Szent István Egyetem

ŐSHONOS MAGYAR TYÚKÁLLOMÁNYOK GENETIKAI DIVERZITÁSÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ MOLEKULÁRIS GENETIKAI MARKEREK SEGÍTSÉGÉVEL

Doktori (Ph.D) értekezés

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

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5
1. BEVEZETÉS 7
1.1. Célkitűzés 8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 11
2.1. A házityúk eredete, háziasítása, elterjedése 11
2.2. Őshonos magyar tyúkfajtáink kialakulásának története 12
2.3. Őshonos magyar tyúkfajták (SZALAY 2002) 14
2.3.1. Fehér magyar 14
2.3.2. Sárga magyar 15
2.3.3. Kendermagos magyar 16
2.3.4. Az erdélyi kopasznyakú tyúkfajták 17
2.4. Őshonos magyar tyúkfajták fenntartásának jelentősége 19
2.5. A populációgenetika fogalma és a variabilitást befolyásoló mechanizmusok 20
2.6. Molekuláris genetikai markerek, DNS polimorfizmusok 21
2.6.1. I. típusú markerek 21
2.6.2. II. típusú markerek 21
2.6.2.1. Mikroszatellitek és felhasználásuk a tyúktenyésztés területén 22
2.6.3. A mitokondriális DNS, mint genetikai marker 24
2.6.4. Pontmutáció 25
3. ANYAG ÉS MÓDSZER 27
3.1. Őshonos tyúkfajtáink eredetének vizsgálata mitokondriális DNS alapján 28
3.1.1. Mintagyűjtés és szekvenálás 28
3.1.2. Genetikai variabilitás és network analízis 29
3.2. Őshonos tyúkfajtáink genetikai diverzitásának vizsgálata mikroszatellit markerekkel 29
3.2.1. Mintavétel és DNS izolálás 29
3.2.2. Genotipizálás 30
3.2.3. Mikroszatellit markerek információ tartalmának (PIC) meghatározása 30
3.2.4. Populáción belüli és azok közötti genetikai diverzitás felmérése 31
3.2.4.1. Általános diverzitásmutatók 31
3.2.4.2. F-statisztika és genetikai távolság 31
3.2.5. Klaszteranalízis 32
3.2.6. Marker Estimated Kinship (MEK) 32
3.2.7. A magyar őshonos tyúkfajták relatív genetikai diverzitása 33
3.3. Őshonos tyúkfajtáink genetikai diverzitásának vizsgálata pontmutációk alapján 34
3.3.1. Vizsgálni kívánt gének kiválasztása 34
3.3.2. SNP meghatározás menete 34
3.3.3. Az SNP analízis 35
4. EREDMÉNYEK 37
4.1. A mitokondriális DNS vizsgálatok eredményei 37
4.1.1. MtDNS D-loop variabilitás 37
4.1.2. Median-Joining Network analízis 40
4.2. A mikroszatellit alapú populációgenetikai vizsgálatok eredményei 43
4.2.1. A vizsgálatban résztvevő mikroszatellit markerek polimorfizmusa 43

4.2.2. Az őshonos magyar tyúkfajták genetikai diverzitása populáción belül és azok között46
4.2.3. Rokonsági kapcsolatok vizsgálata MEK módszerrel 50
4.2.4. A tyúkfajták klaszteranalízise 52
4.2.5. A magyar őshonos tyúkállományok összehasonlítása kereskedelmi és európai őshonos fajtákkal 55
4.2.5.1. A populációk genetikai differenciáltságának összehasonlítása 55
4.2.5.2. A magyar őshonos tyúkfajták helyzete kereskedelmi és európai helyi fajták tekintetében 55
4.2.5.3. A magyar őshonos tyúkfajták relatív genetikai diverzitása 57
4.3. Pontmutációk vizsgálati eredményei 58
4.3.1. HSP90 58
4.3.2. PIT54 59
4.3.3. GHRL 61
4.3.4. A három gén együttes elemzésének eredményei 63
4.4. Új tudományos eredmények 65
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 67
5.1. A mitokondriális DNS vizsgálatokból levonható következtetések 67
5.2. A mikroszatellit markerek alapján elvégzett vizsgálatokból levonható következtetések 68
5.2.1. Magyar őshonos tyúkfajták diverzitása 68
5.2.2. Magyar őshonos tyúkfajták diverzitásának értékelése európai szemszögből 70
5.3. Az SNP vizsgálatokból levonható következtetések 71
5.4. Javaslatok 73
6. ÖSSZEFOGLALÁS 75
7. SUMMARY 77
8. IRODALOMJEGYZÉK (1. számú melléklet) 79
9. MIKROSZATELLIT MARKEREK (2. számú melléklet) 89
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 91

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A: Adenin

BL_A: Brown egg layer A = barna tojó hibrid A vonal

BL_C: Brown egg layer C = barna tojó hibrid C vonal

BL_D: Brown egg layer D = barna tojó hibrid D vonal

BP: Bázispár

BRA: Brakel

BRD_A: Brojler dam line A = hús hibrid, anyai A vonal

BRD_D: Brojler dam line D = hús hibrid, anyai D vonal

BRS_A: Brojler sire line A = hús hibrid, apai A vonal

BRS_B: Brojler sire line B = hús hibrid, apai B vonal

C: Citozin

DNS: Dezoxi-ribonukleinsav

EDTA: Etilén-diamin-tetraecetsav

EKFEH_G: Fehér erdélyi kopasznyakú Gödöllő

EKFEK_G: Fekete erdélyi kopasznyakú Gödöllő

EKK_G: Kendermagos erdélyi kopasznyakú Gödöllő

EKK_H: Kendermagos erdélyi kopasznyakú Hódmezővásárhely

ENSZ: Egyesült Nemzetek Szervezete

FAO: Food and Agriculture Organization = Élelmezési és mezőgazdasági szervezet

FM_G: Fehér magyar Gödöllő

FRH: Friesenhuhn = fríz tyúk

G: Guanin

GDA: Genetic Data Analysis = Genetikai adatelemzés

GLP: Green Legged Partridge = zöld lábú fogolyszínű tyúk

HCL: Hidrogén-klorid

HH1: Hús hibrid 1

HH2: Hús hibrid 2

HIC: Hungarian Indigenous Chicken = magyar őshonos tyúk

HSP: Heat Shock Protein = hősokk fehérje

HWE: Hardy-Weinberg Egyensúly

ICL: Iceland Landrace = Izlandi tyúk

JAE: Jaerhoens

KAS: Kastilianer = Kasztíliai tyúk

$KHCO_3$: Kálium-hidrogén-karbonát

KM_G: Kendermagos magyar Gödöllő

KM_H: Kendermagos magyar Hódmezővásárhely

MAR: Marans

MEK: Marker Estimated Kinship

mtDNS: mitokondriális DNS

NaCl: Nátrium-klorid

NCBI: National Center for Biotechnology Information = Biotechnológiai Információk Nemzeti Központja

NH_4Cl: Ammónium-klorid

ORL: Orloff

PAD: Padovai tyúk

PCR: Polymerase Chain Reaction = polimeráz láncreakció

PIC: Polymorphic Information Content = polimorfizmus információ tartalom

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA = random amplifikálódott polimorf DNS: Dezoxi-ribonukleinsav

RNS: Ribonukleinsav

rRNS: riboszómális RNS

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism = restrikciós fragment hossz polimorfizmus

SM_G: Sárga magyar Gödöllő

SM_M: Sárga magyar Mosonmagyaróvár

SNP: Single Nucleotide Polymorphism = pontmutáció

SSR: Single Sequence Repeat = egyszerű szekvenciaismétlés

T: Timin

TH: Tojó hibrid

tRNS: transzfer RNS

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats = változó számú tandem ismétlődések

WEDS: Weighted Equal Drift Similarity

WL_A: White egg layer A vonal = fehér tojó hibrid A vonal

WL_C: White egg layer C vonal = fehér tojó hibrid C vonal

1. BEVEZETÉS

Háziállatfajtáink, mint genetikai erőforrások a Föld biológiai sokféleségének részét képezik, és mint olyanok, kulcsfontosságú szerepet töltenek be a biológiai egyensúly megőrzésében és az emberi élelmezésben. Védelmük tehát az emberiség egészét érintő globális kérdés. A köztenyésztésben (köztermesztésben) lévő növény- és állatfajták száma rohamosan csökken a nemesítői munka, a szaporító – és tenyészanyag forgalmazás világszerte megfigyelhető koncentrációja miatt. A 2000-ben körülbelül 6300, FAO-ba regisztrált fajtából több mint 1300 tűnt el, vagy a kihalás veszélye fenyegeti. Ezen kívül nagyon sok fajtát nem azonosítottak és úgy tűnhetnek el, hogy még felismerni, megvizsgálni sem állt módunkban. Európában a legmagasabb a kihalt, vagy veszélyeztetett fajták százalékos aránya, emlősöknél 55%, madaraknál 69% (SCHERF 2000).

A veszélyeztetett, kiszorulóban lévő őshonos fajták védelme az intenzív tenyésztés koncentrálódásával napjainkban egyre nagyobb jelentőségű. Az intenzív fajták kiszorítják azokat a genotípusokat, amelyek nagy fenotípusos variabilitással és egyedülálló tulajdonságokkal rendelkeznek. Egyre nehezebb az olyan fajtákhoz, genotípusokhoz hozzáférni, amelyek kiszorultak az árutermelésből. Ez azért okoz nagy problémát, mivel a nemesítés alatt álló genotípusok génkészlete a szelekció, a homogenizálási törekvés miatt folyamatosan szűkül, variabilitása csökken. Ez természetes velejárója a nemesítésnek, mivel abban alapvető cél, hogy a fajtában előforduló legkiválóbb genotípusokat, változatokat szaporítsuk fel a többi rovására. A génkészlet beszűkülése miatt azonban egyre nehezebb a genetikai előrehaladást biztosítani, tenyészcélt váltani, vagy módosítani, annak ugyanis alapvető feltétele az állományon belüli variancia, 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, hiszen a specifikus genotípusokat eredményező gének egyedi kombinációja kialakíthatja a környezethez való adaptálódást (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 kiveszőben lévő fajtákban jelen vannak. Ilyenek a különböző minőségi jellegek, betegség rezisztencia gének és számos más tulajdonság.

A probléma globális méretűvé vált, a folyamat megállítása összefogást és együttműködést igényelt. Ennek tudatában dolgozta ki a biológiai sokféleségről szóló egyezményt az ENSZ 1992-ben Rio de Janeiroban, ahol többek között elfogadásra került az a tétel, hogy a háziállatok is hozzátartoznak a világ biológiai sokféleségéhez. Magyarországon már az 1960-as években megkezdődtek a törekvések a hivatalos génmegőrzési programok indítására, melyek eleinte csupán a létszámfenntartásra szorítkoztak. Napjainkban került sor a ritka értékes genotípusok elszaporítására (pl.: faluprogramok), valamint a génváltozatok gyakoriságának, a genotípusok távolságbecslésének tudományos feltárására.

Az állattenyésztési genetika egyik fő célkitűzése a termelési értékmérők kialakulásában fontos szerepet játszó gének, génváltozatok egyszerűen detektálható markereinek keresése. Ez a kutatómunka rengeteg DNS markert tárt fel különböző fajokban, amelyek kisebb – nagyobb mértékű polimorfizmust mutatnak, és alkalmasak lehetnek egyedek, állományok genetikai jellemzésére is. A fenotípusos jegyeken kívül igen nehéz meghatározni egy – egy populáció genetikai értékét, azaz hogy milyen mértékben térnek el más genotípusoktól és mennyire tekinthetők egyedinek. 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 tenyészkiválasztásában. A molekuláris genetikai analízisek révén nyert információk génmegőrzésben való közvetlen használata körül ma még nincs teljes konszenzus, kérdéses, hogy a DNS markerek önmagukban mennyire elegendőek egy fajta vagy egy állomány értékeléséhez, hiszen a gének expressziójában jelentős különbségek lehetnek, ami már érinti a genom működési – szabályozási folyamatát is.

1.1. Célkitűzés

Munkám során a Kisállattenyésztési Kutatóintézet és Génmegőrzési Koordinációs Központ (KÁTKI) baromfi génbankjában és az ország másik két tenyészetében (Szegedi Tudományegyetem Hódmezővásárhelyi Főiskolai Kar - Hódmezővásárhely, Nyugat - Magyarországi Egyetem - Mosonmagyaróvár) fenntartott hazai őshonos tyúkfajták genetikai összehasonlítását végeztem el.

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 tenyészeteiben fenntartott fajták molekuláris genetikai összehasonlítása

- őshonos magyar tyúkfajtáink genetikai diverzitásának további vizsgálata pontmutációk segítségével

Habár néhány európai őshonos és kereskedelmi tyúkfajtát vizsgáltak már több tanulmányban is (pl.: LIU et al. 2006, TADANO et al. 2007, MUCHADEYI et al. 2008, GONGORA et al. 2008, WILKINSON et al. 2011), a kelet-európai (és hazai) őshonos tyúkfajták eredetét és genetikai diverzitását még nem mérték fel, ezért is bír nagy jelentőséggel ez a munka.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A házityúk eredete, háziasítása, elterjedése

A házityúk származásáról hosszú ideig megoszlottak a véleménynek (SZALAY 2002). Egyesek *monofiletikus,* azaz egy őstől származó, mások *polifiletikus,* azaz több őstől származó fajnak tartották.

A monofiletikus eredet hirdetői (Darwin, Dürigen, Brehm) egyetlen közös ősként a bankiva tyúkot (*Gallus ferrugineus*) jelölték meg, amely Elő – és Hátsó – Indiában, valamint Borneo kivételével a mai Indonézia szigetvilágában őshonos. Szerintük a monofiletikus származás bizonyítékai, hogy a bankiva tyúk rendkívül változékony, könnyen képez fajtákat, és hogy a ma élő tyúkfajták tollazatának, illetve a bőr – és láb, valamint a füllebeny alapszíneződése, valamint hangjuk hasonlósága felfedezhető a bankiva tyúk esetében is.

Az újabb keletű vizsgálatok a házityúk polifiletikus eredetére utalnak. Az elmélet hirdetői a házityúk őseként négy ősi fajt említenek (HORN 1976):

- bankiva vagy vörös dzsungeltyúk
- ceyloni dzsungeltyúk (*Gallus lafayetti*)
- szürke dzsungeltyúk (*Gallus sonneratti*)
- jávai – villásfarkú – dzsungeltyúk (*Gallus varius*)

CSUKÁS (1955) szerint a polifiletikus eredet elsősorban azzal magyarázható, hogy a tyúkfajták alakjában, színében és testnagyságában túl nagy a változatosság ahhoz, hogy egy őstől származzanak. Mindezekből arra a következtetésekre juthatunk, hogy a házityúk ősei az említett vadfajok, illetve alfajok kereszteződéseiből származnak, melynek hazája Dél – és Közép – India, Burma, Ceylon, Szumátra, Jáva és a távol – keleti szigetcsoport volt. Nem vitatható tehát, hogy a távol – keleti tyúkfélék kereszteződéseinél lényeges szerepe volt a korábban egyetlen közös ősként emlegetett bankiva tyúknak, azonban az eredet ma már nem állapítható meg egyértelműen pontos feljegyzések hiányában.

Az eredet megállapításában óriási segítséget nyújtanak a molekuláris genetikai markerek, így az anyai ágon öröklődő mitokondriális DNS. A kilencvenes évek ilyen irányú vizsgálatai még a házityúk egyetlen ősének a vörös dzsungeltyúk egy indokínai populációját tartották (AKISHINONOMIYA et al. 1994, 1996), majd kb. 10 évvel később módosult ez a nézet újabb ázsiai háziasítási centrumok megjelölésével (LIU et al. 2006).

A házityúk háziasításának négy oka lehetett: vallási kultusz, kakasviadalok, kedvtelés és gazdasági haszon. A domesztikáció az időszámításunk előtti III. évezredre tehető. Ezt látszik igazolni Strobel és Jeitteles ásatási anyaga (tyúkcsontok). A legkorábbi leletek az Indus folyó

mentén feltárt lelőhelyekről (Mohanjodaro, Harappa) kerültek elő. Ennek alapján tartják az archeológusok leginkább bizonyítottnak a bankiva tyúk i. e. III. évezredben történő háziasítását.
Irodalmi források szerint Délnyugat – Ázsiában az i. e. IX. – V. században honosodott meg a tyúk, és a Perzsa Birodalom idején terjedt egyre nyugatabbra. Így jutott el az ókori Görögországba is, nem véletlenül hívták a görögök annak idején „perzsa" vagy „méd" madárnak, és áldozati állatként használták. A görögök bevitték Kis – Ázsiába, ahol gyorsan el is terjedt jó gazdasági hasznosításának köszönhetően.

A kelták és a germánok már a római császárság előtt ismerték a házityúkot, a fóniciaiak pedig jóval időszámításunk előtt tenyésztették és szaporították. A tyúk az ókorban került Ázsiából Európába. Az első írásos feljegyzések Theognia és Arisztophanész (i. e. 500 – 400) görög íróktól származnak. Az Alpok északi lejtőin viszont csak a római uralom idején tűnt fel a tyúk.
Kronacher valószínűnek tartja, hogy Közép – Európába nem Itáliából jutott el a tyúk, hanem a kelták hozták magukkal. A római korból jóval több információ áll rendelkezésre a házityúkról. A fehér tyúk és kakas áldozati állatként szerepelt, de a többi színváltozatot tömték, hizlalták, szelektálták, keltették, kezdetleges állategészségügyi eljárásokat alkalmaztak (baromfitetű irtása). Bár megtiltották a hizlalt tyúkok fogyasztását i. e. 161–ben, mégis nélkülözhetetlen háziállat lett a tyúk a rómaiaknál (MATOLCSI 1975).

2.2. Őshonos magyar tyúkfajtáink kialakulásának története

A hazánk területén talált ásatási leletek nagyobb testű tyúktól származnak, mint a népvándorlás kori avar sírokból előkerült házityúkoké, melyről a római kori csontmaradványok tanúskodnak. A magyar parlagi tyúkok őseinek eredete a meglévő régészeti leletek alapján nem tisztázható (MATOLCSI 1975).

A magyar és erdélyi kopasznyakú fajtákat általában egymás színváltozataiként írják le, és sajnos annak ellenére, hogy ezek ma már hivatalosan elismert önálló fajták, a mai napig akadnak tenyésztők, akiknek meggyőződésük, hogy az erdélyi tyúk csupán egy kopasznyakú változata a magyar tyúknak. A kopasznyakú tyúkot először „Szeremley – tyúk" – ként említették első tenyésztőjük, Szeremley Lajos, erzsébetvárosi tanfelügyelő nyomán. Erdélyből nagyon gyorsan elterjedt ez a fajta országszerte, illetve Nyugat – Európában is az 1875-ös bécsi baromfi kiállítást követően, ahol nagy feltűnést keltett az ún. csórényakú tyúk (GRUBICY 1895).

Történelmi és archeológiai adatok alapján azt mondhatjuk, hogy míg a házityúk az Égei – tengeren keresztül érte el Görögországot és Olaszországot, addig a Közép – Európában lévő őshonos tyúkfajták valószínűleg kettős eredettel rendelkeznek (PETER 1913). Az egyik lehetséges származási terület észak, a Fekete – tenger felől (PETER 1913), a másik irány pedig Kína keleti

része, Oroszországon át (WEST és ZHOU 1988). WINKLER (1921) és BAKOSS (1931) szerint a ma ismeretes magyar tyúk ősét a IX. században hozták be Ázsiából a Kárpát-medencébe. Később ezeket az állatokat valószínűleg keresztezték keleti és mediterrán madarakkal, amellyel kialakult a magyar tyúk ma ismert formája, és idővel genetikailag is adaptálódtak a különböző magyar gazdasági rendszerekhez. A Magyarországon is beinduló ipari tenyésztés kezdetéig ezeket a fajtákat nemcsak a relatíve jó tojástermelésük, hanem kitűnő húsminőségük és robusztusságuk miatt is kedvelték. A fehér és a fogolyszínű magyar fajtákat az Alföldön, a sárga és a kendermagos magyar tyúkokat a Dunántúlon, Erdélyben pedig a fekete, fehér és kendermagos kopasznyakú fajtákat preferálták.

A Kisállattenyésztési Kutatóintézet és Génmegőrzési Koordinációs Központ (KÁTKI) elődje egy nagyszabású tenyésztési programot indított a 30-as évek elején. BÁLDY és munkatársai (1954) céltudatos tenyésztői munkájának köszönhetően a jó kettős hasznosítású (tojás és hús) magyar tyúkfajták országszerte elterjedtek.

A második világháború során e baromfik nagy részét kiirtották. Gödöllőn BÁLDY és munkatársai (1954), Mosonmagyaróváron BISZKUP, BEKE valamint kollegái (1951) szisztematikus tenyésztői munkájának köszönhetően a magyar őshonos tyúkfajtákat nemcsak megóvták, hanem széles körben el is terjesztették az 50-es évekre.

A 60-as évek elején, az intenzív tenyésztés elterjedésével a magyar fajtákat hús és tojó típusú hibridek váltották fel, még a kisebb gazdaságokban is. Azóta a magyar és erdélyi fajtákat génbankokban tartják fent. Génmegőrzési program keretében 1973-ban a sárga magyar tyúkot Mosonmagyaróváron tenyésztették tovább, mely állományból 1991-92-ben Kanadából visszaszármaztatott sárga magyar populációval keresztezve hozták létre a gödöllői állományt. A kendermagos tyúk génbankját 1976-ban a Duna-Tisza közén talált fajtatiszta állományokból Hódmezővásárhelyen hozták létre. Ugyanebben az évben hozták Gödöllőre a fekete erdélyi kopasznyakú tyúkállományt a *konstanzai* génbankból, a fehér és kendermagos erdélyi kopasznyakú fajták tenyésztése már 1953-ban elindult. Fehér magyar tyúkállomány Makón maradt fönn 1978-ig, melyből Gödöllőn alakítottak ki egy génbanki állományt (SZALAY 2002).

Három intézetet vontak be tehát ebbe a génmegőrzési programba, ahol ezek a helyi fajták kis létszámban megtalálhatók. Az egyik a Nyugat – Magyarországi Egyetem Mosonmagyaróváron, ahol a sárga magyar fajta egy állománya található, másik a Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Főiskolai Kara Hódmezővásárhelyen, ahol a kendermagos magyar, és a kendermagos erdélyi kopasznyakú fajtákat tartják, és végül a Kisállattenyésztési Kutatóintézet és Génmegőrzési Koordinációs Központ (KÁTKI), ahol minden őshonos magyar fedett és kopasznyakú fajta fellelhető a mai napig. Ezen kívül ma már szép számmal akadnak jelentkezők, akik őshonos magyar tyúkfajták tartására adják a fejüket.

Mivel viszonylag kis létszámú populációkról van szó, az állományokat családtenyésztéssel, fajtánként 10-10 családdal tartják fenn. A családok létszáma átlagosan 20-30 tojó és az 1:7-es ivaránynak megfelelő kakas. Az egy családtól származó utódok alkotják a következő generációt úgy, hogy a tojók az eredeti családban maradnak, míg a kakas rotációszerűen a következő családba kerül át, így elkerülvén az állományok beltenyésztetté válását.

2.3. Őshonos magyar tyúkfajták (SZALAY 2002)

2.3.1. Fehér magyar

A csőr csontfehér, a szem narancsvörös, a taraj, arc, áll – és füllebeny vérpiros. A láb és a lábujjak eredetileg hússzínűek, idősebbeknél csontfehérek, de a nemesítés során kialakult sárga szín is ma már megengedett. Tollazata tiszta fehér, ragyogó, ezüstös zománcú, kakasoknál idősebb korban sárgás árnyalatba hajló lehet. Naposcsibéik sárgásfehér pelyhűek, a tojások általában krém vagy világosbarna színűek. Elsősorban az Alföld és a Duna – Tisza köze tyúkja volt, mivel fehér színével az árnyék nélküli tartást, a tűző napsugarakat a legjobban viselte.

1. ábra: Fehér magyar (Fotó: Dr. Hidas András)

2.3.2. Sárga magyar

A világosabb és sötétebb színárnyalatban előforduló sárga magyar tyúkok közül a világosabb, élénksárga színű egyedek szaporítása a kívánatos. A csőr sárga, a szem narancsvörös, a taraj, arc, áll – és füllebeny vérpiros, a láb, lábujjak, illetve a körmök sárgák. A tollazat alapszíne fiatal tyúkoknál élénksárga, az idősebbeknél némi fakulás megengedhető. A nyaktollak végei, a szárny evezőtollai és a farktollak végei kismértékben barnás feketék (cirmos vagy kormos), a sarlótollak zöldes árnyalatba hajló feketék. A naposcsibék és a tojások egyszínű világosbarnák. A sárga magyar a Dunántúlon, valamint az Alföld és a Duna – Tisza köze egyes részein volt elterjedt. Egy időre háttérbe szorult, majd az 1940 – es években Mosonmagyaróváron ismét felkarolták és nemesítették ezt a fajtát (BISZKUP és BEKE, 1951).

2. ábra: Sárga magyar (Fotó: Dr. Hidas András)

2.3.3. Kendermagos magyar

A csőr csontfehér, a szem narancsvörös, a taraj, arc, áll – és füllebeny vérpiros. A láb és a lábujjak hússzínűek, csontfehérek, de a sárga ennél a fajtánál is megengedett. A körmök fehérek vagy sárgák. Mindkét ivar tollazatának alapszíne kékesszürke. A sötét, fekete színhatású, keskeny keresztsávok váltakozó elhelyezkedése idézi elő a jellegzetes „kendermagos” színt. Kakasoknál a szín világosabb, míg a tyúkoknál sötétebb, ami a „Z” ivari kromoszómán elhelyezkedő, sávozottságot okozó gén (B) homozigóta formában történő megjelenésének köszönhető. A tollak túl világos vagy túl sötét, illetve túl finom vagy túl durva rajzolata kifogásolható. Naposcsibéik sötétszürke – fekete pelyhűek, a kakascsibéknél a has tájékán és a fejen világosabb árnyalatokkal. Tojásaik világosbarna vagy barna színűek. Rejtőzködő színe miatt elsősorban az ország északi részén, általában a szárnyas ragadozók által jobban veszélyeztetett területeken kedvelték, de az egész országban elterjedt fajta volt.

3. ábra: Kendermagos magyar (Fotó: Dr. Hidas András)

2.3.4. Az erdélyi kopasznyakú tyúkfajták

Jellemzője, hogy nyaka, részben melle, valamint hasi része is tollatlan, illetve a fejtetőn kevés toll található. A fajtára jellemző kopasznyakúságot egyetlen autoszómális gén határozza meg. A tulajdonság a fedett nyakúságot meghatározó génnel szemben domináns. Homozigóta kopasznyakú esetében a nyak teljesen csupasz, ún. csórényak, míg a heterozigóta egyedek esetében elöl, a nyak középső részén tollpamacs található (naposcsibéken jól megfigyelhető), melynek semmilyen körülmények között nem szabad a nyak hátsó részére terjednie, vagy a nyakat körülfognia. Több színváltozata fordul elő, korábban legelterjedtebb a fehér volt. Testalkata hasonlít a magyar tyúkéra, de annál nagyobb törzsű, hosszabb és tojásdad alakú, melle kerek, mint a vadmadaraké, szárnya hosszabb és hegyesebb. Az erdélyi kopasznyakú tyúkfajtákat a XX. század első felében még elsőrendű gazdasági tyúkként tartották számon. Rendkívül edzettek, erősek és ellenállóak, gyorsan fejlődnek és gyorsan tollasodnak. Számukra megfelelő környezetben kitűnő tojástermelők. A tojások általában barna vagy krémszínűek, de előfordulhat fehér héjú is. Kotlási hajlama gyenge. Egyes vidékeken kiváló téli tojóként tartották. Gödöllőn az 1950 – es évek elejétől sárga, kendermagos és fehér színben nemesítették. Mai génbanki állományainkban fehér, fekete és kendermagos színben önálló fajtaként őrzik és szaporítják. Mindhárom színváltozatára jellemző, hogy az arc, áll – és füllebeny, a taraj és fej (különösen annak hátsó része) vérpiros, a tojónál – kivéve a fej hátsó részét, mely mindig vérpiros – kissé halványabb árnyalatú. Kívánatos, hogy minden színváltozat, de különösen a fekete kopasznyakúak szeme narancspiros és tüzes legyen, a sötét szem kerülendő. A fekete, egészen sötét színű kopasznyakúak csőre sötét palaszínű, a többi, világosabb színváltozaté fehér, sárga, vagy test – azaz rózsaszínű. A fekete kopasznyakúak láb – és lábujjszíne sötét palaszínű. Eredetileg a fehér és kendermagos tollazatúaké rózsaszínű, de ma már a sárga is elfogadott.

4. ábra: Fekete erdélyi kopasznyakú (Fotó: Dr. Hidas András)

5. ábra: Fehér erdélyi kopasznyakú (Fotó: Dr. Hidas András)

6. ábra: Kendermagos erdélyi kopasznyakú (Fotó: Dr. Hidas András)

2.4. Őshonos magyar tyúkfajták fenntartásának jelentősége

A régi magyar baromfifajták között tartjuk számon azokat a szárnyasféléket, melyek évszázadok folyamán őseink vagy idegen népek által a Kárpát - medencébe behozott fajtákból alakultak ki, alkalmazkodtak hazánk környezeti és éghajlati viszonyaihoz, s így őshonos vagy honosult fajtákká váltak. Ezek közé soroljuk többek között a magyar és az erdélyi kopasznyakú tyúk több színváltozatát is. Régi magyar állatfajtáinkat, köztük a baromfiféléket is, nemzeti kulturális örökségünk részeként kell kezelnünk. A kendermagos és erdélyi kopasznyakú tyúkfajták jellegzetes emlékei a régi, hagyományos paraszti gazdaságoknak, élő muzeális tárgyaknak tekinthetők. Európa számos régiójában az ilyen hagyományos fajtákat szinte nemzeti jelképként tartják számon. Ezek a fajták a hazai multifunkcionális mezőgazdaság kialakításában és fenntartásában is nélkülözhetetlenek. Azok a különleges termékek, melyek hungarikumként Magyarország mezőgazdaságának hírét öregbíthetik világszerte, elsősorban régi, hagyományos, őshonos állatfajtáinkkal termeltethetők. E fajtákat igényli mind a fejlesztési célok között szereplő faluturizmus, mind az érzékeny természeti területek mezőgazdasága.

2.5. A populációgenetika fogalma és a variabilitást befolyásoló mechanizmusok

A populációgenetika a populációk genetikai összetételét, illetve az azt megváltoztató mechanizmusokat vizsgálja. Alapja a populáción belüli és azok közötti variancia, ami az allélgyakorisággal mérhető. Egy ideális populációban, a szülők és az utódok allélgyakorisága azonos (Hardy-Weinberg törvény), ahol az egyedek véletlenszerűen párosodnak (pánmixis).
Az ideálistól eltérő populációban azonban, a genetikai variabilitást olyan tényezők befolyásolják, mint a genetikai sodródás, mutáció, migráció (génáramlás), a szelekció (természetes, mesterséges), a különböző párosítási rendszerek (pl. pánmixis, beltenyésztés). A genetikai variabilitásért többnyire ezek együttes hatása a felelős (HARTL és CLARK 1989).

Genetikai drift-nek (genetikai sodródás) nevezzük azt az evolúciós folyamatot, amikor az allélgyakoriságok változását véletlenszerű események határozzák meg, főként kisméretű populációkban jelentkezik. Lényege, hogy bizonyos allélok homozigóta formában fixálódnak, míg más allélok elvesznek, és csak lassú mutációk által pótlódnak. Nem csupán egyes, esetleg nem kívánatos gének kiküszöbölését jelenti, hanem teljes genotípusok tűnhetnek el.

A genetikai drift mellett a populációkban folyamatosan ***mutáció***k lépnek fel, ami a DNS nukleotid sorrendjének, vagy azok számának örökletes megváltozását jelenti. A mutáció gyakoriságát a mutációs ráta fejezi ki. Ha ennek értéke kisebb, mint 10^{-6}, akkor a mutáció szórványos, ha 10^{-6} és 10^{-4} között van, akkor közepes, és általában generációnként ismétlődő, ha 10^{-4} feletti az érték, akkor pedig labilis. Pontmutáció esetében a DNS nagyon kis szakaszának, egyetlen nukleotidjának vagy bázispárjának megváltozásáról van szó, kromoszóma mutáció esetében a gén nukleotid szerkezetében vagy sorrendjében következik be a változás.

A ***migráció*** keveri a különböző populációkban található allélokat, így azok differenciálódását akadályozza. Két típusa van, az *emigráció*, amikor az allélok/gének kivándorolnak a populációból, és az *immigráció*, amikor allél/gén bevándorlása történik a populációba. A migráció az allélgyakoriságot legjelentősebb mértékben megváltoztató tényező.

A ***szelekció***nál megkülönböztetünk természetes és mesterséges szelekciót. A természetes kiválasztódás egészen addig tart, amíg nem határozunk meg szelekciós kritériumokat (mesterséges szelekció). Emellett viszont egy bizonyos mértékű folyamatos természetes szelekció továbbra is hat az állományokra. Egy szelekciónak kitett populációban az allélgyakoriságok a szelekciós kritériumoknak megfelelően alakulnak. Minél tovább van két populáció egymástól izoláltan, a genetikai különbség annál nagyobb lesz köztük (DOHY 1999).

2.6. Molekuláris genetikai markerek, DNS polimorfizmusok

A DNS marker általában egy rövid, a genom legtöbbször ismeretlen funkciójú szakasza, a kromoszóma olyan lókusza, amely a különböző genotípusokban eltérő szekvenciákat hordoz (JEFFREYS et al. 1985, WEBER és MAY 1989). A molekuláris genetikai markerek két csoportra oszthatók, az I. és II. típusú markerekre (O'BRIEN 1991).

2.6.1. I. típusú markerek

Az I. típusú markerek a gének fehérjét kódoló régiói. Alacsony mutációs ráta jellemzi, hiszen a fehérjék működéséért felelős szakaszról van szó, melynek változására érzékenyen reagál a szervezet, legtöbbször szelekciós hátrányt okoz. Az 1980-as évek elején a restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP = **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) volt a leggyakrabban alkalmazott módszer DNS polimorfizmusok kimutatására és igazságügyi DNS azonosítás céljára (BOTSTEIN 1980). Alapja, hogy restrikciós endonukleáz enzimekkel hasítva a különböző DNS mintákat, majd detektálva a létrejött mintázatot, eltérések találhatók ott, ahol azok az enzim hasítási helyén eltérő szekvenciát tartalmaznak. Detektálására általában radioaktívan jelölt próbával végzett Southern hibridizációt alkalmaznak.

Ma már inkább a PCR alapú RFLP technikát használják, miszerint a vizsgálni kívánt szakaszt specifikusan felsokszorozzák, majd a termékeket restrikciós enzimmel emésztik, így az allélok egyedi mintázatot produkálnak. Ezt a módszert főként ismert mutációk azonosítására alkalmazzák (direkt géntesztek) (FÉSÜS et al. 2000).

2.6.2. II. típusú markerek

A II. típusú markerek (DNS polimorfizmusok) a genom adott régiójának legtöbbször ismeretlen funkciójú változatai, melyek alkalmasak lehetnek az egyedek, fajták, populációk megkülönböztetésére. Legtöbbször a DNS fehérjéket kódoló szakaszain kívül helyezkednek el, így nincsenek szelekciós nyomás alatt. Legnagyobb előnyük, hogy nagy számban fordulnak elő és magas polimorfizmust, változatosságot mutatnak (TAUTZ 1984).

A polimorf markereken belül megkülönböztetünk *repetitív* és *nem repetitív* szekvenciájúakat.

A ***nem repetitív szekvenciájú markerek*** csoportjába tartoznak a ***RAPD*** (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) markerek (WILLIAMS 1990), melyek a genetikai diverzitás és a származás ellenőrzés vizsgálata szempontjából jelentőséggel bírnak (APOSTOL et al. 1996; PLOTSKY et al. 1995; ZHANG et al. 1995; ROMANOV és WEIGEND 2001). Nagy előnye, hogy a

polimorfizmusok akkor is kimutathatók, ha nem ismert a szekvencia, viszont nagyon érzékeny a reakciókörülmények, a környezet változásaira, a mintázatot erősen befolyásolhatja a templát DNS minősége. Hátránya, hogy a sávok domináns jellegűek (WEIGEND 1999). A RAPD-hoz hasonlóan véletlen primerek használatán alapuló módszer az ***AP-PCR*** (**A**rbitrarly **P**rimed **PCR**) annyi különbséggel, hogy hosszabb szekvenciájú (20 oligonukleotid) primerekkel, magasabb hőmérsékleten és ciklusszámmal történik a PCR reakció (HAJÓSNÉ 1999). Az ***AFLP*** (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) az RFLP-hez hasonló, kromoszómális eredetű restrikciós fragmentek detektálására alkalmas. A fragmentumok meglétének, avagy hiányának meghatározása PCR amplifikációval történik, akárcsak a RAPD markerek esetében, domináns öröklődést mutatnak, viszont jóval több lókuszt lehet velük detektálni (HAJÓSNÉ 1999). A ***FluoMEP*** (**Fluo**rescent **M**otif **E**nhanced **P**olymorphism) ugyancsak a RAPD módszeren alapul, lényege, hogy egy fluoreszcens jelöléssel ellátott közös primer, és a RAPD rövid, 10 oligonukleotid hosszúságú primere amplifikál, így lehetővé téve a polimorfizmusok gyors és hatékony detektálását (CHANG et al. 2007).

Populációgenetikai szempontból több és megbízhatóbb információt nyújtanak a ***repetitív szekvenciájú DNS motívumok.*** Az eukarióta genom nagy mennyiségben tartalmaz sokszorosan ismétlődő szekvencia csoportokat, melyek általában nem íródnak át fehérje nyelvre. Arányuk a genomban fajra jellemző. Elhelyezkedésük alapján két nagy csoportba sorolhatók: az egyikben az ismétlődések folyamatos sorozatot alkotnak (tandemly repeated DNA), míg a másik esetben egy adott szekvencia a genomban elszórtan fordul elő (interspersed repetitive DNA).

Markerként a tandem ismétlődések használata terjedt el, melyek a *VNTR* (**V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats = változó számú tandemismétlődések) markerek elnevezést kapták (JEFFREYS et al. 1985). Az ismétlődő egységek sorozatát hosszuk, illetve az egységek mérete alapján három nagy csoportba osztották: midi-, mini- és mikroszatellitek (MARIAT et al. 1992). Legnagyobb jelentőséggel a mikroszatellit markerek bírnak.

2.6.2.1. Mikroszatellitek és felhasználásuk a tyúktenyésztés területén

Az 1-4 bázispár hosszú ismétlődések sorozatát mikroszatelliteknek (SSR = **S**hort **S**equence **R**epeat), nevezzük (TAUTZ 1984, LITT és LUTTY 1989). A mikroszatelliteket határoló DNS szekvenciák általában egy adott faj esetében konzervatívak. Ezek ismeretében a konzervatív határoló régiókhoz tapadó primerek segítségével a közreeső mikroszatelliteket a faj valamennyi genotípusára PCR-rel amplifikálni (Sequence Tagged Site-PCR), és gélelektroforézissel detektálni lehet. A módszerrel a különböző hosszúságú fragmentumok révén az eltérő ismétlődésszámot tudjuk kimutatni (WEBER és MAY 1989).

Előnye, hogy egy lókuszon a heterozigócia is detektálható (kodominancia) és a populációkban több allél is előfordulhat, ami a DNS replikáció során bekövetkező hiba eredménye. A különböző allélok, a megismételt egységek eltérő számából jönnek létre, a mutációs rátát 10^{-4} és $5x10^{-6}$-ra becsülik (EDWARDS et al. 1991). A mikroszatellitek könnyen izolálhatók, ezért azonosításuk az eukarióta genomban viszonylag egyszerű (TAUTZ 1989). A vizsgálandó anyag követelményei nem szigorúak, kis mennyiségű vérből, szövetből izolált DNS szükséges hozzá (BRUFORD et al. 1993).

Hátránya, hogy az egyes lókuszokra specifikus primerszekvenciákat kell tervezni, aminek előfeltétele, hogy szekvencia ismerettel rendelkezzünk a genom mikroszatelliteket hordozó fragmentjeiről (BECKMAN és SOLLER 1990). Azonban megfelelő kombinációk használatával különböző specifikus primerekkel egy PCR reakcióban (Multiplex PCR) több mikroszatellit marker is amplifikálható. Ennek lehetősége az elemzést takarékosabbá teszi mind idő, energia és költség szempontjából is.

A gerincesek genomjában a leggyakoribbak a 2 bp hosszú ismétlődések (dinukleotid típusú mikroszatellitek), ezek közül is a CA/TG és CT/AG szekvenciák meglehetősen gyakoriak, ám a CG/GC ismétlődés kevésbé fordul elő (ROHRER et al. 1994). A tri- illetve tetranukleotid formák jóval ritkábbak, azonban metodikai szempontból értékesebbek (HAJÓSNÉ 1999).

A mikroszatellitek viszonylag egyenletesen oszlanak el a genomban, ami igen jó lehetőséget nyújt a géntérképezéshez, a nagy variabilitást pedig igen jól lehet hasznosítani egyedi, illetve fajtaazonosításban és genetikai összehasonlításokban is (pl.: CROOIJMANS et al. 1996, TAKAHASHI et al. 1998, ZHOU és LAMONT 1999, ROMANOV és WEIGEND 2001).

A származás ismerete az állattenyésztésben alapvető fontosságú, hiszen e nélkül nem állapítható meg az utódok öröklött tulajdonságaiban a szülők befolyása, mely a genetikai előrehaladást is gátolja (ISRAEL et al. 2000). A baromfitenyésztés területén egy egyed származásának ellenőrzése többnyire mikroszatellitekkel történik (TAKAHASHI et al. 1998, VANHALA 1998, PONSUKSILI et al. 1999). Öt, meglehetősen informatív (PIC = 0,25-0,50) mikroszatellit marker variabilitása esetén a valószínűsége, hogy két rokon egyednek azonos a genotípusa, 6×10^{-7} (BRUFORD et al. 1993). A származásellenőrzés nemcsak azért bír nagy jelentőséggel, mert be tudjuk azonosítani az állatokat, hanem a beltenyésztés elkerülése érdekében is tudjuk azokat alkalmazni. Számos leírást találhatunk az irodalomban erre más állatfajok esetében is, például a szarvasmarha, ló, juh, méh, stb. (MACHADO et al. 2003, CANON et al. 2000, CRAWFORD et al. 1991, NEUMANN et al. 1999, stb.).

A mikroszatellit markerek alapján végzett diverzitás vizsgálatok megbízható információt nyújtanak a tyúkállományokon belüli és azok közötti genetikai variabilitásról, rokonságokról, különbségekről (ZHOU és LAMONT 1999, ROMANOV és WEIGEND 2001). A populáción belüli

genetikai variancia különösen fontos szerepet játszik a domesztikált haszonállat-fajtákban, melyeket hosszú időn keresztül együtt tartottak (CABALLERO és TORO 2002). Továbbá, a genetikai diverzitás vizsgálatok informálhatnak minket arról, hogy mely tyúkfajták érdemesek génmegőrzésre. Általában ilyen jellegű adatokat a genetikai távolságok meghatározásával nyerhetünk (NEI 1972, REYNOLDS et al. 1983). A populációk közötti rokonságból (EDING és MEUWISSEN 2001) készíthetünk olyan statisztikákat, melyek közvetlenül a genetikai varianciához kapcsolódnak. Az egyedek populációba való sorolásával - azok genotípusa alapján - (PRITCHARD et al. 2000) meg tudjuk határozni a fajták közötti kapcsolatokat bármiféle előzetes feltételezés nélkül.

Mivel a mikroszatellitek a legalkalmasabbak a különböző (tyúk) populációk jellemzésére, számos tanulmányt találunk a szakirodalomban, ezért csak néhányat ragadnék ki közülük. Az egyik legfontosabb ilyen populációgenetikai vizsgálat az AVIANDIV projekt keretén belül történt (WEIGEND et al. 1998-2000; http://aviandiv.tzv.fal.de), amikor is 52 tyúk populációt vizsgáltak meg a FAO által javasolt 30 mikroszatellit marker alapján (http://aviandiv.tzv.fal.de/primer_table.html). A gödöllői New Hampshire kísérleti állománya, és a fekete erdélyi kopasznyakú fajta is részt vett a programban. Ezt a market szettet – vagy ezek közül választott markereket – számos más tanulmány is alkalmazta és alkalmazza a mai napig (pl.: HILLEL et al. 2003 és 2007, MUCHADEYI et al. 2007, MWACHARO et al. 2007, CHEN et al. 2008, GRANEVITZE et al. 2009, CUC et al. 2010, WILKINSON et al. 2011, ELTANANY et al. 2011). Azonban a legnagyobb szabású tanulmány egy nemrég zárult nemzetközi projekt, a GLOBALDIV (2007 – 2011; http://www.globaldiv.eu), mely többek között az AVIANDIV markerkészletből kiválasztott 25 mikroszatellit marker segítségével 163, már genotipizált tyúk populáció együttes analízisét végzi.

2.6.3. A mitokondriális DNS, mint genetikai marker

A mitokondrium a citoplazmában található sejt szervecske, a sejt „energiagyárának” fogható fel. Egy cirkuláris, kör alakú kromoszómája van, ez a mitokondriális DNS (mtDNS). Sejttípusonként eltérő számú mitokondrium található, ezek genetikai állománya eltérő lehet. A mtDNS átlagosan kb. ezer példányban található egy-egy szomatikus sejtben, de petesejtekben akár a 100 000 kópiát is elérheti (CHEN et al. 1995). A magas kópiaszámnak köszönhetően a súlyosan degradálódott, bomlott minták (pl. csontmaradványok, szőrképletek) elemzése során is képes annyi információt nyújtani, mely nukleáris DNS esetén már nem elérhető.

Az állati mtDNS kb. 16000 nukleotidból áll, fehérjéit 37 gén kódolja: 22 gén tRNS-t, 2 gén rRNS-t, 13 gén pedig elektron transzport láncban résztvevő fehérjéket kódol. A mtDNS nem kódoló

része az ún. kontroll régió, melyet D-loop szakasznak is neveznek. Mivel ez a rész nem kódol fehérjét, kis szelekciós nyomás alatt van, ezért képes az új nukleotid variációkat megőrizni, ezáltal a polimorfizmus mértéke lényegesen nagyobb (hipervariábilis), mint a kódoló régióban. Emiatt, és mert a mitokondrium kisebb mértékű DNS javító mechanizmussal rendelkezik, a D-loop régiónak kb. tízszer nagyobb a mutációs rátája, mint a sejtmagi DNS-nek, melynek eredményeképpen jöhetnek létre a különböző variációk az egyébként azonos anyai vonalakból. Kizárólag maternálisan, anyai ágon öröklődik, és nem rekombinálódik (HAYASHI et al. 1985). A mtDNS alkalmazásának jelentősége rendkívüli mértékben megnőtt az utóbbi években bizonyos vizsgálati területeken.

A tyúk mitokondriális genom teljes szekvenciáját először 1990-ben tette közzé DESJARDINS és MORAIS. Azóta már a mtDNS-t széles körben alkalmazzák a tyúk fajban is – mint molekuláris genetikai marker – rokonsági kapcsolatok vizsgálatára fajok között és azokon belül (ZHANG és SHI 1992), valamint különböző származásellenőrzési és populáció genetikai vizsgálatokra baromfi illetve más fajokban is (tyúk: AKISHINONOMIYA et al. 1994, AKISHINONOMIYA et al. 1996, LIU et al. 2006, méh: FRANK et al. 2001).

2.6.4. Pontmutáció

A szekvencia szintű változatosság legegyszerűbb esete a pontmutáció vagy SNP (**S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism). Becslések szerint az emberi genomban több mint 2,8 millió SNP található, amelyek géntérképezéshez, betegségek vizsgálatához, illetve származás ellenőrzéshez markerek kimeríthetetlen tárházát képezhetik. Vizsgálatukra számos csúcstechnológiájú metodika létezik, azonban az adott változat és szekvencia környezetének pontos ismerete szükséges (KWOK és CHEN 2003).

A pontmutáció alatt értjük egy nukleotid kicserélődését egy másikra, illetve egy, esetleg néhány nukleotid addícióját, delécióját. Rendszerük biallélos, azaz egy populációban általában csak két allél van jelen. Következésképpen az információ tartalom SNP markerenként kevesebb, mint a mikroszatellit markereknél, ami egy multiallélos rendszer. Öt SNP információ tartalma felel meg egy mikroszatellitének, ami azt jelenti, hogy egy genetikai térképen lévő specifikus SNP-k számának nagyobbnak kell lenniük, mint a legsűrűbb, ma elérhető mikroszatellit térkép. Ezért a nagy teljesítményű technológiákhoz nagyszámú SNP meghatározására van szükség (BEUZEN et al. 2000).

Az előbbiek ismeretében felmerül a kérdés, miért is alkalmazzák ilyen széles körben ezt a kétallélos rendszert, mint molekuláris genetikai marker. Nos, ennek egyik fő oka éppen a sűrűségükben rejlik, például embernél megközelítőleg minden ezredik bázis SNP. Ezen kívül, ha

megfelelő mennyiségben detektáljuk őket a szekvenciában, sokkal informatívabb markereket nyújtanak egy-egy lókuszon, vagy azok közelében, mint akár a mikroszatellitek (LANDEGREN et al. 1998).

Vannak olyan SNP-k, melyek a kódoló régióban helyezkednek el, így közvetlenül hathatnak bizonyos fehérje funkciókra, ezáltal felelősek lehetnek a fontos tulajdonságokban előforduló variációkért az egyedek között. Öröklődés szempontjából a pontmutációk sokkal stabilabbak, ami alkalmassá teszi azokat hosszú távú marker szelekcióra is. Számos módszer létezik azonosításukra, melyek közül említésre méltóak a hagyományos, gél alapú megközelítések, mint például a szekvenálás, PCR, restrikciós emésztés, és a gélelektroforézis egyéb formái (PARSONS és HEFLICH 1997).

Mivel az SNP a legmegfelelőbb alap a nagy teljesítményű genetikai analízisek elvégzésére, hamar elterjedt a DNS microarray (SNP chip) használata, mellyel egyszerre nagy mennyiségű (40000) pontmutáció elemezhető egy időben (LIPSCHUTZ et al. 1999). Felhasználásuk ezért bír nagy jelentőséggel, a 60K SNP chipet (Illumina) már használták a tyúk fajban is (GROENEN et al. 2011).

3. 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 egyedeket Magyarország három különböző területén, zárt populációkban tartották: Gödöllő - Kisállattenyésztési Kutatóintézet és Génmegőrzési Koordinációs Központ (sárga, fehér, kendermagos magyar, fekete, fehér és kendermagos erdélyi kopasznyakú fajták), Mosonmagyaróvár - Nyugat-Magyarországi Egyetem (sárga magyar), valamint Hódmezővásárhely - Szegedi Tudományegyetem hódmezővásárhelyi főiskolai kara (kendermagos magyar és kendermagos erdélyi kopasznyakú).

Munkám során tehát 9 magyar őshonos populáció genetikai analízisét végeztem el, melyekből 3 fajta (sárga, kendermagos magyar, és a kendermagos erdélyi kopasznyakú fajták) azonos, csupán az imént említett különböző tenyészetekből származnak (1. táblázat). Ezeket az állományokat a későbbiekben párhuzamos populációknak neveztem, melyek tehát egy fajtából származnak, csupán 30-40 éve külön, zárt populációban tartották őket.

1. táblázat: A kísérletben szereplő magyar őshonos tyúkállományok

Populáció neve	**Rövidítés**	**Mintavétel helye**
Sárga magyar Gödöllő	SM_G	Gödöllő
Sárga magyar Mosonmagyaróvár	SM_M	Mosonmagyaróvár
Fehér magyar Gödöllő	FM_G	Gödöllő
Fehér erdélyi kopasznyakú Gödöllő	EKFEH_G	Gödöllő
Kendermagos erdélyi kopasznyakú Gödöllő	EKK_G	Gödöllő
Kendermagos erdélyi kopasznyakú Hódmezővásárhely	EKK_H	Hódmezővásárhely
Fekete erdélyi kopasznyakú Gödöllő	EKFEK_G	Gödöllő
Kendermagos magyar Gödöllő	KM_G	Gödöllő
Kendermagos magyar Hódmezővásárhely	KM_H	Hódmezővásárhely

A különböző molekuláris genetikai markerek vizsgálata során lehetőségem volt kereskedelmi és más európai országbeli fajta genotípusaival összehasonlítani hazai tyúkfajtáinkat, ezáltal egy pontosabb képet kapni a magyar fajták helyzetéről Európában (2. táblázat). Az összevetéshez használt fajták mindegyike az AVIANDIV projektből került kiválasztásra, és minden kereskedelmi vonal minta származási helye Németország.

2. táblázat: Az összehasonlításhoz használt kereskedelmi vonalak és európai őshonos állományok

Kereskedelmi vonalak		Európai őshonos populációk		
Populáció	**Rövidítés**	**Populáció**	**Rövidítés**	**Minta származási helye**
Fehér Leghorn A vonal	WL_A	Orloff	ORL	FÁK
Fehér Leghorn C vonal	WL_C	Kasztíliai tyúk	KAS	Németország
Barna tojó hibrid A vonal	BL_A	Fríz tyúk	FRH	Németország
Barna tojó hibrid C vonal	BL_C	Brakel	BRA	Németország
Barna tojó hibrid D vonal	BL_D	Padovai tyúk	PAD	Olaszország
Brojler anyai vonal A	BRD_A	Izlandi tyúk	ICL	Izland
Brojler anyai vonal D	BRD_D	Maransi tyúk	MAR	Franciaország
Brojler apai vonal A	BRS_A	Jaerhoens	JAE	Norvégia
Brojler apai vonal B	BRS_B	Zöldlábú fogolyszínű tyúk	GLP	Lengyelország

3.1. Őshonos tyúkfajtáink eredetének vizsgálata mitokondriális DNS alapján

Őshonos magyar tyúkfajtáink származásának genetikai vizsgálatához a mitokondriális genom szekvenciapolimorf részét (D-loop régió) nemzetközi együttműködésben (Dr. Olivier Hanotte, ILRI, Kenya) vizsgáltam.

3.1.1. Mintagyűjtés és szekvenálás

A mintavétel összesen 90 állat (10 egyed/populáció) szárnyvénájából történt, melyeket Whatman FTA szűrőpapíron szárítottam be. A DNS izolálás az FTA kártyákat gyártó cég instrukciói alapján történt (http://www.whatman.com/FTAElute.aspx) (ILRI = International Livestock Research Institute). A kísérlet során a tyúk mitokondriális genom hipervariábilis D-loop régiója 530 bp hosszú szakaszát analizáltam a GONGORA és munkatársai által 2008-ban leírtakkal megegyezően, mind a PCR reakció körülményeit, mind pedig a szekvenálást, illetve az alkalmazott primereket tekintve.

3.1.2. Genetikai variabilitás és network analízis

A genetikai diverzitást leíró statisztikákat (hasító helyek (*S*) és haplotípusok (*Ht*) száma, haplotípus (*Hd*) és nukleotid (π) diverzitás) az Arlequin 3.11 szoftverrel végeztem el (EXCOFFIER et al. 2005).

A magyar mintákban előforduló haplotípusok kapcsolatát "median-joining" hálózattal (Network 4.1.1.2 szoftver; BANDELT et al. 1999) 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 mtDNS referencia szekvenciákat, melyek jól reprezentálják a különböző domesztikált tyúkfajták haplocsoportjait. Az összehasonlításhoz használt 9 referencia haplotípus: *LIUA1 (AB114069), LIUB1 (AB007744), LIUC1 (AB114070), LIUD1 (AY588636), LIUE1 (AB114076), LIUF1 (AF512285), LIUG1 (AF512288), LIUH1 (D82904), LIUI1 (AB009434)* (LIU et al. 2006). A szoftver használati utasításának megfelelően, a transzverziók háromszoros (*HIC8*), míg az inszerciók és a deléciók (*LIUC1*) kétszeres súlyozással vettek részt az értékelésben a tranzíciókhoz képest.

Az NCBI génbankban (ALTSCHUL et al. 1990, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) található összes valamely haplotípushoz annotált D-loop szekvenciát letöltöttem és ehhez hasonlítottam a magyar állományokban azonosított haplotípusokat. A szekvenciákat a Geneious 5.3 programban illesztettem (DRUMMOND et al. 2010).

3.2. Őshonos tyúkfajtáink genetikai diverzitásának vizsgálata mikroszatellit markerekkel

3.2.1. Mintavétel és DNS izolálás

Populációnként 30-30 (20 tojó, 10 kakas) állat szárnyvénájából gyűjtöttem vérmintát antikoaguláns hozzáadásával, a vér és a Na-citrát aránya 1:1 volt. Összesen 270 egyedből izoláltam DNS-t a hagyományos kisózásos módszerrel (MILLER et al. 1988), melyet az alábbiak szerint módosítottam a tyúk fajra. A vérmintákat felszuszpendáltam 1 ml sejt lízis pufferben (*0.15M* NH_4Cl*, 0.01M* $KHCO_3$*, 1mM EDTA, pH 7.4*), majd centrifugálást követően 300 µl mag lízis pufferben (*1M Tris-HCl, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, pH 8.2*) inkubáltam 10%-os SDS hozzáadásával. Ezután 100 µl túltelített *NaCl* oldatot adagoltam minden csőhöz, majd vortexelés és centrifugálás után, 300 µl izopropanolban csaptam ki a DNS-eket. A mosáshoz 500 µl 70%-os etanolt használtam, majd beszárítás után 37°C-on, 60 µl desztillált vízben oldottam vissza az örökítő anyagot, végül -20°C-on fagyasztva tároltam. Felhasználás előtt a DNS-ek mennyiségét és minőségét spektrofotométerrel mértem, majd 20 ng/µl koncentrációra egalizáltam.

3.2.2. Genotipizálás

Az egyedeket 29, az AVIANDIV projektből kiválasztott mikroszatellit markerrel genotipizáltam. 28 ezek közül a markerek közül a FAO (2004) által javasolt 30 mikroszatellit markert tartalmazó listából való, melyeket a tyúk faj genetikai diverzitásának vizsgálatára használnak. Míg az általam alkalmazott MCW0080-as lókusz nincsen a FAO által javasolt listán, az azon lévő MCW0284 és LEI0192 lókuszokat nem vettem bele kísérletbe a könnyebb multiplexálhatóság érdekében. Így jött ki tehát a 29 mikroszatellitből álló markerkészlet (2. sz. melléklet).

A DNS-t hét multiplex PCR reakcióban amplifikáltam fel az AVIANDIV projekt honlapján (http://aviandiv.tzv.fal.de/primer_table.html, WEIGEND et al. 1998-2000) megtalálható primer tapadási hőmérsékleteknek megfelelően.

A PCR termékeket fluoreszcens festékkel (IRD700 és IRD800) megjelölt primerekkel generáltam, és 8%-os poliakrilamid (akrilamid:biszakrilamid 19:1) gélen, LICOR LongReadIR 4200 félautomata DNS szekvenátor (LICOR Biotechnology Division, Lincoln, Nebraska, USA) segítségével detektáltam. Az elektroforegram és allélméretek meghatározása az RFLP scan szoftverrel (Scanalytics, Billerice, USA), standard alléllétrák használatával történt.

3.2.3. Mikroszatellit markerek információ tartalmának (PIC) meghatározása

A PIC (**P**olymorphic **I**nformation **C**ontent) értékek jelzik markereink hasznosságát, azaz azt, hogy mennyire informatív egy lókusz. Meghatározása a következő képlet szerint történt:

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

n = allélok száma; p_i = i allél gyakorisága; p_j = j allél gyakorisága

A PIC értéke függ a detektálható allélok számától, azok gyakoriságának eloszlásától, és számol a különböző markerek esetleges kapcsoltságával is. BOTSTEIN (1980) leírása alapján a marker nagyon informatív, ha PIC > 0,50; meglehetősen informatív, ha 0,25 < PIC < 0,50 és kevéssé informatív, és ha PIC < 0,25. A PIC értékeket a Microsatellite Toolkit program (PARK S. D. E. 2001) használatával számoltam ki.

3.2.4. Populáción belüli és azok közötti genetikai diverzitás felmérése

3.2.4.1. Általános diverzitásmutatók

Populáción belüli genetikai diverzitás mérése céljából a Microsatellite Toolkit program (PARK S.D.E. 2001) segítségével meghatároztam az allélfrekvenciákat, az allélszámok átlagát (MNA), a várt (H_E) és tényleges (H_O) heterozigozitást. A várt (H_E) és tényleges (H_O) heterozigozitás értékeket nemcsak állományokra, hanem lókuszokra nézve is kiszámoltam, hogy információt nyerjek azok heterogenitásáról.

3.2.4.2. F-statisztika és genetikai távolság

Az F statisztika értékei F_{IT}, F_{ST} és F_{IS}, fixációs indexekből állnak, melyekkel megbecsülhető a strukturált populációk differenciáltsága. Az F_{IT} a teljes állományra vonatkozó változatosság, az F_{ST} az állományok közötti változatosság, az F_{IS} pedig a populáción belüli, egyedek közötti változatosság, beltenyésztettségi koefficiensként is emlegetik. Az értékekkel a heterozigóta veszteség határozható meg (HARTL és CLARK 1989).

Az F_{ST} a szubpopulációk genetikai differenciájának tekinthető. Ha értéke 0,05-nél kevesebb, a differenciáltságot csekély mértékűnek ítélhetjük, 0,05 – 0,15 között enyhe, 0,15 – 0,25 közé eső értékek nagymértékű, végül a 0,25 feletti F_{ST} értékek igen nagymértékű izolációra, fajon belüli fragmentálódásra utalnak (WRIGHT 1978, HARTL és CLARK 1989).

Az F_{IT} és F_{IS} értékek alkalmasak a Hardy-Weinberg Egyensúlytól (HWE) való eltérés meghatározására a szubpopuláción és teljes állományon belül. Amennyiben pozitív értéket kapunk, akkor az a heterozigóta egyedek hiányára, ha negatív értéket, az heterozigóta többletre utal (HEDRICK 2000).

A lókuszokra és populációkra vonatkozó fixációs indexeket (F_{IT}, F_{ST}, F_{IS}) (WEIR és COCKERHAM 1984), valamint azok szórásait és a szignifikancia szinteket az FSTAT szoftver (GOUDET 2001) használatával számoltam ki. Ezt követően a kapott értékeket összehasonlítottam 9 kereskedelmi és 9 európai helyi fajtáéival (2. táblázat).

Az egyes magyar populációkat páronként (F_{ST}) is összehasonlítottam a GENEPOP szoftver (RAYMOND és ROUSSET 1995) alkalmazásával.

Ebből aztán könnyedén meg tudtam határozni a REYNOLDS (1983) féle genetikai távolságokat is az alábbi képlettel:

$$D_R = -LN/1-F_{ST}$$

Az adatok szemléletessé tétele céljából a PHYLIP programmal (FELSENSTEIN 1993) Neighbour-Joining dendrogramot készítettem. Ennek a jelentősége abban áll, hogy a későbbiekben is alkalmaztam a PHYLIP programot más jellegű adatokból való dendrogram felállítására, és az azonos szoftverrel készített filogenetikai fák jobban összevethetőek egymással.

3.2.5. Klaszteranalízis

Őshonos tyúkfajtáink osztályozását a STRUCTURE szoftverrel (PRITCHARD et al. 2000) végeztem el (admixture model). Az analízis lényege, hogy az egyedek allél mintázatait hasonlítja össze páronként 50.000 iterációban, és sorolja a genotípusokat azonos, illetve különböző csoportokba mindenféle előfeltételezés nélkül. Ehhez a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) módszert alkalmazza a program, amely olyan Markov láncot (valószínűségi változók sorozata, melyek minden tagjának valószínűsége csak az előtte lévőtől függ) generál, amely konvergál a kívánt eloszláshoz. A konvergenciát gyorsítja, ha a kezdő állapot valószínűsége a kívánt eloszlásban nagy, így egy ún. burn-in fázis után vesszük a mintákat. Jelen vizsgálatban 20000 burn-in lépést és 50000 iterációt állítottam be Granevitze 2009-ben leírt STRUCTURE beállítások tesztelési eredményei alapján.

A K-értékek jelentik a csoportok számát, melyeket én határoztam meg, jelen esetben $2 \leq K \leq 9$. Minden egyes K-értéknél 100 futást indítottam, melyeket páronként összevetettem hasonlósági indexeik alapján a SIMCOEFF program segítségével (ROSENBERG et al. 2002). Azok a futások, melyek hasonlósági indexe 0,95 felett van, azonosnak tekinthetők, ezek a leggyakrabban előforduló megoldások.

Az EVANNO módszert alkalmaztam a legvalószínűbb csoportosítás meghatározására, mely a STRUCTURE által generált valószínűségi értékeken alapuló delta K érték számítását jelenti (EVANNO et al. 2005), és a DISTRUCT szoftverrel vizualizáltam azt (ROSENBERG 2004).

3.2.6. Marker Estimated Kinship (MEK)

A rokonsági kapcsolatok vizsgálatára az úgynevezett Marker Estimated Kinship (MEK) módszert alkalmaztam.

A populáción belüli és azok közötti rokonsági értékek kalkulációját EDING és MEUWISSEN (2001) számításai alapján végeztem el a MEKSAFE32 programmal. A WEDS (Weighted Equal Drift Similarity) index (OLIEHOEK et al. 2006) segítségével korrigáltam az allélokat (IBS = identical by state, 1000 bootstrap). A kapott MEK mátrixot rokonsági távolságokká ($D(i, j)$) konvertáltam az alábbi képletet használva:

$$D(i,j) = \hat{f}_{ii} + \hat{f}_{jj} - 2\hat{f}_{ij}$$

ahol $\hat{f}_{ii}$ és $\hat{f}_{jj}$ i és j populáción belüli rokonságát, $\hat{f}_{ij}$ pedig i és j populációk közötti rokonságát jelenti (MATEUS et al. 2004).

Az értékeket kontúrábrázolással (Excel) és dendrogramon (PHYLIP szoftver, FELSENSTEIN 1993) is szemléltettem, 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 (GRANEVITZE et al. 2007, 2. táblázat). A MEK távolságokat használva (már a 27 állományra vonatkozóan), a magyar populációk, a kereskedelmi vonalak és az európai helyi fajták közötti rokonságot egy filogenetikai hálózattal (network fa) szemléltettem a SPLITSTREE szoftver segítségével (HUDSON és BRYANT 2006).

3.2.7. A magyar őshonos tyúkfajták relatív genetikai diverzitása

Az egyes magyar populációk relatív fontosságát, azaz azt, hogy egy-egy magyar fajta milyen mértékben járul hozzá a teljes, 9 magyar őshonos állomány genetikai diverzitásához, „*core set*” analízissel, egyediségének mértékét a kereskedelmi és európai őshonos állományokhoz viszonyítva „*safe set*” analízissel határoztam meg. Az analízisek elvégzésére a MEKSAFE32 szoftvert alkalmaztam, melybe programozva vannak azok a számítások (THAON D’ ARNOLDI et al. 1998, EDING et al. 2002), melyekkel egy adott populáció összdiverzitása kalkulálható rokonsági értékek (MEK) alapján. Ezekkel az elemzésekkel tehát egy populáció relatív genetikai diverzitását, fontosságát, egyediségét lehet számszerűsíteni.

A core set analízis során arra kerestem a választ, hogy a kilenc magyar tyúkállomány – jelen esetben ez a core szett – összdiverzitásának kialakításában milyen mértékben vesznek részt az azt alkotó egyes magyar populációk.

A safe set analízis esetében két különböző szettet (safe set) alakítottam ki, egyet a kilenc kereskedelmi, egyet pedig a kilenc más európai őshonos állományból (2. táblázat). Azt vizsgáltam, hogy a számunkra kitüntetett fajták – jelen esetben a kereskedelmi, illetve az európai őshonosok – összdiverzitásához milyen mértékben járulnak hozzá az egyes magyar populációk, melyek tehát nem képezik részét a safe szetteknek.

3.3. Őshonos tyúkfajtáink genetikai diverzitásának vizsgálata pontmutációk alapján

3.3.1. Vizsgálni kívánt gének kiválasztása

A pontmutációk vizsgálatakor igyekeztem olyan géneket választani, melyek irodalmi adatok alapján nagy változatosságot mutatnak, és fontos biológiai funkciókat töltenek be. Az egyik ilyen, a HSP90 fehérjét kódoló gén, melyet a citoplazma legnagyobb mennyiségben előforduló stressz fehérjéjeként tartanak számon, s mint ilyen, a citoplazma összfehérje mennyiségének akár 1 – 3 % -át is kiteheti. Szerepe a károsodott fehérjék megkötése, ám a többi fehérjével ellentétben nem egy, hanem több kötőhelyet tartalmaz, így emellett peptideket, RNS – és más nukleotid darabkákat is képes megkötni (CSERMELY et al. 1998).

A másik két gén egy korábbi tanulmány alapján került kiválasztásra, amikor is génekben vagy azokhoz közel elhelyezkedő 25 SNP alapján vizsgáltak meg 20 tyúkfajtát (TWITO et al. 2007). Mindkét gén vizsgált mutációja kódoló régióban van, de nem okoz aminosav cserét, szinonim SNP-ről van szó.

Az egyik a *Gallus gallus* PIT54 nevezetű génje (NCBI génbanki azonosító: BAB39761.1), mely specifikus a madarak osztályára, és a szabad hemoglobin kötéséért felelős haptoglobin funkcióját látja el (IWASAKI et al. 2001).

A másik a GHRL (ghrelin) gén (NCBI génbanki azonosító: D10484.1), mely egy növekedési hormon kiválasztását elősegítő fehérjét kódol (TANAKA et al. 1992), és SNP lókuszai több fontos, táplálkozással, növekedéssel összefüggő mennyiségi/minőségi tulajdonsággal mutatott kapcsolatot.

A leírt eredmények alapján a vizsgált 20 tyúkfajtában ez a két gén mutatott a legnagyobb polimorfizmust, ez indokolja azok kiválasztását.

3.3.2. SNP meghatározás menete

A rendelkezésre álló pénzügyi és technikai viszonyokat tekintve a legnagyobb teljesítményű direkt szekvenálást választottam a vizsgálatok eszközéül, melyet a BIOMI Kft. végzett el.

A szekvenáláshoz összeállítottam egy 96 mintából álló panelt, amely 8-8 DNS-t tartalmazott a kilenc őshonos tyúkfajtából (korábbi vizsgálatokban is résztvevő egyedek), valamint összehasonlítás gyanánt két fehér brojler (HH1, HH2) és egy barna tojó hibrid (TH) állomány mintáit is tartalmazta ugyanakkora számban. Az egyes ivarokat 4-4 állat képviselte.

A kiválasztott gének polimorfizmust mutató szakaszaira specifikus primereket terveztem a Geneious 5.3 szoftverrel (DRUMMOND et al. 2010), szekvenciáit, a PCR során alkalmazott tapadási hőmérsékleteket, és az amplifikált fragment hosszát a 3. táblázat tartalmazza:

3. táblázat: SNP detektálás során használt primerek

Gén	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Tm (°C)	Termék mérete (bp)
HSP90	TTGCACACCCAGCTACTTCT	GACCACCCAATTGTGGAAAC	60	517
PIT54	CTTCTCCATATTTTGACTTCTTG	AGATGGACTTCTGGTCATATAAA	60	398
GHRL	GGTGTGTATTTTTCACTCCTGCT	TCTTCTCCAGTGCTTGTCCA	63	540

A PCR reakciót 15 µl végtérfogatban (4. táblázat), az alábbi reakciókörülményekkel hajtottam végre: 4 perc 95°C denaturálás, majd ezt 30 cikluson keresztül követett 15 másodperc 95°C, 15 másodperc a megfelelő primerek tapadási hőmérsékletével (3. táblázat) és 2 perc 72°C. Az utolsó ciklus után egy 72°C, 9 perces elongáció zárta le a protokollt.

4. táblázat: A reakcióelegy összetétele

Desztillált víz	7,7 µL
Mg^{++} Dyna puffer (10x)	1,5 µL
Primer F (5µM)	1,5 µL
Primer R (5µM)	1,5 µL
dNTP mix (2µM)	1,5 µL
Dyna Taq polimeráz (2 U/µL)	0,3 µL
Genomi DNS (20 ng/µL)	1 µL

Ezt követően kerültek a minták szekvenálásra a megfelelő primerekkel (3. táblázat) a BIOMI Kft. jóvoltából. A kapott szekvenciákat a Geneious 5.3 programmal illesztettem, és kerestem meg a szekvenciák jól olvasható részeiben a pontmutációkat.

3.3.3. Az SNP analízis

A szekvenciák illesztését és az SNP-k meghatározását követően az adatokat a GDA szoftverrel (LEWIS és ZAYKIN 2001) elemeztem.

Meghatároztam a lókuszonkénti allélgyakoriságokat, az állományokra vonatkozó alap diverzitásértékeket, így a várt (H_E) és tényleges (H_O) heterozigozitást, valamint a populáción belüli beltenyésztettségi koefficienst (F_{IS}).

A populációk differenciáltságát a Wright féle fixációs indexekkel jellemeztem (GDA szoftver) mind a magyar, mind a kereskedelmi fajtákra nézve.

A populációk közötti Reynolds genetikai távolságok (D_R) GDA szoftverrel való számítását követően azokat kladogram formájában szemléltettem a SPLITSTREE (HUDSON és BRYANT 2006) program használatával.

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.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A mitokondriális DNS vizsgálatok eredményei

4.1.1. MtDNS D-loop variabilitás

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

A kilenc őshonos magyar tyúkállomány alapvető diverzitást jellemző paramétereit, valamint a haplotípusok számát és azok eloszlását az 5. táblázat tartalmazza. 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 (n=8) azonos – a teljes populációban leggyakoribb – haplotípusba (*HIC1*) 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* haplotípus a fehér erdélyi kopasznyakú kivételével minden kopasznyakú fajtában mutatkozott.

5. táblázat: A kilenc magyar állomány mtDNS diverzitás indexei és a haplotípus előfordulások (*HIC1-HIC11*)

Populáció	**N**	**S**	**Ht**	**Hd**	**π**	***HIC1***	***HIC2***	***HIC3***	***HIC4***	***HIC5***	***HIC6***	***HIC7***	***HIC8***	***HIC9***	***HIC10***	***HIC11***
SM_G	6	1	2	0,533	0,0010	4							2			
SM_M	10	2	4	0,733	0,0017	2					1	2	5			
FM_G	9	9	2	0,222	0,0038	8										1
EKFEH_G	8	0	**1**	0,000	0,0000	8										
EKK_G	9	4	**5**	0,833	0,0022	3	3	1	1					1		
EKK_H	8	9	3	0,464	0,0046	6			1							1
EKFEK_G	8	8	3	0,464	0,0041	6			1						1	
KM_G	10	10	3	0,688	0,0086	5				2						3
KM_H	6	9	2	0,533	0,0091	2										4
	74	**17**	**11**	**0,626**	**0,0049**	**44**	**3**	**1**	**3**	**2**	**1**	**2**	**7**	**1**	**1**	**9**

N = Szekvenciák száma; **S** = Polimorf lókuszok száma; **Ht** = Haplotípusok száma; **Hd** = Haplotípus diverzitás; **π** = Nukleotid diverzitás

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*) (LIU et al. 2006).

A leggyakrabban előforduló *HIC1* haplotípust alapul véve a szekvenciákban talált különbségeket mutatja a 6. táblázat.

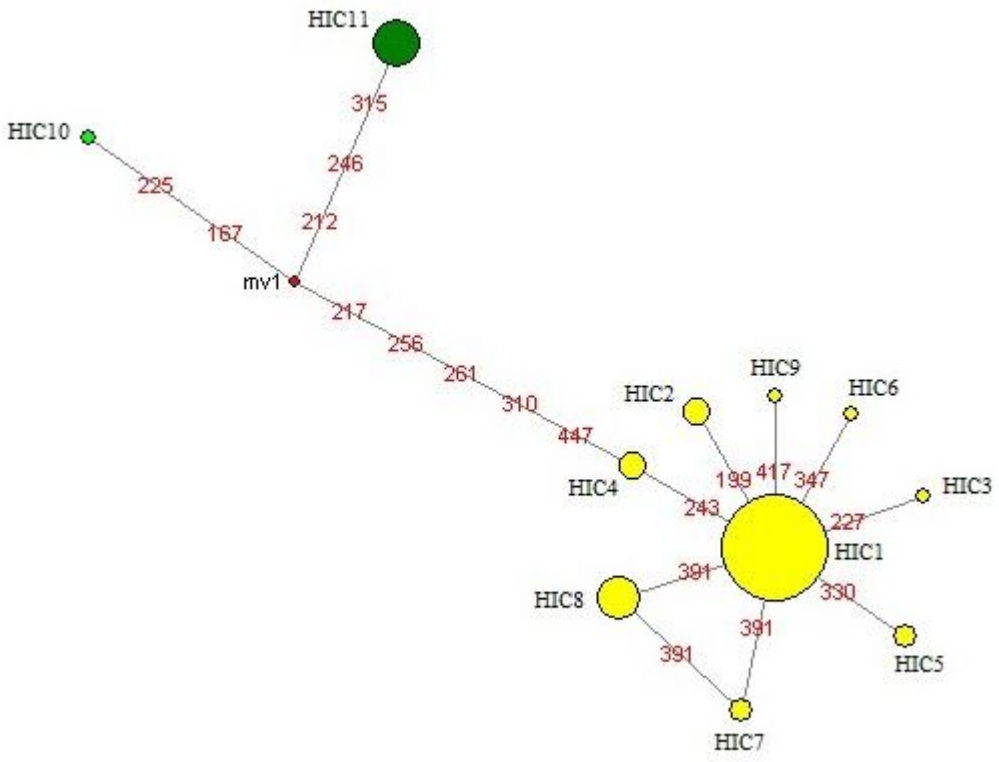
6. táblázat: A különböző haplotípusok szerkezete

Nukleotid pozíció (bp)	**167**	**199**	**212**	**217**	**225**	**227**	**243**	**246**	**256**	**261**	**310**	**315**	**330**	**347**	**391**	**417**	**447**
HIC1	T	T	G	C	C	C	C	C	C	T	T	C	C	A	C	C	T
HIC2	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
HIC3	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
HIC4	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
HIC5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
HIC6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
HIC7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
HIC8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
HIC9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
HIC10	C	.	.	T	T	.	T	.	T	C	C	.	.	.	.	.	C
HIC11	.	.	A	T	.	.	T	T	T	C	C	T	.	.	.	.	C

A különböző színek a három különböző azonosított haplocsoportot jelölik.

4.1.2. Median-Joining Network analízis

A magyar mintákban előforduló haplotípusok kapcsolatának median-joining hálózattal való vizsgálata során (7. ábra) 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 utóbbit csillagszerűen veszi körbe az azonos haplocsoportba tartozó 8 kisebb reprezentáltságú haplotípus egy-egy mutációs különbséggel, ami azok kialakulásának eredetét mutatja. A három csoportot egy feltételezett, a mintáinkban elő nem forduló haplotípus kapcsolja össze (mv1). Ez lehet a viszonylag kevés vizsgált mintaszám okozta torzulás, vagy utalhat a populációkból mára eltűnt haplotípusra.

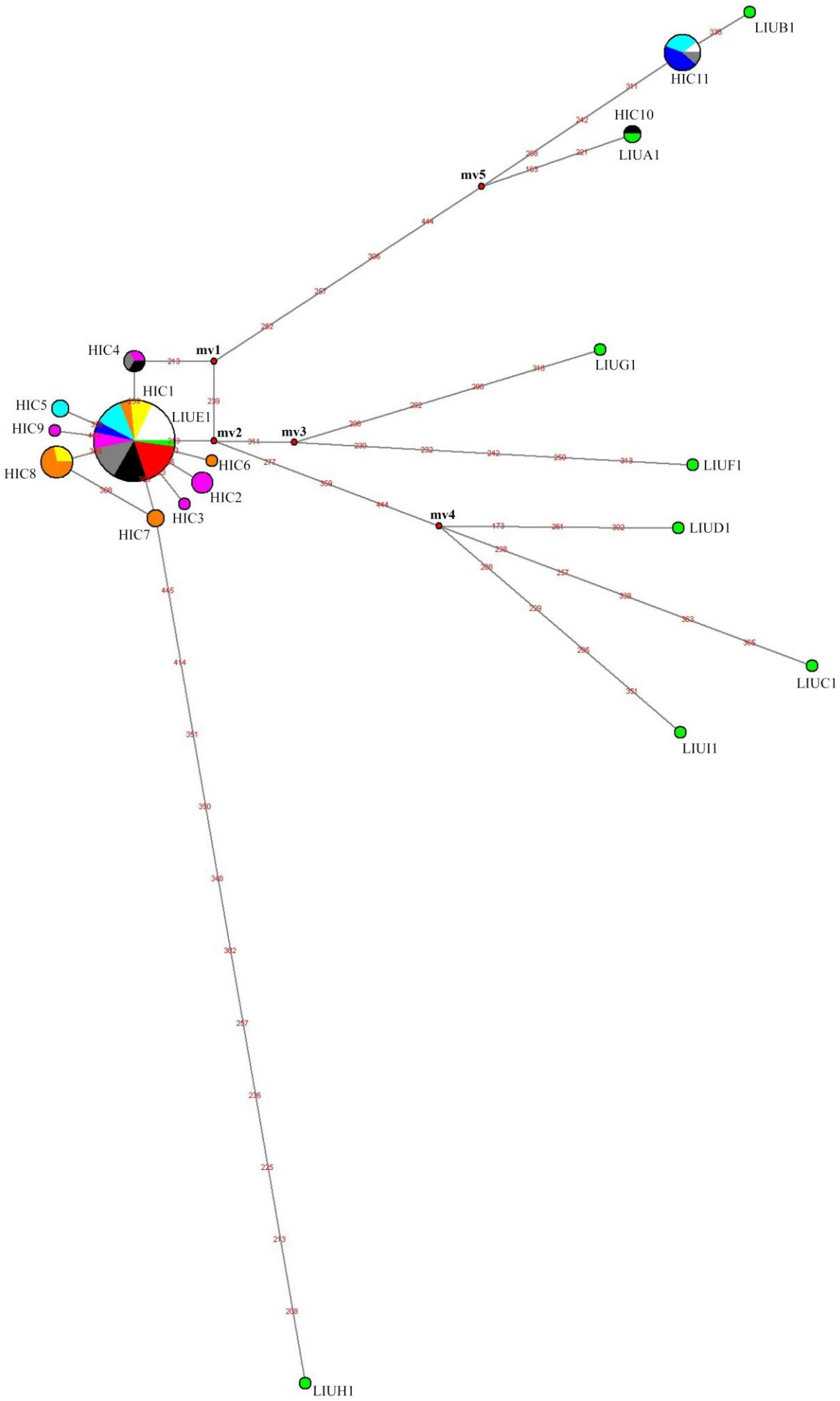


7. ábra: A magyar haplotípusok egymáshoz való viszonya (median-joining hálózat)

A körök mérete arányos a haplotípust alkotó egyedek számával, a különböző színek a különböző haplocsoportokat mutatják. mv1 = median vektor: a magyar mintákban nem előforduló, de valószínűleg létező haplotípus, mely összekapcsolja a három magyar haplocsoportot. A pirossal jelzett számok a mutációk pozícióira utalnak (lsd. 6. táblázat).

A magyar őshonos állományok haplotípusait összevetve referencia szekvenciákkal (LIU et al. 2006) azt tapasztaltam, hogy azok három, már korábban leírt referencia szekvencia köré csoportosulnak: *LIUA1*, *LIUB1* és *LIUE1* (8. ábra). 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 8. ábrán tisztán látszik, hogy a *HIC10* és *HIC11* a sok mutációnak köszönhetően világosan elkülönülnek a fő haplotípustól (*HIC1*), melyet ugyancsak csillagszerűen vesz körbe csupán 1 bp eltéréssel a többi magyar haplotípus.

A *HIC10* és *HIC11* haplotípusokat újra összevetettem az NCBI génbankban található D-loop szekvenciákkal, és 100% egyezést mutattak a Délkelet-Ázsiából származó haplotípusokkal, melyeket már többen leírtak (MIYAKE 1997, KOMIYAMA et al. 2003, HARUMI et al. 2004, OKA et al. 2007, GONGORA et al. 2008, SILVA et al. 2009).


LIUB1
HIC11
HIC10
LIUA1
mv5
HIC4
mv1
LIUG1
HIC1
HIC5
LIUE1
HIC9
mv2
mv3
HIC8
HIC6
LIUF1
HIC2
HIC3
HIC7
mv4
LIUD1
LIUC1
LIUI1
LIUH1

8. ábra: A 11 magyar őshonos, illetve a 9 referencia szekvencia (LIU et al. 2006) összehasonlítása median-joining hálózattal (ε = 0), a mtDNS D-loop régiójának variábilis helyei alapján.

A körök mérete arányos a haplotípust alkotó egyedek számával, a különböző színek az egyes populációkat jelölik, kivéve a referencia szekvenciákat, melyek zöld színe a haplocsoportot mutatja.

A network szoftver által generált median vektor (mv1, mv2, mv3, mv4, mv5) mutatja azon "köztes" haplotípusokat, melyek nem voltak jelen a vizsgált mintákban, viszont valószínűleg léteznek. A hálózat csomópontjain elhelyezkedő számok a nukleotid mutációk pozícióira utalnak.

Színkódok: zöld = referencia szekvenciák (*LIUA1-LIUI1*, LIU et al. 2006), citromsárga = sárga magyar Gödöllő, narancssárga = sárga magyar Mosonmagyaróvár, fehér = fehér magyar Gödöllő, piros = fehér erdélyi kopasznyakú Gödöllő, ciklámen = kendermagos erdélyi kopasznyakú Gödöllő, szürke = kendermagos erdélyi kopasznyakú Hódmezővásárhely, fekete = fekete erdélyi kopasznyakú Gödöllő, világoskék = kendermagos magyar Gödöllő, sötétkék = kendermagos magyar Hódmezővásárhely

4.2. A mikroszatellit alapú populációgenetikai vizsgálatok eredményei

4.2.1. A vizsgálatban résztvevő mikroszatellit markerek polimorfizmusa

Az összes általam használt marker nagymértékű polimorfizmust (PIC átlag = 0,59) mutatott (7. táblázat), az *MCW0098* a legkevésbé, és a *LEI0234* a leginkább polimorf markerek.

A heterozigozitás értékek megmutatják, hogy az allélfrekvenciákból számolva a Hardy – Weinberg szabály figyelembe vételével mennyi a heterozigóták aránya.

Az allélok száma 2 és 14 között változott, ezzel egyenesen arányosan a várt és tényleges heterozigozitás, valamint a PIC értékei.

7. táblázat: Az egyes lókuszok heterozigozitására és információ tartalmára vonatkozó eredmények a 9 magyar őshonos tyúkállományra (270 egyed) vetítve

Lókusz	**Allélméret (bp)**	**Allélok száma**	**H_E**	**H_O**	**PIC**
MCW0103	266-270	2	0,45	0,43	0,35
MCW0295	90-106	6	0,66	0,53	0,59
MCW0222	220-226	4	0,54	0,50	0,50
ADL0268	104-118	7	0,70	0,59	0,65
MCW0183	296-322	8	0,80	0,57	0,77
MCW0014	164-178	6	0,47	0,31	0,41
MCW0067	178-184	4	0,67	0,61	0,59
MCW0098	263-265	**2**	**0,37**	**0,30**	**0,30**
LEI0166	356-366	3	0,50	0,42	0,44
MCW0069	158-176	7	0,63	0,50	0,60
MCW0081	114-135	7	0,65	0,50	0,60
ADL0112	124-132	5	0,68	0,52	0,62
MCW0034	220-242	10	0,82	0,66	0,79
MCW0111	98-114	6	0,69	0,58	0,64
MCW0078	135-143	4	0,56	0,49	0,48
MCW0206	223-239	5	0,75	0,59	0,70
LEI0094	249-283	7	0,76	0,60	0,72
MCW0248	215-223	3	0,39	0,32	0,32
LEI0234	217-316	**14**	**0,87**	**0,74**	**0,85**
MCW0330	258-290	5	0,69	0,51	0,63
MCW0016	170-204	6	0,73	0,37	0,68
MCW0104	190-226	10	0,75	0,64	0,71
MCW0020	179-197	5	0,70	0,56	0,64
MCW0165	114-118	3	0,60	0,53	0,53
MCW0123	80-94	7	0,74	0,63	0,70
ADL0278	114-123	6	0,68	0,62	0,63
MCW0037	154-158	5	0,64	0,54	0,58
MCW0080	268-280	7	0,66	0,47	0,62
MCW0216	141-145	4	0,59	0,43	0,54
Átlag (szórás)		**5,79 (2,52)**	**0,65 (0,12)**	**0,52 (0,11)**	**0,59 (0,14)**

H_E és H_O = lókuszok heterogenitásának foka; PIC = lókuszok információ tartalmának számszerűsítése. Az allélméret a PCR termék méretét jelenti, ami magában foglalja a mikroszatellit ismétlődéseket is.

A munka során 5 lókuszon 6 privát, csak a magyar állományokban előforduló, unikális allélt találtam, melyeket a 8. táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat: Hazai tyúkfajtáink génkészletében talált privát allélok előfordulása populációnként és abszolút gyakoriságuk (%) a teljes állományra nézve

Lókusz	**Allélméret (bp)**	**Populáció**	**Allélok száma populációnként**	**Privát allélok gyakorisága (%)**
MCW0020	**197**	EKK_G	3	0,56
LEI0234	**217**	SM_G	1	4,85
		FM_G	12	
		KM_G	1	
		KM_H	1	
		EKK_G	5	
		EKK_H	6	
MCW0016	**204**	KM_G	4	1,67
		KM_H	4	
		EKK_G	1	
MCW0183	**297**	SM_M	10	1,85
	322	KM_G	6	1,30
		EKK_H	1	
ADL0278	**115**	FM_G	1	2,22
		SM_G	2	
		SM_M	1	
		KM_G	7	

4.2.2. Az őshonos magyar tyúkfajták genetikai diverzitása populáción belül és azok között

A populációkra vonatkozó leíró diverzitásmérőket tartalmazza a 9. táblázat. A magyar fajtákban összesen 168 allélt találtam a 29 mikroszatellit marker alapján. Az allélszámok átlaga 2,9 (EKFEH_G, EKFEK_G) és 4,2 (KM_H) között változott.

Ennek megfelelően alakultak a várt heterozigozitási értékek (H_E), melytől a tényleges heterozigozitás (H_O) értékei némileg eltértek, bár ez nem volt szignifikáns. Az F_{IS} (beltenyésztettségi koefficiens állományon belül) meglehetősen alacsony értékei is ezt támasztják alá.

A legmagasabb tényleges heterozigozitást a kendermagos erdélyi kopasznyakú hódmezővásárhelyi populációjánál mértem (0,58). A fehér erdélyi kopasznyakú esetében a tényleges heterozigozitás nagyobb volt a vártnál, a fekete erdélyi kopasznyakúnál pedig nem volt különbség.

9. táblázat: Az őshonos magyar tyúkfajták heterozigozitása és a beltenyésztettségi mutatója

Populáció	**Allélszámok átlaga**	**H_E**	**H_O**	**F_{IS}***
SM_G	3,1±1,16	0,50±0,036	0,51±0,017	-0,021
SM_M	3,1±1,09	0,50±0,034	0,50±0,017	0,001
FM_G	3,9±1,44	0,54±0,033	0,51±0,017	0,051
EKFEH_G	**2,9±0,84**	**0,49±0,032**	**0,51±0,017**	-0,039
EKK_G	3,2±1,18	0,54±0,029	0,53±0,017	0,016
EKK_H	3,7±1,55	0,55±0,032	**0,58±0,017**	-0,051
EKFEK_G	**2,9±0,96**	**0,44±0,033**	**0,44±0,017**	0,015
KM_G	3,8±1,21	0,55±0,033	0,54±0,017	0,031
KM_H	**4,2±1,56**	0,56±0,033	0,55±0,017	0,022

*$P > 0.05$ (nincs szignifikáns eltérés)

A heterozigóták többségének, avagy hiányának kimutatására alkalmazott F-statisztika eredményei (10. táblázat) azt mutatják, hogy mind lókuszonként az összes populációra nézve, mind pedig az összes lókuszra 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.

10. táblázat: A magyar őshonos tyúkfajták differenciáltsága és a fixációs indexek (F_{IT}, F_{ST}, F_{IS}) az egyes lókuszokra nézve

Lókusz	**F_{IT}** *(F)*	**F_{ST}** *(θ)*	**F_{IS}** *(f)*
MCW0103	0,057	0,051***	0,006
MCW0295	0,208***	0,160***	0,057
MCW0222	0,087*	0,124***	-0,042
ADL0268	0,174***	0,177***	-0,003
MCW0183	0,306***	0,266***	0,054
MCW0014	0,355***	0,324***	0,045
MCW0067	0,091*	0,144***	-0,062
MCW0098	0,214***	0,229***	-0,020
LEI0166	0,175***	0,158***	0,020
MCW0069	0,240***	0,257***	-0,024
MCW0081	0,254***	0,243***	0,014
ADL0112	0,254***	0,272***	-0,025
MCW0034	0,205***	0,203***	0,002
MCW0111	0,180***	0,162***	0,021
MCW0078	0,132**	0,191***	-0,072
MCW0206	0,229***	0,226***	0,005
LEI0094	0,238***	0,244***	-0,008
MCW0248	0,201***	0,191***	0,012
LEI0234	0,166***	0,191***	-0,032
MCW0330	0,288***	0,289***	-0,001
MCW0016	0,506***	0,264***	0,329***
MCW0104	0,163***	0,221***	-0,074
MCW0020	0,222***	0,236***	-0,019
MCW0165	0,128***	0,079***	0,054
MCW0123	0,173***	0,180***	-0,008
ADL0278	0,106**	0,168***	-0,075
MCW0037	0,170***	0,236***	-0,086
MCW0080	0,312***	0,288***	0,033
MCW0216	0,290***	0,296***	-0,008
Átlag (szórás)	**0,215***(0,017)**	**0,212***(0,011)**	**0,003(0,015)**

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

A páronkénti F_{ST} (11. táblázat, átló felett) értékeket, és az azokból számolt Reynolds féle genetikai távolságokat (11. táblázat, átló alatt) tekintve megállapítható, hogy legközelebb egymáshoz a két kendermagos magyar állomány volt. A legtávolabb a sárga magyar mosonmagyaróvári populációja és a fekete erdélyi kopasznyakú került egymástól (0,340).

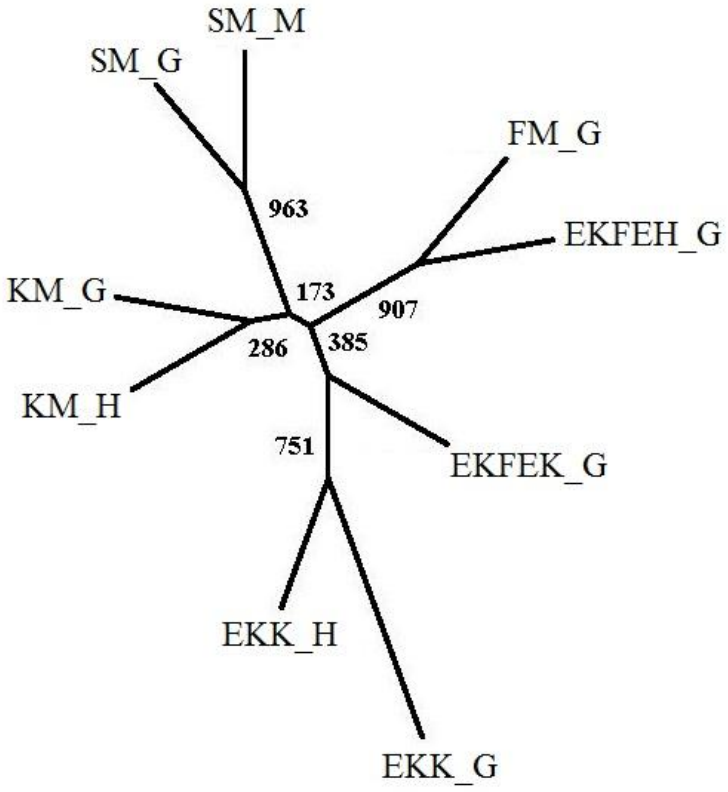
A párhuzamos állományok, azaz a két sárga magyar, valamint a fedett és kopasznyakú kendermagosok genetikai távolsága (páronkénti F_{ST} értékei is) viszonylag kicsi: 0,179, 0,149 és 0,127. Előfordulnak azonban esetek, amikor teljesen különböző fajtáknál kisebb genetikai távolságokat kaptam, mint az előbb említett, párhuzamos populációknál. Így például a fehér magyarnak a hódmezővásárhelyi kendermagos kopasznyakúhoz, vagy a kendermagos magyarhoz való viszonya, ahol az értékek 0,166 és 0,140.

11. táblázat: Páronkénti F_{ST} értékek (átló felett) és a Reynolds féle genetikai távolságok (átló alatt) a magyar tyúkfajták között

Populáció	**SM_G**	**SM_M**	**FM_G**	**EKFEH_G**	**EKK_G**	**EKK_H**	**EKFEK_G**	**KM_G**	**KM_H**
SM_G		0,164	0,250	0,257	0,265	0,201	0,284	0,221	0,173
SM_M	0,179		0,237	0,264	0,279	0,230	0,288	0,212	0,210
FM_G	0,288	0,270		0,150	0,212	0,153	0,268	0,174	0,131
EKFEH_G	0,297	0,306	0,162		0,263	0,213	0,258	0,237	0,174
EKK_G	0,308	0,327	0,238	0,305		0,139	0,227	0,211	0,190
EKK_H	0,224	0,261	0,166	0,240	0,149		0,228	0,178	0,131
EKFEK_G	0,333	**0,340**	0,312	0,299	0,258	0,258		0,214	0,187
KM_G	0,250	0,238	0,191	0,271	0,237	0,196	0,240		0,120
KM_H	0,189	0,235	0,140	0,191	0,210	0,140	0,207	**0,127**	

A genetikai távolságok (D_R) alapján felállított dendrogramon (9. ábra) is egyértelműen látszik a fentiekben leírt megállapítás, miszerint az azonos, de különböző tenyészetekből származó (párhuzamos) fajták viszonylag közel helyezkednek el egymáshoz.

A filogenetikus fa szépen mutatja azt is, hogy a fedett és kopasznyakú állományok világosan elkülönültek egymástól. Ezt csupán a fehér magyar és a fehér erdélyi kopasznyakú fajták feltűnő közelsége zavarja meg.



9. ábra: Reynolds féle genetikai távolságok alapján felállított dendrogram (1000 bootstrap) Az ábrán lévő számok a bootstrap értékek.

4.2.3. Rokonsági kapcsolatok vizsgálata MEK módszerrel

A kilenc magyar helyi fajta rokonsági értékeit (MEK) a 12. táblázatban foglaltam össze. Legkisebb hasonlóságot a kendermagos erdélyi kopasznyakú és a sárga magyar gödöllői populációi között, a legnagyobbat pedig a fedett és kopasznyakú fehér fajták között kaptam. Utóbbitól nem sokban tér el a két sárga magyar állomány közötti rokonsági érték sem (0,232).

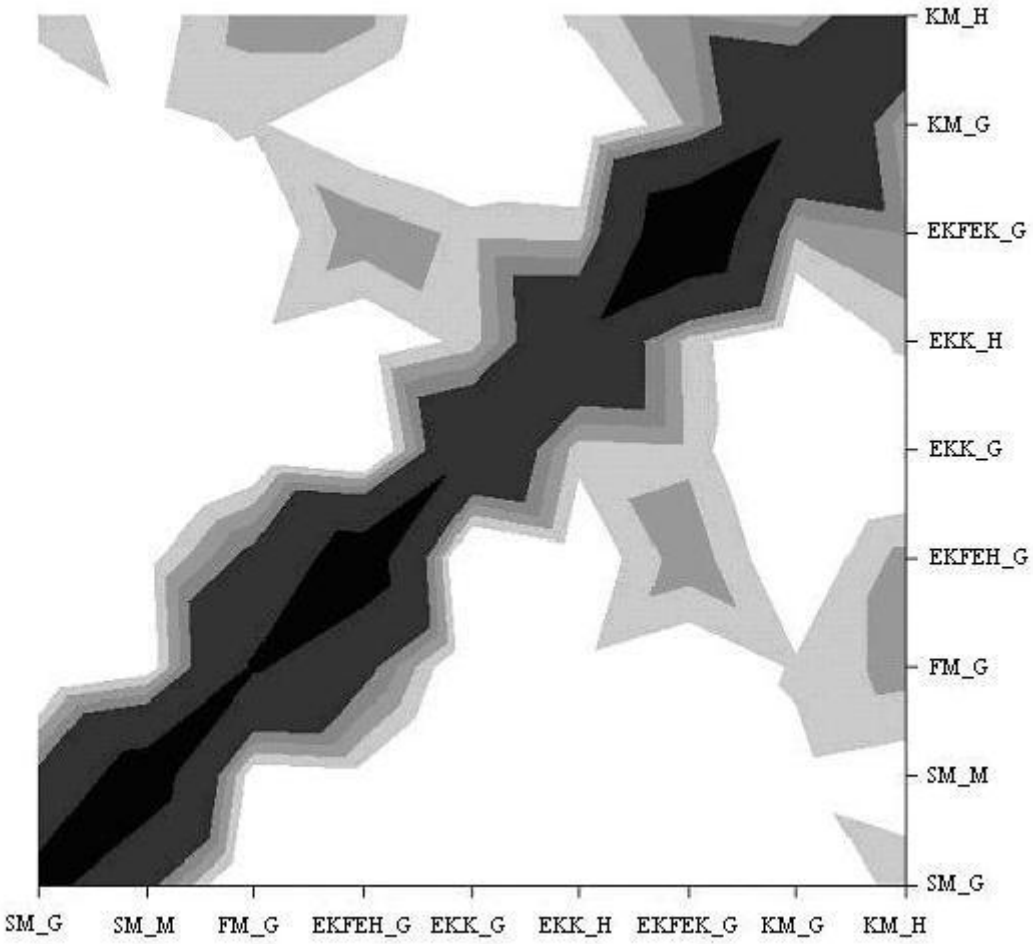
Az állományok közötti rokonsági fok (0,77-0,235) minden esetben alacsonyabbnak bizonyult az állományon belülinél (0,285-0,427; 12. táblázat, átló), ami tulajdonképpen egy beltenyésztettségi mutatóként is felfogható. Ez alapján a leginkább beltenyésztett populációk a fekete (0,427) és fehér (0,385) erdélyi kopasznyakú fajták.

12. táblázat: Őshonos magyar tyúkfajtáink rokonsági értékei (MEK)

Populáció	**SM_G**	**SM_M**	**FM_G**	**EKFEH_G**	**EKK_G**	**EKK_H**	**EKFEK_G**	**KM_G**	**KM_H**
SM_G	**0,353**								
SM_M	**0,232**	**0,381**							
FM_G	0,106	0,140	**0,329**						
EKFEH_G	0,144	0,149	**0,235**	**0,385**					
EKK_G	**0,077**	0,078	0,124	0,103	**0,301**				
EKK_H	0,143	0,114	0,154	0,138	0,168	**0,294**			
EKFEK_G	0,143	0,145	0,136	0,194	0,175	0,171	**0,427**		
KM_G	0,126	0,154	0,163	0,136	0,107	0,122	0,182	**0,304**	
KM_H	0,172	0,145	0,190	0,189	0,120	0,167	0,201	0,186	**0,285**

Az átlóban feltűntetett értékek az állományon belüli hasonlóságot, az átló alatti értékek az állományok közötti rokonságot jelentik.

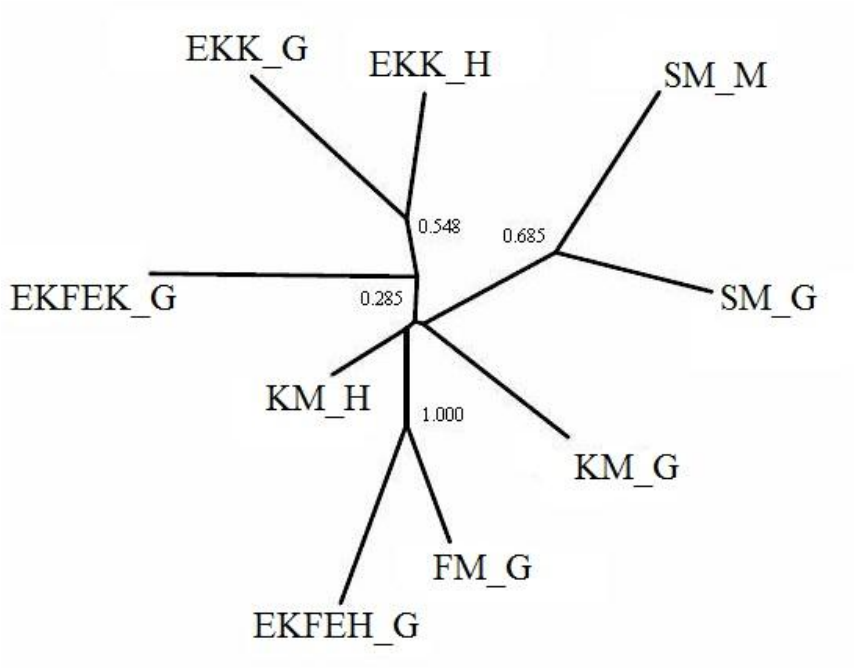
A kapott eredményeket a kontúrábrázolás (10. ábra) is nagyon jól mutatja, a sötét szín nagyobb rokonságot jelent a populációk között, ahogy világosodik a szín, úgy azok egyre távolabb vannak egymástól. Az átló jelzi az állományon belüli rokonságot, azaz a beltenyésztettséget.



10. ábra: Rokonsági értékek (MEK) kontúrábrázolása

Az ábra átló feletti és alatti részei tulajdonképpen egymás tükörképei, csupán a könnyebb leolvasást segítik. Minél sötétebb a szín, annál nagyobb a rokonság két állomány között, ahogy világosodik, úgy egyre kevésbé rokon populációkról van szó.

A rokonsági értékek (12. táblázat) alapján elkészített dendrogramon (11. ábra) jól látható, hogy a fedett és kopasznyakú állományok azonos színváltozatai világosan elkülönültek egymástól. A kendermagos magyar hódmezővásárhelyi populációja némi zavart kelt ebben a képben azzal, hogy a kopasznyakúak közé ékelődött. A két fehér állomány ismét meglehetősen közel került egymáshoz.



11. ábra: Rokonsági értékek alapján felállított filogenetikus fa (1000 bootstrap)
Az ábrán feltüntetett számok jelzik a bootstrap értékeket.

4.2.4. A tyúkfajták klaszteranalízise

Tyúkfajtáink STRUCTURE programmal való osztályozása (12. ábra) során azt tapasztaltam, hogy a két sárga magyar populáció már a legalacsonyabb csoportosításnál (K=2) elvált a többitől és az analízis végéig együtt maradtak.

A következőkben (K=3) a fedett és kopasznyakú fehér állomány határolódott el a többitől, a kendermagos magyar tenyészetek pedig a kopasznyakúakkal maradtak (kivéve EKFEH_G).

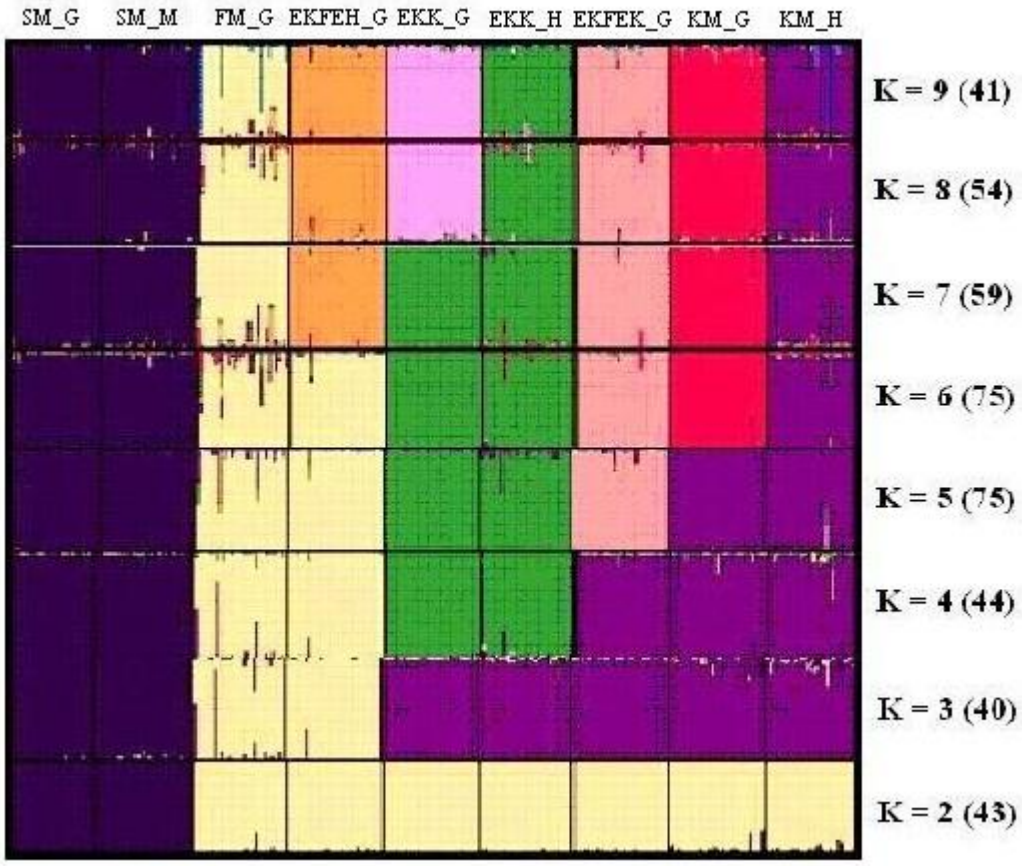
K=4 esetén a két kendermagos kopasznyakú populáció alkotott egy újabb csoportot, melyet a zöld szín megjelenése jelez.

Hogy 100 futásból hányszor kaptam ugyanazt a megoldást, azt a K-értékek utáni zárójeles szám jelzi. Ez legmagasabb a K=5 és K=6 esetén lett (n=75). Először (K=5) a fekete erdélyi

kopasznyakú különült el egyedülálló állományként, majd (K=6) a két kendermagos magyar vált szét egymástól.

K=7-nél a két fehér, K=8-nál pedig a két kendermagos kopasznyakú populáció különült el egymástól.

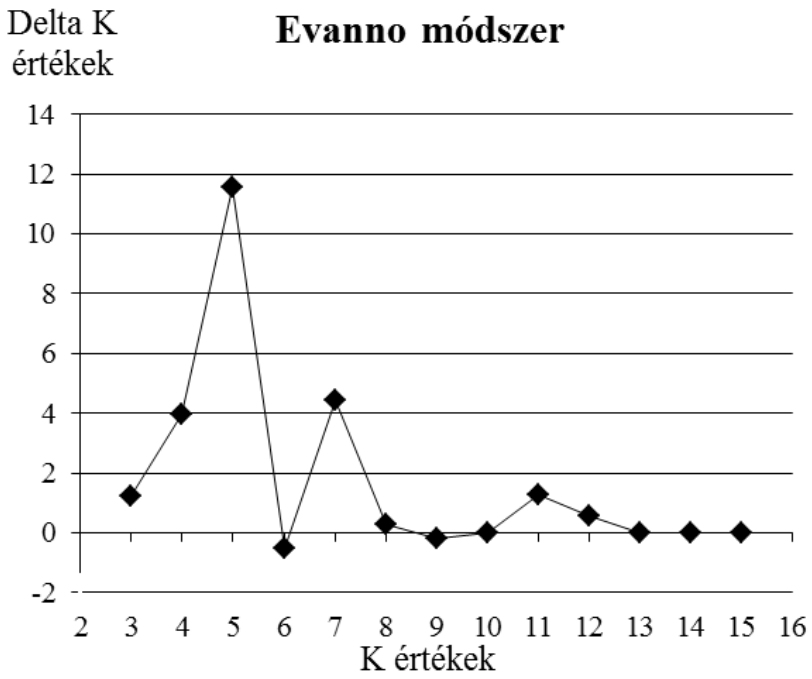
Jól látható az ábrán, hogy a K=8 és K=9 esetében is ugyanazt az eredményt kaptam, tehát amikor a programnak 9 csoportba (kilenc különböző színnel) kellett volna sorolnia az egyedeket, akkor is csak 8 csoportot hozott létre. Ez annyit jelent, hogy a sötétlila színnel jelölt két sárga magyar állomány között képtelen volt különbséget tenni a program.



12. ábra: Magyar őshonos tyúkfajták osztályozása STRUCTURE programmal

K jelenti a csoportok számát, minden egyes *K* értéknél a különböző színek jelölnek egy-egy csoportot, a megjelenő újabb szín egy újabb csoportot jelent, amely elkülönült a többitől. A zárójeles számok arra utalnak, hogy százból hány futás produkálta ugyanazt az itt látható, leggyakrabban előforduló megoldást. Értéke minél nagyobb, annál valószínűbb az a csoportosítás.

Az Evanno módszer szerint a K=5 csoportosítás a legvalószínűbb (13. ábra). Ennél a K értéknél figyelhető meg a két sárga magyar, a fedett és kopasznyakú fehérek, valamint az azonos fajták különböző tenyészeteinek együtt való csoportosulása is.



13. ábra: Az Evanno módszerrel számított delta K értékeinek ábrázolása a legvalószínűbb csoportosítás meghatározására

Ahol a legmagasabb a csúcs, az a legvalószínűbb csoportosítása az egyedeknek a STRUCTURE ábrán, mely jelen esetben a K=5.

4.2.5. A magyar őshonos tyúkállományok összehasonlítása kereskedelmi és európai őshonos fajtákkal

4.2.5.1. A populációk genetikai differenciáltságának összehasonlítása

A magyar, a kereskedelmi és európai helyi fajták Wright féle fixációs indexeit a 13. táblázatban foglaltam össze.

A teljes beltenyésztettségi koefficiens (F_{IT}) értéke a 27 populációra vonatkozóan meglehetősen nagy, 0,321 volt. Legmagasabb volt az európai szettben, melyet a kereskedelmi vonalak, végül a magyar fajták követnek.

Az európai állományok genetikai különbsége (F_{ST}) valamelyest kisebb, mint a kereskedelmi vonalaké.

Mind a populációk közötti (F_{ST}), mind az azokon belüli (F_{IS}) genetikai variáció értéke legkisebb volt a magyar fajtáknál.

13. táblázat: A Wright féle fixációs indexek (átlag F_{IT}, F_{ST}, F_{IS}±szórás) a magyar, a kereskedelmi és az európai őshonos tyúkállományokban

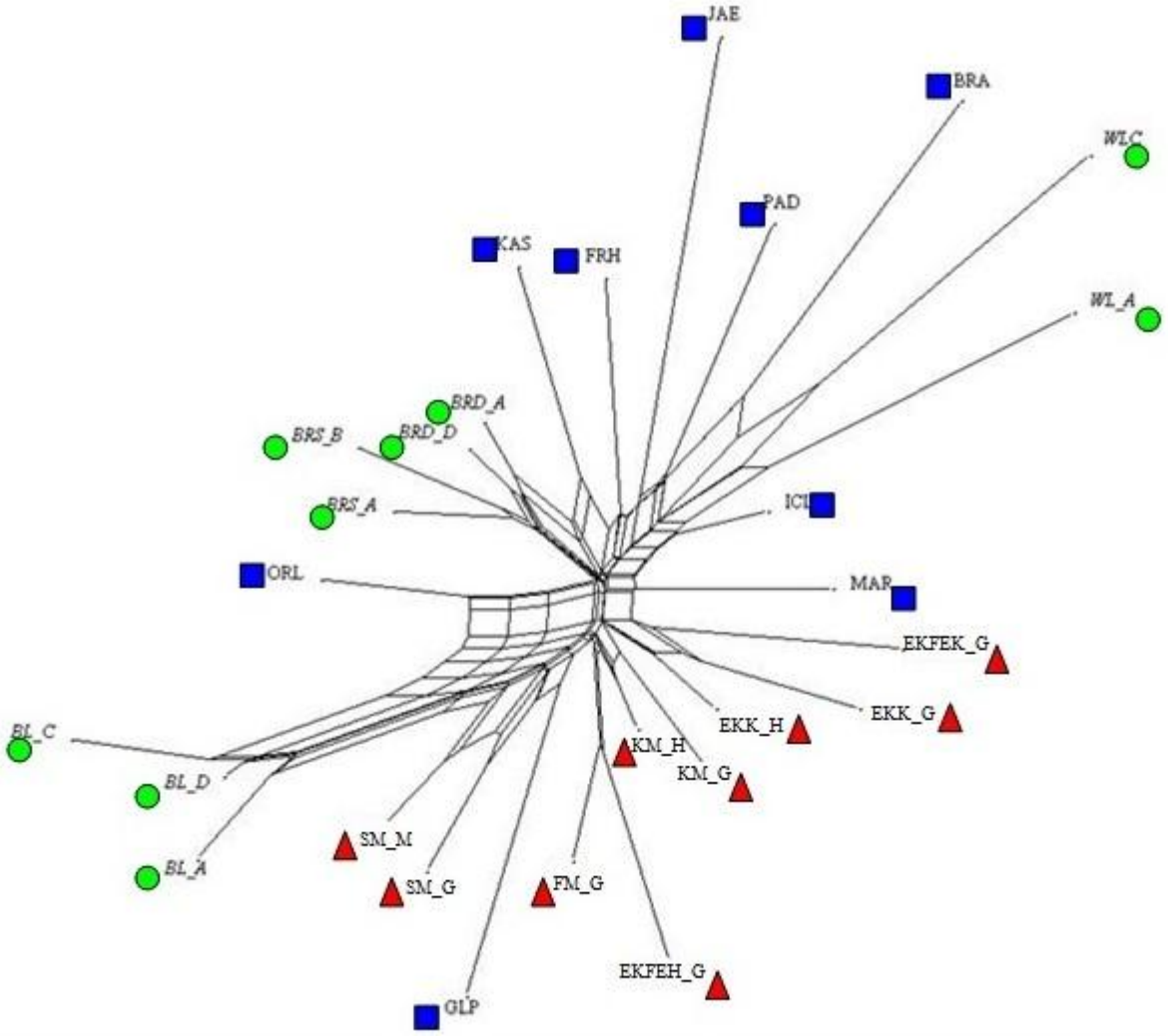
Populáció	**F_{IT} ± SE**	**F_{ST} ± SE**	**F_{IS} ± SE**
Magyar őshonos állományok	0,215***± 0,017	0,212***± 0,011	0,003± 0,015
Európai helyi fajták	0,370***±0,018	0,317***±0,017	0,077***±0,013
Kereskedelmi vonalak	0,346***±0,024	0,327***±0,022	0,028**±0,013
27 populáció	0,321***±0,011	0,297***±0,010	0,034***±0,008

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

4.2.5.2. A magyar őshonos tyúkfajták helyzete kereskedelmi és európai helyi fajták tekintetében

A 9 magyar, 9 kereskedelmi és 9 európai őshonos fajta egymáshoz viszonyított rokonsági kapcsolatait láthatjuk a 14. ábrán. A magyar állományok világosan elhatárolódtak az európai populációktól, kivéve a lengyel fajtát (GLP), és inkább a kereskedelmi vonalakhoz helyezkednek el közelebb. A fehér (WL_A, WL_C) és barna (BL_A, BL_C, BL_D) tojó hibridek, valamint a brojlerek (BRD_A, BRD_D, BRS_A, BRS_B) külön csoportokat formáltak.

Ha kizárólag a magyar tyúkfajtákat nézzük, az látható, hogy a fedett és kopasznyakú állományok szépen elkülönültek egymástól. Ez alól kivételt képez a már sokszor emlegetett fehér kopasznyakú, amely mindig nagyfokú hasonlóságot mutat a fedett nyakú fehér magyarral.



14. ábra: 27 populáció rokonsági értékei (MEK) alapján felállított network fa

Jelölés: zöld kör = kereskedelmi vonalak, kék négyszög = európai őshonos állományok, piros háromszög = magyar őshonos populációk. A hálórajz a lehetséges rokonságokat jelképezi, minél hosszabb az ág, annál beltenyésztettebb az adott állomány.

4.2.5.3. A magyar őshonos tyúkfajták relatív genetikai diverzitása

Az egyes magyar őshonos tyúkállományok genetikai diverzitásának hozzájárulását a magyar, illetve a kereskedelmi és európai helyi fajtákhoz viszonyítva a 14. táblázat mutatja.

A magyar fajtákból álló szett (*core*) diverzitása kielégítő, 0,840 volt. A fekete kopasznyakú semmilyen mértékben nem járult hozzá ehhez, míg a kendermagos kopasznyakú gödöllői populációja nagymértékben (C_i = 0,274).

Mindkét kitüntetett szett (kereskedelmi, európai) teljes diverzitása 0,881 volt, ami azt jelenti, hogy az alapító populációban lévő genetikai variancia 88%-át azok őrzik, természetesen készletenként. Leginkább a kendermagos erdélyi kopasznyakú gödöllői állománya (d(i) = $11{,}66\times10^{-3}$ és $11{,}85\times10^{-3}$), legkevésbé pedig fekete kopasznyakú (d(i) = $0{,}20\times10^{-3}$ és $0{,}36\times10^{-3}$) járult hozzá mind a kereskedelmi, mind az európai helyi fajták diverzitásához.

Összehasonlítva a két kitüntetett (*safe*) szettet, bár nem volt számottevő a különbség, mégis, 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 vonalakhoz.

14. táblázat: Az egyes magyar őshonos tyúkfajták genetikai diverzitásának hozzájárulása a kilenc magyar, valamint a kereskedelmi és európai őshonos állományok genetikai diverzitásához

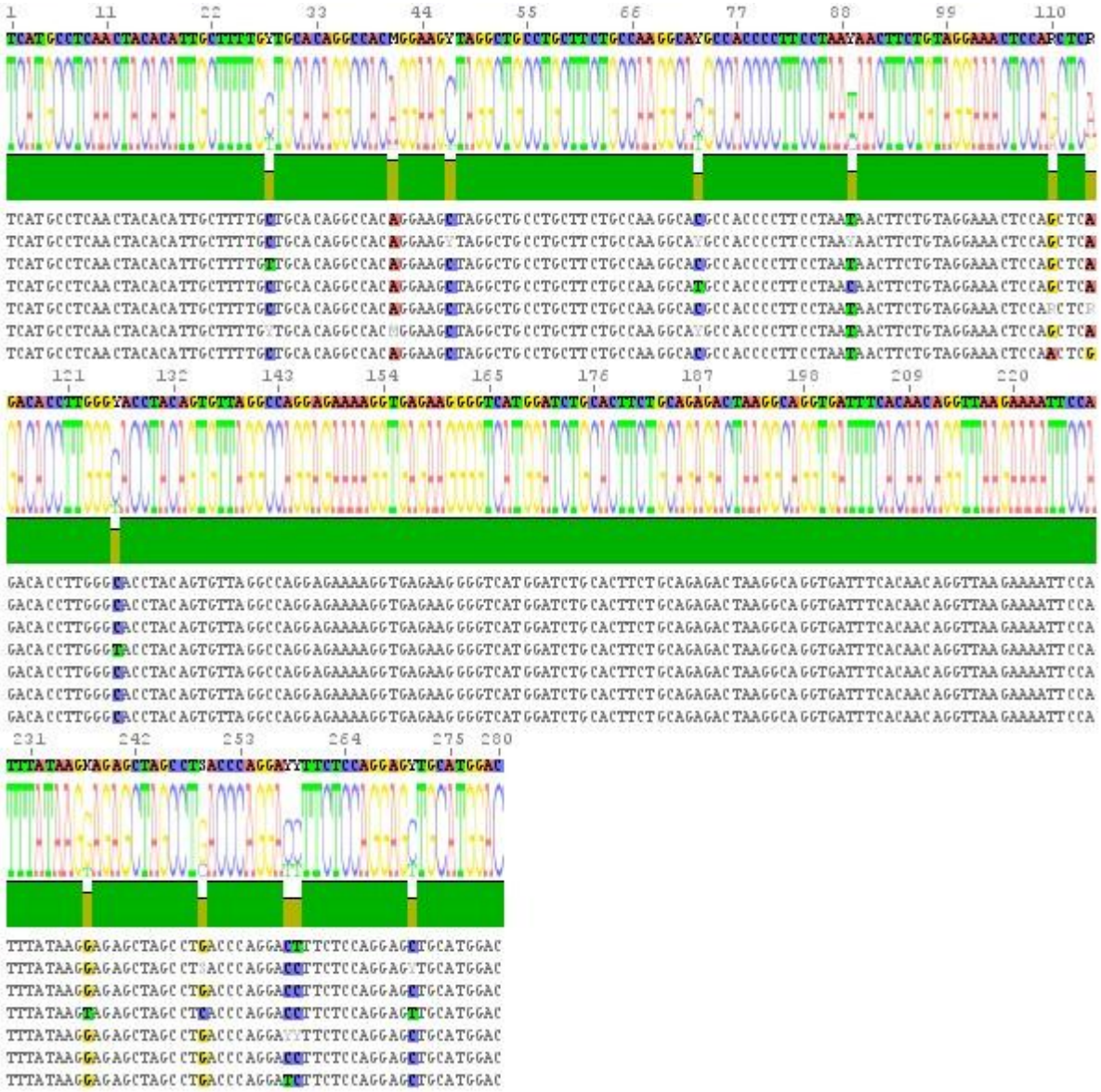
	Core set	**Safe set 1**		**Safe set 2**	
	Magyar populációk	Kereskedelmi populációk		Európai őshonos populációk	
	C_i	**Div (S+i)**	**d(i)*1000**	**Div (S+i)**	**d(i)*1000**
Teljes diverzitás	0,840	0,881		0,881	
SM_G	0,160	0,887	5,68	0,886	4,92
SM_M	0,092	0,883	1,76	0,888	6,77
FM_G	0,084	0,889	7,77	0,893	11,97
EKFEH_G	0,090	0,888	7,26	0,892	10,37
EKK_G	**0,274**	**0,893**	**11,66**	**0,893**	**11,85**
EKK_H	0,111	0,888	6,71	0,889	7,34
EKFEK_G	**0,000**	**0,881**	**0,20**	**0,882**	**0,36**
KM_G	0,188	0,887	6,48	0,885	3,18
KM_H	0,001	0,886	5,10	0,885	3,27

Div (S+i) = a kitüntetett szett teljes genetikai diverzitása plusz egy populáció, *S* = kitüntetett szett, *i* = populáció. A d(i) pedig a diverzitás %-os növekedése, C_i az egyes fajták genetikai diverzitásának hozzájárulása a teljes, kilenc magyar állományra nézve

4.3. Pontmutációk vizsgálati eredményei

4.3.1. HSP90

A 96 mintából 94 esetben volt jól értékelhető a szekvencia. A 428 bp hosszúságú szakaszon 13 SNP-t azonosítottam (15. ábra), melyek mindegyike intronban helyezkedik el, és főként tranzíciók (T/C), de transzverzió is volt köztük.



15. ábra: A vizsgált HSP90 szekvencia polimorfizmust mutató része

Olyan egyedek szekvenciáit választottam ki az ábra elkészítéséhez, melyek reprezentálják az azonosított mutációkat.

A 13 talált SNP lókusz allégyakoriságát az 15. táblázatban foglaltam össze. Amint az látható, a sárgával és zölddel jelölt, egymást követő lókuszok esetében (110/114 és 126/237) az allélgyakoriságok azonosak, és a szekvenciákat áttekintve azonos haplotípust alkotnak, ezért ezek között kapcsoltságot feltételeztem. Előbbi esetében kizárólag A-G vagy G-A, utóbbi esetében pedig C-G vagy T-T allélkombinációk fordultak elő.

15. táblázat: A HSP90 gén vizsgált szakaszában azonosított SNP lókuszok allélgyakorisága

Lókusz	Allél	Gyakoriság %	Lókusz	Allél	Gyakoriság %	Lókusz	Allél	Gyakoriság %
28 T/C	T	8,51						
	C	64,89	**110 A/G**	A	1,06	**249 G/C**	G	71,28
	T/C	26,60		G	85,11		C	3,19
41 A/C	A	98,94		A/G	13,83		G/C	25,53
	A/C	1,06	**114 A/G**	A	85,11	**258T/C**	T	4,26
47 T/C	C	96,81		G	1,06		C	85,11
	T/C	3,19		A/G	13,83		T/C	10,64
73 T/C	T	15,96	**126 T/C**	T	2,13	**259 T/C**	T	2,13
	C	44,68		C	74,47		C	89,36
	T/C	39,36		T/C	23,40		T/C	8,51
89 T/C	T	53,19	**237 G/T**	T	2,13	**271 T/C**	T	3,19
	C	11,70		G	74,47		C	72,34
	T/C	35,11		T/G	23,40		T/C	24,47

A lókuszok nevei az értékelhető szekvenciákban található polimorfizmusok helyét (bp) jelentik. A lókuszok közötti feltételezett kapcsoltságot különböző színekkel jelöltem, a sárgával jelölt két lókusz, valamint a zölddel jelölt két lókusz kapcsolt egymással.

4.3.2. PIT54

A 96 szekvencia mindegyike megfelelően értékelhető volt, 331 bp hosszúságú szakasz bizonyult jól olvashatónak az összes mintában.

A génbankban annotált két exonikus SNP lókusz (125 T/C és 130 C/G) a magyar mintákban is előfordult, illetve egy új intronikus variábilis helyet (308 A/G) is azonosítottam (16. ábra), amely kis gyakorisággal (3,13%) fordult elő (16. táblázat). Mindhárom tranzíció, kapcsoltságot még a közeli lókuszok között sem feltételeztem, a szekvenciák áttekintése során azok különböző haplotípusokat alkottak.

16. ábra: A Pit54 szekvencia polimorfizmust mutató része

Olyan egyedek szekvenciáit választottam ki az ábra elkészítéséhez, melyek reprezentálják az azonosított mutációkat.

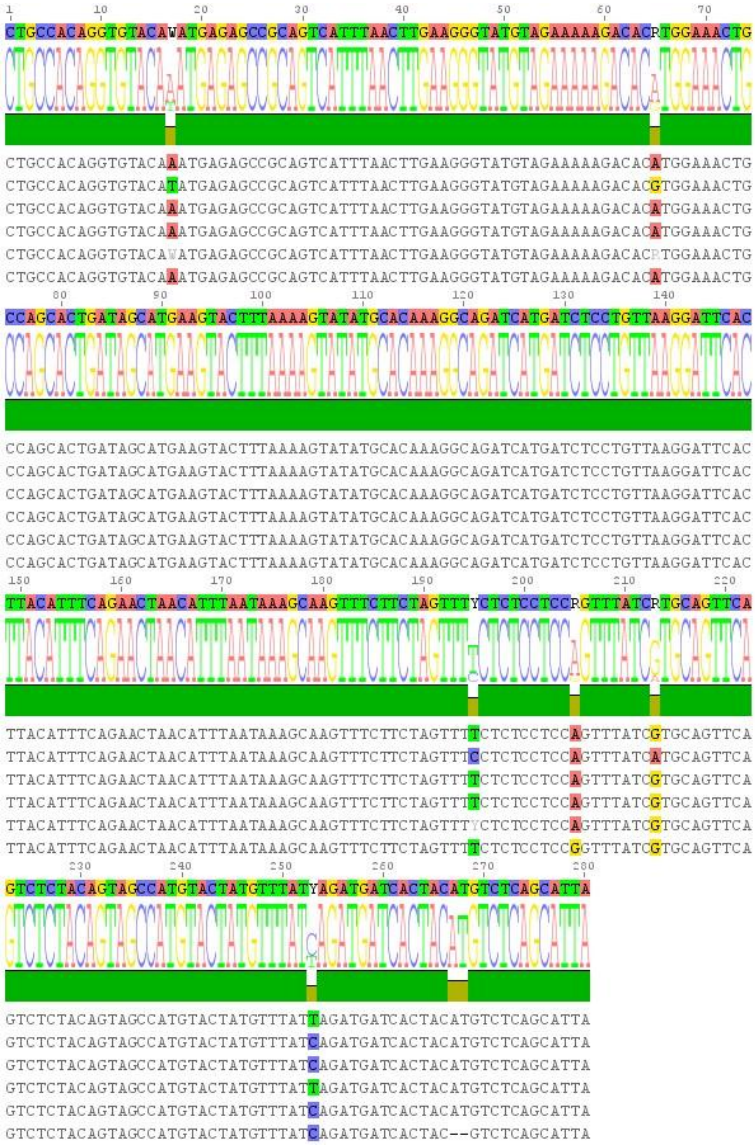
16. táblázat: A PIT54 gén vizsgált szakaszában azonosított SNP lókuszok allélgyakorisága

Lókusz	Allél	Gyakoriság (%)
125 T/C	T	38,54
	C	13,54
	T/C	47,92
130 G/C	G	35,42
	C	19,79
	G/C	44,79
308 A/G	G	96,88
	A/G	3,13

A lókuszok nevei az értékelhető szekvenciákban található polimorfizmusok helyét (bp) jelentik.

4.3.3. GHRL

A Ghrelin gén esetében mindössze 71 szekvencia elemzését tudtam elvégezni. A vizsgált szekvencia 379 bp hosszúságú szakasza volt jól olvasható, melyen 6 SNP-t és egy 2 bp-os deléciót (AT) azonosítottam a sárga magyar mosonmagyaróvári populációjának (SM_M) egyetlen egyedében. (17. ábra). Az ebből a populációból vizsgált nyolc állatból egy homozigóta volt, melyben detektálni tudtam a deléciót, viszont a heterozigóta mintákban az azt követő szekvencia olvasása nem volt lehetséges a kevert reakció miatt. Ezért voltak rosszabb minőségűek a szekvenciák. Mivel ez a deléció nem volt tipizálható, csak egyetlenegy állatban, a későbbi értékelésből kihagytam.



17. ábra: A GHRL gén szekvencia polimorfizmust mutató része

Olyan egyedek szekvenciáit választottam ki az ábra elkészítéséhez, melyek reprezentálják az azonosított mutációkat.

Az 17. táblázatban bemutatott 6 lókuszból négy a vizsgált populációkban azonos gyakorisággal fordult elő, és a tipizált állatokban mindig ugyanazt a haplotípust mutatták, így itt is kapcsoltságot feltételeztem. Az ezeket elválasztó 205 A/G lókuszon a „G" allélt egyetlen állatban (SM_M), heterozigóta formában találtam meg, tehát ahol jelen voltak a 195 T/C és 213 A/G mutációk, ott a 205 A/G biztosan nem. A talált variabilitások nagy része tranzíció, kivéve egy transzverziót (17 A/T).

17. táblázat: A Ghrelin gén vizsgált szakaszában azonosított SNP lókuszok allélgyakorisága

Lókusz	**Allél**	**Gyakoriság (%)**
17 A/T	A	67,6
	T	11,3
	A/T	21,1
65 A/G	A	67,6
	G	11,3
	A/G	21,1
195 T/C	C	11,3
	T	67,6
	T/C	21,2
205 A/G	A	98,6
	G	1,4
213 A/G	A	11,3
	G	67,6
	A/G	21,1
253 T/C	T	7,1
	C	74,6
	T/C	18,3

A lókuszok nevei az értékelhető szekvenciákban található polimorfizmusok helyét (bp) jelentik, a sárgával jelölt lókuszok pedig a feltételezett kapcsoltságot.

4.3.4. A három gén együttes elemzésének eredményei

A három génben együttesen 22 SNP lókuszt azonosítottam, ami figyelembe véve a kimutatott kapcsoltságot, 17 variábilis lókuszt eredményezett. Tekintve, hogy a legtöbb populációban, főleg a GHRL gén esetében az értékelhető mintaszám csökkent, az egyes populációgenetikai elemzéseket a három génre nézve együttesen (17 lókusz) végeztem. 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, a 41 A/C „C" allélját a fehér magyarban, míg a 205 A/G „G" allélját a sárga magyar mosonmagyaróvári populációjában. Nem találtam meg a magyar állományokban, viszont az egyik brojler vonalban (HH1) a 47 T/C „T" allélját detektáltam.

A várt (H_E) és tényleges heterozigozitás (H_O) értékei között – az összes magyar populációra és lókuszra nézve – alig volt némi különbség: H_E = 0,20 és H_O = 0,21. A beltenyésztettségi koefficiens (F_{IS}) átlagértéke szintén a magyar tyúkfajtákat nézve, meglehetősen alacsony, -0,04 ($P > 0,05$) volt, azaz az állományok Hardy-Weinberg egyensúlyban vannak, vagy nagyon közel hozzá. Hasonló értékeket produkált a három intenzív vonal is heterozigozitás tekintetében: H_E = 0,22, H_O = 0,20, az F_{IS} pedig 0,06 volt.

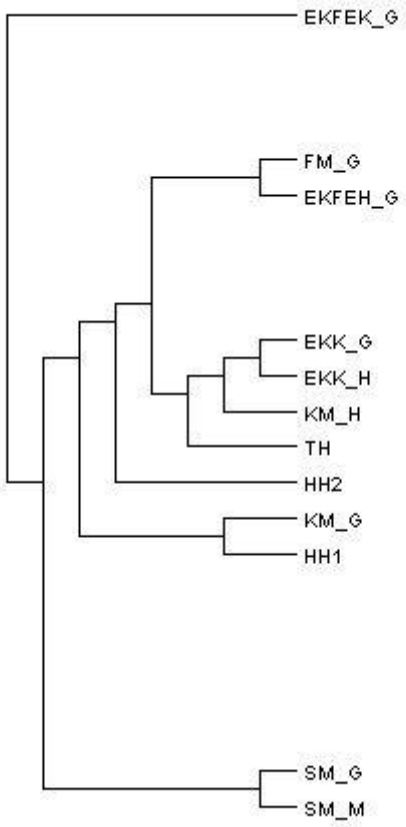
A Wright féle fixációs indexek értékei ugyancsak a három génre és a magyar őshonos génbankra kalkulálva a következők lettek: F_{IT} = 0,19; F_{ST} = 0,21; F_{IS} = -0,02, ami a fajták közötti tiszta strukturálódást és kis betenyésztettséget jelent. A kereskedelmi fajták értékei ettől kissé eltérőek (F_{IT} = 0,15; F_{ST} = 0,06 és F_{IS} = 0,09) lettek, főleg a populációk közti genetikai differenciáltság tekintetében.

A Reynolds féle rokonsági koefficiens alapján készített filogenetikus fa (Neighbour-Joining kladogram) a 9 magyar és 3 intenzív fajtára nézve a 18. ábrán látható.

Jól kivehető, hogy a két sárga magyar nagyon elkülönült a többitől, közel egymáshoz. Ugyanez látszik a fekete kopasznyakú esetében önmagában. A fedett és kopasznyakú fehér populációk 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.



18. ábra: Kilenc magyar és három kereskedelmi populáció egymáshoz való viszonya SNP lókuszok alapján kalkulált Reynolds genetikai távolságokból felállított kladogram segítségével

4.4. Új tudományos eredmények

1. Elsőként vizsgáltam meg 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 fajtával 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

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. 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 a mitokondriális DNS szintjén, egyetlen haplotípussal (*HIC1*), melyet a fajta minden egyedében (n = 8) megtaláltam. Ez megegyezik a mikroszatellit markerek alapján kapott diverzitási eredménnyel, miszerint legkevesebb az allélszámok átlaga (2,9±0,84) ebben az állományban. Ez valószínűleg a genetikai drift és a beltenyésztettség okozta haplotípus veszteség, genetikai beszűkülés következménye.

A haplotípus diverzitás (π) nulla (EKFEH_G) és 0,0091 (KM_H) között változott, akárcsak a LIU et al. (2006) által mért értékek a különböző Európából, a Közel-Keletről és Délkelet-, Kelet-Ázsiából származó tyúkfajtáknál.

Tekintve, hogy a génbanki adatbázis nem fedi le az őshonos tyúk fajták jelentős részét, sőt leginkább az irodalomban is közölt távol keleti, afrikai fajták szekvenciái hozzáférhetőek, 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.

Mivel a mitokondriális DNS öröklődése maternális és klonális, az egyes haplocsoportok földrajzi elhelyezkedése egyben a háziasítási centrumokat is megjelöli. A kilencvenes évek mtDNS vizsgálatai a házityúk egyetlen őseként a *Gallus gallus gallus* (vörös dzsungeltyúk) egyetlen indokínai, valószínűleg tájföldi populációját jelölték meg (AKISHINONOMIYA et al. 1994, 1996). LIU et al. (2006), meglehetősen nagy adatbázisa felhasználásával módosította ezt a nézetet, ezzel újabb ázsiai centrumokat megjelölve, Indiát is beleértve (KANGINAKUDRU et al. 2008).

Ahhoz, hogy megválaszoljam a kérdést, vajon a magyar őshonos tyúkfajták honnan származtathatók, 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. Meg kell említenem, hogy utóbb említett két magyar haplotípus megegyezik kereskedelmi fajtákban, főleg barna tojó hibridekben (*B3, AN746035*) és brojler vonalakban (*B4, AN746036*) fellelhető haplotípusokkal is (MUCHADEYI et al. 2008). Így nem lehet tehát kizárni, hogy ezen haplotípusok jelenléte nem egy korábban történt, kereskedelmi fajtával való keresztezés

eredménye, mint ahogy arra utalásokat tesz HREBLAY (1900) és SZALAY (2002), továbbá a mikroszatellit alapú vizsgálataim is ezt erősítették meg.

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.

5.2. A mikroszatellit markerek alapján elvégzett vizsgálatokból levonható következtetések

5.2.1. Magyar őshonos tyúkfajták diverzitása

Kilenc magyar őshonos tyúkfajta genetikai variabilitását vizsgáltam meg populáción belül és azok között 29 mikroszatellit marker segítségével a németországi Friedrich-Löffler Intézetben, a Dr. Steffen Weigend által vezetett, haszonállat genetikával foglalkozó laboratóriumban, melyre egy nemzetközi együttműködés keretében volt lehetőség. Kooperációnk biztosította, hogy eredményeim bekerültek abba az adatbázisba, amelybe gyűjtik a világ számos egyéb területéről is származó genetikai információkat az őshonos és ritka tyúkfajtákról.

A tényleges heterozigozitás (H_O) meglehetősen hasonló volt a várthoz (H_E), következésképpen a beltenyésztettségi koefficienseknél (F_{IS}) nincs szignifikáns különbség ($P > 0,05$), azaz a populációk közel vannak a Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) állapotához. Ez alapján az őshonos magyar tyúkfajták tenyésztési módszere megfelelőnek mondható, miszerint a genetikai variancia maximalizálva van fenotípusos válogatás alapján, a kakasokat (testvér kakasok) pedig forgatják a családok között (SZALAY 2002).

A populációnkénti allélszámok átlaga, akárcsak a tényleges heterozigozitás 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 (C_i, 14. táblázat) más eredményeket adott, mint a heterozigozitási és F_{IS} értékek. Míg a kendermagos magyar hódmezővásárhelyi állománya mutatta a legmagasabb várt heterozigozitást és átlag allélszámot, addig a második legkisebb értéket kaptam a magyar (*„core”*)

szetthez való hozzájárulása tekintetében. Ez azt mutatja, hogy a KM_H ugyan egy diverz állomány, azonban jelentős az „átfedés”, azaz nagy a rokonság a többi magyar fajtával. Ezzel szemben a kendermagos erdélyi kopasznyakú gödöllői populációja, amely a legnagyobb mértékben járult hozzá a magyar fajták diverzitásához, mégis csak közepes mértékű heterozigozitást és F_{IS} értékeket produkált. A magas C_i 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 tenyészeteiben fenntartott fajtáknál (párhuzamos populációk: KM_G és KM_H, SM_G és SM_M, EKK_G és EKK_H) kalkulált páronkénti F_{ST} értékek így a Reynolds féle genetikai távolságok (D_R) is általában véve alacsonyabbak, mint a teljesen különböző fajták között, ami magas genetikai hasonlóságot jelent (11. táblázat). 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 (STRUCTURE). A párhuzamos populációk relatíve nagyfokú rokonságot mutattak egymással, ám néhány esetben két teljesen különböző fajtánál azokat meghaladó értékeket kaptam.

A klaszteranalízis (12. ábra) során a magyar őshonos fajták egyértelmű csoportosulását tapasztaltam. A kapott eredmények jól egyeznek a rokonsági távolságok (MEK) alapján készített filogenetikus hálózattal (14. ábra). 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 génvándorlás (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 (MEK), hasonlóságot (F_{ST}, D_R) mutattak minden vizsgálatnál. Ez többféleképpen magyarázható: történelmi megközelítése, hogy mivel a 60-as években az azonos színű fedett és kopasznyakú állatokat egyazon fajtába tartozó egyedeknek tekintették, így együtt is tartották őket, ezáltal génkicserélődést biztosítva köztük. Egy másik megközelítés, hogy a múltban történhetett intenzív vonallal való állományjavítást (HREBLAY 1900, SZALAY 2002) azonos fajtával 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 (9. ábra), és a rokonsági kapcsolatok vizsgálata során is (11. és 14. ábra). Ugyancsak ennél a K értéknél megfigyelhető az azonos fajták különböző tenyészeteinek együtt való klaszterződése is, de a csoportok számának növelésével világosan elkülönültek egymástól, melyet szintén alátámasztanak a további filogenetikai vizsgálatok.

5.2.2. Magyar őshonos tyúkfajták diverzitásának értékelése európai szemszögből

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 megfelelőnek bizonyultak ahhoz, 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.

Az F_{IT} értékek azt mutatták, hogy a heterozigóta hiány mértéke legkisebb a magyar helyi fajtákban volt, amit csaknem teljesen megmagyaráz a populációk közti különbség (F_{ST}). 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 tyúkpopulációk strukturálódása egyáltalán nem ilyen egyértelmű (MUCHADEYI et al. 2007). Európai helyi fajtákhoz és intenzív vonalakhoz hasonlítva a magyar állományok beltenyésztettségi értékeit (F_{IS}) azt tapasztaltam, hogy őshonos fajtáinkban a genetikai variancia megőrzése sikeresnek bizonyult fenntartásuk során.

A 27 populáció rokonsági (MEK) távolságokon alapuló filogenetikus network analízis (14. ábra) a három különböző szett (magyar, kereskedelmi, európai) egyértelmű csoportosulását mutatta. Nemcsak ez, hanem a magyar állományokra jellemző 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

(14. táblázat), 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 (C_i). Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy figyelembe kell venni, milyen kontextusban vizsgálja az ember a genetikai diverzitást.

A fekete erdélyi kopasznyakú járult hozzá a genetikai diverzitásokhoz legkevésbé, legyen szó bármelyik szettről, 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 (MEK), ami mintegy beltenyésztettségi 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 (11. és 14. ábra) 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. Az azonos színű fedett és kopasznyakú populációk nem csupán egymás változatai, hanem valóban különálló fajták. Főként a kopasznyakú állományok mondhatóak egyedinek a magyar genetikai erőforrásokat tekintve. Az egy családból származó, de 30-40 éve külön, zárt populációban tartott állományok elkülöníthetők voltak, kivéve a két sárga magyart a klaszteranalízis során, mely a gödöllői génbanki állomány már említett módon történt újbóli kialakításának köszönhető.

5.3. 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 (a 126

T/C-vel kapcsolt 237 G/T lókusz) az általában kis szelekciós nyomás alatt lévő 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 heterozigozitása 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 heterozigozitások 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 (F_{ST} = 21%) jelezve. A beltenyésztettség mértéke elfogadható, a heterozigóták aránya a populációk többségében nagy, amit a kis F_{IT} (0,19) és F_{IS} (-0,02) értékek nagyon jól reprezentálnak, ezzel is mutatva, hogy a tenyésztési módszer megfelelő. Ezzel szemben a három kereskedelmi fajtára vonatkozó beltenyésztettségi mutatókból az látszik, hogy bár a teljes (F_{IT}), és populációkon belüli (F_{IS}) beltenyésztettségi értékek nem sokban térnek el a magyar fajtákétól, a genetikai különbség (F_{ST} = 6%) 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 – sárga magyar, kendermagos magyar és a kendermagos erdélyi kopasznyakú – különböző tenyészetei 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 az előzőekben 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 tenyészeteihez, míg a mikroszatellit alapú vizsgálatokban inkább a két sárga magyar állomány tette ugyanezt.

Összefoglalva, a 17 SNP lókusz 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 tyúkpopulációkról.

5.4. 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

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Hat hazai őshonos tyúkfajta kilenc populációját vizsgáltam jelen tanulmányban, melyek a sárga, fehér, kendermagos magyar, valamint a fekete, fehér és kendermagos erdélyi kopasznyakú fajták. Védelmük napjainkban egyre nagyobb jelentőségű, hiszen az intenzív fajták kiszorítják azokat a genotípusokat, melyek nagy variabilitással, egyedülálló tulajdonságokkal rendelkeznek. Egyre nehezebb az árutermelésből kirekesztett fajtákhoz hozzáférni és sajnálatos módon ellenálló képességük és termékeik kiváló minősége ma ismeretlen a fogyasztók és termelők többsége számára.

A mitokondriális DNS vizsgálataim során a 9 magyar tyúkpopuláció D-loop régióiban 11 haplotípust azonosítottam 17 polimorf helyről. A magyar szekvenciákat összehasonlítottam az NCBI génbankban fellelhető tyúk D-loop szekvenciákkal, melynek eredményeként három unikális, csak a magyar állományokra jellemző haplotípust találtam. Továbbá kilenc, az európai tyúkfajtákat jól reprezentáló referencia szekvenciát is bevontam a vizsgálatba, mely szerint állományaink három haplocsoportba rendeződtek, két maternális vonalat megjelölve származásukat illetően.

Ezen kívül, 29 mikroszatellit marker és 17 SNP lókusz alapján tanulmányoztam hazai tyúkpopulációinkat genetikai diverzitásuk, egyediségük felmérése céljából.

Huszonkilenc mikroszatellit marker használatával meghatároztam az egyes állományokra vonatkozó alap diverzitásmutatókat, úgymint a várt és tényleges heterozigozitást, valamint a beltenyésztettségi koefficiens értékeit, melyek arra engednek következtetni, hogy az állományok nem térnek el szignifikánsan a Hardy-Weinberg egyensúlytól. A klaszteranalízis a fajták egyértelmű strukturálódását mutatta, a fedett és kopasznyakú állományok elkülönültek egymástól. Ezt több, különböző módon kalkulált genetikai távolságok alapján felállított dendrogram is jól reprezentálja. Ahhoz, hogy bizonyítsam a magyar őshonos állományok egyediségét, összehasonlítottam azokat kereskedelmi és más európai helyi fajtákkal is. A beltenyésztettségi mutatókat (teljes állományra nézve, állományok között, állományon belül), rokonsági kapcsolatokat, valamint a relatív genetikai diverzitást („*safe set*” analízis) vizsgáltam meg. Az eredmények tükrében azt a következtetést vontam le, hogy a magyar tyúkfajták állapota beltenyésztettség tekintetében kielégítő, és bár mutatnak némi hasonlóságot az intenzív fajtákkal, azoktól, és más európai populációktól is egyértelműen elkülönülnek.

Az SNP lókuszok alapján történő elemzéshez három, irodalmi adatok alapján polimorf gént választottam ki (HSP90, PIT54, GHRL). A gének együttes vizsgálata során a 22 azonosított SNP lókuszból 17 volt variábilis, különböző haplotípusokat eredményezve. A mikroszatellit vizsgálatokhoz hasonló, a genetikai diverzitás meghatározására alkalmas méréseket végeztem, úgymint beltenyésztettségi mutatók és rokonsági koefficiensek. A kapott értékeket összevetettem

három, az SNP lókuszok alapján megvizsgált kereskedelmi vonaléval. Beltenyésztettség tekintetében a magyar fajták jó állapotban vannak, és bár felfedezhető némi hasonlóság intenzív vonalakkal rokonsági értékek alapján, mégis egyértelmű strukturálódást mutattak, megerősítve ezzel a mikroszatellit vizsgálatok eredményét.

Összegezve elmondható, hogy a magyar őshonos tyúkfajták többsége az Indiai-szubkontinensről származik, míg kisebb hányada Délkelet-Ázsia, Kína és Japán területeiről eredeztethető. A mikroszatellit és SNP analízisek során kapott eredmények meglehetősen hasonlóak voltak. Eszerint a leginkább beltenyésztett állományok a fekete és fehér erdélyi kopasznyakú fajták, ám összességében és európai viszonylatban a tenyésztési szisztéma megfelelőnek mondható. Szelekciós és/vagy drift hatást mutattam ki a több mint 30 generáción keresztül egymástól elkülönítve, zárt populációkban fenntartott, ugyanazon tyúkfajta különböző tenyészeteiben. Molekuláris genetikai úton bebizonyítottam (SSR, SNP), hogy a fedett és kopasznyakú fajták nem csupán egymás színváltozatai, hanem valóban különálló fajták, a fehér erdélyi kopasznyakú és a fehér magyar fajták nagyfokú rokonsága ellenére. Más nemzetek fajtáinak genotípusaival összehasonlítva, hazai tyúkfajtáink egyedinek mondhatóak, érdemes tehát erőfeszítéseket tennünk megőrzésük, és további vizsgálatuk érdekében.

7. SUMMARY

In current study, nine populations of six Hungarian native chicken breeds were investigated which are regarded as Hungarian national treasures: Hungarian White, Yellow and Speckled, and Transylvanian Naked Neck White, Black and Speckled. In animal husbandry the number of animal breeds is continually decreasing, and hence, it is assumed that the variability is reducing. This lessens the possibilities of breed elevation. Moreover, unique combinations of genes making up a specific genotype, which might constitute adaptation to local environment or other potentially beneficial traits are at risk of disappearing. Traditionally used breeds are excluded from competition in spite of their unique values as meat quality, disease resistance and adaptation to the local environment, which are unknown for most of the customers.

I assessed the maternal origin of these local chickens using mitochondrial DNA (mtDNA) information. The first 530 bases of the D-loop region were sequenced in 74 chickens of 9 Hungarian populations and compared to nine reference sequences. Eleven haplotypes were observed from 17 variable sites. The comparison of the Hungarian and other D-loop sequences annotated in the NCBI GeneBank gave three haplotypes unique to Hungary. Network analysis indicated that Hungarian native chickens grouped into 3 clades, determining two maternal lineages.

Furthermore, I characterized these nine Hungarian chicken populations using microsatellite markers and SNP loci.

In total, 270 individuals were analyzed with 29 microsatellite markers to determine the basic diversity measures, like expected and observed heterozigosity as well as inbred level per population, which do not differ significantly from the Hardy-Weinberg Equilibrium. Cluster analysis showed clear separation between the Hungarian stocks; at the most frequent solutions the Transylvanian Naked Neck breeds formed a separate group of populations. The Hungarian native chickens were compared to commercial lines and other European local breeds. To identify genetic resources unique to Hungary, inbreeding coefficients and marker estimated kinships were estimated and a safe set analysis was performed. I measured the contribution of the Hungarian breeds to the total diversity of a given set of populations (commercial and European sets). However, the Hungarian stocks showed some similarities with commercial lines, clearly different from them and other European local chickens.

To investigate genetic diversity with SNPs, three genes (HSP90, PIT54, GHRL) were chosen, which are polymorphic based on the literature. I identified 22 SNP loci in the genes together where 17 SNPs were polymorphic, providing different haplotypes. The same genetic diversity measures were calculated as with microsatellites, like inbreeding and kinship coefficients and compared to three commercial lines. According to inbreeding estimates, the Hungarian chicken

breeds are well managed populations, just like at microsatellite level. However, they show a little similarity with commercial lines based on coancestry coefficients, but still clear structuring.

In summary, the majority of the Hungarian sequences originates on the Indian subcontinent, while the other two haplogroups likely originate from South-East Asia, China and Japan. Analyses performed with microsatellite and SNP loci provided very similar results. I found the Transylvanian Naked Neck Black and White breeds as the most inbred populations, but in total, and relative to other European stocks, the breed management is good and correct. I established the effect of selection and/or genetic drift in the parallel breeds, which came from the same ancestral family but were kept separately, as closed populations for more than 30 generations. I proved in molecular genetic way that the feathered and naked neck populations are distinct breeds and not just color variants. Hungarian local chicken breeds are genetically distinct from other chicken genetic resources, effort should be made to conserve them, and in parallel, to study their genetic features in detail.

8. IRODALOMJEGYZÉK (1. számú melléklet)

AKISHINONOMIYA F., MIYAKE T., SUMI S., TAKADA M., OHNO, S. & KONDO, N. (1994): One subspecies of the red junglefowl (Gallus gallus gallus) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA,* 91: 12505-12509.

AKISHINONOMIYA F., MIYAKE T., TAKADA M., SHINGU R., ENDO T., GOJOBORI T., KONDO N. & OHNO S. (1996): Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowl. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA,* 93: 6792-5.

ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W. & LIPMAN D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology,* 215 (3): 403-410. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

APOSTOL B. L., Black W. C., Reiter, P., Miller B. R. (1996): Population genetics with RAPD PCR the breeding structure of Aedes in Puerto Rico. *Heredity,* 76: 170 – 176.

BAKOSS L. (1931): Gazdasági baromfitenyésztés. *Második kiadás.* Csáthy Ferenc Egyetemi könyvkereskedés és Irodalmi Vállalat Rt., Budapest-Debrecen

BÁLDY B. (1954): A baromfi tenyésztése. Mezőgazdasági kiadó, Budapest

BANDELT H. J., FORSTER P., RÖHL A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution,* 16 (1): 37-48.

BECKMAN J. S. & SOLLER M. (1990): Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio/Technology (Nature Publishing Company),* 8 (10): 930-932.

BEUZEN N. D., STEAR M. J. & CHANG K. C. (2000): Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal,* 160: 42–52.

BISZKUP F. és BEKE L. (1951): A magyaróvári sárga magyar tájfajta tyúk kitenyésztésének módszerei, eredményei. *Agrártudomány:* III (9): 461-467.

BOTSTEIN B., WHITE R. L., SKOKNICK M., DAVIS R. W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics,* 32 (3): 314-331.

BRUFORD M. W. & WAYNE R. K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development,* 3 (6): 939-943.

CABALLERO A. & Toro M. A. (2002): Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation genetics,* 3 (3): 289-299.

CANON J., CHECA M. L., CARLEOS C., VEGA-PLA J. L., VALLEJO M. & DUNNER S. (2000): The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics,* 31 (1): 39-48.

CHANG A., LIEW W.C., CHUAH A., LIM Z., LIN Q. & ORBAN, L. (2007): FluoMEP: A new genotyping method combining the advantages of randomly amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism. *Electrophoresis,* 28 (4): 525–534.

CHEN G., BAO W., SHU J., JI C., WANG M., EDING H., MUCHADEYI F., WEIGEND S. (2008): Assessment of population structure and genetic diversity of 15 Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,* 21 (3): 331-339.

CHEN X., PROSSNER R., SIMONETTI S., SADLOCK J., JAGIELLO G., SCHON E. A. (1995): Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *American Journal of Human Genetics,* 57 (2): 239-247.

CRAWFORD A. M., BUCHANAN F.C. & SWARBRICK P. A. (1991): The use of dinucleotide repeats or microsatellites as genetic markers in domestic animals. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production,* 51: 79-84.

CRAWFORD R. D. (1990): Poultry genetic resources: evolution, diversity and conservation. *Poultry Breeding and Genetics,* 43-60. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands

CROOIJMANS R. P. M. A., GROEN A. F., VAN KAMPEN A. J. A., VAN DER BEEK S., VAN DER POEL J. J. & GROENEN M. A. M. (1996): Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pooled blood samples. *Poultry Science,* 75 (7): 904-909.

CUC N. T. K., SIMIANER H., EDING H., TIEU H. V., CUONG V. C., WOLLNY C. B. A., GROENEVELD L. F. & WEIGEND S. (2010): Assessing genetic diversity of Vietnamese local chicken breeds using microsatellites. *Animal Genetics,* 41 (5): 545-547.

CSERMELY P., SCHNAIDER T., SŐTI CS., PROHÁSZKA Z., NARDAI G. (1998): The 90 - kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics,* 79 (2): 129–168.

CSUKÁS Z. (1955): Baromfitenyésztés. *Mezőgazdasági Kiadó,* Budapest (1955)

DESJARDINS P. & MORAIS R. (1990): Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology,* 212 (4): 599-634.

DOHY J. (1999) Genetika állattenyésztőnek. Mezőgazda kiadó, Budapest

DRUMMOND A. J., ASHTON B., BUXTON S., CHEUNG M., COOPER A., DURAN C., FIELD M., HELED J., KEARSE M., MARKOWITZ S., MOIR R., STONES-HAVAS S.,

STURROCK S., THIERER T., WILSON A. (2010): Geneious v5.3; http://www.geneious.com

EDING H. & MEUWISSEN T. H. E. (2001): Marker-based estimate of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity. *Journal of Animal Breeding and Genetics,* 118 (3): 141-159.

EDING H., CROOIJMANS R. P. M. A., GROENEN M. A. M. & MEUWISSEN T. H. E. (2002): Assessing the contribution of breeds to genetic diversity in conservation schemes. *Genetics Selection Evolution,* 34: 613-633.

EDWARDS A., CIVITELLO A., HAMMOND H. A., CASKEY C. T. (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics,* 49 (4): 746–756.

ELTANANY M., PHILIPP U., WEIGEND S., DISTL O. (2011): Genetic diversity of ten Egyptian chicken strains using 29 microsatellite markers. *Animal genetics,* 42 (6): 666-669.

EVANNO G., REGNAUT S. & GOUDET J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology,* 14 (8): 2611-2620.

EXCOFFIER L., LAVAL L. G. & SCHNEIDER S. (2005): Arlequin Version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1: 47-50. http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3

FAO (2004): Guidelines for development of national management of farm animal genetic resources plans.

FELSENSTEIN J. (1993): PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA

FÉSÜS L., KOMLÓSI I., VARGA L., ZSOLNAI A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. *Agroinform Kiadó,* Budapest

FRANCK P., GARNERY L., LOISEAU A., OLDROYD B. P., HEPBURN H. R., SOLIGNAC M., CORNUET J. M. (2001): Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity,* 86 (4): 420-30.

GONGORA J., RAWLENCE N. J., MOBEGI V. A., JIANLIN H., ALCALDE J. A., MATUS J. T., HANOTTE O., MORAN C., AUSTIN J. J., ULM S., ANDERSON A. J., LARSON G. & COOPER A. (2008): Indo-European and Asian origins for Chilean and Pacific chickens revealed by mtDNA. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA,* 105: 10308 – 10313.

GOUDET J. (2001): FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm

GRANEVITZE Z., HILLEL J., CHEN G. H., CUC N. T. K., FELDMAN M., EDING H. & WEIGEND S. (2007): Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. *Animal Genetics,* 38 (6): 576–583.

GRANEVITZE Z., HILLEL J., FELDMAN M., SIX A., EDING H. & WEIGEND S. (2009): Genetic structure of a wide-spectrum chicken gene pool. *Animal Genetics,* 40 (5): 686–93.

GROENEN M. A. M., MEGENS H-J., ZARE Y., WARREN, W. C., HILLIER, L. W., CROOIJMANS, R. P. M. A., VEREIJKEN, A., OKIMOTO, R., MUIR, W. M. & CHENG, H. H. (2011): The development and characterization of a 60K SNP chip for chicken. *BMC Genomics,* 12: 274.

GRUBICY G. (1895): Baromfitenyésztés. *Negyedik kiadás,* Athenaeum, Budapest

HAJÓSNÉ NOVÁK M. (1999): Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. In: Genetikai variabilitás vizsgálata DNS markerekkel. *Mezőgazda Kiadó,* Budapest

HARTL D. L. & CLARK A. G. (1989): Principles of population genetics. *2nd edition,* Sinauer Associates, Sunderland, MA.

HARUMI T., SANO A., KAGAMI H., TAGAMI T., MATSUBARA Y. & NAITO M. (2004): Polymerase chain reaction detection of single nucleotide polymorphisms in the chicken mitochondrial D-loop region. *Animal Science Journal,* 75 (6): 503-507.

HAYASHI J., TAGASHIRA Y. & YOSHIDA M. C. (1985): Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Experimental Cell Research,* 160 (2): 387–395.

HEDRICK P. W. (2000): Genetics of populations. *2nd edition,* Jones and Bartlett publishers, Sudbury, Massachusetts

HILLEL J. GROENEN M. A. M., TIXIER-BOICHARD M., KOROL A. B., DAVID L., KIRZHNER V. M., BURKE T., BARRE-DIRIE A., CROOIJMANS R. P. M. A., ELO K., FELDMAN M. W., FREIDLIN P. J., MÄKI-TANILA A., OORTWIJN M., THOMSON P., VIGNAL A., WIMMERS K. & WEIGEND S. (2003): Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetic Selection and Evolution,* 35 (6): 533-557.

HILLEL J., GRANEVITZE Z., TWITO T., BEN-AVRAHAM D., BLUM S., LAVI U., DAVID L., FELDMAN M.W., CHENG H., WEIGEND S. (2007): Molecular markers for the assessment of chicken biodiversity. *World's Poultry Science Journal,* 63 (1): 33-45.

HORN A. (1976): Állattenyésztési enciklopédia. *Mezőgazdasági Kiadó,* Budapest

HREBLAY E. (1900) Baromfitenyésztés. “Pátria” Irodalmi Vállalat és Nyomdai Részvénytársaság, Budapest

HUDSON D. H. & BRYANT D. (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23 (2): 254-267.

ISRAEL C., Weller J. I. (2000): Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science*, 83 (1): 181-187.

IWASAKI K., MORIMATSU M., INANAMI O., UCHIDA E., SYUTO B., KUWABARA M. and NIIYAMA M. (2001): Isolation, characterization, and cDNA cloning of chicken turpentine-induced protein, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (12): 9400-9405.

JEFFREYS A. J., WILSON V. & THEIN S. L. (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314 (6006): 67-73.

KANGINAKUDRU S., METTA M., JAKATI R. D. & NAGARAJU J. (2008): Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. *BMC evolutionary biology*, 8: 174.

KOMIYAMA T., IKEO, K., GOJOBORI, T. (2003): Where is the origin of the Japanese gamecocks? *Gene*, 317: 195-202.

KWOK P.Y. & CHEN X. (2003): Detection of single nucleotide polymorphisms. *Current Issues in Molecular Biology*, 5 (2): 43-60.

LANDEGREN U., NILSSON, M. & KWOK, P. Y. (1998): Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Research*, 8 (8):769–76.

LEWIS P. O. & ZAYKIN D. (2001): Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c); http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html

LIPSCHUTZ R. J., FODOR S. P. A., GINGERAS T. R. & LOCKHART D. J. (1999): High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, 21 (supp. 1), 20–4.

LITT M., LUTY J. A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44 (3): 397-401.

LIU Y. P., WU G. S., YAO Y. G., MIAO Y. W., LUIKART G., BAIG M., BEJA-PEREIRA A., DING Z. L., PALANICHAMY M. G. & ZHANG Y.P. (2006): Multiple maternal origins of chickens: out of Asian jungles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38 (1): 12-19.

MACHADO M. A., SCHUSTER I., MARTINEZ M. L., CAMPOS A. L. (2003): Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32 (1): 93-98.

MARIAT D., VERGNAUD G. (1992): Detection of polymorphic loci in complex genomes with synthetic tandem repeats. *Genomics*, 12 (3): 454-458.

MATEUS J. C., EDING H., PENEDO M. C. T. & RANGEL-FIGUEIREDO M. T. (2004): Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Animal Genetics,* 35 (4): 305 -13.

MATOLCSI J. (1975): A háziállatok eredete. *Mezőgazdasági kiadó,* Budapest

MILLER S. A., DYKES D. D. & POLESKY H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research,* 16 (3): 1215.

MIYAKE T. (1997): Gallus gallus mitochondrial DNA for D-loop region (*Published only in database*)

MUCHADEYI F.C., EDING H., WOLLNY C. B. A. (2007): Absence of population substructuring in Zimbabwe chicken ecotypes inferred using microsatellite analysis. *Animal Genetics,* 38: 332-339.

MUCHADEYI F. C., EDING H., SIMIANER H., WOLLNY C. B. A., GROENEVELD E. & WEIGEND S. (2008): Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. *Animal Genetics,* 39: 615-622.

MWACHARO J. M., NOMRA K., HANADA H., JIANLIN H., HANOTTE O., AMANO T. (2007): Genetic relationships among Kenyan and other East African indigenous chickens. *Animal Genetics,* 38 (5): 485–490.

NEI M. (1972): Genetic distance between populations. *The American Naturalist,* 106: 283-292.

NEUMANN P., MORITZ R. F. A. & MAUTZ D. (1999): Using DNA microsatellites for maternity testing in honeybees (Apis mellifera L.). *Apidologie,* 30 (6): 505-512.

O'BRIEN S. J. (1991): Mammalian genome mapping: lessons and prospects. *Current Opinion in Genetics and Development,* 1 (1): 105-111.

OKA T., INO Y., NOMURA K., KAWASHIMA S., KUWAYAMA T., HANADA H., AMANO T., TAKADA M., TAKAHATA N., HAYASHI Y., AKISHINONOMIYA F. (2007): Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal Genetics,* 38 (3): 287-293.

OLIEHOEK P. A., WINDIG J. J., VAN ARENDONK J. A. M. & BIJMA P. (2006): Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. *Genetics,* 173: 483-496.

PARK S. D. E. (2001): Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection (PhD thesis) University of Dublin

PARSONS B. L. & HEFLICH R. H. (1997): Genotypic selection methods for direct analysis of point mutations. *Mutation Research,* 387 (2): 97–121.

PETER J. P. (1913): The cock. *Journal of the American Oriental Society,* 33: 363-396.

PLOTSKY Y., KAISER M. G., LAMONT S. J. (1995): Genetic characterization of highly inbred chicken lines by two DNA methods: DNA fingerprinting and polymerase chain reaction using arbitrary primers. *Animal Genetics,* 26 (3): 163–170.

PONSUKSILI S., WIMMERS K., SCHMOLL F., HORST P. & SCHELLANDER K. (1999): Comparison of multilocus DNA Fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chicken. *The Journal of Heredity,* 90 (6): 656-659.

PRITCHARD J. K., STEPHENS M. & DONNELLY P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics,* 155: 945-59.

RAYMOND M. & ROUSSET F. (1995): GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity,* 86: 248-249.; http://genepop.curtin.edu.au.

REYNOLDS J., WEIR B. S. & COCKERHAM C. (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics Society of America,* 105: 767-79.

ROHRER G. A., ALEXANDER L. J., KEELE J. W. (1994): A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics,* 136 (1): 231-45.

ROMANOV M. N. & WEIGEND S. (2001): Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry Science,* 80 (8): 1057-1063.

ROSENBERG N. A., PRITCHARD J. K., WEBER J. L., CANN H. M., KIDD K. K., ZHIVOTOVSKY L. A. & FELDMAN M. W. (2002): Genetic structure of human populations. *Science,* 298: 2381-2385.

ROSENBERG N. A. (2004): Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes,* 4: 137-138.

SCHERF B. D. (2000): World Watch List of Domestic Animal Diversity. FAO, *Harmadik kiadás,* Rome, Italy, 726.

SILVA P., GUAN X., HO-SHING O., JONES J., XU J., HUI D., NOTTER D. & SMITH E. (2009): Mitochondrial DNA-based analysis of genetic variation and relatedness among Sri Lankan indigenous chickens and the Ceylon junglefowl (Gallus lafayetti). *Animal Genetics,* 40 (1): 1-9.

SZALAY I. (2002): Régi magyar baromfifajták. *Mezőgazda Kiadó.* Budapest.

TADANO R., NISHIBORI M., NAGASAKA N. & TSUDZUKI M. (2007): Assessing genetic diversity and population structure for commercial chicken lines based on forty microsatellite analysis. *Poultry Science,* 86: 2301–2308.

TAKAHASHI H., NIRASAWA K., NAGAMINE Y., TSUDZUKI M. & YAMAMOTO Y. (1998): Genetic relationships among japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *The Journal of Heredity,* 89 (6): 543-546.

TANAKA M., HOSOKAWA Y., WATAHIKI M. & NAKASHIMA K. (1992): Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene,* 112 (2): 235-239.

TAUTZ D. & RENZ M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research,* 12 (10): 4127-4138.

TAUTZ D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research,* 17 (16): 6463-6471.

THAON D'ARNOLDI C., FOULLEY J.-L. & OLLIVIER L. (1998): An overview of the Weitzman approach to diversity. *Genetics Selection Evolution,* 30: 149–161.

TWITO T., WEIGEND S., BLUM S., GRANEVITZE Z., FELDMAN M. W. PERL-TREVES R. LAVI U., HILLEL J. (2007): Biodiversity of 20 chicken breeds assessed by SNPs located in gene regions. *Cytogenetic and Genome Research,* 117 (1-4): 319-326.

VANHALA T., TUISKULA-HAAVISTO M., ELO K., VILKKI J. & MÄKI-TANILA A. (1998): Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science,* 77 (6): 783-790.

WEBER J. L. & MAY P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics,* 44 (3): 388-396.

WEIGEND S. (1999): Assessment of biodoversity in poultry with DNA markers. In: Proceedings: Poultry Genetics Symposium, Mariensee, Germany, 7-14.

WEIGEND S. (coordinator), GROENEN M. A. M., TIXIER-BOICHARD M., VIGNAL A., HILLEL J., WIMMERS K., BURKE T. & MÄKI-TANILA A. (1998-2000): Development of strategy and application of molecular tools to assess biodiversity in chicken genetic resource. AVIANDIV; EC Contract No. BIO4-CT98-0342. http://aviandiv.tzv.fal.de

WEIR B. S. & COCKERHAM C. C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution,* 38, 1358-70.

WEST B. & ZHOU B. X. (1988): Did chickens go North? New evidence for domestication. *Journal of Archaeological Science,* 15 (5): 515-533.

WILKINSON S., WIENER P., TEVERSON D., HALEY C. S. & HOCKING P. M. (2011): Characterization of the genetic diversity, structure and admixture of British chicken breeds. *Animal Genetics,* DOI: 10.1111/j.1365- 2052.2011.02296.x

WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAVALSKI, J. A., TINGEY S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22): 6531-6535.

WINKLER J. (1921): Baromfitenyésztés. “Pátria” Irodalmi Vállalat és Nyomdai Részvénytársaság, Budapest

WRIGHT S. (1978): Evolution and the Genetics of Populations. University of Chicago Press, Chicago.1. 12-15.

ZHANG X., McDaniel G. R. and Giambrone J. J. (1995): Random amplified polymorphic DNA comparisons among broiler lines selected for incidence of tibial dyschondroplasia. *Poultry Science*, 74 (8): 1253-1258.

ZHANG Y. P. & SHI L. M. (1992): Mitochondrial DNA polymorphism in animals: A review *Zoological Research*, 13: 289-298.

ZHOU H. J. & LAMONT S. J. (1999): Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Animal Genetics*, 30 (4): 256–264.

9. MIKROSZATELLIT MARKEREK (2. számú melléklet)

2. számú melléklet : A vizsgálatban résztvevő mikroszatellit markerek elhelyezkedése a genomban, primerszekvenciái, olvadási hőmérsékletük, valamint a lehetséges allélméretek és allélszámok

Mikroszatellit lókusz	Kromoszóma	Forward primer szekvencia (5' → 3')	Reverse primer szekvencia (5' → 3')	T_m (°C)	Allél méretek (bp)	Allélok száma
MCW0103	3	AACTGCGTTGAGAGTGAATGC	TTTCCTAACTGGATGCTTCTG	64	266-270	2
MCW0295	4	ATCACTACAGAACACCCTCTC	TATGTATGCACGCAGATATCC	58	90-106	6
MCW0222	3	GCAGTTACATTGAAATGATTCC	TTCTCAAAACACCTAGAAGAC	60	220-226	4
ADL0268	1	CTCCACCCCTCTCAGAACTA	CAACTTCCCATCTACCTACT	60	104-118	7
MCW0183	7	ATCCCAGTGTCGAGTATCCGA	TGAGATTTACTGGAGCCTGCC	67	296-322	8
MCW0014	6	(AAAA)TATTGGCTCTAGGAACTGTC	(ACCG)GAAATGAAGGTAAGACTAGC	55	164-178	6
MCW0067	10	GCACTACTGTGTGCTGCAGTTT	GAGATGTAGTTGCCACATTCCGAC	60	178-184	4
MCW0098	4	GGCTGCTTTGTGCTCTTCTCG	CGATGGTCGTAATTCTCACGT	60	263-265	2
LEI0166	3	CTCCTGCCCTTAGCTACGCA	TATCCCCTGGCTGGGAGTTT	62	356-366	3
MCW0069	E60C04W23	GCACTCGAGAAAACTTCCTGCG	ATTGCTTCAGCAAGCATGGGAGGA	60	158-176	7
MCW0081	5	GTTGCTGAGAGCCTGGTGCAG	CCTGTATGTGGAATTACTTCTC	60	114-135	7
ADL0112	10	GGCTTAAGCTGACCCATTAT	ATCTCAAATGTAATGCGTGC	58	124-132	5
MCW0034	2	TGCACGCACTTACATACTTAGAGA	TGTCCTTCCAATTACATTCATGGG	60	220-242	10
MCW0111	1	GCTCCATGTGAAGTGGTTTA	ATGTCCACTTGTCAATGATG	62	98-114	6
MCW0078	8	CCACACGGAGAGGAGAAGGTCT	TAGCATATGAGTGTACTGAGCTTC	60	135-143	4
MCW0206	2	ACATCTAGAATTGACTGTTCAC	CTTGACAGTGATGCATTAAATG	60	223-239	5

LEI0094	4	GATCTCACCAGTATGAGCTGC	TCTCACACTGTAACACAGTGC	62	249-283	7
MCW0248	1	GTTGTTCAAAAGAAGATGCATG	TTGCATTAACTGGGCACTTTC	60	215-223	3
LEI0234	2	ATGCATCAGATTGGTATTCAA	CGTGGCTGTGAACAAATATG	55	217-316	14
MCW0330	17	TGGACCTCATCAGTCTGACAG	AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC	60	258-290	5
MCW0016	3	ATGGCGCAGAAGGCAAAGCGATAT	TGGCTTCTGAAGCAGTTGCTATGG	55	170-204	6
MCW0104	13	TAGCACAACTCAAGCTGTGAG	AGACTTGCACAGCTGTGTACC	60	190-226	10
MCW0020	1	TCTTCTTTGACATGAATTGGCA	GCAAGGAAGATTTTGTACAAAATC	60	179-197	5
MCW0165	23	CAGACATGCATGCCCAGATGA	CAGACATGCATGCCCAGATGA	60	114-118	3
MCW0123	14	CCACTAGAAAAGAACATCCTC	GGCTGATGTAAGAAGGGATGA	60	80-94	7
ADL0278	8	CCAGCAGTCTACCTTCCTAT	TGTCATCCAAGAACAGTGTG	62	114-123	6
MCW0037	3	ACCGGTGCCATCAATTACCTATTA	GAAAGCTCACATGACACTGCGAAA	66	154-158	5
MCW0080	15	GAAATGGTACAGTGCAGTTGG	CCGTGCATTCTTAATTGACAG	60	268-280	7
MCW0216	13	GGGTTTTACAGGATGGGACG	AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	58	141-145	4

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni mindenkinek a segítséget, aki bármilyen módon is hozzájárult dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Hidas András**nak, az évek során nyújtott szakmai, lelki támogatásért, végtelen türelméért, és amiért lehetővé tette számomra a kutatómunkába való bekapcsolódást, majd az egész téma feldolgozását.

Köszönet illeti **Dr. Révay Tamás**t, aki szakmai tanácsaival, biztatásával és türelmével nagy segítségemre volt.

Hálával tartozom továbbá a KÁTKI Genetikai és Szaporodásbiológiai Kutatócsoportja minden tagjának a technikai és baráti támogatásért, valamint a dolgozatom készülése alatt tanúsított megértéséért, segítő szándékáért:

Dr. Liptói Krisztina, Sztán Nikoletta, Lipcsei Józsefné Ica, Patakiné Dr. Várkonyi Eszter, Dr. Barna Judit, Váradi Éva.

Köszönöm továbbá **Dr. Szalay István**nak, a KÁTKI igazgatójának, aki az őshonos magyar tyúkfajták kialakulásával kapcsolatos információk rendelkezésemre bocsátásával nyújtott nagy segítséget, és **Barta Ildikó**nak, a KÁTKI tenyésztés vezetőjének, aki nemcsak szakmai tapasztalatit osztotta meg velem az őshonos állományokat illetően, hanem baráti támogatást is nyújtott.

A magyar őshonos tyúkfajták vizsgálatát a Jedlik Ányos program (OSHONDIV) támogatta.

Szakmai előmenetelemet nagymértékben előrelendítette **Dr. Steffen Weigend** (Friedrich-Löffler Intézet) és genetikai kutatócsoportjának (**Annett Weigend, Anke Flörke**) támogatása, melyek főként a mikroszatellit markerekkel való vizsgálatokra irányultak (TÉT pályázat).

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Olivier Hannotte**-nak és kutatócsoportjának (Kenya-ILRI) a mitokondriális DNS vizsgálatokban nyújtott szakmai segítségért.

Végezetül hálás vagyok családomnak, szüleimnek, testvéreimnek, páromnak, **Kiss Dániel**nek, és kedves barátnőmnek, **Dr. Körösi Katalin**nak, akik az évek során végtelen türelemmel, lelki támogatással mindvégig mellettem álltak. Dolgozatom nem készülhetett volna el az Ő biztatásuk nélkül, mellyel a sokszor nehéz időszakokon átsegítettek.