

SZENT ISTVÁN EGYETEM ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR
Ökológia Tanszék

**A KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK DNS-RE GYAKOROLT
DEGRADÁCIÓS HATÁSAINAK MODELLEZÉSE
MADÁRTOLLAKON**

**Készítette:
Nemesházi Edina**

**Témavezető:
Vili Nóra**

**2011
Budapest**

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3.
1.2. Mintavételi eljárások	3.
1.3. Nem-invazív mintavétel.....	3.
1.4. Vedlett tollak vizsgálata.....	3.
1.5. DNS kivonás madártollakból	4.
1.6. A környezeti tényezők hatásai.....	5.
1.7. Mikroorganizmusok szerepe a tollak bomlásában	6.
1.8. A DNS minőségének elbírálása.....	8.
2. CÉLKITŰZÉS	9.
3. MÓDSZEREK.....	10.
3.1. Mintavétel	10.
3.2. Kezelések	10.
3.2.1. Előkísérlet.....	10.
3.2.2. Kísérlet	11.
3.3. Preparálás	15.
3.4. DNS kivonás	16.
3.5. A DNS állapotának elbírálása	17.
3.5.1. DNS minta vizsgálata gélelektroforézissel.....	17.
3.5.2. Fragmentáltság mértékének megállapítása.....	18.
3.5.2.1. PCR.....	19.
3.5.2.2. PCR termék gélelektroforézise.....	21.
3.6. Az eredmények kiértékelése	22.
3.7. Kiegészítő vizsgálatok	23.
3.7.1. Fotoreflektancia mérése	23.
3.7.2. Tollakban megjelent gomba vizsgálata.....	23.
4. EREDMÉNYEK	24.
4.1. A CHD1 (2550F/2718R) szakasz tesztelése	24.
4.2. Előkísérlet	24.
4.3. Kísérlet.....	25.
4.3.1. Környezeti tényezők a természetes fénynek kitett csoportban.....	25.
4.3.2. A DNS minősítése.....	25.

4.3.3. Fragmensek amplifikációja	26.
4.3.4. A kezelések összehasonlítása	28.
4.4. Kiegészítő vizsgálatok	30.
4.4.1. Fotoreflektancia mérése	30.
4.4.2. Tollakban megjelent gomba vizsgálata	30.
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	32.
5.1. Kísérlet.....	32.
5.2. Kiegészítő vizsgálatok	33.
5.2.1. Fotoreflektancia mérése	33.
5.2.2. Tollakban megjelent gomba vizsgálata	33.
5.3. Ajánlások	33.
6. ÖSSZEFOGLALÓ	34.
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	35.
IRODALOMJEGYZÉK.....	I.
MELLÉKLETEK	IV.

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre nagyobb jelentőséget kap a különböző állatfajok kutatásában a genetikai anyag vizsgálata. Egyre többet tudunk meg az egyes lókuszok szerepéről a genomban, és a természetben élő populációk genetikai vizsgálata alapján számos kérdésre kaphatunk választ. Lehetőség nyílik például populáció-genetikai kutatások segítségével filogeográfiai mintázatok vizsgálatára (pl. rétisasok esetén: Hailer et al, 2007), vagy mikroszatellita fragmensanalízis révén akár az egyedek azonosítására is (pl. parlagi sasok esetén: Vili és mtsai, 2009).

1.2. Mintavételi eljárások

A genetikai vizsgálatokra irányuló mintavételezési eljárásokat három csoportba soroljuk: destruktív, invazív és nem-invazív eljárások.

A destruktív mintavételezés a begyűjtött egyedek elpusztításával jár.

Invazív mintavételezéskor az állatot be kell fogni (pl. vérvétel), ami nagy stresszel járhat az egyed számára.

Nem-invazív mintavételi eljárások alkalmazásával elkerülhető az egyedek befogása, zavarása. Ilyenkor az állatok által hátrahagyott képleteket (pl. vedlett toll, ürülék, szőr) gyűjtik be, és abból nyernek DNS mintát. (*Taberlet et al, 1999*)

1.3. Nem-invazív mintavétel

A nem-invazív mintavételi eljárásokra jellemző, hogy gyakran csak nagyon kis mennyiségű és jelentősen degradált mintát nyújtanak. Viszonylag gyakori az „allélkiesés” (PCR reakció után heterozigóta egyedet tévesen homozigótának értékelünk) illetve a műtermék („hamis allél”) jelensége.

Nagy előnye azonban ezeknek a módszereknek, hogy a hátrahagyott nyomok helyzetéből egyedi azonosítás (mikroszatellita-alapú DNS-ujjlenyomat meghatározás) révén a populáció demográfiai sajátosságairól is információkat kaphatunk (pl. be- és kivándorlás), és jól becsülhető az utódok ivararánya. (*Vili Nóra és mtsai, 2009*)

1.4. Vedlett tollak vizsgálata

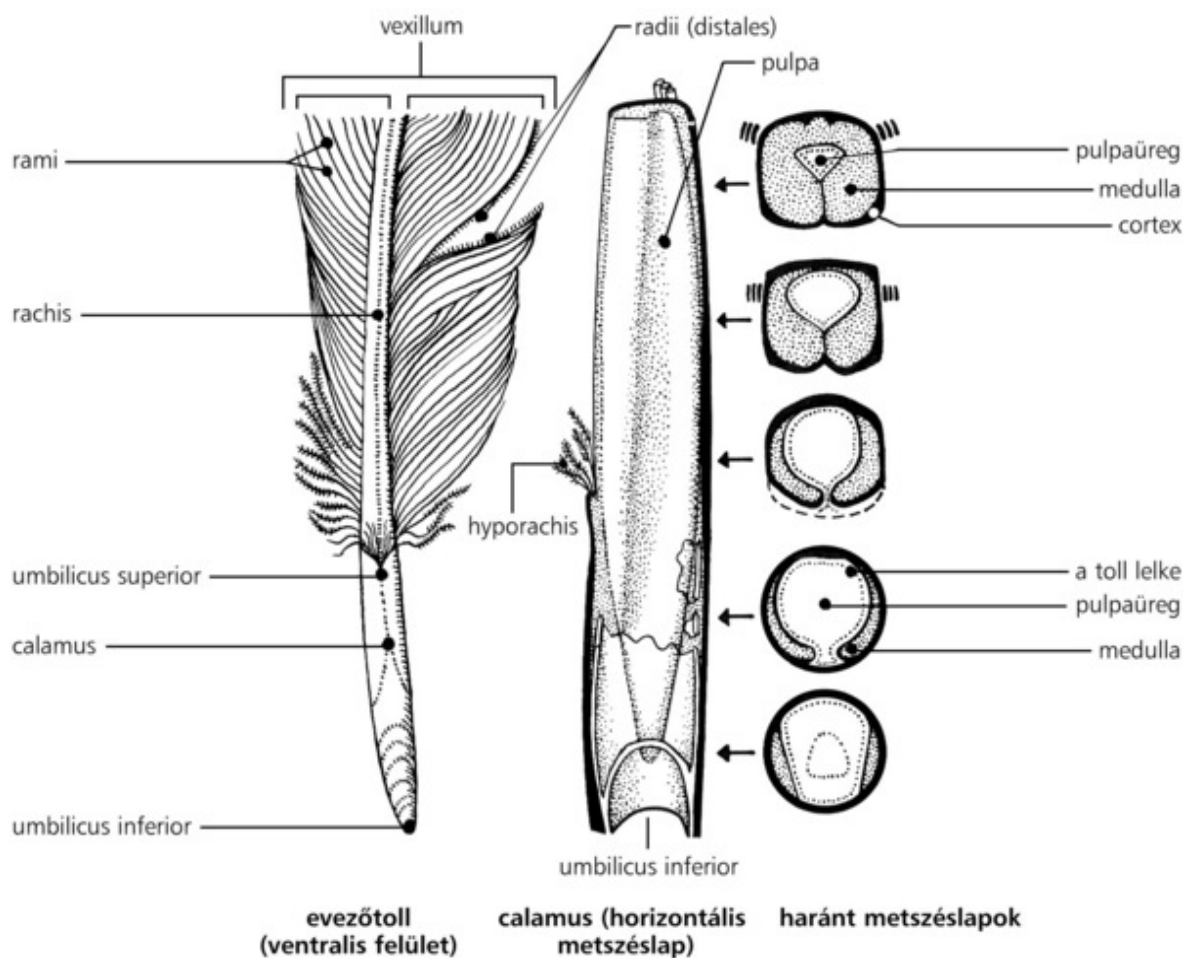
Gyakorlati tapasztalatok (*Vili Nóra és mtsai, 2009*) azt mutatják, hogy a természetben a tollak vedlés után néhány hónap elteltével erőteljes bomlásnak indulnak, de ennek sebessége az időjárástól függhet.

1.5. DNS kivonás madártollakból

A madarak tollaiból leghatékonyabban a felső köldök (umbilicus superior) kimetszésével nyerhetünk DNS mintát (Horváth Márton és mtsai, 2005).

A tollak fejlődése során a tápláló artéria visszahúzódik, de ezen a területen vérrögöt hagy maga után. Ez a képlet alkalmas a DNS vizsgálatokhoz elegendő minta kinyerésére.

„A tengely hosszabb, belül tömörebb szerkezetű, U vagy négyszögletes keresztmetszetű szakasza a gerinc (főgerinc), *rachis*, mely a toll csúcsa felé fokozatosan elvékonyodik. Vázát külső, elszarusodott, lapos sejtekből álló kéregállomány, *cortex*, adja, belsejét levegőtartalmú sejtekből álló, fehér színű velőállomány, *medulla*, tölti ki.” (Fehér György: *A háziállatok funkcionális anatómiája*, 2004)



2.1. ábra: A toll szerkezete (Fehér György: *A háziállatok funkcionális anatómiája*, 2004)

1.6. A környezeti tényezők hatásai

A vedlett tollakból történő DNS vizsgálatok eredményessége nagy mértékben függhet a tollakat ért környezeti hatásoktól. Például parlagi sasok (*Aquila heliaca*) nem-invazív eljárással történő mintavételezése esetében a gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy azokból a tollakból, melyeket a gyűjtést követően száraz, sötét, hűvös helyen tárolnak jelentősen nagyobb arányban lehet jó minőségű DNS-t kinyerni, mint a nem szabályozott tárolási körülményekből származó tollak esetében (*Vili Nóra és mtsai, 2009*). Az egyes fajok vedlési időszakai és azok időtartama nagy mértékben eltérhetnek. Ezekből a különbségekből, és az élőhelyek különbözőségéből adódóan eltérő hatások érhetik az elhullajtott tollakat.

Az egyes környezeti tényezők DNS-re gyakorolt hatásait számos kutató vizsgálta már. A magas hőmérséklet növeli a degradáció valószínűségét, mivel ilyenkor jobban kitekeredik a DNS, így sokkal inkább ki van téve környezet károsító hatásainak, például az UV-B sugárzás esetében. Ezt az összefüggést találták a kutatók amikor megállapították, hogy az UV-B sugárzás DNS károsító hatása a dohány (*Nicotiana tabacum*) sejtekben hőmérséklet-függő. A sejteket 0, 12, illetve 24°C-os hőmérsékleten tették ki UV-B sugárzásnak, és azt tapasztalták, hogy a hőmérséklet növekedésével a károsodás mértéke is növekszik. (*Shaoshan Li et al, 2002*) Emellett megnőhet a kémiai bomlás sebessége, illetve magasabb hőmérsékleten több bontó enzim lehet aktív, ami szintén hozzájárulhat a károsodáshoz.

A magas páratartalom látványos változást eredményez a tollak szerkezetében. A cséve szivacsosodik, emellett a pára előnyös környezetet nyújthat különböző mikroorganizmusoknak, amelyek hozzájárulhatnak a tollak minőségének romlásához (ld. 2.3. fejezet).

Barna medvék (*Ursus arctos*) ürülékéből történő DNS kivonás esetén megállapították, hogy száraz, meleg, déli fekvésű füves domboldalon elhelyezett mintából nagyobb arányban lehet sikeres a mintavételezés 60 nap után, mint egy nedves, hűvös erdő esetében (*Murphy és munkatársai, 2007*).

Ismert az UV sugárzás DNS-re gyakorolt károsító hatása, ami a különböző hullámhossz tartományokban eltérő lehet. Leginkább az UV-C (200-280 nm) sugárzás hatása jelentős, ám ez a napsugárzás hatásainak vizsgálata szempontjából biológiailag nem releváns, mivel a Föld felszínét nem éri el a Napból érkező sugárzásnak ez a hullámhossz tartománya (*Jean-Luc Ravant et al, 2001*). Ilyen tekintetben sokkal nagyobb az UV-B (280-315 nm) sugárzás jelentősége, amely pirimidin (elsősorban timin) dimerek képződését idézi elő a DNS-ben, ezáltal leállítja a DNS-replikációt, nem történhet bázispárosodás.

Laboratóriumi vizsgálatok szempontjából fontos, hogy a besugárzás időtartamával nő az „allélkiesések” száma. (Thacker et al, 2006)

(Allélkiesésnek nevezzük azt a jelenséget, amikor a PCR reakció során a rövid termék preferenciális képződése történik, és emiatt egy heterozigóta egyedet tévesen homozigótának értékelünk.)

Más szempontokat figyelembe véve, az UV sugárzás pozitívan is hathat a tollak állapotának megőrzésére. E hatás oly módon érvényesülhet, hogy a tollak bomlásában szerepet játszó mikroorganizmusok szaporodását gátolja azáltal, hogy roncsolja a sejtjeiket. Ilyen baktérium például a talajlakó, spóráképző, termofil *Bacillus licheniformis*, mely a természetben hozzájárul az elhullott tollak lebomlásához. Ezek a baktériumok kevesebb telepet tudnak képezni napfénynek kitett helyen, mint sötétben (Saranathan and Burt, 2007).

A cséve kérgei területe (cortex) nagy mennyiségű keratint tartalmaz. A keratin típusú fehérjéket azonban az UV tartomány minden hullámhossza károsítja -a rövidebb hullámhossz tartomány például az aromásokat (Smith, 1995).

Egy tanulmány azt mutatta, hogy 200 órányi UV-sugárzásnak kitett tollak „hajlítószilárdsága” (oldalirányú mechanikai behatással szembeni ellenállása) nagyobb volt, mint az UV-val nem kezelt tollak esetében. Hosszabb besugárzás után azonban ez az ellenálló képesség rohamosan csökkent. (Borgudd, 2003)

Nagy héjabagoly (*Ninox strenua*) vedlett tollainak vizuális minősítése, valamint a tollakból kivonható DNS minősége közötti összefüggések vizsgálatokor megállapították a kutatók, hogy a jó állapotúnak minősített tollakból sokkal nagyobb arányban volt sikeres a DNS vizsgálata, mint a közepes, illetve rossz minőségű tollakból. Továbbá arra a következtetésre jutottak, hogy a PCR amplifikáció sikeressége nagyobb mértékben függ a tollak állapotától (minőségétől), mint a típusától. A minősítés során első sorban a calamus területén, illetve kisebb jelentőséggel a zászlóban látható degradációs jelek vizsgálatát javasolják a kutatók. (Hogan et al, 2008)

1.7. Mikroorganizmusok szerepe a tollak bomlásában

A tollak külső vázát alkotó keratin fehérjét a legtöbb fehérjebontó enzim nem képes lebontani. Az α - és β -keratin (α -hélix és β -redő szerkezet) esetén is gyakoriak a diszulfidkötések, ami növeli a mechanikai stabilitást. Ennek ellenére a természetben szinte mindenütt előfordulnak keratin-degradáló mikroorganizmusok, melyek keratináz aktivitású enzimek

előállítására képesek. Vannak köztük talajlakók, de vannak élősködők is. (Onifade et al, 1998)

Például élő állatok keratin tartalmú testfelszíni képleteit parazitálják a dermatophyták, de a gombák között is számos szaprofita, illetve parazita életmódú taxon képes a keratin bontására. A keratin degradációjára képes továbbá az Actinomycetes, Bacillus (pl. *B. licheniformis*), valamint a Streptomyces (pl. *S. patum*, *S. fradiae*) taxonok számos képviselője. Léteznek fajspecifikus mikroorganizmusok is, pl. a *Trichophyton gallinae*, amely szinte kizárólag baromfi tollakon található. A keratint bontani képes mikroorganizmusok egy része azonban termofil keratinázt termel, amely csak magas hőmérsékleten képes kifejteni a hatását (pl. *C. keratinophyllum*, valamint a 40-70°C között aktív enzimet előállító *S. pactum*). (Onifade et al, 1998)

A keratin mikrobiális emésztésének többféle mechanizmusa létezik. Gombák esetén a folyamat általában ún. mechanikai keratinolízissel indul, melynek során a keratin degradációja „micéliális nyomásra”, illetve a keratin tartalmú szubsztrát penetrációja révén valósul meg. Ez a keratin bontó enzim termelődése előtt mérhető folyamat, amely a micéliális növekedéssel függ össze. Mivel a tollakban nagy a cisztein aránya, a keratin hatékony hidrolíziséhez fontos lehet a diszulfid-hidak lebontása szulfitolízis révén, melyet számos gomba fajnál kimutattak (pl. *Microsporium gypseum*). Feltételezhető, hogy gombák, illetve fonalas Actinomycetes fajok esetén a keratin bontása myceliális növekedés révén indul meg, majd a diszulfid-hidak bontását követően, proteolízissel (keratinolízis) fejeződik be. (Onifade et al, 1998)

Cristol és munkatársai (2005) a *Bacillus licheniformis* toll-degradáló hatását vizsgálták vadon élő, befogott madarakon (*Cardinalis cardinalis* és *Sturnus vulgaris*). Ez a baktérium 45°C körüli hőmérsékletet, és magas páratartalmat igényel, és a vízi, illetve talajközeli életmódot folytató madarak tollazatán gyakrabban megtalálható. Sem a hűvös, száraz, sem a meleg, nedves helyen tartott egyedek tollazata nem károsodott jelentősen a kísérlet 2-4 hetes időtartama alatt. A kutatók véleménye szerint, a környezeti feltételek csak speciális életmódú fajok esetén lehetnek megfelelőek ahhoz, hogy a baktérium ki tudja fejteni a tollakra gyakorolt degradáló hatását élő madáron (pl. éjszakai, vagy barlang-lakó fajok, melyek kevés UV-sugárzásnak vannak kitéve), illetve a tollászkodással, vagy más viselkedéssel nem védhető tollak lehetnek annak kitéve (pl. a nyak hátoldalán található pehelytollak, melyekből hiányzik a melanin, illetve a madár nem képes faggyúval bekenni őket).

1.8. A DNS minőségének elbírálása

A DNS minőségét elbírálhatjuk agaróz gélelektroforézis alapján. *Tetyana Zayats és munkatársai* 2009-ben megjelent publikációjukban egy nem-invazív mintavételi eljárással, a száj öblítésével kimosható DNS-t vizsgálták első, illetve második öblítés esetén. Ennek során agaróz gélelektroforézist végeztek, majd a kapott eredményt digitális fényképezőgéppel rögzítették. Vizuális vizsgálattal bírálták el az egyes minták minőségét. Két kategóriát különítettek el: ép, illetve degradált DNS, így bináris kódot használhattak az eredmények kiértékelésénél.

Annak megállapítására, hogy a DNS mennyire fragmentálódott, kézenfekvő megoldás lehet, ha különböző hosszúságú szakaszokat erősítünk fel PCR segítségével. Így a termék megléte vagy hiánya jelzi, hogy a DNS az adott fragmens hosszánál rövidebb szakaszokra töredezett-e. *Hogan és munkatársai* 2008-as tanulmányukban nagy héjabagoly (*Ninox strenua*) tollak vizsgálatakor egy mitokondriális (ND3, kb. 400 bp.), a CHD1 génen (P2/P8 primerpár, kb. 377 bp) található, illetve Nst02 (kb. 151 bp), valamint 13 polimorf mikroszatellita szakaszt erősítettek fel. Az amplifikáció sikerességét a termék megléte vagy hiánya alapján határozták meg. A kutatók szignifikáns korrelációt találtak a CHD1 génen vizsgált szakasz, valamint a rövidebb, mikroszatellita szakaszok amplifikációjának sikeressége között. Azoknál a mintáknál, ahol az ivari kromoszómához kötött CHD1 génen található szakasz felerősítése sikeres volt, ott a mikroszatellita markerek felerősítése is sikeres volt. A kutatók az eredményeik alapján kidolgoztak egy 3 lépéses vizsgálati módszert a DNS multilókuszos genotípus-vizsgálatának alkalmasságára. Az első lépésben a toll vizuális minősítése történik, ahol a rossz állapotban lévő tollakat a vizsgálatból kizárják, a közepes minőségűnek ítélt tollakat pedig csak alacsony mintaszám esetén vetik alá DNS-kivonásnak. A második lépésben történik a DNS kivonása. A harmadik lépésben leghosszabb vizsgált nukleáris DNS szakasz PCR amplifikációja következik. Ez alapján, ha csak a mintaszám nem túl alacsony, csak azokat a mintákat javasolják a multilókuszos genotípus-vizsgálatra, amelyek esetén az amplifikáció sikeres volt.

2. CÉLKITŰZÉS

Vizsgálatunk célja, hogy modellezze a magas hőmérséklet, magas relatív páratartalom illetve a napsugárzás káros hatásait a vedlett tollakból kivonható DNS-re. Ezáltal szeretnénk a madarak genetikai vizsgálatára vonatkozó kutatások szempontjából hasznos ismereteket szerezni, melyek segíthetik a nem-invazív mintavételezés hatékonyabb megtervezését.

Kísérleteink során arra a kérdésre keressük a választ, hogy fontos-e a vedlést követően azonnal összegyűjteni a tollakat, illetve gyűjtés után hogyan érdemes tárolni azokat.

3. MÓDSZEREK

3.1. Mintavétel

A vizsgálatokhoz házasított nyári lúd (*Anser anser*) tollakat használtunk. A szükséges tollak Gödöllő – Babatpusztán (lúd tenyésztelep és keltető) kerültek begyűjtésre 2010 januárjában és 2011 februárjában. Ezekben az időpontokban a madarak vedlés előtt, illetve vedlés alatt álltak, ezért a tollak vérzés nélkül téphetők voltak (a 2011-es gyűjtésben néhány toll vérzett, ezek nem kerültek felhasználásra a kísérletek során). A kísérletben kettes, illetve hármas kézevezők, az előkísérletben pedig egy egyedből származó különböző méretű tollak vizsgálata történt.

A tollakat a kezelésig, illetve kezelés után preparálásig fagyasztó ládában tároltuk, -20°C-on.

Minden tollat egyedi mintakóddal láttunk el. A kódot alkoholos filctollal a csévére írtam, illetve azokhoz a kezelésekhöz, amelyeknél várható volt, hogy a jelölés lekophat, a mintakóddal ellátott papír cédulát is rögzítettem a zászlóra.

A gyűjtött tollak csévéjének átmérőjét tized milliméter pontossággal feljegyeztük (ld. 1. melléklet). Az egyes tollakat randomizálva osztottuk be a kísérletek csoportjaiba.

3.2. Kezelések

3.2.1. Előkísérlet

A vizsgálandó környezeti tényezők (magas hőmérséklet, magas páratartalom, napsugárzás) hatásainak megfelelő elemzéséhez az egyes kezelések szükséges időtartamának és kombinációinak meghatározására előkísérletet terveztünk.

Az előkísérletben egy egyedből származó, különböző méretű tollak kerültek felhasználásra, az egyedi különbségek kiküszöbölése érdekében. Ennek során összesen 60 darab, csoportonként 15 darab tollat vizsgáltunk.

Négy csoportot határoztunk meg:

- 1, Természetes fény +hő
- 2, Pára + hő
- 3, Természetes fény + pára + hő
- 4, Kontroll

1, Az előkísérlet során az napsugárzás hatásait száraz nyári napokon vizsgáltuk (2010.08.09-2010.08.18.). A tollakat két 1,5x2 cm keresztmetszetű fa rúdra kötöttük cérna segítségével úgy, hogy a felső köldök minden esetben szabadon legyen. A tollak stabilan rögzültek a rúdra, hogy a szél ne befolyásolja a helyzetüket. Ezeket a rudakat a kísérlet alatt minden nap kikötöttük egy dél-nyugati fekvésű, a nap nagyobbik részében napsütésnek kitett, magassági szintű ablak biztonsági rácsára, így 7 napon keresztül, napi 420 perc (7 óra) természetes világítás érte a tollakat. A napon töltött időszakok között sötét szekrényben, szobahőmérsékleten voltak tartva. A kezelés időtartama alatt a www.amsz.hu internetes portál nyilvános UV-B index, hőmérséklet, páratartalom és csapadék archivált mérési adatai minden napról elmentésre kerültek (mérőműszer: Oregon Scientific WMR-200).

2, A magas páratartalom és magas hőmérséklet együttes hatásait 30°C-os vízfürdőn vizsgáltuk. A tollakat hungarocell tálcán helyeztem a vízfürdőbe, így nem érintkeztek az alsó vízzel. A relatív páratartalmat 100%-osnak tekintettük, feltételezve, hogy a rendszer zárt a kezelés időtartama alatt. Ez a kísérlet 5 napon keresztül zajlott, megszakítások nélkül. A kezeléskor az egyik toll kimaradt, így ebben a csoportban csak 14 tollat vizsgáltunk.

3, A hármas csoport esetén az előző két csoportban leírt kezeléseket alkalmaztam. Először vízfürdőnek, majd természetes napsugárzásnak voltak kitéve a tollak.

4, A kontroll csoport tollai a gyűjtés után preparálásig fagyasztoóban voltak.

3.2.2. Kísérlet

A kísérlet során a 2010-es gyűjtésből származó 61 és a 2011-es gyűjtésből származó 51, összesen 112 darab toll került felhasználásra. Ezek különböző egyedekből származó kettes, illetve hármas kézvezők voltak. Minden csoportba 16 darab toll került. Ezen kívül a 2011-es gyűjtés során összesen 11 darab tollat gyűjtöttünk ismert ivarú egyedektől (4 darabot tojóktól és 7 darabot hímeiktől), mivel nem találtunk szakirodalmi adatot arra, hogy a CHD1 génen (3.5.2. fejezet) alkalmazott primerpár segítségével pontosan mekkora fragmentumok várhatók PCR termékként *Anser anser* esetén.

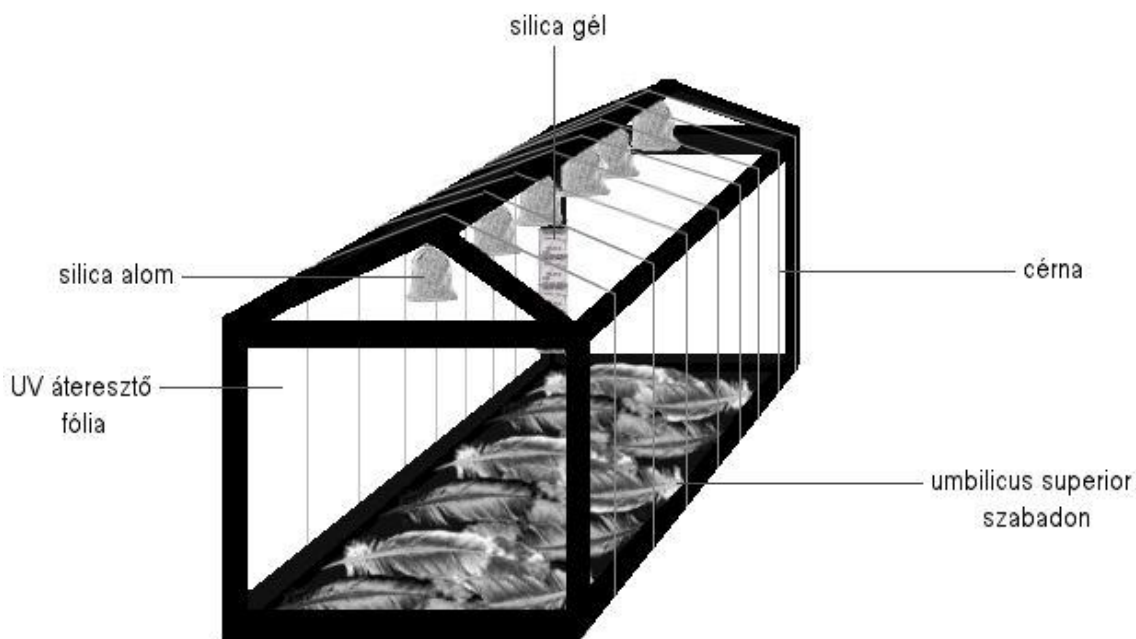
A kísérletben alkalmazott kezeléseket és azok időtartamát az előkísérlet eredményei alapján határoztuk meg.

7 csoportot különböztettünk meg:

- 1, Természetes fény
- 2, Pára+hő
- 3, Pára+hő, fertőtlenített toll

- 4, Száraz hő
- 5, Száraz hő, fertőtlenített toll
- 6, Mesterséges fény + hő
- K, Kontroll

1, A napsugárzás hatásait saját tervezésű „UV-dobozban” modelleztem. A tollakat a 3.3. ábrán látható módon a doboz aljához rögzítettem a doboz aljába fúrt lyukakon keresztül cérna segítségével úgy, hogy minden toll két ponton rögzüljön, így semmilyen irányba el ne mozdulhasson, és a felső köldök minden esetben szabadon legyen. A doboz vázát könnyű műanyag lemez adta, amit szoláriumokban használatos UV-áteresztő fóliával (JK-Licht) vontam be. Az esetleges csapadék hatásainak kiküszöbölésére a doboz felső része háztető-szerűen meredek, a vázat pedig cérnával tekertem be, hogy a fólia be ne szakadjon a ráhulló csapadék súlya alatt, de a tollakat ne árnyékolja a tartószerkezet. A dobozban a páratartalom minimálisra csökkentése érdekében előzőleg kiszárított, lemért száraz tömegű szilikagélt, valamint szilika macskaalmot helyeztem el úgy, hogy zsákok a tollakkal közvetlenül ne érintkezzenek, a fólia záródási pontjai pedig a doboz alá estek, amit így szigetelő szalaggal légmentesen lezártam. A doboz déli fekvésű, körülbelül 4 m magasságban lévő ablak párkányán került rögzítésre, és 3 héten keresztül folyamatosan ott volt (2010.09.10-2010.10.01.). A környezeti tényezőkre vonatkozó adatokat ezalatt az idő alatt az előkísérletnél alkalmazott módon a www.amsz.hu internetes portálról gyűjtöttem (mérőműszer: Oregon Scientific WMR-200), és minden nap 10:30 és 15:30 között mért értékeket vettem figyelembe, mivel ebben az intervallumban a legerősebb a napsugárzás. A kezelés után a doboz felnyitását követően a lehető legrövidebb időn belül a szilika gél, illetve a szilika alom tömegét lemértem, majd külön befőttes üvegbe helyeztem egy-egy darab vízzel átitatott papírtörülkövel együtt, melyek közvetlenül nem érintkeztek a zsákokkal. A befőttes üveget lezártam, majd további két napon ellenőriztem a tömeggyarapodást, hogy meggyőződjek arról, hogy a kísérlet során nem telítődött vízzel a szilika gél illetve alom (tehát képes további nedvesség megkötésére), így biztosak lehessünk abban, hogy a dobozban kellően alacsony volt a páratartalom a kísérlet időtartama alatt.



3.3. ábra „UV doboz”

2, Ebben a csoportban a magas hőmérséklet és 100%-os relatív páratartalom hatásait vizsgáltam az előkísérletben alkalmazott módon, 30°C-os vízfürdőn. A kezelés időtartama 100,5 óra (kb. 4 nap) volt.

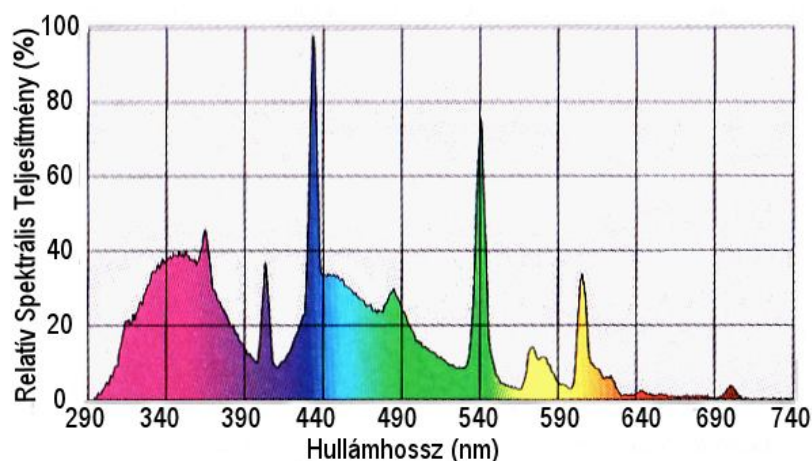
3, Az előkísérletben tapasztalt penészesedés kiküszöbölése érdekében fertőtlenített tollak vízfürdőn való vizsgálatát is indokoltak találtuk. Ehhez a vízfürdőt előzőleg, ecetes tisztítás után UV-C lámpa alá helyeztük 8 órás időtartamra, a tollakat pedig Descosept (baktericid, fungicid és virucid fertőtlenítőszer, melynek 100g mennyisége 38,9g etanolt, 0,1g glioxált és 0,05g didecil-dimetil-ammónium-kloridot tartalmaz) permetezésével fertőtlenítettem. A kezelés 100,5 óráig (kb. 4 nap) zajlott, 30°C-on. A kísérleti körülmények azonban nem tekinthetők sterilnek, mivel a külső levegő rendszerbe kerülését nem tudtuk megakadályozni.

4, A száraz hőmérséklet hatásainak vizsgálatához szárítószekrényt (Memmert) alkalmaztunk. A tollak simítózáras műanyag tasakban, szilika macskaalom hozzáadásával kerültek a 30°C-ra melegített szárítószekrénybe, 100,5 órára (kb. 4 nap).

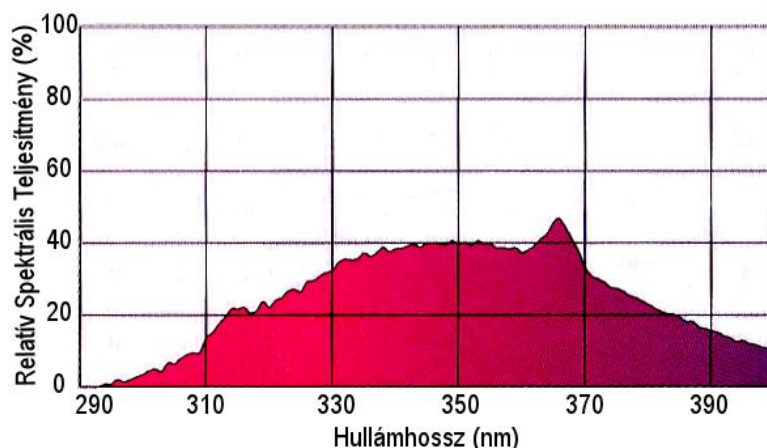
5, A fertőtlenített tollakon történő száraz hőmérséklet hatásainak vizsgálatához a 4-es csoportban alkalmazott módon, Descosepttel fertőtlenítettem a tollakat. A kezelés időtartama itt is 100,5 óra (kb. 4 nap) volt, 30°C-os szárítószekrényben (Memmert), amely előzőleg 60 percig 170 °C hőmérsékleten sterilizálva lett. A tollak előzőleg UV-C lámpával sterilizált simítózáras műanyag tasakba kerültek szilika macskaalommal, amely szintén UV-C

lámpával lett megvilágítva 8 órán keresztül. A kísérleti körülmények azonban nem tekinthetők sterilnek, mivel a külső levegő rendszerbe kerülését nem tudtuk megakadályozni.

6, Mivel a természetes fénynek kitett tollak esetén csak UV-B index állt rendelkezésünkre az UV-B sugárzás intenzitásának megállapítására, amely bonyolult meteorológiai számítások eredménye, ezért mesterséges megvilágítással kezelt tollak vizsgálatát is indokoltnak tartottuk, amely esetén pontosan ismert a tollakat ért sugárzás erőssége az egyes hullámhossz-tartományokban. A mesterséges fénynek kitett tollakat Repti Glo 5.0 (ExoTerra, 60cm, 20W, 3.4. és 3.5. ábra) típusú fénycsővel világítottuk meg. Mivel a természetes fénynek kitett csoport esetén a kezelés 21 napig tartott, és a nyári időszakban (amikor az UV-B sugárzás a legintenzívebben éri a talajt) a legintenzívebb napsütéses órák száma kb. 5 óra (10:30-15:30), ezért 5x21, azaz kb. 105 órán keresztül zajlott ez a kezelés. Ez alatt a tollak 28,5°C-on voltak tartva, amit a kísérleti térben elhelyezett hőmérő leolvasásával a kísérlet időtartama alatt többször ellenőriztünk. A pára kiküszöbölése érdekében a tollak alá nagy mennyiségű szilika macskaalmot helyeztünk, és az egész kísérleti teret (tálca a szilika alommal és a tollakkal + fénycső a foglalattal) fekete nylon fóliával vontuk körbe, és szigetelő szalaggal biztosítottuk, hogy a légtér teljesen zárt legyen. A fénycső 24 cm távolságról világította meg a tollakat úgy, hogy a felső köldököt 90°-os szögben érje a sugárzás (a gyártó ajánlása max. 30cm távolság).



3.4. ábra: A Repti Glo 5.0 fénycső kibocsátási adatai (a termék csomagolása nyomán)



3.5. ábra: A Repti Glo 5.0 fénykibocsátási adatai UV-tartományban (UV-B: 280-315 nm, UV-A: 315-400 nm) (a termék csomagolása nyomán)

K, A kontroll csoportba sorolt tollak a gyűjtést követően preparálásig fagyasztóban voltak.

3.3. Preparálás

A DNS minta kinyeréséhez a tollak felső köldökét steril szikepengével metszettem ki, majd a kimetszett darabot hosszában kettévágtam, hogy a DNS kivonása során az emésztő enzim hatékonyabban kifejthesse hatását. A kontamináció elkerülése érdekében minden toll preparálásához új papír alátétet, gumikesztyűt és steril pengét használtam. (Horváth Márton és mtsai, 2005) A felső köldök területét preparálás előtt 96%-os etanollal fertőtlenítettem, hogy a külső szennyeződésekeltávolítsam. A kimetszett darabok Eppendorf csőben fagyasztóba kerültek, és a DNS kivonásig -20°C-on tároltuk őket.



3.6. ábra Kipreparált felső köldök

3.4. DNS kivonás

A kimetszett felső köldökből a DNS kivonása kisózással történő protokoll szerint történt (*Gemmel és Akiyama, 1998*), néhány módosítással. Az eljárás három napot vett igénybe. Az első napon a preparátumot Proteináz-K emésztésnek tettük ki. Ennek során minden mintához 15 µl Proteináz-K enzimet (Fermentas), 100 µl Proteináz-K puffert, 15 µl 20%-os SDS-t, 155 µl desztillált vizet és 10 µl DTT-t (1,4-ditiotreitol, a keratin oldásához) adtam, majd az elegyet standard módon 15 mp vortexen történő rázásnak vettem alá. Ezután a minták 55-60°C-os vízfürdőre kerültek, egész éjjelre.

A második napon az emésztetlen darabokról leszívtam a DNS-t tartalmazó oldatot, majd 315 µl 5 mol/l koncentrációjú LiCl-oldat és 630 µl kloroform-izoamil alkohol (24:1 arányú keverék) hozzáadása következett. Ez az elegy is standard módon 15 mp vortexen történő rázásnak lett kitéve, majd 14100 fordulat/mp sebességgel 10 percig centrifugáltam, hogy a két fázis jól elkülönüljön. A DNS a felső fázisba került, ebből 400 µl-t új csőbe mérve 400 µl izopropanol (Reanal) hozzáadása következett, majd a csövek forgatás után -20°C-os fagyasztóba kerültek.

A DNS kivonás harmadik napján 15 perc centrifugálás (14100 rpm) után a DNS-ről a propanolt leöntöttem, majd 800 µl 70%-os etanolt (Reanal) mértem rá. Újabb 15 perc centrifugálás után a kicsapódott DNS-ről leöntöttem a felülúszót, majd a nyitott csöveket sötét helyre tettem száradásig. A minták végül 50 µl TE pufferben (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) kerültek beoldásra, ezután -20 °C-on tároltuk őket.

A munkafolyamatok során figyelembe vettük *Taberlet és Luikart (1999)* javaslatait a nem-invazív mintavételi eljárásokból származó DNS-minták kezelésére vonatkozóan. E szerint a PCR előtti és utáni folyamatokat célszerű térben elkülöníteni egymástól, kerülni kell a DNS kivonására szolgáló helyiségben a koncentrált DNS kivonatokat, minden mintához külön, aeroszol-rezisztens pipetta hegyet kell használni, és a reagenseket folyamatosan meg kell figyelni a DNS szennyeződésének elkerülése érdekében. Ez utóbbi szempont miatt negatív kontrollt használtunk a PCR reakciók során (az egyik csőbe a DNS mennyiségének megfelelő mennyiségű nukleáz-mentes víz került DNS helyett, minden más reagens meggyegyzett a DNS mintákhoz mért eleggyel).

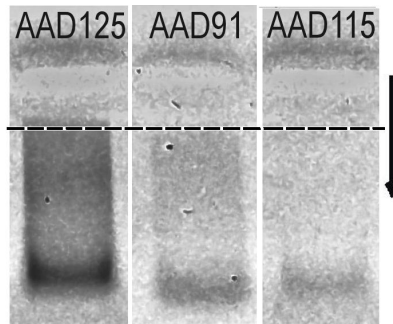
3.5. A DNS állapotának elbírálása

Az egyes kezelések DNS-re gyakorolt hatásának erősségét, azaz a degradáció mértékét két szempont alapján állapítottuk meg. Minden DNS minta állapotát (degradáltságát) agaróz gélelektroforézis segítségével becsültük meg, és a fragmentáltság mértékét különböző hosszúságú (kb. 151, 300, 500, 985 bázispár) DNS szakaszok felszaporításával vizsgáltuk. A legnagyobb felszaporítható fragmenshossz alapján becsültük meg, hogy milyen mértékben töredezett a vizsgált DNS minta.

3.5.1. DNS minta vizsgálata gélelektroforézissel

A tollakból kivont DNS-t 0,8 %-os agaróz gélen futtattam meg (minden zsebbe 5-5 µl DNS minta került, amihez előzőleg 2-2 µl felvivő festéket (Ficoll^R + EDTA + brómfenolkék) kevertem). A minták mellett minden esetben DNS-létrát (Fermentas, O'GeneRulerTM) futtattam. Az előkísérlet során a DNS festése gélbe öntött etídium-bromid segítségével történt. A kísérlet során az elektroforézis 100V feszültségen, 20 percig zajlott, ezután a szokásos eljárás szerint, 5 perc etídium-bromidos mosás, majd 10 perc desztillált vizes öblítés következett. Ezután a gél UV-asztalra (Vilber Lourmat ECX-20.C) tettem, az eredmény digitális fényképezőgéppel, standard távolságról, standard beállításokkal rögzítésre került. Az előkísérlet során Olympus FE-310, a kísérlet során Fujifilm FinePix S1600 típusú fényképezőgépet használtunk. Az UV-asztal védő tetejét felnyitottuk, hogy ne zavarja a fényképezést, és egy fekete fotókartonnal kibélelt kartondobozban készítettük el a képeket egy, a fényképezőgép objektívjének megfelelő méretű lyukon keresztül, így kizártuk a külső zavaró fényforrásokat.

Az egyes minták minőségének elbírálásához három kategóriát állapítottunk meg: jó minőségű (2), gyenge minőségű (1), illetve degradált (0) DNS. (3.7. ábra) Egy mintát degradáltnak tekintettünk, ha az elektroforézis után nem volt látható közvetlenül a zseb alatti, hosszú szakaszokból álló sáv (ld. 3.7. ábra).



3.7. ábra: A DNS minőségének elbírálása. Balról: jó, gyenge, degradált DNS. A szaggatott vonal jelzi a hosszabb fragmenseket, amelyek megléte vagy hiánya alapján minősítettük a DNS-t. A futás irányát a nyíl jelzi.

3.5.2. Fragmentáltság mértékének megállapítása

Annak megállapítására, hogy a DNS minták mennyire töredezték a kezelések során, különböző hosszúságú szakaszokat erősítettünk fel PCR segítségével. Az alapján, hogy mekkora volt a leghosszabb fragmens, amit sikerült amplifikálni, megbecsültük a fragmentálódás mértékét.

A vizsgálat során négy különböző hosszúságú (kb. 151, 300, 500, 985 bázispár) nukleáris DNS-szakaszt vizsgáltunk. A vizsgált szakaszokat a 3.9. ábra tartalmazza.

Lókuszt	Primer szekvencia (5'-3')	Méret (bp)
CHD1	F: GTTACTGATTCGTCTACGAGA R: ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	500*
α -aktin	F: TACCT(GC)ATGAAGATCCTCACTGAG R: TCCTGCTTGGTGATCCACATCTG	985
Bcap6	F: TTTAACCCAGTAGCCTATCATGTCA R: GTCTGAAGATAATGCTGCATGGTT	151*
Ans24	F: ATGGTCAACTCTCAGTGGCTA R: CAGTGTTTTCCATGAAGGTCA	299-301

3.9. ábra: A kísérletben használt primerek. (*: a saját gélfotó eredményeink alapján kapott fragmens hossz *Anser anser* esetén – „151 bp”: Buchholz és munkatársainak kanadai lúdra vonatkozó eredményei miatt. Gélfotóink: kb. 150 bp olvasható le.)

A Bca μ 6 lókuszhhoz tartozó primer szekvenciákat kanadai lúdra (*Branta canadensis*) írták le, ahol egy 151 bp hosszúságú szakaszt erősítenek fel. (Buchholz et al, 1998) Ez a primer pár az általunk vizsgált minták esetén is körülbelül ilyen hosszúságú terméket eredményezett.

Az Ans24 lókuszhhoz tartozó primer szekvenciákat nyári lúdra tervezték. Ennek a mikroszatellita lókusznak a hossza 299-301 bp között változik, és mindössze két allélt találtak rajta. (Weiß et al, 2008)

Az α -aktin génen használt primer szekvenciák univerzális szekvenciák („Forward”: Act2, „Reverse”: Act4). Ez a primerpár nyári lúd esetén egy 985 bp hosszúságú szakaszt erősít fel. (Rodríguez et al, 2002)

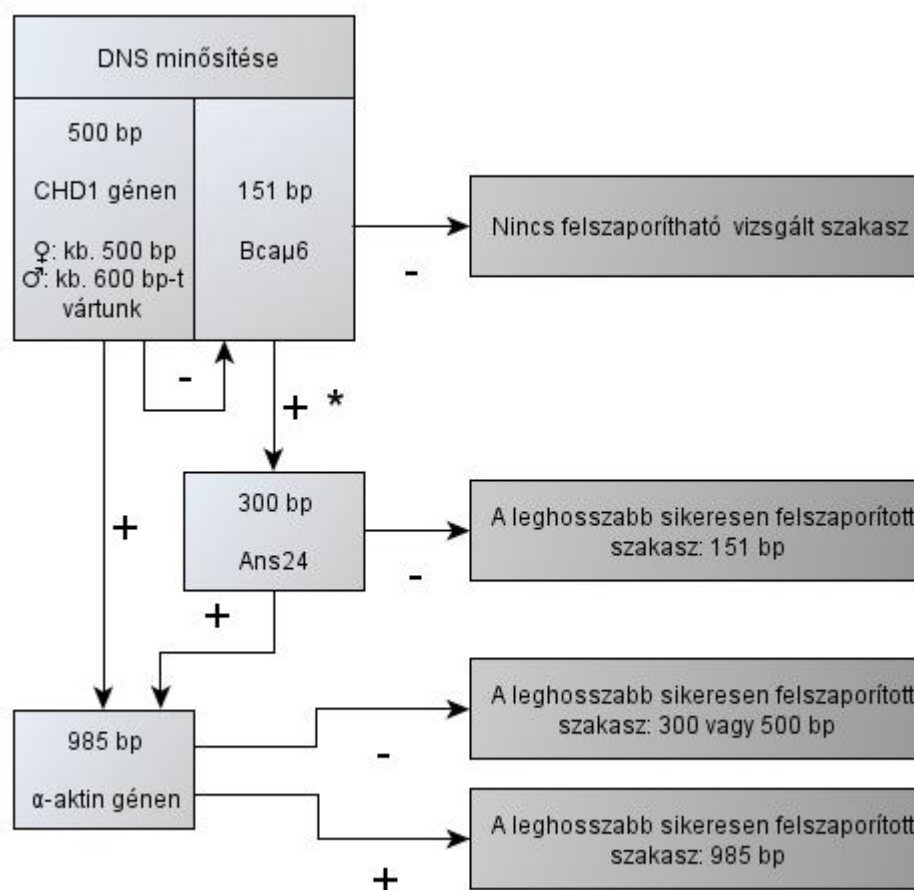
A CHD1 gén felerősítésére a 2550F-2718R primer párt használtuk. Madarak esetén a tojó a heterogametikus ivar (WZ), a hím pedig a homogametikus (ZZ). A CHD1 gén madarak esetén két változatban létezik: a W kromoszómához (Griffiths és Tiwari 1995), valamint a Z kromoszómához kötött változatban, így alkalmasak az ivar meghatározására. Mivel az ivari kromoszómák rekombinálandó pszeudoautoszomális régióin kívül találhatóak, mindkét gén konzervatív. A 2550F-2718R primerpár mindkét génváltozatot amplifikálja, de eltérő méretű intronokat határolnak a két kromoszóma esetén, így a termékek között kb. 150 bp eltérés van (néhány fajnál ez a különbség jóval kisebb lehet, ami az ivarok elkülönítését megnehezítheti). (Fridolfsson és Ellegren, 1999) Ennek a szakasznak a vizsgálatát több más, szintén az Anatidae családba tartozó fajon elvégezték, így pl. a tőkés réce (*Anas platyrhynchos*) esetén, ahol a tojóknál kb. 500 bp, a hímeknél kb. 600 bp-os szakaszt tudtak felerősíteni. (Murthy et al, 2009) Érdekes módon, a fenti tanulmányban, valamint Fridolfsson és Ellegren 1999-es publikációjában is, a családba tartozó vizsgált fajokban a tojók esetén csak a rövidebb (W) fragmens volt felszaporítható, a Z kromoszómán található szakasz nem. Az általunk vizsgált minták esetén ez a primerpár egy kb. 500 bp hosszúságú szakaszt erősített fel, és kizárólag tojók esetén működött (ld. 4.1. fejezet).

3.5.2.1. PCR

Az előkísérlet során csak ivarmeghatározást végeztem.

A DNS-fragmentáltság mértékének megállapításához a kísérlet során először minden mintán ivarmeghatározást (CHD1 gén, kb. 500 bp fragmens), valamint a legrövidebb szakasz (Bca μ 6: kb. 151 bp) felerősítését végeztem el. Az egyes fragmensek vizsgálatának sorrendjét, valamint a döntési mechanizmust a 3.10. ábra szemlélteti. A folyamat alap koncepciója az volt, hogy amennyiben egy mintában adott hosszúságú szakasz amplifikációja sikeres, akkor

az annál rövidebb szakaszok is sikeresen felszaporíthatóak. (Hogan *et al*, 2008) Ezt a koncepciót azonban módosította az a tény, hogy a CHD1 génen vizsgált szakasz felszaporítása csak tojók esetén működött (kb. 500 bp), még a hímeknél nem kaptunk terméket, amelyet más, az Anatidae családba tartozó faj (*Anas platyrhynchos*) esetén leírtak alapján 600 bp körül vártunk (ld. 4.1. fejezet). (Murthy *et al*, 2009) Ez a jelenség megnehezítette a fragmentáltság mértékének megállapítását, mert az, hogy a CHD1 génen vizsgált szakasz amplifikációja nem volt sikeres egy mintában, jelenthette azt, hogy a vizsgált minta erősebben fragmentálódott, vagy azt, hogy a vizsgált egyed hím. Ennek kiküszöbölésére az Ans24 (kb. 300 bp) szakaszt is megvizsgáltam minden olyan esetben, ahol volt 151 bp-os, de nem volt 500 bp-os termék. Az α -aktin génen vizsgált szakaszt (985 bp) csak olyan esetekben próbáltam meg felerősíteni, ahol az 500 bp-os, vagy annak hiányában a 300 bp-os szakasz működött.



3.10. ábra: A fragmentálódás mértékének megállapítása PCR termékek alapján egy mintára vonatkoztatva. A nyilak mellett + és – jelek jelölik a PCR sikerességét az adott szakasz esetén. *: ezt a lépést csak abban az esetben végeztem el, ha az 500bp-os szakaszra nem kaptam PCR terméket.

Minden PCR reakció 25 µl térfogatban zajlott (2,5µl Puffer(10x DreamTaq™, Fermentas), 0,1µl DreamTaq™ (Fermentas), 4µl primer mix (5 pmol/µl), 1µl dNTP (Fermentas), 3,5 µl MgCl₂ (25mM, Promega), 12,9 µl H₂O és 1 µl DNS).

Az CHD1 génen található szakaszt „touch-down PCR” módszerrel erősítettük fel, amely alkalmas a nem-invazív mintavételi eljárások esetén gyakran előforduló rossz minőségű DNS adott szakaszainak felerősítésére. A touch-down PCR program során a kezdeti denaturáló lépést (94°C-on, 2 percig) követően 11 cikluson keresztül ciklusonként 1 °C-kal csökkent az annelláció hőmérséklete (60-50°C). Ezáltal a kezdeti ciklusokban kevesebb, de erősen specifikus termék keletkezik, melyek a későbbi, alacsonyabb annellációs hőmérsékleten zajló ciklusokban nagy számban amplifikálhatóak. A 11 ciklusos „touch-down” szakaszt további 25 ciklus követte, 50°C annellációs hőmérsékleten. Az egyes ciklusokban a denaturáció 92°C-on, 30 mp-ig zajlott, ezután 30 mp annelláció, majd 30 mp elongáció következett 72°C-on. Végül az extenzió 5 percig zajlott 72°C hőmérsékleten.

Az Ans24 lószhoz tartozó primerpár használatakor a kezdeti denaturáló lépés 95°C-on 1 percig zajlott, ezután 30 cikluson keresztül a denaturáció 94°C-on történt 1 percig, majd az annelláció következett 58°C-on 1 percig, végül 72°C-on 1 percig zajlott az elongáció. A végső extenziós ciklus 10 percig tartott, 72°C hőmérsékleten. (*Weiß et al, 2008*)

A Bcam6 lókuszt felerősítése során a kezdeti denaturáló lépés 94°C-on zajlott 2 percig. Ezt követően 37 ciklusban 94°C-on 30 mp-ig zajlott a denaturáció, majd 60°C-on 45 mp-ig az annelláció, végül 45 mp-ig 72°C-on az elongáció. A végső extenziós lépés 7 percig zajlott 72°C-on.

Az Act2-Act4 primerpár (α-aktin gén) esetén a PCR program kezdeti denaturáló lépése 93°C-on zajlott 3 percig, ezt 35 ciklus követte, melynek során 1 percig 93°C-on denaturáltuk, majd az annelláció következett 1,5 percig 59°C-on, végül minden ciklus 2 perc elongációval zárult 72°C-on. A végső extenziós lépés 7 percig zajlott 72°C-on. (*Rodríguez et al, 2002*)

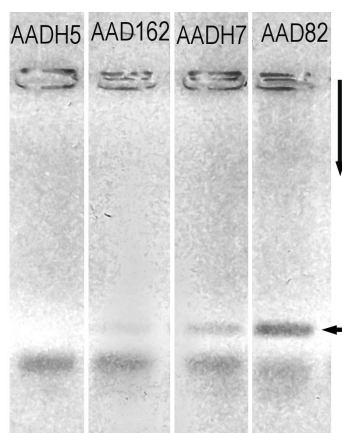
Az egyes PCR reakcióknál, ha szükséges volt, a negatív kontroll mellett pozitív kontrollt (már korábban az adott fragmensre terméket adott minta) is használtam.

3.5.2.2. PCR termék gélelektroforézise

A DNS fragmentáltságának mértékét, vagyis a felszaporítható méretű szakaszok hosszát 2%-os agaróz gélen történő elektroforézis (100V, 45 perc) segítségével vizsgáltuk. Minden zsebbe 5-5 µl DNS minta került, amihez előzőleg 2-2 µl felvivő festéket (Ficoll^R + EDTA +

brómfenolkék) kevertem. A minták mellett minden esetben DNS-létrát (O'GeneRuler™, Fermentas) futtattam. A gélt az elektroforézist követően 5 percig etídium-bromid oldatban festettem meg, majd 10 perc öblítés következett desztillált vízben. Ezután a gélt UV-asztalon (Vilber Lourmat ECX-20.C), a 3.5.1. fejezetben leírtak szerint standard távolságról és beállításokkal lefényképeztem. Az előkísérlet során Olympus FE-310, a kísérlet során Fujifilm FinePix S1600 típusú fényképezőgépet használtunk.

A PCR termékek minősége szerint 3 kategóriát különítettünk el: nincs termék (0), gyenge termék (1), jól látható termék van (2). A kategóriákat a 3.11. ábra mutatja.



3.11. ábra: A PCR termék minőségének elbírálása. Balról: nincs termék, gyenge termék, az utolsó két esetben: jól látható termék. A függőleges nyíl a futás irányát, a vízszintes nyíl a termék helyét jelzi.

3.6. Az eredmények kiértékelése

A DNS minősítéséből, valamint a különböző PCR termékek minősítéséből kapott eredményeket mintánként táblázatba foglaltam (ld. 2-4. melléklet). Az eredmények kiértékelését R statisztikai program segítségével végeztem.

A sikeresen felszaporított PCR termékek arányát minden vizsgált fragmens esetén csoportonként táblázatba foglaltam, valamint mozaik ábrán ábrázoltam.

Az egyes csoportok páronkénti összehasonlítására Fisher-féle egzakt próbát végeztem minden vizsgált szakaszon a PCR reakciók sikerességének arányára (a csoporton belül a termékek (1+2) száma) vonatkozóan.

3.7. Kiegészítő vizsgálatok

3.7.1. Fotoreflektancia mérése

Mivel nem találtunk szakirodalmi adatot a madártollak csévájának fényátersztésére, sem fényvisszaverésre, ahhoz, hogy megfelelően magyarázhassuk a napfény teljes spektrumában történő sugárzás (első sorban az UV-B lehet jelentős (*Jean-Luc Ravant et al, 2001*)) hatásait, indokoltnak tartottuk a fotoreflektancia megmérését. A vizsgálathoz 3 db. kezeletlen és 3 db. páras környezetnek (ld. 3.2.2. fejezet 2,3 alpontok) kitett tollat választottunk ki, hogy a páras környezetben megváltozott szerkezetű tollak eltérő tulajdonságairól is képet kapjunk. A páras környezetnek kitett tollak közül 2 db. a Descosepttel kezelt, és 1 db. a nem fertőtlenített csoportból került ki, mivel mindkét csoport esetén penészesedést tapasztaltunk (ld. 4.4.2 fejezet).

Az fotoreflektancia mérést az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) Állatrendszertani- és Ökológiai Tanszékén végezték az Ocean Optics (Europe) műszereivel (fényforrás: DH-2000, detektor: USB-2000, program: OOIBase32, Optikai szál: R400-7, fehér standard: WS-1), fekete standard-nek fekete textilt használtak. A mérőfej a felülettől 3 mm távolságra mért, 90°-os szögben a felszínhez képest. A mért terület átmérője 6 mm. A reflektancia mértékét a következő képlet adja meg:

$$R = \frac{R_{minta} - R_{fekete\ standard}}{R_{fehér\ standard} - R_{fekete\ standard}} \times 100$$

Minden tollon két ponton mérték meg a reflektanciát: a felső köldök fölött a medulla tartalmú résznél, valamint a másik oldalon, a cséve domború felszínénél, ahol nem látható medulla. Minden mérést háromszor ismételték meg. Az ismételt mérések eredményeit átlagoltam, és grafikonon ábrázoltam. A műszer az ELTE kutatóinak tapasztalatai szerint kb. 250-750 nm között megbízható, ezért az elemzésnél ezt a tartományt vettem figyelembe.

3.7.2. Tollakban megjelent gomba vizsgálata

A magas páratartalomnak kitett tollak esetén felmerült a mikroorganizmusok bejutásának veszélye. A vizsgálat során a tollak penészesedését tapasztaltuk (ld. 4.4.2. fejezet), ezért 2-2 db. tollat mikroszkópos vizsgálatnak vetettünk alá a fertőtlenített, valamint a nem fertőtlenített páras környezetnek kitett, illetve a kontroll csoportból. A tollaknak közvetlenül a felső köldök fölött, valamint a felső köldök mögött található medulla részeiből, valamint a cséve belsejében található hártás képletből készített nyúzatokat vizsgáltuk meg. A felvételeket fénymikroszkóppal (Digital 200 Mikroszkóp) készítettük, 60x16 nagyításon.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A CHD1 (2550F/2718R) szakasz tesztelése

A CHD1 (2550F/2718R) szakasz ivaronként felszaporítható hosszát ismert ivarú egyedekből származó kezeletlen tollakon teszteltük. Ennek során 7 darab hím, és 4 darab tojó egyedekből származó tollat vizsgáltunk, mivel a tojóktól várt fragmens hosszúságot a 2010-ben gyűjtött tollak esetén már sikerült felszaporítanunk. A tojók esetén 75% (3 darab) volt a PCR reakció sikeressége (500 bp), még hímek esetén egyetlen esetben sem volt sikeres.

4.2. Előkísérlet

Az előkísérlet során a DNS minősítése alapján a vizsgált tollak 55,17%-ából (32 darab) vontunk ki közepes (1) vagy jó (2) minőségű DNS-t. A nem degradálódnak (1+2), valamint ebből a jó minőségűnek (2) ítélt DNS arányát, valamint a PCR sikerességének (1+2) és ebből jó minőségű termékek (2) arányát a 4.2.1. táblázat mutatja.

4.2.1. táblázat: Az előkísérlet eredményei.

Csoport	DNS		500 bp	
	1+2	2	1+2	2
Természetes fény	73,33% (11 db)	81,82% (9 db)	86,67% (13 db)	76,92% (10 db)
Magas páratartalom	28,57% (4 db)	7,14% (1 db)	42,86% (6 db)	33,33% (2 db)
Magas párat. + Term.fény	46,67% (7 db)	14,29% (1 db)	13,33% (2 db)	50% (1 db)
Kontroll	66,67% (10 db)	60% (6 db)	80% (12 db)	58,33% (7 db)

Az eredmények tehát azt mutatták, hogy a magas páratartalom hatása volt a legjelentősebb, még a természetes napfény hatása viszonylag csekély (az előkísérlet egy hetes időtartama alatt). Az előkísérlet eredményei alapján határoztuk meg a kísérlet felépítését, a vizsgált kezelési csoportokat, illetve a beállított időtartamokat.

4.3. Kísérlet

4.3.1. Környezeti tényezők a természetes fénynek kitett csoportban

A természetes fénynek kitett csoport esetén a kezelési időtartam alatt naponta 10:30 és 15:30 között mért környezeti tényező értékek összesített eredményei a 4.1. ábrán látható táblázatban olvashatók (mérési adatok forrása: www.amsz.hu). A kezelés időtartama alatt a hőmérséklet nem emelkedett 23,6°C fölé, tehát a többi csoporttal (30°C, illetve 28,5 °C) összehasonlítva a hőmérséklet hatása sokkal kisebb volt.

A kezelés után a szilika gél, illetve macskaalom tömege további gyarapodást mutatott, tehát további vizet volt képes felvenni a befőttes üvegben a papírtörletől. Ez alapján a tollakat ért környezeti hatások közül a relatív páratartalom közel 0%-nak tekinthető.

<i>Hőmérséklet (°C)</i>	<i>UVI</i>	<i>Napsugárzás (W/m²)</i>
Várható érték: 18,15	Várható érték: 1,36	Várható érték: 278,68
Standard hiba: 0,14	Standard hiba: 0,05	Standard hiba: 9,21
Medián: 18,10	Medián: 1,10	Medián: 258,75
Módusz: 14,90	Módusz: 0,50	Módusz: 127,70
Szórás: 2,83	Szórás: 0,97	Szórás: 183,22
Minta varianciája: 8,02	Minta varianciája: 0,93	Minta varianciája: 33567,97
Tartomány: 11,60	Tartomány: 4,00	Tartomány: 672,90
Minimum: 12,00	Minimum: 0,00	Minimum: 9,30
Maximum: 23,60	Maximum: 4,00	Maximum: 682,20
Darabszám: 396,00	Darabszám: 396,00	Darabszám: 396,00

4.1. ábra: Környezeti tényezők értékei a legnaposabb órákban a kezelés időtartama alatt. (UVI: az UV-B index értékei)

4.3.2. A DNS minősítése

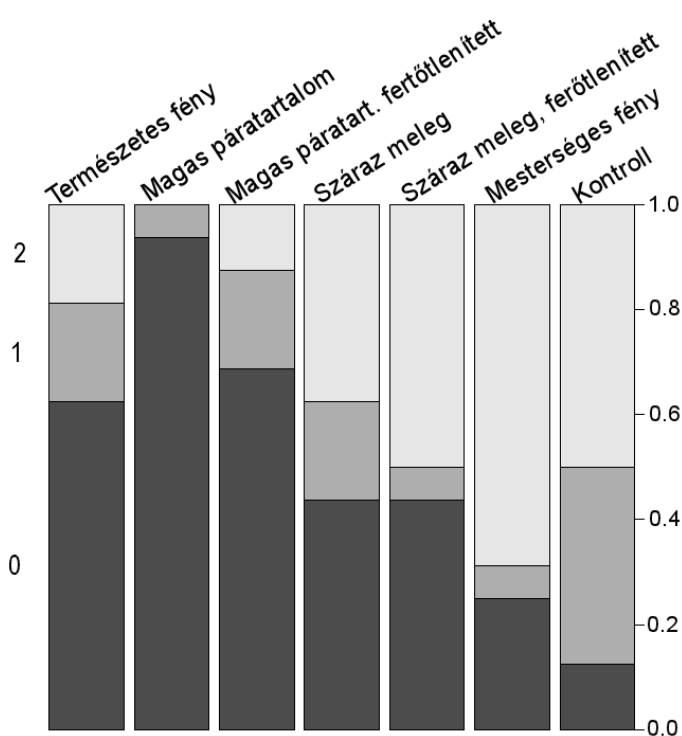
A DNS három fokozatú skálán történő minősítése során (ld. 3.5.1. fejezet) a kísérletben vizsgált 112 darab tollból összesen 56 darab (50%) tollból sikerült kivonni közepes (1) vagy jó (2) minőségű DNS-t. Ebből 38 darab (67,86%) volt jó, még 18 darab (32,14%) csak közepes minősítést kapott.

A nem degradáltak (1+2), és ebből jó minőségűnek (2) talált minták arányát kezelési csoportonként a 4.3.1. táblázat, valamint a 4.2. ábra mutatja.

Jól látható, hogy a legnagyobb DNS-károsító hatása a magas páratartalomnak volt, és a legjobb minőségűek a kezeletlen (kontroll) tollak.

4.3.1. táblázat: DNS minősítése csoportonként.

Csoport	DNS	
	1+2	2
<i>Természetes fény</i>	37,5% (6 db)	50% (3 db)
<i>Magas páratartalom</i>	6,25% (1 db)	0% (0 db)
<i>Magas párat. fertőtlenített</i>	31,25% (5 db)	40% (2 db)
<i>Száraz meleg</i>	56,25% (9 db)	66,67% (6 db)
<i>Száraz meleg, fertőtlenített</i>	56,25% (9 db)	88,89% (8 db)
<i>Mesterséges fény</i>	75% (12 db)	91,67% (11 db)
<i>Kontroll</i>	87,5% (14 db)	57,14% (8 db)



4.2. ábra: A degradált (0), gyenge (1), valamint jó (2) minősítést kapott DNS minták aránya kezelési csoportonként.

4.3.3. Fragmensek amplifikációja

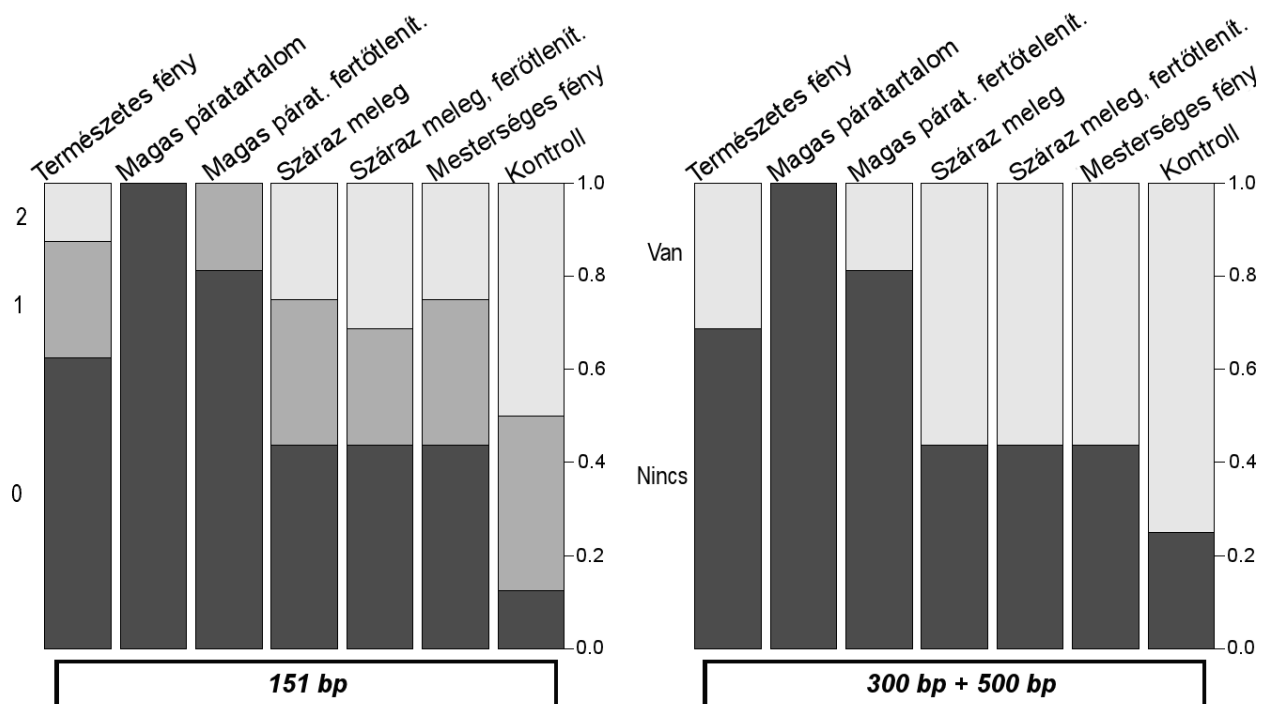
A vizsgált fragmensek sikeres felszaporításának arányát (1+2), valamint a kapott termékeken belül a jó minőségűek arányát (2) a 4.3.2. táblázat, valamint a 4.3. és a 4.4. ábra mutatja. A 300 bp és 500 bp hosszúságú fragmensek felszaporításának sikerességét indokoltnak tartottam egybevonni, mert a döntési folyamat (3.10. ábra) alapján egy mintára vagy az egyik, vagy a másik fragmensből kaphattam terméket, így az összevont elemzésük pontosabb képet adhat az egyes kezelési csoportok közti különbségekről.

4.3.2. táblázat: Az egyes fragmensek PCR sikerességének aránya csoportonként.

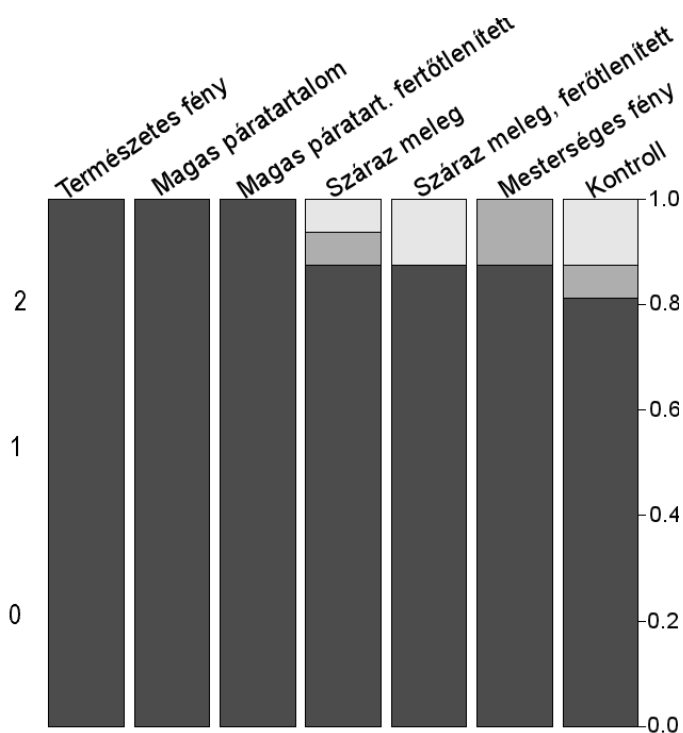
Csoport	151 bp		300 bp *		500 bp		985 bp *		300+500 bp
	1+2	2	1+2	2	1+2	2	1+2	2	1+2
Természetes fény	37,5% (6 db)	33,33% (2 db)	80% (4 db)	50% (2 db)	6,25% (1 db)	0% (0 db)	0% (0 db)	0% (0 db)	31,25% (5 db)
Magas páratartalom	0% (0 db)	0% (0 db)			0% (0 db)	0% (0 db)			0% (0 db)
Magas párat. fertőtlenített	18,75% (3 db)	0% (0 db)	100% (2 db)	100% (2 db)	6,25% (1 db)	0% (0 db)	0% (0 db)	0% (0 db)	18,75% (3 db)
Száraz meleg	56,25% (9 db)	44,44% (4 db)	100% (7 db)	85,71% (6 db)	12,5% (2 db)	0% (0 db)	25% (2 db)	50% (1 db)	56,25% (9 db)
Száraz meleg, fertőtlenített	56,25% (9 db)	55,56% (5 db)	66,67% (4 db)	50% (2 db)	31,25% (5 db)	40% (2 db)	22,22% (2 db)	100% (2 db)	56,25% (9 db)
Mesterséges fény	56,25% (9 db)	44,44% (4 db)	100% (4 db)	100% (4 db)	31,25% (5 db)	40% (2 db)	22,22% (2 db)	0% (0 db)	56,25% (9 db)
Kontroll	87,5% (14 db)	57,14% (8 db)	100% (8 db)	87,5% (7 db)	37,5% (6 db)	33,33% (2 db)	21,43% (3 db)	66,67% (2 db)	75% (12 db)

* A fragmens alatt szereplő arányok a döntési folyamat (3.10. ábra) alapján meghatározott, vizsgálandó minták számára van vonatkoztatva

Áthúzott cellák: a döntési folyamat (3.10. ábra) alapján nem végeztem PCR vizsgálatot.



4.3. ábra: A PCR reakciók sikerének aránya a 151 bp hosszúságú szakasz, valamint a 300 bp és 500 bp hosszúságú szakaszok eredményeinek összevonása esetén. (0/1/2: minősítési kategóriák; Van/Nincs: volt-e termék (1+2 kategória) a csoportban)



4.4. ábra: PCR termékek aránya a 985 bp hosszúságú fragmens esetén, kezelési csoportonként 16 tollra (a teljes csoportra) vonatkoztatva.

4.3.4. A kezelések összehasonlítása

A legnagyobb méretű sikeresen felszaporított szakasz csoportonként 16 tollra vonatkoztatva a kontroll tollak esetén 985 bp (18,75%, 3 darab toll), a száraz melegnek kitett fertőtlenített tollak esetén 985 bp (12,5%, 2 darab), a száraz melegnek kitett nem fertőtlenített tollak esetén 985 bp (12,5%, 2 darab), a mesterséges fénynek kitett tollak esetén 985 bp (12,5%, 2 darab), a természetes fénynek kitett tollak esetén 500 bp (6,25%, 1 darab), a magas páratartalomnak kitett fertőtlenített tollak esetén 500 bp (6,25%, 1 darab) volt. A magas páratartalomnak kitett nem fertőtlenített tollak esetén egyetlen vizsgált DNS szakasz felszaporítása sem volt sikeres.

Az egyes kezelési csoportokat páronként Fisher-féle egzakt teszttel hasonlítottam össze a nem degradáltak minősített DNS, illetve a vizsgált fragmensekre kapott termékek száma alapján. A 300 bp és az 500 bp hosszúságú szakaszok PCR-sikerességének arányát összevontam, mert a döntési folyamat (3.10. ábra) alapján egy mintából vagy az egyik, vagy a másik szakaszra lehet termék. A tesztek eredményeit a 6-8. mellékletek tartalmazzák. Azokat a párosításokat, ahol szignifikáns különbség volt kimutatható, csillaggal jelöltem. A

DNS minősítése, valamint a vizsgált szakaszok amplifikációjának sikeressége alapján szignifikánsan különböző csoportokat a 4.5. ábra mutatja.

A Fisher-féle egzakt tesztek alapján a magas relatív páratartalom hatása szignifikánsan eltér a kezeletlen, a száraz melegnek kitett, a természetes fénynek kitett és a mesterséges fénynek kitett csoportokétól. A napsugárzásnak kitett csoport szintén szignifikáns eltérést mutat a kezeletlen tollaktól.

A 985 bp hosszúságú fragmens felszaporításának sikeressége a tesztek alapján nem mutatott szignifikáns különbségeket a csoportok között.

Csoportok		p-érték		
		DNS	151 bp	300 bp + 500 bp
Kontroll	- Természetes fény	0,0091	0,0091	0,032
Kontroll	- Magas páratartalom	$6,84 \cdot 10^{-6}$	$5,091 \cdot 10^{-7}$	$1,61 \cdot 10^{-5}$
Kontroll	- Magas párat. fertőtlenített	0,0032	0,00024	0,0038
Természetes fény	- Magas páratartalom	X	0,018	0,043
Magas páratartalom	- Száraz meleg	0,0059	0,00082	0,00082
Magas páratartalom	- Száraz meleg, fertőtlenített	0,0059	0,00082	0,00082
Magas páratartalom	- Mesterséges fény	0,00017	0,00082	0,00082
Magas páratart. Fertőtlenített	- Mesterséges fény	0,032	X	X

4.5. ábra: A Fisher-féle egzakt tesztek alapján szignifikánsan különböző kezelési csoportok. (X: a teszt nem mutatott szignifikáns különbséget)

4.4. Kiegészítő vizsgálatok

4.4.1. Fotoreflektancia mérése

A tollakon mért fotoreflektancia adatokból készített grafikonok a 10. és 11. mellékletben láthatók. A kb. 650-660 nm közé eső kiugró érték minden mérés esetén megfigyelhető, és feltehetően mérési hibából adódik, ezért az elemzésnél nem vettem figyelembe.

Az UV-B tartományban (280-315 nm) a felső köldök magasságában a toll medulla felőli oldalán 5,39-26,6 % között, még a domború oldalán 19,05-54,09 % között változott az átlagos visszaverődés mértéke a kontroll tollak esetén. Az előzőleg magas páratartalomnak kitett tollak esetén ugyanebben a tartományban 18,39-32,22 % volt az átlagos reflektancia a medulla felőli, és 34,93-54,14 % a domború oldalon.

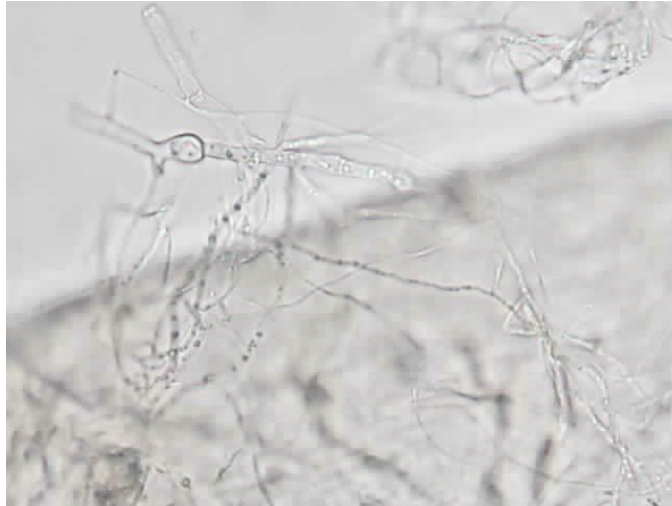
Az egyes tollak egyes mérési pontjain külön meghatároztam a teljes mért hullámhossz tartományban (250-750 nm) mért reflektancia értékek felső kvartilisét. Ez az érték minden toll esetén nagyobb volt a medulla felőli oldalon, mint a domború oldalon. Látható egy tendencia, miszerint a magas páratartalomnak kitett tollak esetén a domború oldalon mért felső kvartilis értékek (ld. 5. melléklet) magasabbak, mint a kontroll tollak esetén. Ez a tendencia a medulla felőli oldalon nem látható.

A felső kvartilis fölé eső reflektancia értékek a kontroll tollakon mindhárom esetben a 610-749 nm hullámhossz tartományban voltak mérhetőek a medulla felőli oldalon. A páras környezetnek kitett tollak esetén ugyanezek a mérések valamivel nagyobb változatosságot mutattak, de mindhárom tollon mért, felső kvartilis fölötti értékek a 607-749 nm közötti hullámhossz tartományba estek. Ugyanezek az adatok a tollak domború oldalán változatosabb képet mutattak: több hullámhossz tartományban is mérhető volt a felső kvartilisnél nagyobb mértékű visszaverődés. A legszembetűnőbb különbség az volt, hogy a kontroll tollakon mindhárom esetben mérhető volt nagyobb arányú reflektancia 700 nm körül, páras környezetnek kitett tollak esetén viszont csak egy esetben volt a 600 nm fölötti tartományban mérhető a felső kvartilisnél nagyobb mértékű visszaverődés.

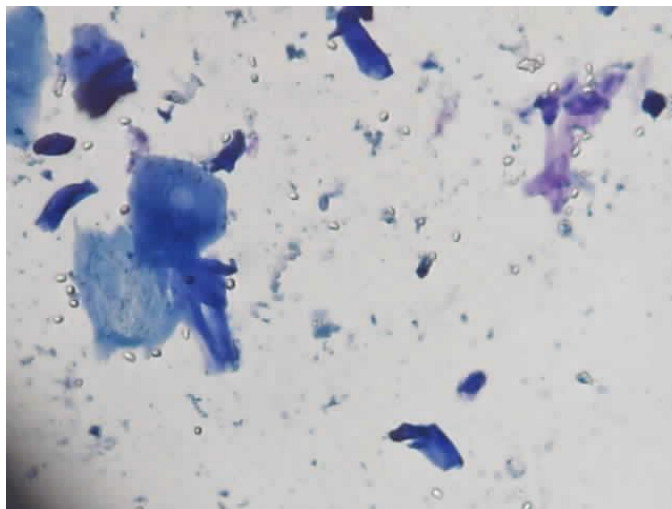
4.4.2. Tollakban megjelent gomba vizsgálata

A vizsgált 6 tollmintából három esetben találtuk egyértelmű jelét gombák behatolásának a cséve belsejébe. Egy toll esetében csak spórákat találtunk, két toll esetén pedig a spórák mellett gombafonalakat is. A mikroszkópi felvételek alapján annyit tudtunk teljes bizonyossággal megállapítani, hogy valamilyen fonalas penészgomba faj (vagy fajok) hatoltak be a toll belsejébe (Dr. Turcsányiné Dr. Siller Irén, Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Kar Növényteni Tanszék), pontosabb taxonómiai meghatározásra nem volt lehetőségünk. Mindhárom pozitív minta a párás környezetnek kitett tollak közül került ki, ebből kettő a fertőtlenített, egy pedig a nem fertőtlenített csoportból. Nem láttuk nyomát gombáknak a kezeletlen tollak, valamint egy nem fertőtlenített toll esetében. A tollakban talált gombákat az 4.8. és 4.9. ábrák szemléltetik.



4.8. ábra: Gombafonalak a tollban



4.9. ábra: Spórák a tollban (festés: cottonblue festék)

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Kísérlet

Az eredményeink alapján a vedlett tollakból kinyerhető DNS-re a legnagyobb veszélyt a magas relatív páratartalom jelenti, amely - megfelelő hőmérsékleti viszonyok mellett - ideális környezetet jelent a különböző mikroorganizmusok számára. Mivel a természetben számos olyan gomba, illetve prokarióta taxon él, amelyek képesek a keratin bontására (*Onifade et al, 1998*), a tollakban található DNS védtelenné válásával rövid időn belül alkalmatlanná válhat a genetikai vizsgálatok elvégzésére.

A magas páratartalomnak kitett tollak, valamint a vízfürdő megelőző fertőtlenítése javította kissé a kinyerhető DNS minőségét, de a légkörből bekerülő mikroorganizmusok hatása önmagában is jelentős volt.

A magas hőmérséklet hatása önmagában nem volt jelentős a kísérleti időtartam alatt a tollakból kivonható DNS-re.

A 3 héten át napi 5 órának megfelelő mennyiségű mesterséges megvilágítást (kb. 290-740 nm, 5% UV-B, 30% UVA) kapott tollak minősége romlott legkevésbé a kezelt csoportok közül, azonban a 3 hétig természetes őszi fény- és hőmérsékleti viszonyoknak kitett, száraz körülmények között tartott tollak jelentős minőségromlást mutattak. Ennek magyarázata további vizsgálatokat igényel.

A kísérlet során alkalmazott DNS-minősítési kategóriák viszonylag jól előre jelezték a 151 bp, illetve 300 bp hosszúságú nukleáris DNS-szakaszok felerősítésének sikerét, azonban a 985 bp hosszúságú fragmens felerősítésének valószínűségére már nem adtak megfelelő becslést. A kb. 500 bp hosszúságú (CHD1 2550F/2718R) szakaszra végzett PCR reakció sikeressége esetünkben önmagában nem volt bizonyító értékű, mivel a termék hiánya utalhatott a DNS fragmentáltságának mértékére, de jelenthette egyszerűen azt is, hogy az adott egyed hím volt, mivel hímek esetében nem működött a reakció.

5.2. Kiegészítő vizsgálatok

5.2.1. Fotoreflektancia mérése

A tollak fényvisszaverő képességének vizsgálata megmutatta, hogy a természetes körülmények között levedlett tollakból kivonható DNS-re eltérő hatást gyakorolhat a napsugárzás attól függően, hogy a toll melyik oldalát éri a fény, mivel eltérő mértékben verik vissza a különböző hullámhossz tartományokba eső sugárzást. Emellett a fotoreflektanciát befolyásolhatja a magas relatív páratartalom mellett kialakuló szerkezet-változás is.

Eredményeink alapján úgy látszik, hogy a 250-750 nm hullámhossz tartományon belül legkisebb arányban az UV tartományban képesek a fény visszaverésére a nyári lúd tollak.

Meg kell azonban jegyezni, hogy az elvégzett mérések csak a visszavert fény arányára adnak információkat, de nem derül ki belőlük, hogy a vissza nem vert fény mekkora része nyelődött el a toll szerkezetét képező anyagokban, és mekkora része hatolhat el a vérrögben található DNS-ig.

5.2.2. A tollakban megjelent gomba

A párás, meleg környezetnek kitett tollak esetén tapasztalt gombásodás, és a kivonható DNS minőségének nagy mértékű leromlása arra enged következtetni, hogy természetes körülmények között a madárgenetikusok munkáját leginkább a párás környezetben elszaporodó mikroorganizmusok nehezíthetik meg. Mivel a természetben szinte mindenütt megtalálhatóak olyan mikroorganizmusok, melyek képesek a tollak szerkezetét bontani (*Onifade et al, 1998*), a felső köldökben található vérrög gyorsan védtelenné válhat a külső hatásokkal szemben.

5.3. Ajánlások

Azt javasoljuk a vedlett tollak vizsgálatát végző kutatóknak, hogy amennyiben a vizsgálati terület és az aktuális időjárás ismeretében szélsőségesen magas relatív páratartalomra számítanak, a vedlési időszakot követő lehető legrövidebb időn belül, vagy - amennyiben lehetőség van rá - akár a vedlési időszakban több alkalommal végezzék el a gyűjtést.

Az összegyűjtött tollakat érdemes a párától és fénytől védeni, például sötét színű műanyag zsákban tartani nagyobb mennyiségű szilika gél használata mellett.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

A madárgenetikai vizsgálatok során egyre inkább elterjedt nem-invazív mintavételi eljárás a vedlett tollak terepen történő összegyűjtése. Ezek a tollak azonban a legkülönbözőbb helyekről (cserjék alól, lombozatról, nedves talajról, vagy éppen száraz sziklákról) kerülhetnek elő, és számos környezeti hatás érheti őket.

Összeállítottunk egy kísérletet, amelyben külön vizsgáltuk a magas relatív páratartalom és magas hőmérséklet, az alacsony relatív páratartalom melletti magas hőmérséklet, valamint a napsugárzás hatásait a tollakból kivonható DNS-re.

A kísérlethez 2010-ben és 2011-ben nyári lúd (*Anser anser*) tollakat (kettes és hármas kézevezők) téptünk a vedlési időszak környékén, hogy azok állapota megközelítse a természetes úton vedlett tollakét, de ne érje azokat ismeretlen környezeti hatás. A kísérlet során összesen 112, kezelésenként 16 darab tollat vizsgáltam meg. A DNS kinyerése a tollakból a felső köldök kimetszésével történt.

A DNS fragmentáltságának (károsodásának) mértékét különböző hosszúságú (151 bp, 300 bp, 500 bp és 985 bp) nukleáris DNS szakaszok PCR-rel történő felszaporításával vizsgáltam.

Eredményeink azt mutatták, hogy a vedlett tollakból kivonható DNS minőségét leginkább a magas relatív páratartalom mellett elszaporodó mikroorganizmusok veszélyeztethetik, hosszabb távon pedig az erős napsugárzás is jelentős károsodást okozhat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Vili Nórának a témáért és a sok segítségért amit a munka közben kaptam.

Köszönöm Dr. Turcsányiné Dr. Siller Irénnek a tollakban megjelent gomba vizsgálatát és a készített fotókat, Laczi Miklósnak és Molnár Orsolyának a tollak fotoreflektanciájának megmérését, valamint Lang Zsoltnak a segítséget az eredmények statisztikai értékelésében.

Köszönöm továbbá a www.amsz.hu adminisztrátorának hozzájárulását a környezeti tényezőkre vonatkozó archivált adataik felhasználására.

IRODALOMJEGYZÉK

- Beja-Pereira, A, Oliveira, R, Alves, P. C, Schwartz, M K, Luikart, G: Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. In: Molecular Ecology Resources, 2009, 9. vol. 1279-1301 p.
- Borgudd, J: Mechanical properties of bird feathers – Influence of UV-radiation and mechanical fatigue. Masters dissertation, 2003.
- Buchholz, W. G, Pearce, J. M, Pierson, B. J. & Scribner, K. T: Dinucleotide repeat polymorphisms in waterfowl (family Anatidae): characterization of a sex-linked (Z-specific) and 14 autosomal loci. In: Animal Genetics, 1998, 29, 323–325 p.
- Cadet, J, Sage, E, Douki, T: Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. In: Mutation Research, 2005, 571. vol. 3–17 p.
- Cristol, D. A, Armstrong, J. L, Whitaker J. M, Forsyth M. H: Feather-degrading bacteria do not affect feathers on captive birds. In: The Auk, 2005, 122 (1) vol. 222-230 p.
- Fehér Gy: A háziállatok funkcionális anatómiája. Mezőgazda Kiadó, 2004
- Fridolfsson, A.-K, Ellegren, H: A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. In: Journal of Avian Biology, 1999, 30. vol. 116-121 p.
- Gemmel, N, Akiyama, S: An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissue. In: Trends in Genetics, 1998, 12. vol. 338-339. p.
- Hailer, F, Helander, B, Folkestad, A. O, Ganusevich S. A, Garstad, S, Hauff, P, Koren, C, Masterov, V. B, Nygård, T, Rudnick, J. A, Shiraki, S, Skarphedinsson, K, Volke, V, Wille, F, Vilà, C: Phylogeography of the white-tailed eagle, a generalist with large dispersal capacity. In: Journal of Biogeography, 2007, 34. 1193-1206 p.
- Hogan, F. E, Cooke, R, Burrige, C. P, Norman, J. A: Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis. In: Molecular Ecology Resources, 2008, 8. vol. 561-567 p.
- Horváth M. B, Martínez-Cruz, B, Negro, J. J, Kalmár L, Godoy J. A: An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds, In: Journal of Avian Biology, 2005, 36. vol. 84-88 p.
- Hoting, E, Zimmermann, M, Hilterhaus-Bong, S: Photochemical alternations in human hair I. Artificial irradiation and investigations of hair proteins. In: Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1995, 46. vol. 85-99 p.

- Hörz, W, Oefele, K. V, Schwab, H: A Simple Logarithmic Amplifier for the Photographic Quantitation of DNA in Gel Electrophoresis. In: Analytical Biochemistry, 1981, 117. vol. 266-270 p.
- Li, S, Paulsson, M, Björn, L. O: Temperature-dependent formation and photorepair of DNA damage induced by UV-B radiation in suspension-cultured tobacco cells. In: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2002, 66(1) vol. 67-72 p.
- Murphy, M. A, Kendall, K. C, Robinson, A, Waits, L. P: The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. In: Conserv Genet, 2007, 8. vol. 1219–1224 p.
- Murthy, H. N. N, Nagmote, S. G, Isloor, S: PCR based sexing of ducks (*Anas platyrhynchos*). In: IV World Waterfowl Conference 2009, 2009.november 11-13, 66-69 p.
- Nogueira, A. C. S, Dicelio, L. E, Joekes, I: About photo-damage of human hair. In: Photochemical & Photobiological Sciences, 2006, 5. vol. 165–169 p.
- Onifade, A. A, Al-Sane, N. A, Al-Musallam, A. A, Al-Zarban, S: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. In: Bioresource Technology, 1998, 66. vol. 1-11 p.
- Ravant, J-L, Douki, T, Cadet, J: Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. In: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 63, 2001, 88–102 p.
- Ribeiro, E. A, Sutherland, J. C: Quantitative gel electrophoresis of DNA: Resolution of overlapping bands of restriction endonuclease digests. In: Analytical Biochemistry, 1991, 194. vol. 174-184 p.
- Rodríguez, M. A, García, T, González, I, Asensio, L, Mayoral, B, López-Calleja, I, Hernández, P. E, Martín, R: Development of a polymerase chain reaction assay for species identification of goose and mule duck in foie gras products. In: Meat Science, 65, 2003, 1257-2363 p.
- Saranathan, V, Burt, E. H. Jr: Sunlight on feathers inhibits feather-degrading bacteria. In: The Wilson Journal of Ornithology, 2007, 119(2) vol. 239-245 p.
- Smith, G. J: New Trends in Photobiology (Invited Review) Photodegradation of keratin and other structural proteins. In: Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology 27, 1995, 187-198 p.
- Taberlet, P, Bouvet, J: A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. In: Auk, 1991, 108. vol. 959-960 p.

- Taberlet, P, Luikart, G: Non-invasive genetic sampling & individual identification. In: Biological Journal of the Linnean Society, 1999, 68. vol. 41-55. p.
- Taberlet, P, Waits, L. P, Luikart, G: Noninvasive genetic sampling: look before you leap. In: Tree, 1999, 14. vol. 8. no, 323-327. p.
- Thacker, C. R, Oguzturun, C, Ball, K. M, Syndercombe Court D: An investigation into methods to produce artificially degraded DNA. In: International Congress Series 1288, 2006, 592–594 p.
- Vili N, Horváth M. B, Kovács Sz, Chavko, J, Hornung E, Kalmár L: Alternatív mintavételi módszer gyakorlati alkalmazhatósága madárgenetikai vizsgálatokban: parlagi sasok ivarmeghatározása, mikroszatellitákon alapuló egyedi azonosítása és mtDNS-ének vizsgálata. Magyar Állatorvosok Lapja, 2009/7. 426-435 p.
- Vili N: Parlagi sasok egyedi azonosítása nem-invazív mintavételi módszer segítségével. Szakdolgozat, SZIE-ÁOTK, 2005.
- Weber, T. P, Borgudd, J, Hedenstörn, A, Persson, K, Sandberg, G: Resistance of flight feathers to mechanical fatigue covaries with moult strategy in two warbler species. In: Biology Letters, 2005, 1. vol. 27-30 p.
- Weiß, B. M, Poggemann, K, Olek, K, Foerester, K, Hirschenhauser, K: Isolation and characterization of microsatellite marker loci in the greylang goose (*Anser anser*). In: Molecular Ecology Resources, 2008, 8. vol. 1411-1413 p.
- Zayats, T, Young, T. L, Mackey, D. A, Malecize, F, Calvas, P, Guggenheim, J A: Quality of DNA Extracted from Mouthwashes. In: Plos One, 2009, vol. 4 (7): e6165

Ábrák forrása

Fehér Gy: A háziállatok funkcionális anatómiája. 632. ábra, Mezőgazda Kiadó, 2004
Exo Terra Repti Glo 5.0 fénycső csomagolása: grafikonok

Környezeti tényező adatok forrása

<http://www.amsz.hu/ws/index.php?view=archiv>, soper - Budapest XVIII. Kerület, Letöltés időpontja: 2011.03.27.

MELLÉKLETEK

1. melléklet: A tollak cséve-átmérője és a gyűjtés időpontja csoportonként

Csoport	Minta	Átmérő (mm)	Gyűjtés	Csoport	Minta	Átmérő (mm)	Gyűjtés	Csoport	Minta	Átmérő (mm)	Gyűjtés
Természetes fény	91	6,3	2010	Száras meleg	102	6,1	2010	Kontroll	1	6,1	2010
	93	6,6	2010		111	6,2	2010		4	6,1	2010
	97	6,2	2010		112	6,4	2010		5	6,2	2010
	99	6,3	2010		117	6,0	2010		7	6,2	2010
	100	6,2	2010		123	6,1	2010		9	6,0	2010
	105	6,1	2010		130	6,0	2010		10	6,1	2010
	109	6,1	2010		132	5,9	2010		98	5,4	2010
	110	5,9	2010		144	5,9	2010		107	6,8	2010
	113	6,1	2010		148	6,8	2011		118	5,9	2010
	115	6,0	2010		165	5,7	2011		128	5,8	2010
	122	5,9	2010		166	5,9	2011		129	5,8	2010
	125	6,0	2010		176	5,7	2011		133	5,3	2010
	131	6,0	2010		177	6,0	2011		136	5,8	2010
	134	6,0	2010		178	5,9	2011		162	5,9	2011
Magas páratartalom	137	5,2	2010		179	6,0	2011		182	5,1	2011
	138	6,0	2010		213	6,2	2011		183	5,2	2011
	94	6,0	2010	Száras meleg, fertőtlenített	92	6,9	2010				
	95	6,2	2010		114	6,0	2010				
	101	6,0	2010		119	5,9	2010				
	103	6,0	2010		120	5,5	2010				
	108	5,1	2010		124	6,0	2010				
	116	6,2	2010		139	6,0	2010				
	121	5,8	2010		141	6,1	2010				
	145	6,1	2010		142	6,1	2010				
	146	7,0	2011		147	5,9	2011				
	150	5,8	2011		154	5,9	2011				
	159	6,1	2011		157	6,1	2011				
	184	5,7	2011		164	5,6	2011				
	189	6,0	2011		168	6,1	2011				
	207	5,9	2011		186	6,4	2011				
Magas páratartalom, fertőtlenített	209	6,3	2011		197	5,8	2011				
	212	6,1	2011		208	6,2	2011				
	96	6,0	2010	Mesterséges fény	149	6,0	2011				
	104	6,0	2010		158	5,9	2011				
	106	6,1	2010		160	5,9	2011				
	126	6,0	2010		171	5,6	2011				
	127	6,2	2010		172	6,0	2011				
	135	5,9	2010		180	5,8	2011				
	140	6,5	2010		181	7,0	2011				
	143	6,0	2010		187	6,3	2011				
	155	6,0	2011		188	5,8	2011				
	169	6,0	2011		190	5,9	2011				
	173	5,8	2011		191	5,8	2011				
	175	6,2	2011		194	5,9	2011				
	192	6,0	2011		200	6,8	2011				
	195	6,2	2011		201	6,0	2011				
	204	6,1	2011		205	6,3	2011				
	211	5,7	2011		210	6,3	2011				

2. melléklet: DNS-minősítés és PCR eredmények a természetes fénynek kitett, a magas relatív páratartalomnak kitett, és a magas relatív páratartalomnak kitett fertőtlenített tollak esetén.

Csoport	Minta	Eredmény				
		DNS	151	300	500	985
Természetes fény	91	1	1	1	0	0
	93	1	1	0	0	
	97	0	0		0	
	99	0	0		0	
	100	0	0		0	
	105	0	0		0	
	109	2	2	2	0	0
	110	0	0		0	
	113	0	0		0	
	115	0	0		0	
	122	2	1	2	0	0
	125	2	2		1	0
	131	0	0		0	
	134	0	0		0	
	137	1	1	1	0	0
	138	0	0		0	
Magas páratartalom	94	0	0		0	
	95	0	0		0	
	101	1	0		0	
	103	0	0		0	
	108	0	0		0	
	116	0	0		0	
	121	0	0		0	
	145	0	0		0	
	146	0	0		0	
	150	0	0		0	
	159	0	0		0	
	184	0	0		0	
	189	0	0		0	
	207	0	0		0	
	209	0	0		0	
	212	0	0		0	
Magas páratartalom, fertőt.	96	0	0		0	
	104	0	0		0	
	106	0	0		0	
	126	0	0		0	
	127	0	0		0	
	135	1	1		1	0
	140	0	0		0	
	143	0	0		0	
	155	0	0		0	
	169	1	0		0	
	173	0	0		0	
	175	2	1	2	0	0
	192	1	0		0	
	195	0	0		0	
	204	0	0		0	
	211	2	1	2	0	0

Szürke cellák: a döntési folyamat (3.10. ábra) alapján nem végeztem el a PCR-t.

3. melléklet: DNS-minősítés és PCR eredmények a száraz melegnek kitett, a száraz melegnek kitett fertőtlenített, és a mesterséges fénynek kitett tollak esetén.

Csoport	Minta	Eredmény				
		DNS	151	300	500	985
Száraz meleg	102	0	1	1	0	
	111	0	0		0	
	112	0	0		0	
	117	0	0		0	
	123	0	0		0	
	130	0	0		0	
	132	2	2	2	0	1
	144	2	1		1	0
	148	2	1	2	0	0
	165	1	0		0	
	166	2	2	2	0	0
	176	2	2		1	0
	177	0	0		0	
	178	1	1	2	0	0
	179	1	1	2	0	0
	213	2	2	2	0	2
Száraz meleg, fertőtlenített	92	0	0	0	0	
	114	2	2		2	2
	119	0	0	0	0	
	120	1	1	1	0	0
	124	2	2		2	2
	139	2	2		1	0
	141	0	1	1	0	0
	142	0	0		0	
	147	0	0		0	
	154	2	1		1	0
	157	2	2		1	0
	164	2	1	2	0	0
	168	0	0		0	
	186	2	0		0	
	197	0	0		0	
	208	2	2	2	0	0
Mesterséges fény	149	2	1	2	0	0
	158	0	0		0	
	160	2	0		0	
	171	0	0		0	
	172	2	1	2	0	0
	180	2	1		2	1
	181	2	0		0	
	187	2	2	2	0	0
	188	2	2		1	0
	190	1	0		0	
	191	2	2		1	0
	194	2	2		2	1
	200	0	0		0	
	201	0	0		0	
	205	2	1		1	0
	210	2	1	2	0	0

Szürke cellák: a döntési folyamat (3.10. ábra) alapján nem végeztem el a PCR-t.

4. melléklet: DNS-minősítés és PCR eredmények a kontroll tollak esetén.

Csoport	Minta	Eredmény				
		DNS	151	300	500	985
Kontroll	1	1	1	2	0	0
	4	2	2	2	0	2
	5	2	2		2	1
	7	2	2		1	0
	9	0	0		0	
	10	1	1	2	0	0
	98	2	2		1	2
	107	2	2		1	0
	118	1	1	1	0	0
	128	2	2		2	0
	129	0	0		0	
	133	1	1	2	0	0
	136	1	2	2	0	0
	162	1	1	2	0	0
	182	2	2		1	0
	183	2	1	2	0	0

Szürke cellák: a döntési folyamat (3.10. ábra) alapján nem végeztem el a PCR-t.

5. melléklet: Fotoreflektanciából számított értékek

Minta	UV-B átlag (%)	Felső kvartilis (nm)	Felső kvartilis fölött (nm)
104-domb	54,14	61,43	306-314,372-378, 393-495
104-med	18,51	65,64	619-750
127-domb	42,84	75,27	435-558,574-577, 645-660
127-med	32,22	74,78	624-749
145-domb	34,93	46,05	419-554
145-med	18,39	69,72	607-749
163-domb	54,09	58,95	401-405,412-489,566-590,591-601,727-749
163-med	26,6	71,66	610-749
174-domb	42,46	49,99	407-545,741-749
174-med	21,26	74,3	610-749
203-domb	19,05	42,09	468-480,485-564,625-671, 697-700
203-med	5,39	64,14	610-749

Tollanként, mérési pontonként (domb: domború oldal, med: medulla felőli oldal).

UVB-átlag: fényvisszaverő képesség átlagos mértéke az UV-B tartományban

Felső kvartilis: a teljes tartományban (250-750 nm)

Felső kvartilis fölött: hullámhossz-tartományok, amiben a felső kvartilis fölé eső reflektancia értékeket mértük.

6. melléklet: Fisher-féle egzakt tesztek eredményei a kezelési csoportok összehasonlítására a DNS minősítése alapján.

	Kontroll	Természetes fény	Magas páratartalom	Magas párat. Fertőtlenített	Száraz meleg	Száraz meleg, fertőtlenített	Mesterséges fény
Kontroll		OddsRatio: 0,09 Konf.Int: 0,01-0,63 *	OddsRatio: 0,01 Konf.Int: 0,0002-0,15 *	OddsRatio: 0,07 Konf.Int: 0,006-0,49 *	OddsRatio: 0,19 Konf.Int: 0,02-1,33 *	OddsRatio: 0,19 Konf.Int: 0,02-1,33 *	OddsRatio: 0,44 Konf.Int: 0,03-3,71 *
Természetes fény	OddsRatio: 10,66 Konf.Int: 1,59-129,40 *		OddsRatio: 0,12	OddsRatio: 0,76	OddsRatio: 2,09	OddsRatio: 2,09	OddsRatio: 4,73
Magas páratartalom	OddsRatio: 78,24 Konf.Int: 6,87-4522,98 *	OddsRatio: 8,43 Konf.Int: 0,83-439,71 *	Konf.Int: 0,002-1,21	Konf.Int: 0,14-4,13 OddsRatio: 6,44 Konf.Int: 0,60-342,78 *	Konf.Int: 0,42-11,10 OddsRatio: 17,45 Konf.Int: 1,83-894,71 *	Konf.Int: 0,42-11,10 OddsRatio: 17,45 Konf.Int: 1,83-894,71 *	Konf.Int: 0,89-30,52 OddsRatio: 37,98 Konf.Int: 3,83-2015,72 *
Magas párat. Fertőtlenített	OddsRatio: 13,83 Konf.Int: 2,03-171,49 *	OddsRatio: 1,31 Konf.Int: 0,24-7,37 *	OddsRatio: 0,16 Konf.Int: 0,003-1,67 *	OddsRatio: 0,37	OddsRatio: 2,73 Konf.Int: 0,54-15,45 *	OddsRatio: 2,73 Konf.Int: 0,54-15,45 *	OddsRatio: 6,17 Konf.Int: 1,14-41,57 *
Száraz meleg	OddsRatio: 5,15 Konf.Int: 0,75-61,86 *	OddsRatio: 0,48 Konf.Int: 0,09-2,35 *	OddsRatio: 0,06 Konf.Int: 0,001-0,55 *	OddsRatio: 0,37	OddsRatio: 1	OddsRatio: 1	OddsRatio: 2,27
Száraz meleg, fertőtlenített	OddsRatio: 5,15 Konf.Int: 0,75-61,86 *	OddsRatio: 0,48 Konf.Int: 0,09-2,35 *	OddsRatio: 0,06 Konf.Int: 0,001-0,55 *	Konf.Int: 0,06-1,84 OddsRatio: 0,37	Konf.Int: 0,2-5,01 OddsRatio: 1	Konf.Int: 0,2-5,01 OddsRatio: 1	Konf.Int: 0,42-14,15 OddsRatio: 2,27
Mesterséges fény	Konf.Int: 0,27-29,33 *	Konf.Int: 0,03-1,12 *	Konf.Int: 0,0005-0,26 *	Konf.Int: 0,06-1,84 OddsRatio: 0,16	Konf.Int: 0,2-5,01 OddsRatio: 0,44	Konf.Int: 0,2-5,01 OddsRatio: 0,44	Konf.Int: 0,42-14,15 OddsRatio: 2,27

összehasonlítására a 151 bp hosszúságú fragmens (Bcau6) felerősítésének sikerességére.

IX

összehasonlítására a 300 bp (Ans24) és az 500 bp (CHD1 génen) hosszúságú fragmensek felerősítésének összesített sikeressége alapján.

	Kontroll	Természetes fény	Magas páratartalom	Magas párat. fertőtlenített	Száraz meleg	Száraz meleg, fertőtlenített	Mesterséges fény
Kontroll		OddsRatio: 0,16 Konf.Int: 0,02-0,88 *	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-0,15 *	OddsRatio: 0,085 Konf.Int: 0,01-0,004 *	OddsRatio: 0,44	OddsRatio: 0,44	OddsRatio: 0,44
Természetes fény	OddsRatio: 6,17 Konf.Int: 1,14-41,57 *		OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-0,94 *	OddsRatio: 0,52 Konf.Int: 0,07-3,39 *	Konf.Int: 0,07-2,39 OddsRatio: 2,73 Konf.Int: 0,54-15,45	Konf.Int: 0,07-2,39 OddsRatio: 2,73 Konf.Int: 0,54-15,45	Konf.Int: 0,07-2,39 OddsRatio: 2,73
Magas páratartalom	OddsRatio: Inf. Konf.Int: 6,64-Inf *	OddsRatio: Inf Konf.Int: 1,06-Inf *		OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,43-Inf *	OddsRatio: Inf Konf.Int: 3,18-Inf *	OddsRatio: Inf Konf.Int: 3,18-Inf *	OddsRatio: Inf Konf.Int: 3,18-Inf *
Magas párat. fertőtlenített	OddsRatio: 11,72 Konf.Int: 1,92-100,84 *	OddsRatio: 1,93 Konf.Int: 0,29-15,33	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-2,32	OddsRatio: 0,19	OddsRatio: 5,25 Konf.Int: 0,92-40,46	OddsRatio: 5,25 Konf.Int: 0,92-40,46	OddsRatio: 5,25 Konf.Int: 0,92-40,46
Száraz meleg	OddsRatio: 2,27	OddsRatio: 0,37	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-0,31 *	OddsRatio: 0,19	OddsRatio: 1	OddsRatio: 1	OddsRatio: 1
Száraz meleg, fertőtlenített	Konf.Int: 0,42-14,15	Konf.Int: 0,06-1,85	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-0,31 *	Konf.Int: 0,02-1,09	Konf.Int: 0,2-5,01	Konf.Int: 0,2-5,01	Konf.Int: 0,2-5,01
Mesterséges fény	OddsRatio: 2,27	OddsRatio: 0,37	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-0,31 *	OddsRatio: 0,19	OddsRatio: 1	OddsRatio: 1	Konf.Int: 0,2-5,01

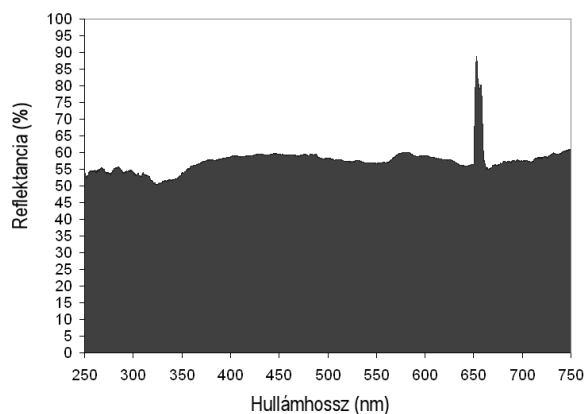
9. melléklet: Fisher-féle egzakt tesztek eredményei a kezelési csoportok összehasonlítására a 985 bp (α -aktin génen) hosszúságú fragmens felerősítésének sikeressége alapján.

	Kontroll	Természetes fény	Magas páratartalom	Magas párat. fertőtlenített	Száraz meleg	Száraz meleg, fertőtlenített	Mesterséges fény
Kontroll		OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-2,32	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-2,32	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-2,32	OddsRatio: 0,63 Konf.Int: 0,05-6,43	OddsRatio: 0,63 Konf.Int: 0,05-6,43	OddsRatio: 0,63 Konf.Int: 0,05-6,43
Természetes fény	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,43-Inf		OddsRatio: 0 Konf.Int: 0-Inf	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0-Inf	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf
Magas páratartalom	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,43-Inf	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0-Inf		OddsRatio: 0 Konf.Int: 0-Inf	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf
Magas párat. fertőtlenített	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,43-Inf	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0-Inf	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0-Inf		OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf	OddsRatio: Inf Konf.Int: 0,19-Inf
Száraz meleg	OddsRatio: 1,59 Konf.Int: 0,16-21,96	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27		OddsRatio: 1 Konf.Int: 0,06-15,62	OddsRatio: 1 Konf.Int: 0,06-15,62
Száraz meleg, fertőtlenített	OddsRatio: 1,59 Konf.Int: 0,16-21,96	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27	OddsRatio: 1 Konf.Int: 0,06-15,62	OddsRatio: 1 Konf.Int: 0,06-15,62	OddsRatio: 1 Konf.Int: 0,06-15,62
Mesterséges fény	OddsRatio: 1,59 Konf.Int: 0,16-21,96	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27	OddsRatio: 0 Konf.Int: 0,00-5,27	OddsRatio: 1 Konf.Int: 0,06-15,62	OddsRatio: 1 Konf.Int: 0,06-15,62	OddsRatio: 1 Konf.Int: 0,06-15,62

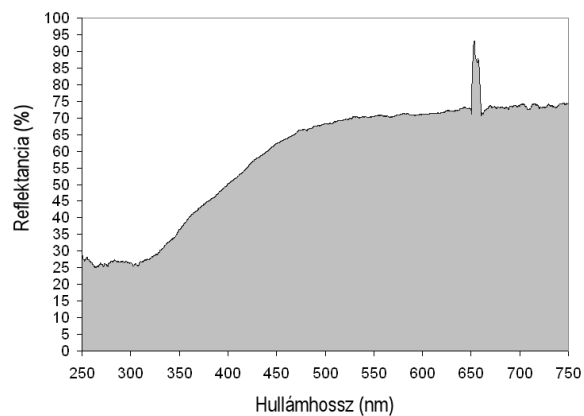
6-9. melléklet: Konf.Int: 95%-os konfidencia intervallum.

10. melléklet: Fotorefleksztancia a kezeletlen tollak esetén.

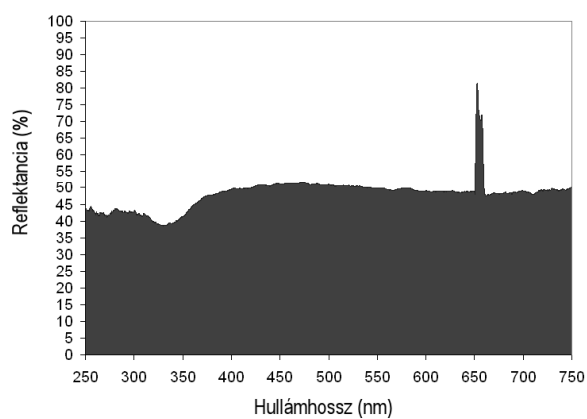
163 - domború



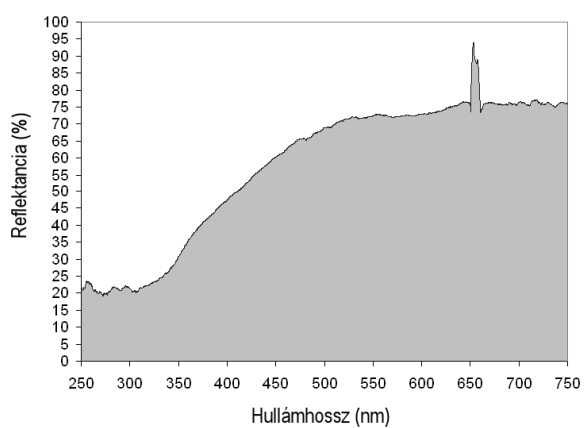
163 - medulla



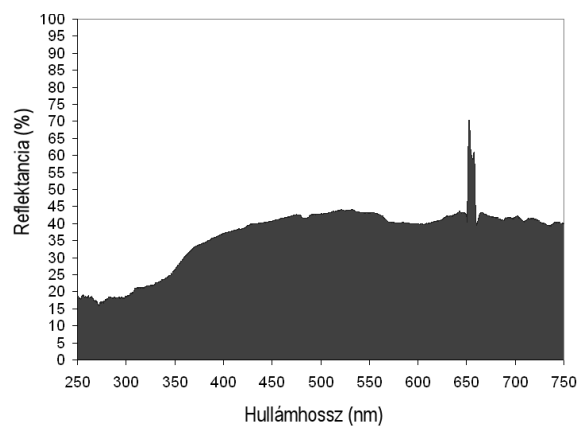
174 - domború



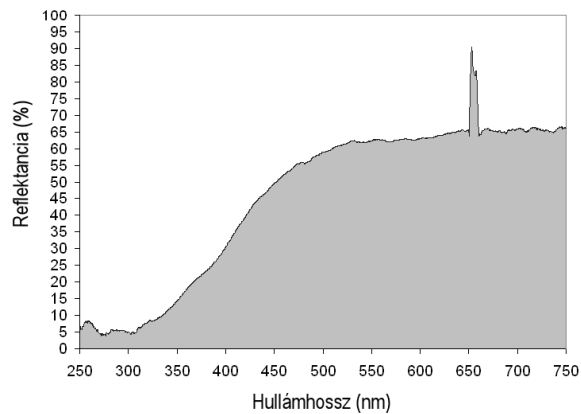
174 - medulla



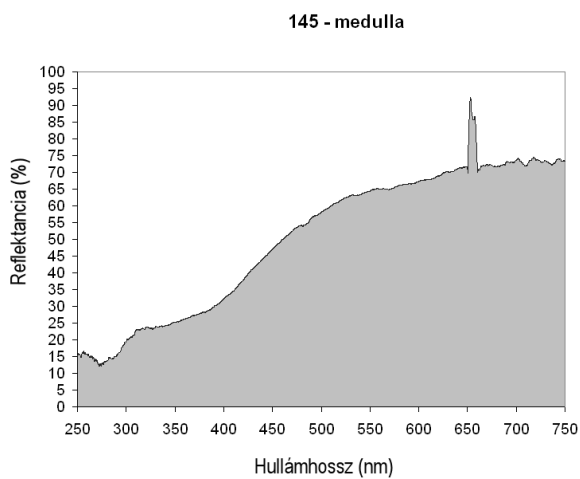
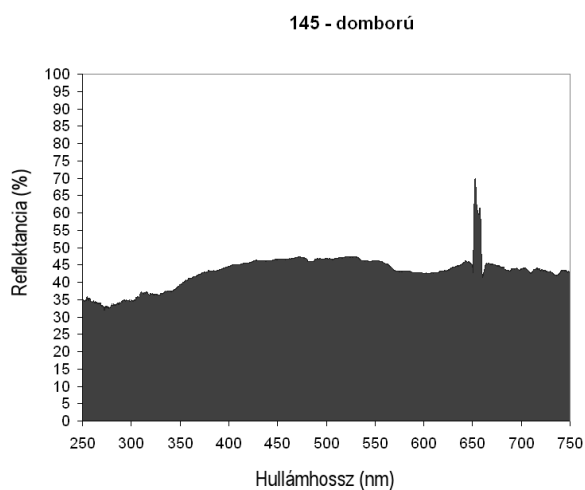
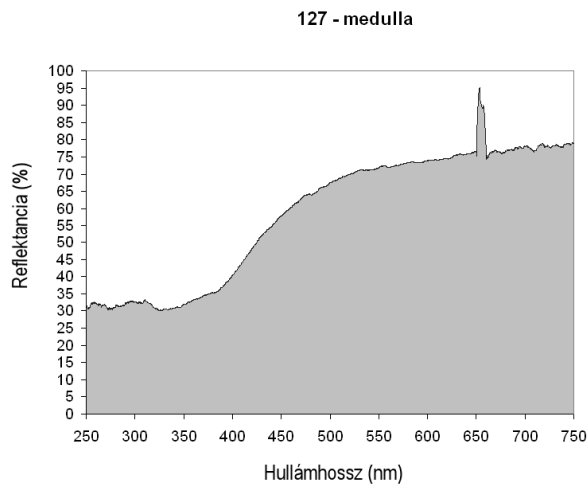
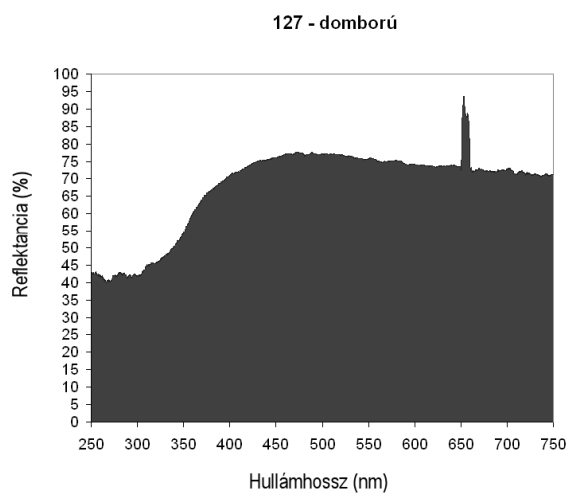
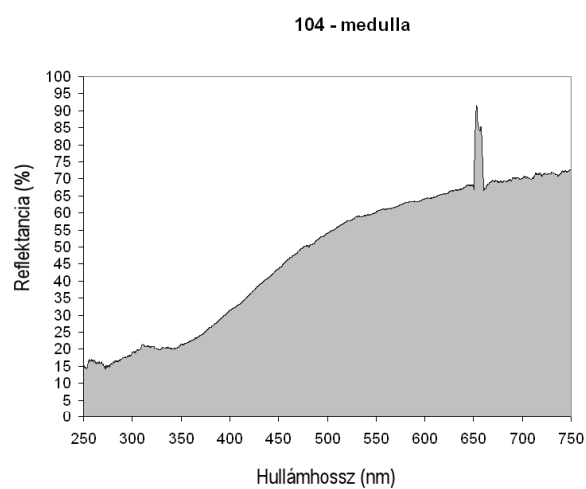
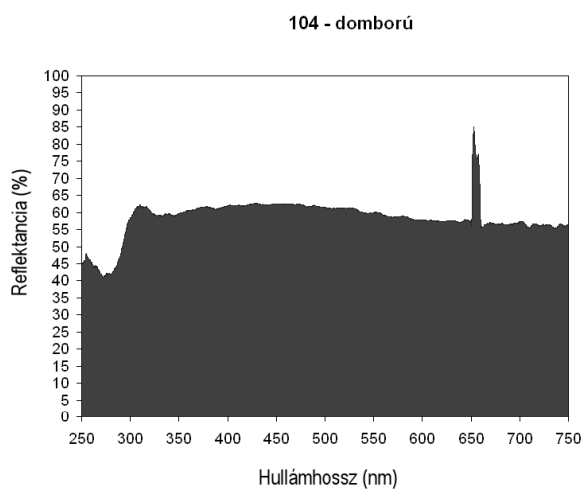
203 - domború



203 - medulla



11. melléklet: Fotorefleksztancia a magas páratartalomnak kitett tollak esetén.



10-11. melléklet: A grafikonok címe a vizsgált toll mintakódját, valamint a mérés helyét jelöli.