsági vizsgálatok (MEK), mind pedig a klaszteranalízis.

A klaszteranalízis során a magyar őshonos fajták egyértelmű csoportosulását tapasztaltam. A kapott eredmények jól egyeznek a rokonsági távolságok alapján készített filogenetikus hálózattal. Eszerint a két sárga magyar állományt nem lehetett elkülöníteni egymástól, hiába voltak egymástól izoláltan, zárt populációban tartva több generáción keresztül. Ennek egyik oka lehet egy múltban történt génevándorlás (migráció), vagy ama tény, hogy a gödöllői sárga magyar állományt a Kanadából visszaszármaztatott, illetve a Mosonmagyaróváron tenyésztett sárga magyar állományokból hozták létre újra 1991-92-ben. Továbbá a klaszteranalízis jól demonstrálta azt is,

hogy a fedett és kopasznyakú fajták tisztán elszeparálódtak egymástól, külön csoportokat képezve. Ez azt jelenti, hogy a fedett és kopasznyakú állományok valóban külön fajták, és nem csupán egymás színváltozatai gyakori génvándorlással, mint ahogy azt korábban gondolták.

Ez alól kivételt képeznek a fedett és kopasznyakú fehér populációk, melyek a klaszteranalízisnél együtt csoportosultak, illetve nagymértékű rokonságot, hasonlóságot mutattak minden vizsgálatnál. Ez többféleképpen magyarázható: történelmi megközelítése, hogy mivel a 60-as években az azonos színű fedett és kopasznyakú állományokat egyazon fajtaba tartozó egyedeknek tekintették, így együtt is tartották őket, ezáltal génkicserélődést biztosítva köztük. Egy másik megközelítés, hogy a múltban történelmi intenzív vonallal való állományjavítást (HREBLAY 1900, SZALAY 2002) azonos fajttal végezték, mind a mitokondriális DNS vizsgálati eredményei, mind a magyar fajták kereskedelmi vonalakkal való összehasonlítása során kapott eredmények ezt sugallják.

Alacsony mértékű csoportosításoknál (K-értékeknél) a fekete erdélyi kopasznyakú fajta egyedei a kendermagos kopasznyakú két tenyészetével csoportosultak, azonban az Evanno módszer szerinti legvalószínűbb csoportosítás (K=5) esetén el is különült azoktól. Hasonló eredményeket kaptam a genetikai távolságok, és a rokonsági kapcsolatok vizsgálata során is. Ugyancsak ennél a K értéknél figyelhető meg az azonos fajták különböző tenyészetekének együtt való klasztereződése is, de a csoportok számának növelésével világosan elkülönültek egymástól, melyet szintén alátámasztanak a további filogenetikai vizsgálatok.

Értékeltem a magyar őshonos tyúkfajták genetikai diverzitását összehasonlítva kereskedelmi és más európai helyi fajtákkal is. Habár ezek a szettek nem merítik ki az Európában fellelhető összes őshonos, és a forgalomban lévő kereskedelmi állományokat, mégis jól reprezentálják azokat, és elégségesek, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a magyar helyi fajták egyedülállóságának mértékéről. A másik oka ennek az összevetésnek az volt, hogy felmérjem, a magyar őshonos tyúkfajták mennyiben járulnak hozzá európai őshonos, és intenzív fajták genetikai diverzitásához.

A heterozigóta hiány mértéke legkisebb a magyar helyi fajtákban volt, amit csaknem teljesen megmagyaráz a populációk közti nagy különbség. Hasonlóan az európai és intenzív fajtákhoz, melyek bizonyítottan különálló populációk, a magas F_{ST} értékek a magyar állományok világos strukturálódását jelzik. Ezt támasztják alá a klaszteranalízis eredményei is. Ezzel szemben, például a zimbabwei helyi tyúkpulációk strukturálódása egyáltalán nem ilyen egyértelmű (MUCHADEYI et al. 2007). Európai helyi fajtákhoz és intenzív vonalakkal összehasonlítva a magyar állományok beltenyésztettségi értékeit (F_{IS}) azt tapasztaltam, hogy őshonos fajtáinkban a genetikai variancia megőrzése sikeresnek bizonyult fenntartásuk során.

A 27 populáció rokonsági távolságokon alapuló filogenetikus network analízis a három különböző szett (magyar, kereskedelmi, európai) egyértelmű csoportosulását mutatta. Emellett a

relatíve rövid „faágak” is arra engednek következtetni, hogy azok nagymértékben különböznek a vizsgált európai helyi fajtáktól, melyek többsége hosszabb ágakkal rendelkezik, mintegy mutatva azok nagyobb mértékű beltenyésztettségét is.

Továbbá a magyar fajták – különösen a két sárga magyar – meglehetősen közel csoportosultak a brojler vonalakhoz. Ez jól egyezik a „safe set” analízisben kapott eredményekkel, ahol a magyar állományok jobban hozzájárultak az európai helyi fajták genetikai diverzitásához, mint a kereskedelmiekéhez. Ennek értelmében a magyar őshonos tyúkfajták jobban hasonlítanak az intenzív vonalakhoz, mint az európai állományokhoz. A kendermagos erdélyi kopasznyakú gödöllői populációja konzekvensen magas értékeket produkált mindkét elemzés során, de az értékek változása nem mindig ilyen következetes. Ez leginkább a fehér magyarban figyelhető meg, ami bár figyelemre méltó mértékben járult hozzá a kitüntetett (safe) szettek (főleg európai) genetikai diverzitásához, viszont ezt megosztja a többi magyar fajtával is, azaz a magyar állományok összdiverzitásának kialakításában nem játszik akkora szerepet. Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy nem mindegy, milyen kontextusban vizsgálja az ember a genetikai diverzitást.

A fekete erdélyi kopasznyakú járult hozzá a genetikai diverzitásokhoz legkevésbé, legyen szó bármelyik szetről, mégis, a klaszteranalízis során már viszonylag alacsony csoportosításnál (K=5) különvált a többi állománytól. Ez a következőképpen magyarázható: a többi magyar állományhoz viszonyítva ez a fajta produkálta a legmagasabb állományon belüli rokonságot, ami mintegy beltenyésztettség mutatóként is felfogható. Egyéb oka az is lehet, hogy a fekete kopasznyakúnál igen kevés kakassal sikerült kialakítani a védett állományt. Alátámasztja ezt az elméletet a MEK és network fánál látható, fekete kopasznyakúra jellemző hosszú ág (a többi magyar fajtákhoz hasonlítva). Tehát a nagyobb beltenyésztettség (nagy távolságot okozva a többi fajtától) eredményezi a fekete kopasznyakú fajta korai elkülönülését a többitől a klaszteranalízis során. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy ez a beltenyésztettség csak viszonyítottan nagy, általánosságban véve a fekete kopasznyakú állomány állapota is kielégítő.

A magyar őshonos tyúkfajták tehát genetikailag különböznek más genetikai erőforrásoktól, és érdemes erőfeszítéseket tenni megőrzésük, valamint további vizsgálatuk érdekében.

4. 3. Az SNP vizsgálatokból levonható következtetések

Az SNP vizsgálatok megerősítették a korábban, mikroszatellit markerekkel kapott eredményeket. A vizsgált három, fontos biológiai funkciókat ellátó fehérjét kódoló gén (HSP90, PIT54, GHRL) közül kettőben (HSP90, GHRL) bizonyos lókuszok között kapcsoltságot feltételeztem az azonos allélgyakoriságok és a haplotípusok különbözősége alapján. A HSP90 esetében különösen érdekes, hogy az egyik, több mint 100 nukleotid hosszú kapcsolt lókusz intronban található, talán valamely szabályozó funkcióban játszhat szerepet.

Mindez alapján összesen 17 SNP lókusszal végeztem el a mikroszatellit vizsgálatokban is résztvevő magyar állományok 8-8 egyedén a mutációk detektálását. A magyar őshonos tyúkfajták várt és tényleges heterozigotitása között bár volt némi különbség, de összességében ez elenyészőnek tekinthető, és az F_{IS} átlagértékére is meglehetősen alacsony számot kaptam. Ezek a mikroszatellit vizsgálatokkal egyetemben azt mutatják, hogy az állományok nem, vagy nem szignifikáns mértékben térnek el a Hardy-Weinberg egyensúlytól. A magyar fajtákban mért átlagos heterozigotitások hasonló tartományba estek a korábban leírt, más európai őshonos populációkéhoz (TWITO et al. 2007), akárcsak a három intenzív állomány értékei.

Az SNP lókuszok alapján kalkulált fixációs indexek eredményei megegyeznek a mikroszatellit alapú számításokkal, a magyar populációk erőteljes, egyértelmű differenciálódását jelezve. A beltenyésztettség mértéke elfogadható, a heterozigóták aránya a populációk többségében nagy, amit a kis F_{IT} és F_{IS} értékek nagyon jól reprezentálnak, ezzel is mutatva, hogy a tenyésztési módszer megfelelő. Ezzel szemben a három kereskedelmi fajtára vonatkozó beltenyésztettség mutatókból az látszik, hogy bár a teljes, és populációkon belüli beltenyésztettség értékek nem sokban térnek el a magyar fajtákétól, a genetikai különbség HARTL és CLARK (1989) leírása alapján csekély mértékű önmagában véve is, nemcsak a magyar fajtákhoz képest.

Az SNP lókuszok allélgyakoriságaiból számolt rokonsági koefficienseken (Reynolds genetikai távolság) alapuló kladogram a magyar fajták egyértelmű strukturálódását mutatja. A fekete kopasznyakú nagyon hamar diverzifikálódott a többi fajtától, a párhuzamos állományok különböző tenyésztési nagyon közel helyezkednek el egymáshoz, de még 17 SNP lókusz alapján is elkülöníthetőek voltak. Mindezt alátámasztják a mikroszatellitekkel elvégzett statisztikai elemzések is, mint például a klaszteranalízis, vagy a rokonsági kapcsolatok vizsgálata. Ugyancsak megfigyelhető a fedett és kopasznyakú fehér populációk meglehetősen szoros kapcsolata, melynek lehetséges okai már említésre kerültek.

Ezen kívül, ha összehasonlítjuk a magyar fajtákat kereskedelmi vonalakkal, az intenzív fajták beékelődtek a magyarok közé, jelen esetben a fedett és kopasznyakú kendermagos

tenyészetéhez, míg a mikroszatellit alapú vizsgálatokban inkább a két sárga magyar állomány tette ugyanezt.

Összefoglalva, a 17 SNP lókuszt vizsgálata alapján meglehetősen hasonló eredményeket kaptam a 29 mikroszatellit marker alapúakhoz rövidebb idő alatt. Az egyes magyar állományokra ez alapján az SNP készlet alapján messzemenő következtetéseket nem lehet levonni, ezért az összes állományra és génre nézve tettem meg ezt. A vizsgálni kívánt gének és egyedek számának növelésével, több SNP meghatározásával még pontosabb képet kaphatnánk a magyar őshonos tyúkpopulációról.

4.4. Javaslatok

A munkám során elvégzett vizsgálatok alapján az alábbiakat javaslom:

- a környező országokban fellelhető őshonos tyúkállományok eredetének vizsgálatát mitokondriális DNS segítségével, mellyel még pontosabb képet kaphatunk a kárpát-medencei tyúkfajták származását illetően;
- a Kárpát-medence őshonos tyúkfajtáinak populációgenetikai jellemzését molekuláris genetikai markerekkel, mely révén olyan információkra tehetünk szert, melyeket alkalmazhatunk a genetikai diverzitás megőrzése céljából, a beltenyésztettség elkerülése érdekében;
- további tenyésztési módszerek tesztelését (génmegőrzés szempontjait figyelembe véve) molekuláris genetikai markerek alkalmazásával;
- fontos tulajdonságokkal (termelési, élettani) kapcsolatos további gének vizsgálatát pontmutációk meghatározásával, nemcsak a genetikai diverzitás, hanem a funkcionális változásokat okozható genetikai variánsok kimutatására is.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként vizsgáltam az őshonos magyar tyúkfajták eredetét mitokondriális DNS alapján, miszerint a nagyobb részük az Indiai-szubkontinensről származik, míg kisebb hányaduk eredete Délkelet-Ázsia, Kína és Japán.
2. Molekuláris genetikai úton bebizonyítottam (SSR, SNP), hogy a fedett magyar és erdélyi kopasznyakú állományok nem csupán egymás színváltozatai, hanem valóban különálló fajták, a fehér erdélyi kopasznyakú és a fehér magyar fajták meglehetősen nagyfokú rokonságának ellenére.
3. A több mint 30 generáción keresztül egymástól elkülönítve, zárt populációkban fenntartott, ám egy fajtától származó populációkban szelekciós és/vagy drift hatást mutattam ki. Bár a hasonlóság nagymértékű volt ezen állományok között, a különféle, populációgenetikában alkalmazott statisztikai módszerekkel el tudtam különíteni őket.
4. Mikroszatellit markerekkel, akárcsak a mitokondriális DNS szintjén és SNP analízis során is nagyobb hasonlóságot tapasztaltam az őshonos magyar tyúkfajták és intenzív vonalak között, mint a legtöbb más Európai helyi fajttal való összehasonlítás során.
5. A Wright-féle fixációs indexek (beltenyésztettségi mutatók) alapján teszteltem az őshonos magyar tyúkfajtákon alkalmazott tenyésztési módszert. Eredményeim szerint a genetikai diverzitás maximalizálása fenotípusos jelleg alapján, és a testvérkakasok rotációjának alkalmazása a családokon megfelelőnek mondható, az állományok jelenlegi állapota kielégítő, nemcsak önmagukban nézve, hanem Európai őshonos állományokhoz viszonyítva is.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Nemzetközi, impakt faktoros, lektorált folyóiratban megjelent publikáció

N. Bodzsár, T. Révay, H. Eding, A. Hidas, S. Weigend (2009) Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. *Animal Genetics*, 40: 516-523.

T. Révay, **N. Bodzsár**, V. E. Mobegi, O. Hanotte, A. Hidas (2010) Origin of Hungarian indigenous chicken breeds inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences. *Animal Genetics*, 41: 548-550.

Nemzetközi konferencián bemutatott poszter

N. Bodzsár, K. Szentés, T. Révay, Zs. Kotsis, A. Hidas: Investigation of Hungarian indigenous chicken breeds with molecular genetic markers

IV. European Poultry Genetics Symposium, Dubrovnik, 2005. október 7-8.

N. Bodzsár, K. Szentés, T. Révay, A. Hidas: Genetic analysis of Hungarian indigenous chicken breeds with molecular genetic markers

XII. European Poultry Conference, Verona, 2006. szeptember 10-14.

Nemzetközi konferencián tartott előadás

N. Bodzsár, T. Révay, H. Eding, A. Hidas, S. Weigend: Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers

V. European Poultry Genetics Symposium, Dánia, 2007. szeptember 25-28.

N. Bodzsár, H. Eding, S. Weigend, V. Mobegi, O. Hanotte, T. Révay, A. Hidas: The origin and genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on molecular markers

6th Hungarian-Vietnamese International Conference, Gödöllő, 2009. július 2.

N. Bodzsár, T. Révay, V. Mobegi, O. Hanotte, A. Hidas: Origin of Hungarian native chicken breeds based on mitochondrial DNA D-loop information

VI. European Poultry Genetics Symposium, Bedlewo-Poznan, 2009. szeptember 30.-október 2.

Magyar konferencián bemutatott poszter

Bodzsár N., Révay T., H. Eding, S. Weigend, Hidas A.: Őshonos magyar tyúkállományok eredetének és genetikai diverzitásának vizsgálata molekuláris markerekkel

Magyar Tudomány Ünnepe, FVM központi rendezvény „Fiatal kutatók az élhető földért” 2008. november 24.

Magyar konferencián tartott előadás

Bodzsár N., Révay T., S. Weigend, H. Eding, Hidas A.: Óshonos magyar tyúkállományok molekuláris genetikai jellemzése mikroszatellit markerekkel

VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred, 2007. április 15-17.

Bodzsár N., Révay T., H. Eding, S. Weigend, O. Hanotte and Hidas A.: Mit mondanak a molekuláris genetikai markerek az óshonos magyar tyúkfajták helyzetéről?

Genetikai Műhelyek Magyarországon, VII. Minikonferencia, Szeged, 2008. szeptember 12.