

Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem
Genetika és Biotechnológia Intézet
Genetika és Genomika Tanszék



Tudományos Diákköri dolgozat

Házinyúl tetranukleotid STR markerszett fejlesztése populációgenetikai vizsgálatokhoz

Készítette:

Pásztor Adrienn

Mezőgazdasági Biotechnológus MSc II. évfolyam

Témavezetők: Dr. Stéger Viktor
Tanszékvezető

Dr. Varga László
Intézetigazgató helyettes

Gödöllő
2021

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	3
I. Bevezetés	5
II. Célkitűzés.....	6
III. Irodalmi áttekintés	7
3.1 A házinyúl eredete.....	7
3.2 A házinyúl rendszertana	8
3.3 Nyúlhús termelés helyzete a világban.....	9
3.4 Fajták és Hibridek	10
3.5 Populációgenetikai vizsgálatok alapjai	12
3.6 Autoszómás mikroszatellit markerek	13
3.6.1 Mikroszatellit markerek alkalmazása házinyulakban	14
IV. Anyagok és módszerek	16
4.1 Kísérleti és kontroll állatok	16
4.2 Mintavétel.....	17
4.3 DNS izolálás.....	17
4.4 DNS minőségének és mennyiségének ellenőrzése.....	18
4.5 Tetranukleotid STR markerek tervezése	19
4.6 PCR vizsgálatok	20
4.7 Populációgenetikai elemzések.....	20
V. Eredmények és értékelésük.....	21
5.1 DNS vizsgálatok.....	21
5.2 Tetranukleotid STR markerek multiplexelése és genotipizálása	21
5.3 Tetranukleotid STR markerek alkalmazása házinyulakban	27
5.3.1 Referencia mintaszett vizsgálata	27
5.3.2 Tetranukleotid markerek alkalmazása a tenyésztésben.....	30
5.4 A két mintaszett összehasonlítása	33
VI. Összefoglalás	37
VII. Irodalomjegyzék	39
Internetes források.....	45
VIII. Köszönetnyilvánítás.....	46
IX. Mellékletek	47

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

μl	microliter-mikroliter
μM	micromole-mikromól
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism-Amplifikált töredékhosszúságú polimorfizmus
bp	base pair-bázispár
cM	centi Morgan
db	darab
DNS	deoxyribonucleic acid-dezoxiribonukleinsav
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid-Etilén-diamin-tetraecetsav
IGV	Integrative Genomics Viewer
INRA	l’Institut National de la Recherche
kb	kilobase pair-kilobázispár
N _a	Talált allélok száma
N _e	Effektív allélok száma
NZW	New Zealand white rabbit-új-zélandi fehér nyúl
PBS	Phosphate-buffered-foszfát-puffer
PCoA	Főkoordináta analízis
PCR	Polimerase Chain Reaction-polimeráz láncreakció
QDD	Qualified Derivative Dealer
QTL	Quantitative trait loci-Kvantitatív tulajdonság lókus
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region-Szekvencia jellemzett amplifikált régió
SNP	Single Nucleotide Polymorphism-Egy pontos nukleotid polimorfizmus
SSR	Simple Sequence Repeat-Egyszerű szekvencia ismétlődés
STR	Short Tandem Repeat-Rövid tandem ismétlődés
UCSC	University of California Santa Cruz Genome Browser

VNTR	Variable Number Tandem Repeats-Változó számú tandem ismétlődés
------	--

I. BEVEZETÉS

Hazánkban már az 1900-as évek elejétől létezik ipari nyúltenyésztés. Gödöllőn 1952-ben, elsőként indítottak szervezett kutatást a nyúltenyésztéssel kapcsolatban. A rendszerváltás előtt az árutermelő nyúltenyésztés nagy ütemben fejlődött Magyarországon, viszont a rendszerváltás után a mezőgazdasági feltételek változása miatt ez jelentősen lecsökkent, mára már csak a 14-ik helyet foglalja el a világban (Szendrő, 2014). "1990 óta átrendeződött az egész ágazat, beszűkült a hagyományos, háztáji körülmények között termelt nyúl piaca" (Juráskó, 2017). A hanyatlást több tényező okozta, például: a megemelkedett üzemanyagár, a takarmány- és az energiaárak növekedése. Míg régebben hazánkban a felvásárolt nyulak 90%-a kisüzemekből származott, addigra manapság már csak 1-2% származik ilyen telepekről (Szendrő, 2015). A támogatásoknak, illetve a jobb alkupozíciónak köszönhetően (Szendrő et al. 2010) lehetőség nyílt arra, hogy a házinyulak nagyüzemi körülmények között tartsák (Szendrő, 2015).

A tenyésztők legfőbb feladata az, hogy minél nagyobb genetikai értékű állományokat hozzanak létre és ezt hosszú távon fent tudják tartani. Abban az esetben, ha az előzőekben említett feltételeket nem teljesítik, akkor beltenyésztettség alakulhat ki, vagyis a nem kívánatos gének homozigóta formában rögzülhetnek a populációban (Szabó, 2004). Az ilyen információkhoz a származás ismeretében, pedigre analízissel vagy genetikai markerek segítségével végzett vizsgálatok során jutunk (Gyovai, 2011). Az egyes populációk genetikai változatosságának feltárása az utóbbi években előtérbe került (Wooliams et al. 2002). Ezen információk ismeretében képet kapunk az állatok őseiről, oldalági rokonairól, mely segítségével fontos számításokat végezhetünk el a populáció genetikai szerkezetének és változásának megállapítására (Maignel et al. 1996). A mikroszatellitek jelenleg az egyik leghatékonyabb genetikai markernek tekinthetők és használatuk széles körben elterjedt a genomikában (Kiss 2005, Kimberly & Tonnen 2006).

TDK dolgozatomban a házinyulak populációgenetikai vizsgálatával foglalkozom, autoszómás mikroszatellit markerek segítségével. Előzőekben már kidolgoztak egy molekuláris marker szettet, mely szekvenciákat irodalmi adatokból gyűjtötték ki (Alves et al. 2015, Sternstein et al. 2015), azonban ezeket a mikroszatelliteket három plexben sikerült csak összesíteni, valamint dinukleotid ismétlődést is mutattak, így kevésbé voltak informatívak, és gazdaságilag hasznosak. Ezért úgy döntöttünk, hogy olyan markereket alkalmazunk, melyek tetranukleotid ismétlődést mutatnak, 100-500 bázis pár hosszúság között helyezkednek el, polimorfak és egy multiplexbe összeállíthatóak. A tetranukleotid markerek így sokkal

költséghatékonyabbak lehetnek, illetve az egyedazonosítás szempontjából is jobbnak bizonyulhatnak, mint a dinukleotidok.

II. CÉLKITŰZÉS

Célunk az, hogy a genomszekvenálásból származó adatokat bioinformatikai módszerek segítségével feldolgozzuk, ezt követően primereket tervezzünk, hogy a populációk diverzitását fajspecifikus multiplexek segítségével továbbiakban vizsgálhassuk. Így lehetőségünk nyílik a különböző fajták és fajtahibridek mikroszatellit marker alapú elkülönítésére, illetve populációgenetikai vizsgálataira, úgymint rokonságvizsgálatra fajtákon belül és genetikai távolság becslésére.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A házinyúl eredete

Az üregi nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) (1. ábra) a házinyúl őse. A jó alkalmazkodóképességének köszönhetően ma is egész Európában elterjedt fajnak számít (Bakonyi et al. 1995). A külön fajhoz tartozó mezei nyulat sok esetben összekeverik a vadas színű üregi nyúllal (*Lepus europeus*) (1. ábra). A közhiedelemben sokszor a házinyúl ősének a mezei nyulat tekintik, azonban a házinyúl és a mezei nyúl között csak család szinten van származási kapcsolat. Az üregi nyúl a házinyúllal sikeresen keresztezhető, viszont a mezei nyúllal nem. Ennek oka, a két faj közötti kromoszóma szám különbség. Ugyanis a mezei nyúlnak 48 kromoszómája van, az üregi nyúlnak pedig 44, így előfordulhat, hogy az ivarsejtek egyesülésekor az anyai és apai kromoszómák nem találják meg a megfelelő párjaikat (Holdas, 1985).

Mezei nyúl
(*Lepus europaeus*)



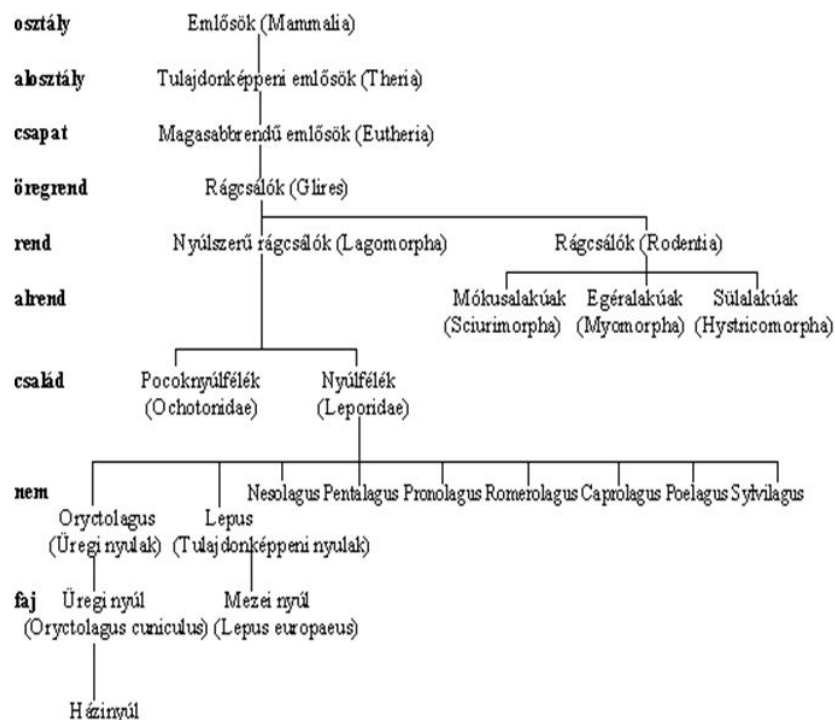
Üregi nyúl/Házinyúl
(*Oryctolagus cuniculus*)



1. Ábra: Mezei és üregi nyúl összehasonlítása (Fotó: <http1>)

3.2 A házinyúl rendszertana

A házinyulat rendszertanilag (2. ábra) a gerincesek törzsébe (Vertebrata), azon belül az állkapcsosok altörzsébe (Gnathostomata), az emlősök osztályába (Mammalia), a tulajdonképpeni emlősök alosztályába és a magasabb rendű emlősök (Eutheria) csapatába sorolják. Ebben a csapatban több öregrend található, melyek közül a nyúlfélék a rágcsálók (Glires) öregrendjébe tartoznak. Ebben két rendet állítottak fel a zoológusok. Az egyik a nyúlszerű rágcsálók (Lagomorpha), a másik pedig a rágcsálók (Rodentia) rendje. Az utóbbiba tartoznak az egerek és a patkányok. A nyúlszerű rágcsálók rendjén (Lagomorpha) belül találjuk a gazdasági szempontból jelentős nyúlfék (Leporidae) családját (Holdas, 1985). A Leporidae család 9 nemzetséget tartalmaz (Lepus, Sylvilagus, Oryctolagus, Romerolagus, Pentalagus.stb) és összesen mintegy 50 különböző fajt különítünk el (Lebas et al. 1986). Az egyik genus az üregi nyulaké (Oryctolagus), ahová a házinyúl őse is az üregi nyúl tartozik. A hazánkban vadon élő másik nyúlféle, a mezei nyúl (Lepuseuropaeus) a Lepus genusba tartozik (Holdas, 1985).



2. ábra: A házinyúl rendszertani besorolása (Fotó: Holdas, 2000)

3.3 Nyúlhús termelés helyzete a világban

A nyúlhús a korszerű táplálkozás alapjának számít, hiszen alacsony az energia tartalma, könnyen emészthető, nagy biológiai értékű, illetve kiváló tulajdonságainak köszönhetően a bébiétel gyártók is előszeretettel használják (Bleyer, 2002). Lényeges, hogy a koleszterin-, zsír, illetve fehérje tartalma magas, emellett vitaminokban és ásványi anyagokban gazdag szemben, a sertéssel vagy marhahússal, amelyek zsírsavtartalma az összes zsíron belül, eléri a 63%-ot (Lugasi, 2007). A 3. ábrán is látható, Magyarországon a rendszerváltás után (1990- 2009-ig) jelentős mennyiségben csökkent a felvásárolt nyúlhús mennyisége, illetve ezzel arányosan az export is visszaesett.

Év (Year)	Felvásárolt élőszűly, tonna (Purchase, live rabbits, tons)	Export (tonna)	Egységár USD/kg (Price)	Árbevétel (ezer USD) (Export sales, Thousand USD)
1990	33 468	16 763	3,1	52 283
1991	37 132	19 224	3,0	58 226
1992	34 444	18 512	3,1	58 060
1993	26 255	13 346	2,9	38 039
1994	15 732	8 845	3,3	29 339
1995	16 939	8 129	3,5	28 595
1996	15 959	8 866	3,5	31 425
1997	13 743	7 263	3,2	22 840
1998	13 903	6 419	3,4	21 727
1999	12 716	6 359	3,2	20 407
2000	10 870	5 118	3,3	16 846
2001	12 761	5 615	3,7	20 643
2002	11 887	5 388	3,4	18 161
2003	10 932	5 045	4,6	23 156
2004	12 074	5 287	5,9	31 180
2005	13 520	5 310	4,3	22 825
2006	12 979	4 491,7	?	21 458
2007	12 070	5 530	4,8	26 542
2008	9 900	4 900	4,85	23 765
2009	9 700	4 800	4,9	23 520

3. ábra: Húsnyúl felvásárlás és az export alakulása a Nyúl terméktanács 2009. évi beszámolója alapján
(Fotó: Bogó, 2013)

Kína után a világ második legnagyobb nyúlhús előállítója az Európai Unió (Európai élelmiszerbiztonsági hatóság, 2020 alapján) (<http2>). Magyarország a nyúlhús termelő országok között a világban a 14-ik helyet foglalja el (Szendrő, 2014). A nyúlhús prémium terméknek

számít előállításuk sokkal drágább, mint a csirke- vagy a sertéshúsé, a hazai fogyasztók többsége a prémium marha vagy baromfitermékekhez hasonlóan a nyúlhús fogyasztását sem engedheti meg magának. Magyarországon mindössze 10 dkg nyúlhús fogyasztás jut egy főre egy évre levetítve (Szendrő 1998; Tanai 2007). A termelés célja az export (Virág 1996; Bodnár et al. 2003), hiszen hazánk a legnagyobb nyúlhús exportáló országok között van a világban Spanyol- és Franciaország mellett (Cullere & Dalle Zotte, 2018). Itthon leginkább vidéken van hagyománya a nyúlhús fogyasztásnak és háztáji nyúl tartásnak, az emberek saját fogyasztásra tenyésztik ezeket a jószágokat, ami a család hús bevitelét bizonyos mértékben kiegészíti (Bodnár et al. 2003).

A 4. ábra bemutatja, hogy a Magyarországon tenyésztett nyulak nagy részét, mely országokba exportálják (pl.: Svájc, Belgium, Olaszország, Németország) (Lugasi, 2007).



4. ábra: A magyar nyúlhúsexport célországai (szürke árnyalattal jelölve) (Fotó: Szendrő, 2015)

3.4 Fajták és Hibridek

Napjainkban mintegy 200 nyúlfajtát különböztetnek meg. Legtöbbjük, valamilyen gazdasági szándékkal jött létre, egy részük pedig a véletlennek köszönhető (Harangi, 2005).

A fajtatizta Pannon fehér nyúl (5. ábra), egy Magyarországon nemesített fajta. Néhány évvel ezelőtt, ezért a Kaposvári Egyetemen – a hibrid anyai és apai vonalakhoz hasonlóan – egy anyai és egy nagytestű vonalat alakítottak ki. Az anyai vonal szaporaságban, tejtermelő- és nevelőképességben tűnik ki. A nagytestű vonal viszont súlygyarapodásban kiváló. Új-zélandi fehér nyulat (NZW) (5. ábra) használtak szinte kivétel nélkül a hibrid vonalak kialakításához. Emellett más, szaporaságban jó teljesítményre képes állományt is bevontak a nemesítő

programba. Az apai vonalak kialakításánál többnyire valamelyik nagytestű fajtát vonták be a tenyésztésbe (Szendrő et al. 2010).



5. ábra: Új-Zélandi fehér nyúl, Pannon fehér nyúl (Fotó: Szendrő et al. 2010)

A hazai piacon 1995-ben jelentek meg a Hycole hibrid tenésznnyúl vonalak (D, C, X (XXL), Color, Mixte) (6. ábra), mint honosított nyúlhibridek, illetve elsőként kaptak fajtaelismerést és forgalmazási engedélyt Gerber Johann tenyésztésvezető munkájának köszönhetően. A hibrid fenntartása és sikeres hazai forgalmazása, a hazai tenyésztők jelentős részének tenyészállomány váltása, genetikai frissítése zajlott le a vezetése alatt álló Gerend, majd Leporex Kft. neve alatt (<http3>).



6. ábra: Hycole C, Hycole D szülőpár nőstények (Fotó: <http3>)

Francia nyúlhibrid a Hyplus (7. ábra), amiből több hazai nyúltelepre kerültek állatok. Anyai vonalait ugyancsak a toulouse-i l'Institut National de la Recherche (INRA) kutatóintézettel együttműködve nemesítik. A termelési cél határozza meg, hogy ugyanazt a szülőpár anyát standard, nagytestű, vagy színes (burgundi vörös vagy champagni ezüst) apai vonallal termékenyítik meg (Szendrő et al. 2010).



7. ábra: Hyplus hibrid nyulak (Fotó: http3)

Németországban nemesítik a Zika (8. ábra) hibrid nyulat. Napjainkban csökken a szerepe, viszont korábban nagyobb létszámú állomány került belőle Magyarországra (Szendrő et al. 2010).



8. ábra: Zika hibrid nyulak (Fotó: Szendrő et al. 2010)

Az előzőekben megemlített hibrid nyulak mellett még előfordul hazánkban a Hyla; a Cunistar; az Eurolap; az Elco; és a Provisal, viszont ezeknek jelenleg nincs jelentős szerepük a magyarországi vágónyúl-termelésben (Szendrő et al. 2010).

3.5 Populációgenetikai vizsgálatok alapjai

A természetes populációk genetikai diverzitásának vizsgálatára alkalmazzák a populációgenetikai módszereket (Robert & Philipp 1997). A rendelkezésre álló módszerek nagy fejlődésen mentek keresztül az utóbbi évtizedekben, így a vizsgálati célok is jelentősen bővültek.

A legkorábbi populációgenetikai vizsgálati módszer a Randomly Amplified Polymorphic (RAPD). Ennél a technikánál random, 9-12 nukleotidból álló primer alkalmazásával végeznek PCR-t, a kapott fragmentumok száma pedig attól függ, hogy a primerek hányszor találhatnak

komplementer szakaszokat a DNS molekula két szálán (Burlando et al. 1996; Senthil et al. 2011). Az RAPD módszerhez képest a mikroszatellit vizsgálatok előnye, hogy egy lókuszon több allél is előfordulhat, illetve heterozigócia is detektálható. Viszonylagos hátránya az, hogy többé-kevésbé fajspecifikus, illetve közeli fajoknál csak részlegesen alkalmazhatók (Hidas, 2002).

3.6 Autoszómás mikroszatellit markerek

A mikroszatellitek olyan repetitív szekvencia családba tartoznak, ahol néhány bázis, illetve szekvencia ismétlődik egy szakaszon, viszont a kópiaszám nagymértékű variabilitást mutat. A tandem ismétlődő régiókat VNTR-nek (Variable Number Tandem Repeats= változó számú tandem ismétlődés) (Edwards et al. 1991) mikroszatellitnek (Litt & Luty, 1989) vagy SSR-nek (Simple Sequence Repeat = egyszerű szekvencia ismétlődés) (Jacob et al. 1991) nevezzük. A mikroszatellit lókuszek olyan nem átíródnak DNS-régiók, amik 2-6 bázispárból állnak és egyenletesen oszlanak el a genomban (Buduram et al. 2005; Litt & Luty 1989; Weber & May 1989; Tautz & Renz 1984; Jeffreys et al. 1985). Az STR ismétlődő szekvenciák elnevezése az ismétlődő motívum hossza alapján di-, tri-, tetra-, penta- illetve hexanukleotid, melyek a nevüknek megfelelően 2, 3, 4, 5 vagy 6 nukleotidból állnak. A mikroszatellitek nagy polimorfizmust mutatnak, azaz egy populációban, meghatározott génhelyen (lókus) allélok egész sora azonosítható (DeWoody & Avise, 2000). A repetitív minta kedvez a mutációknak, ami a mikroszatellitek polimorfizmusának az egyik oka. A mikroszatellitek mutációs rátája 10^{-4} és 5×10^{-6} -ra becsülik (Edwards et al. 1992; Dallas 1992; Craighead et al. 1995).

A mikroszatellitek használata széles körben elterjedt a genomikában, populációgenetikában valamint a kvantitatív tulajdonságok genetikai vizsgálatában is. Az ismétlődésszámban kifejezett allélhosszak a laboratóriumok közötti információcserét is egyszerűsítik a gélfotókon rögzített mintázathoz képest (Kiss 2005, Kimberly & Tonnen 2006).

A tetranukleotid ismétlődések magas aránya azért fontos, mert technikailag az ilyen markerek allélhosszúságainak értékelése a legkönnyebb (Edwards et al. 1991, Szabolcsi et al. 2014). A tetranukleotid markereket pontosabban lehet elemezni, ezért sokkal közkedveltebbek.

Napjainkban elsősorban tetranukleotid ismétlődéseket használnak a humán igazságügyi genetikában (Edwards et al. 1991, Szabolcsi et al. 2014), viszont emellett alkalmazták már gímszarvasok egyedazonosítására (Zoltán 2013), kutyák genetikai térképezésére (Francisco et

al. 1996), sertésekben származási vizsgálatoknál (Cherel et al. 2011), illetve lovak esetében genotipizálásnál (Builes et al. 2013) is. A nem-humán populációgenetikai vizsgálatokban azonban még a dinukleotid markerek a dominánsak (Zsolnai et al. 2009, Kalia et al. 2011, Cai et al. 2013, Szabolcsi et al. 2014).

3.6.1 Mikroszatellit markerek alkalmazása házinyulakban

A házinyúl jó modellállatnak bizonyul a laboratóriumokban zajló a kutatásokhoz, mind a kutatásban, mégis nagyon kevés információnk van -e faj genomi erőforrásainak összetételéről. A Nemzeti emberi genomkutató intézet (USA) 2004 augusztusában jelentette be a nyúlgenom részleges szekvenálására irányuló programot (Chantry-Darmon et al. 2005). A genetikai térképezés még mindig nagyon korlátozott ebben a fajban (Fox 1994, Korstanje et al. 2001). Az l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA Franciaország) 2001-ben nyúlgenom-feltérképezést indított, melynek célja a Quantitative trait loci (QTL, mennyiségi tulajdonságot befolyásoló lókusz) feltérképezése, illetve a jelölt gének azonosítása termelési tulajdonságok szempontjából. A cél az volt, hogy rendszeresen integrált citogenetikai és genetikai térképet készítsenek el mikroszatellitek alapján elosztva a nyúl genomjában (Chantry-Darmon et al. 2006).

Sternstein 2015-ben kiadott tanulmányának fő célja a meglévő kapcsoltsági térképek javítása és a kvantitatív tulajdonsági lókuszok (QTL) feltérképezése volt, a hasított test és a húsminőség jellemzőire. A vizsgálatot egy F2 populációban végezték el, melyben a kezdeti keresztezéseket az Óriás szürke és az Új-zélandi fehér nyúl között hajtották végre. Az eredmények a legátfogóbb genetikai térképet és az első genomszintű QTL-térképezést mutatták be a hasított test és a húsminőség jellemzőire nyulakban (Sternstein et al. 2015).

Tajvanban 2018-ban mikroszatellit marker alapú populációgenetikai vizsgálatokat végeztek laboratóriumi nyulakon (Lai et al. 2018). A kutatás során 5 populáció alapítóitól izoláltak DNS mintákat. A genetikai elemzésekhez 18 mikroszatellit markert terveztek, melyek nagyfokú diverzitást mutattak. Az eredményekből az következett, hogy a helyi populációk nagymértékben beltenyésztettek. Ugyanakkor a molekuláris varianciaelemzés eredményei szerint a kísérlethez használt laboratóriumi nyulak magas szintű (83%-os) populáción belüli genetikai differenciáltságot mutattak (Lai et al. 2018). A tanulmány fő célja mikroszatellit markerek létrehozása volt a helyi nyúlpopulációk genetikai nyomon követésére, és ezen

mikroszatellit markerek felhasználásával lehetőségük volt meghatározni a populációkon belüli genetikai variációt, valamint a genetikai szerkezetet (Lai et al. 2018).

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Kísérleti és kontroll állatok

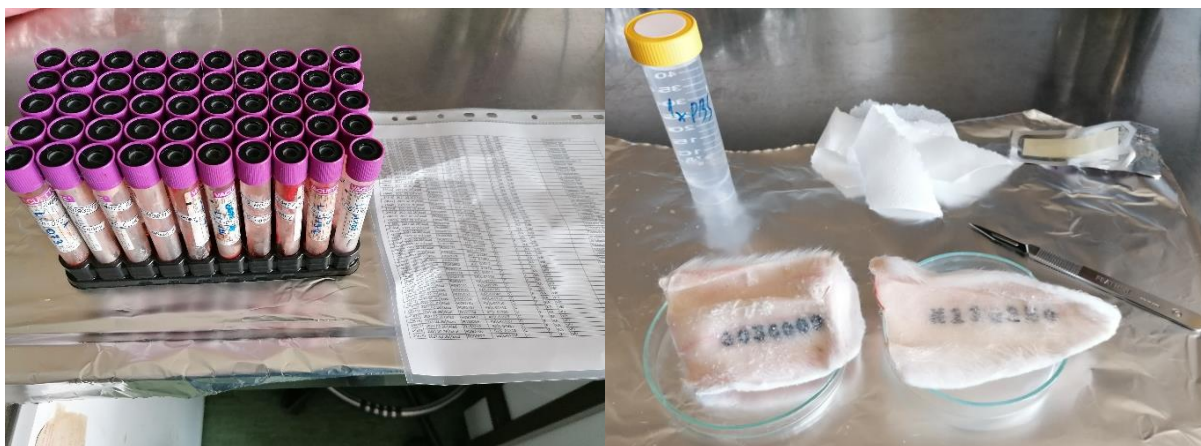
Kísérleteink során négy fajtát és azok hibridjeit vizsgáltam meg. Mivel a célzott nyúlállományunk többvonalas hibridekből tevődik össze, emiatt szükség van mintákra nemcsak a hibridállományból, hanem az azokat kialakító szülői populációkból is. A 96 darabból (Plate_I) álló referencia minták (2. melléklet) esetén az egyedeket úgy válogattuk össze, hogy közeli rokonok, illetve fele-fele arányban hímek és nőstények is legyenek közöttük. A 101 darabból álló második mintaszett (Plate_II) a tenyésztésben fontos C, D és XXL fajtájú nőstényeket tartalmazta (3. melléklet).

Mindkét esetben a válogatásnál elsődleges szempont volt, hogy minden fajtából és azok hibridjeiből is minimum 12 minta álljon rendelkezésre. A populációgenetikai elemzések értékeléséhez minél nagyobb mintaszámra van szükség, mivel ezek alapján határozható meg, hogy az általunk tervezett és optimalizált mikroszatellit markereknek mekkora a fajok/fajták vagy vonalak közötti szétválasztó ereje, illetve mennyire képesek egyedazonosításra és a rokonsági kapcsolatok feltárására.

A vizsgálatokhoz szükséges minden adatunkat a saját Biobankunkban tároljuk, mely rendszerben szűréseket lehet használni több tulajdonságra is, pl.: fajtákra; ivarra; azonosító számra; DNS koncentrációra stb., ennek köszönhetően gyors és egyszerű a keresés a több ezer minta között.

4.2 Mintavétel

A kísérleti állatok mintáit kísérleti nyúltelepekről gyűjtöttük be, a résztvevő állatokat egyedileg, ketrecekben tartották. Az élő állatok fülénájából vért vettünk kilenc milliliteres Vacuette EDTA-t tartalmazó csövekbe, ha nem állt rendelkezésünkre vérminta, akkor egyéb mintatípusból izoláltuk a DNS-t, mint pl.: fül, tetem, fülcsipke (9. ábra). Az izolálás megkezdéséig a mintákat a rajtuk lévő és hozzájuk tartozó fülszámmal és az általunk használt azonosítóval feliratozott zacskókban $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. Vér esetében a vérvevő csöveket feliratoztuk a nyulak fülszámával vagy ketrec számával, majd az általunk készített adatbázisban ezekhez is Biobanki (azonosító) számokat rendeltünk, illetve ebben az esetben is $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztókban tároltuk a mintákat a feldolgozásáig.



9. ábra: Vér és nyúlfülminták (Fotó: Pásztor Adrienn)

4.3 DNS izolálás

A DNS izolálását különböző protokollok alapján végeztem, attól függően, hogy vér vagy egyéb szövetminta volt a kiindulási anyag.

Szövetminta esetén a DNS kivonását MagCore® Genomic DNA Tissue Kittel végeztem, MagCore® Automated Nucleic Acid Extractor robotban (RBC Bioscience Corporation) (10. ábra). Első lépésként 1x PBS-sel letakarítottam a fülnek a belső részét, majd egy kis területet metszettem ki a fül felső rétegéből, úgy hogy a porcot ne vágjam bele, mivel így a Proteináz K enzim jobban kifejti a hatását. Minden egyes fülnél külön steril szikét használtam a kontaminálódás elkerülése miatt. Ezt követően a sejtek jobb feltárása érdekében $400\text{ }\mu\text{l}$ GT buffert és $20\text{ }\mu\text{l}$ Proteináz K enzimet adtam a mintákhoz, majd vortex segítségével

homogenizáltam őket. Ezt követően a mintákat 90 percre 55 °C-os thermomixerbe helyeztem, majd ennek lejárta után ellenőriztem, hogy az enzim sikeresen megemésztette-e a fehérjéket. Következő lépésként pedig a mintákat szűrő oszlopokon szűrtem át és 5 percen keresztül centrifugáltam maximális fordulatszámon. Ezután minden mintából 400 µl-t pipettáztam át a mintacsőbe, majd a mintákat behelyeztem a DNS izoláló robotba. Az izolálás utolsó lépéseként beállítottam a roboton a megfelelő programot, ami ebben az esetben a 401-es számú volt. A DNS-t 100 µl vízben vettem le.



10. ábra: A laborban található, DNS izoláláshoz használt MagCore® Automated Nucleic Acid Extractor
(fotó: Pásztor Adrienn)

4.4 DNS minőségének és mennyiségének ellenőrzése

A DNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) ellenőriztem. Abban az esetben, ha a DNS koncentrációja meghaladta az 50ng/µl-t és a tisztasága elérte az 1,8 feletti értéket, akkor a tömény DNS-t 15ng/ µl -re hígítottam.

A DNS minőségének ellenőrzését agaróz gélelektroforézis segítségével végeztem. 150-200 ng DNS-t futtattam 1 %-os gélben, 45 percig 120 Volton. Létraként GeneRuler 1 kb plusz molekula tömeg markert használtam.

4.5 Tetranukleotid STR markerek tervezése

Az STR markerek tervezése során először a genomszekvenálásból származó nyers szekvenciák referencia genomhoz illesztése történt meg. A következő lépésben a QDD szoftvercsomag segítségével a rendelkezésünkre álló mikroszatelliteket kiválogattuk, annak függvényében, hogy hány allélt (ideálisnak a 6-8 allélt tartalmazókat vettük) tartalmaznak. Ezt követően már csak az általunk használni kívánt mikroszatellitekkel dolgoztunk tovább, melyeket egy BED (Browser Extensible Data) file-ba konvertálva Integrative Genomics Viewer-be (IGV) töltöttünk. Az Integrative Genomics Viewer (IGV) rendszere egy nagy teljesítményű, könnyen használható interaktív eszköz, ami lehetőséget ad a genomi adatok vizuális feltárásához ([http4](http://4)). Az IGVtools segédprogramnak köszönhetően (ami eszközkészletet biztosít az adatfájlok előzetes feldolgozásához) az eddig leválogatott mikroszatellitekből tetranukleotid STR markereket kerestünk. A program további alkalmazásával elvégeztünk még néhány vizsgálatot, pl.: meg tudtuk nézni, hogy a tetranukleotid markereknek milyen a frekvenciájuk, illetve ezen felül még egyéb szűréseket is eszközöltünk. A mikroszatellit markerek határoló régióira primereket tervezünk a Primer3 program segítségével. Abban az esetben, ha megvannak a primerek, a tervezést követő lépés azok működőképességének ellenőrzése, amely az University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC in-silico) program segítségével történt. A kiválogatott tetranukleotid STR markereknek megnéztük a varianciáját, hiszen a genotipizálás annál sikeresebb minél polimorfabb az adott mikroszatellit.

A bioinformatikai programok használata után a számunkra megfelelő primereket alternatív plexekbe próbáltuk elhelyezni az allélméreteik alapján. A multiplex reakciók tervezésénél az volt a fő szempont, hogy az allélméretek fluoreszcens jelölésük szerint eltérő mérettartományba essenek, így a kapott jelek nem interferálhatnak a genotipizálásnál.

4.6 PCR vizsgálatok

A DNS mintákat a PCR vizsgálatokhoz 15 ng/μl koncentrációra hígítottuk; a 15 ng/μl koncentrációt el nem érő DNS termékeket hígítás nélkül használtuk a további vizsgálatainkhoz.

Első körben az általunk tervezett tetranukleotid STR markereket (23 db) jelöletlenül rendeltük meg. A PCR vizsgálatok során a mikroszatelliteket használhatjuk külön-külön is reakciónként, de a vizsgálatok multiplex környezetben is elvégezhetők. Ez azt jelenti, hogy egy reakcióban párhuzamosan több markert is vizsgálunk, ezzel a vizsgálatok költség,- illetve időhatékonysága növelhető. Nagyon fontos, hogy az általunk tervezett primereket az optimalizálás után majd egy reakcióba tudjuk rakni. A minták genotipizálásához az általunk tervezett tetranukleotid STR markereket a kapilláris elektroforézis jelerőssége alapján optimalizáljuk. Törekedtünk arra, hogy a kromatogrammon minden esetben jól detektálható csúcsokat kapjunk, melyek a megfelelő bázispár hossz tartományban vannak.

4.7 Populációgenetikai elemzések

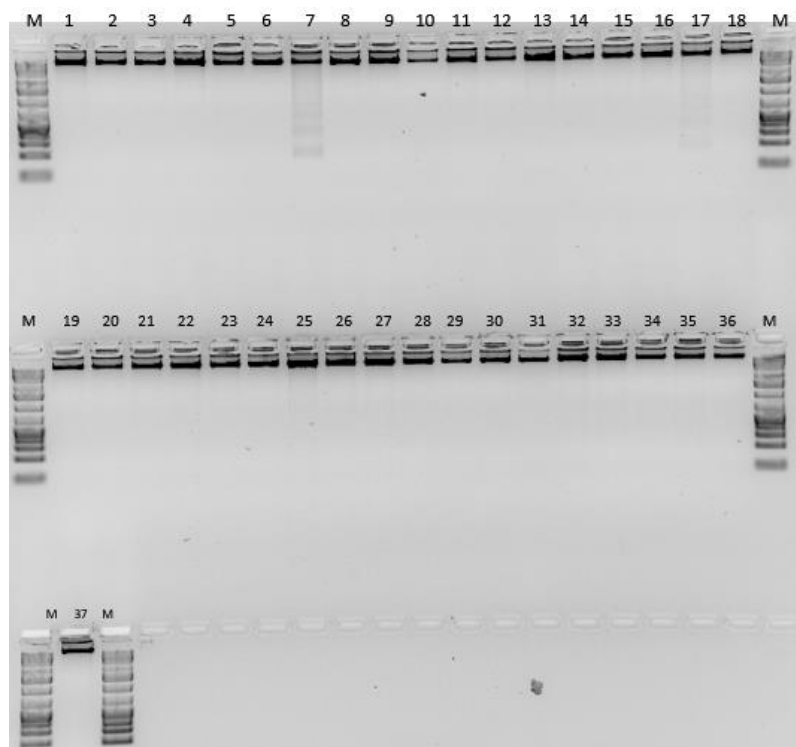
A mikroszatellitek fluoreszcensen jelölt primerekkel végzett multiplex reakciók eredményeként kapott PCR termékek méretét kapilláris elektroforézissel határozták meg a BIOMI Kft-nél, ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Group, USA) készüléken. Az elektroferogramokat Peak Scanner version 1.0 program (Applied Biosystems Group, USA) segítségével értékeltem, majd ezeket az adatokat összevettem a Geneious (Microsatellites plugin for Geneious Prime) automatizált aléllolvasást végző program eredményeivel és a kapott adatokat Excel táblázatban rögzítettem. Az allélek összesítését (allélfrekvenciák, heterozigotizáció) és a populációgenetikai vizsgálatokat GenAlEx version 6.501 (Peakall & Smouse 2012) programmal végeztem.

A rokonsági kapcsolatok kiértékeléséhez a Colony Version 2.0.6.5. (Wang, 2018) programot alkalmaztam. A szoftver alapja egy valószínűségi módszer, amely két páronkénti valószínűségi eljárást valósít meg az egyedek közötti szülői, testvéri és klóntársak (duplikátumok) hozzárendelésére meghatározására a több lókuszu genotípusok felhasználásával. Az eredmények kiértékelésénél különböző output fájlok közül lehet válogatni, mi a Best Cluster-t; a Best_FS_Family-t; a Pairwise Maternityt és Paternityt néztük meg. A Best Cluster esetében lehetőségünk van százalékos arányok alapján kiértékelni az utódok anyai és apai kapcsolatait is. A százalékos eredményeknél a 80% felett lévő értékeket vettem alapul.

V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 DNS vizsgálatok

Az anyag és módszertanban leírtak alapján végeztem el a DNS izolálásokat. A 11. ábrán jól látható, hogy az izolálás sikeres volt, hiszen nem töredeazettek és nem szennyezettek a genomiális DNS-ek.

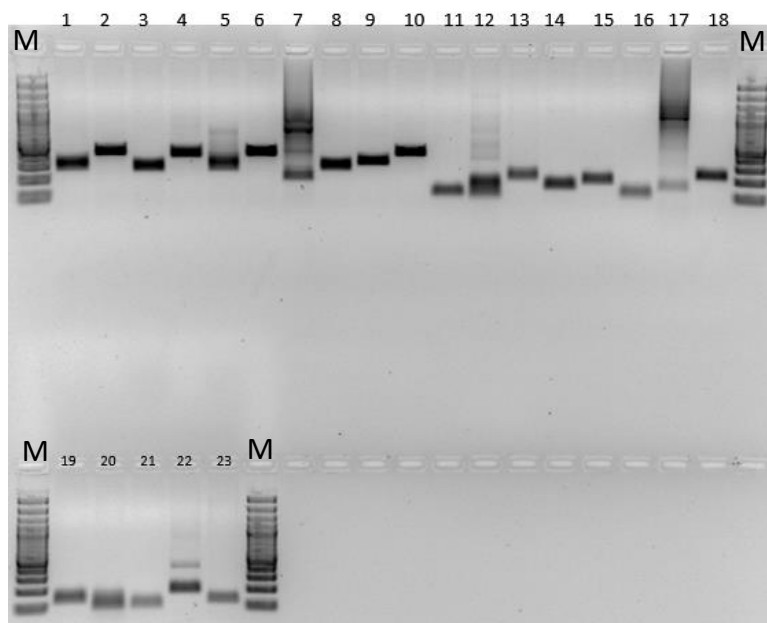


11. ábra: Nyúl genomiális DNS gélképe. Az „M” betű 1 kbp plus molekula tömeg markert jelent.

A gél 1%-os volt.

5.2 Tetranukleotid STR markerek multiplexelése és genotipizálása

Az általunk tervezett 23 marker működőképességét egyenként vizsgáltam meg. Ennek eredménye a 12. ábrán lévő gélképen látható. Vannak olyan esetek, amikor halványan látszanak az amplifikált fragmentek, vagy pedig egy elmosódott (pl.: gélkép 7, 12, 17-es mintái) sáv jelenik meg.



12. ábra: Az általunk tervezett 23 tetranukleotid STR marker gélképe, Az „M” betű 100 bp plus molekula tömeg markert jelent. A gél 1,5%-os volt.

Az eredmények azt mutatták, hogy a 23 mikroszatellitből 16 tetranukleotid STR (1. táblázat) jól működik. Így a genotipizáláshoz használt 16 markert az allélmérteik alapján sikerült egy multiplex reakcióba összerakni, melynek neve az Orycun Tetra Multiplex_I, ennek eredménye az 1. mellékletben látható.

A multiplex reakció optimalizálása során templátként DNS pool-t (több egyed DNS-e azonos koncentrációkban összekeverve) alkalmaztam, amit olyan egyedek DNS-éből válogattam össze, melyeknek a teljes genomszekvenciája a rendelkezésünkre állt. Így ezek segítettek a markerek bioinformatikai szelekciójában. A kiindulási PCR összemérője és programja a 2. táblázatban található.

Primer	Hossz (bp)	Szín	Fluoreszcens jelölés
14_276F	286-340	piros	ATTO565
14_276R			
1_150F	395-423	piros	ATTO565
1_150R			
8_521F	239-271	kék	6-FAM
8_521R			
15_859F	372-400	kék	6-FAM
15_859R			
14_158F	267-327	sárga	ATTO550
14_158R			
9_831F	386-402	sárga	ATTO550
9_831R			
15_416F	257-276	zöld	YAKYE
15_416R			
17_341F	312-336	zöld	YAKYE
17_341R			
1_836F	397-421	zöld	YAKYE
1_836R			
7_319F	98-118	piros	ATTO565
7_319R			
3_946F	141-165	piros	ATTO565
3_946R			
4_730F	175-199	piros	ATTO565
4_730R			
9_376F	133-151	kék	6-FAM
9_376R			
17_753F	177-197	kék	6-FAM
17_753R			
14_467F	89-109	sárga	ATTO550
14_467R			
3_719F	195-218	sárga	ATTO550
3_719R			
14_158F	267-327	sárga	ATTO550
14_158R			
3_946F	141-165	piros	ATTO565
3_946R			
14_276F	286-340	piros	ATTO565
14_276R			

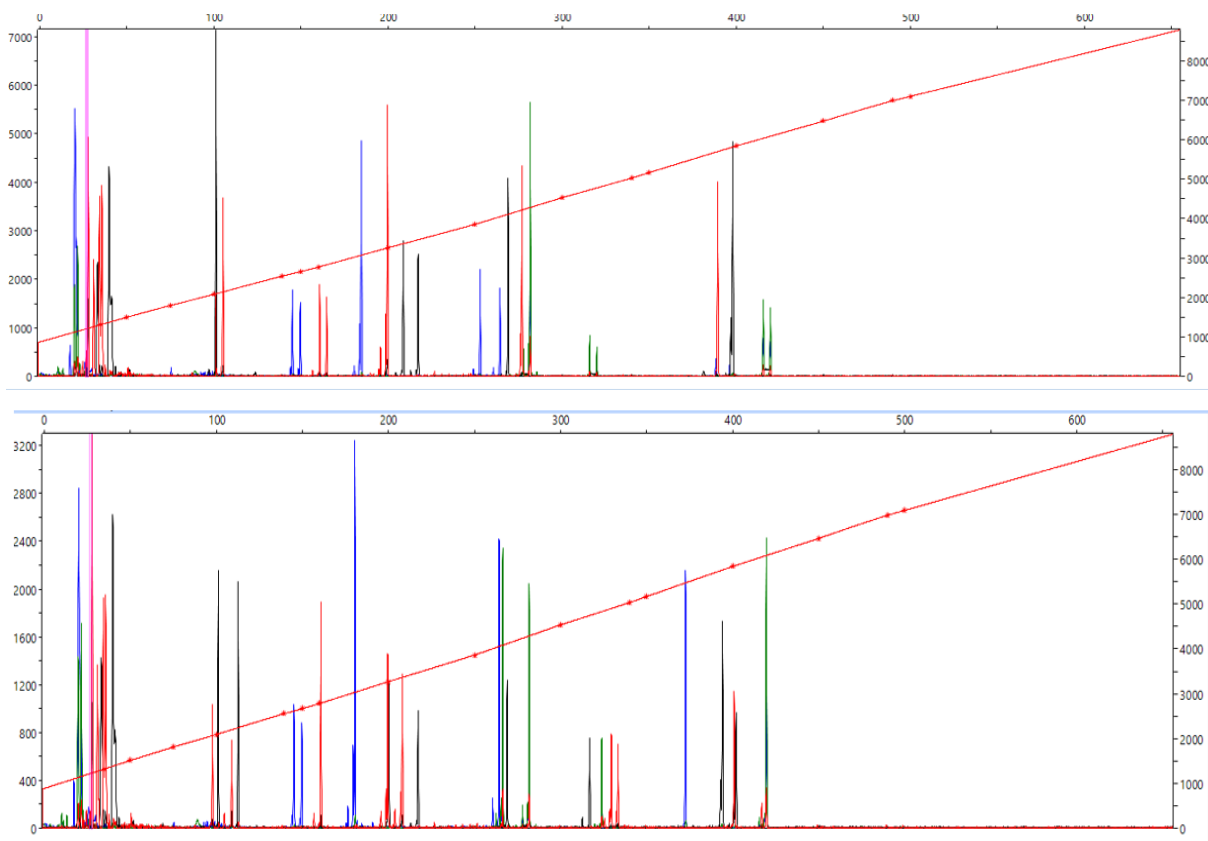
1. Táblázat: Általunk tervezett primerek és a hozzájuk tartozó fluoreszcens jelölések

Nyúl TETRA STR	PA,SV	20201110	X reakcióra (μl)
Reagens	Konc.	1 reakcióra	4
Templát DNS	15 ng/μl	5	
Multiplex PCR Master Mix	2×	25	100
14_467F_ATTO550	10 μM	0,5	2
14_46720045_R	10 μM	0,5	2
7_319F_ATTO565	10 μM	0,25	1
7_31986080_R	10 μM	0,25	1
9_376F_FAM	10 μM	0,25	1
9_37678321_R	10 μM	0,25	1
4_730F_ATTO565	10 μM	0,25	1
4_73019350_R	10 μM	0,25	1
17_753F_FAM	10 μM	0,25	1
17_75376163_R	10 μM	0,25	1
3_719F_ATTO550	10 μM	0,25	1
3_71956084_R	10 μM	0,25	1
8_521F_FAM	10 μM	0,25	1
8_52100925_R	10 μM	0,25	1
15_416F_YAKYE	10 μM	0,25	1
15_4169160_R	10 μM	0,25	1
17_341F_YAKYE	10 μM	0,25	1
17_34100777_R	10 μM	0,25	1
15_859F_FAM	10 μM	0,25	1
15_8595115_R	10 μM	0,25	1
9_831F_ATTO550	10 μM	0,25	1
9_8316247_R	10 μM	0,25	1
1_150F_ATTO565	10 μM	0,25	1
1_150695743_R	10 μM	0,25	1
1_836F_YAKYE	10 μM	0,25	1
1_83632863_R	10 μM	0,25	1
Desztillált víz		13	52
Végtérfogat		50	45-45

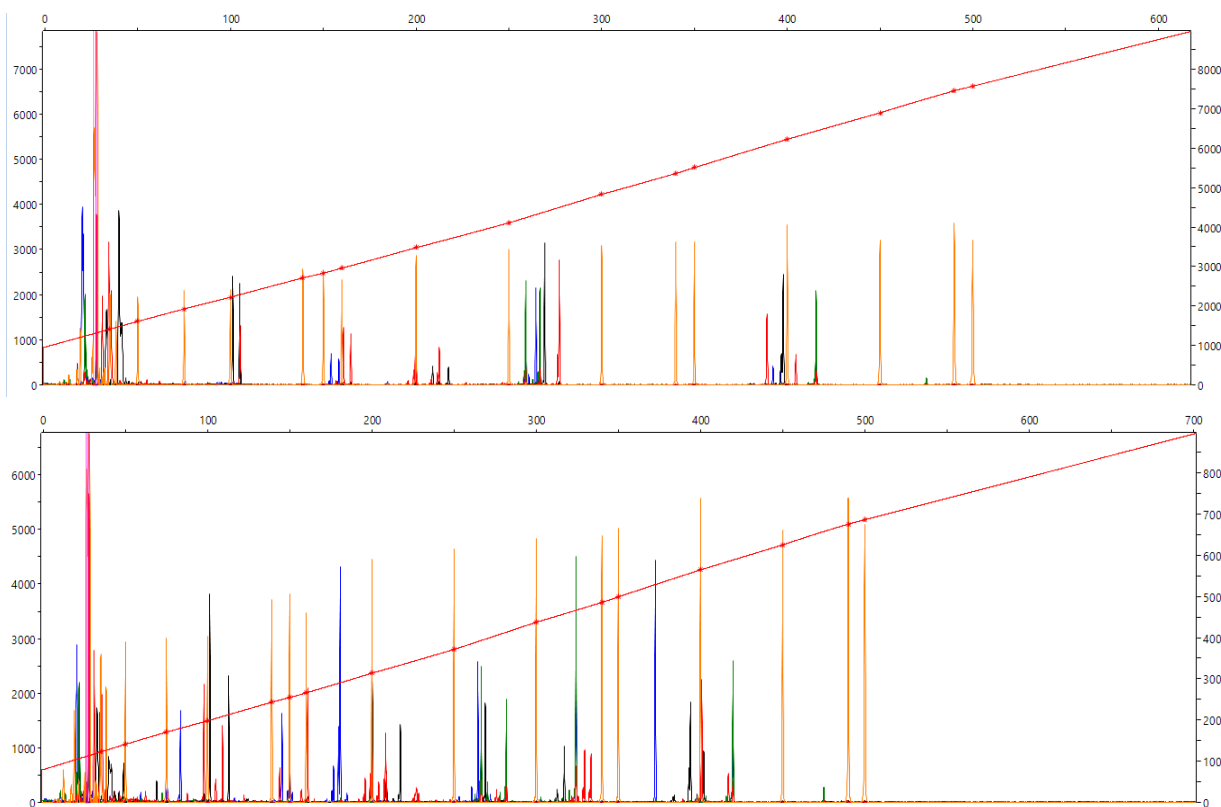
PCR		
95C°	15:00	
94C°	0:30	35x
60C°	0:40	
72C°	0:01:00	
60C°	0:30	

2. Táblázat: Orycun Tetra Multiplex_I kiindulási összemérő táblázata fluoreszcensen jelölt primerekkel, Orycun Tetra Multiplex_I PCR program

Az általunk tervezett fluoreszcensen jelölt tetranukleotid STR markerek fragment analízisének eredménye különböző nyúl mintákban (optimalizálás előtti elektroferogrammmok 13. ábra – optimalizálás utáni eredmények 14. ábra). Továbbiakban a markerek mennyiségét a csúcsok intenzitása alapján állítottuk be.



13. ábra: Kapilláris elektroforézis eredménye üregi nyúlban, illetve C fajtájú nyúlban optimalizálás előtt



14. ábra: Kapilláris elektroforézis eredménye optimalizálás után üregi nyúlban és C fajtájú nyúlban

A kapilláris elektroforézis eredményének köszönhetően sikerült a 16 tetranukleotid STR markert tartalmazó Orycun Tetra Multiplex_I markerszettet (3. Táblázat) optimalizálni az eltérő nyúlfajtákban és azok hibridjeiben.

Nyúl TETRA STR	PA,SV	20210122	X reakcióra (μl)
Reagens	Konc.	1 reakcióra	10
Templát DNS	15 ng/μl	5	
Multiplex PCR Master Mix	2×	25	250
14_467F_ATTO550	10 μM	0,35	3,5
14_46720045_R	10 μM	0,35	3,5
7_319F_ATTO565	10 μM	0,35	3,5
7_31986080_R	10 μM	0,35	3,5
9_376F_FAM	10 μM	0,5	5
9_37678321_R	10 μM	0,5	5
4_730F_ATTO565	10 μM	0,5	5
4_73019350_R	10 μM	0,5	5
17_753F_FAM	10 μM	0,5	5
17_75376163_R	10 μM	0,5	5
3_719F_ATTO550	10 μM	0,5	5
3_71956084_R	10 μM	0,5	5
8_521F_FAM	10 μM	0,35	3,5
8_52100925_R	10 μM	0,35	3,5
15_416F_YAKYE	10 μM	0,35	3,5
15_4169160_R	10 μM	0,35	3,5
17_341F_YAKYE_IDT	10 μM	0,5	5
17_34100777_R	10 μM	0,5	5
15_859F_FAM	10 μM	0,5	5
15_8595115_R	10 μM	0,5	5
9_831F_ATTO550	10 μM	0,25	2,5
9_8316247_R	10 μM	0,25	2,5
1_150F_ATTO565	10 μM	0,45	4,5
1_150695743_R	10 μM	0,45	4,5
1_836F_YAKYE	10 μM	0,5	5
1_83632863_R	10 μM	0,5	5
14_158F_ATTO550	10 μM	0,25	2,5
14_158992270_R	10 μM	0,25	2,5
3_946F_ATTO565	10 μM	0,25	2,5
3_94669804_R	10 μM	0,25	2,5
14_276F_ATTO565	10 μM	0,35	3,5
14_27650661_R	10 μM	0,35	3,5
Desztillált víz		7,1	71
Végtérfogat		50	45-45

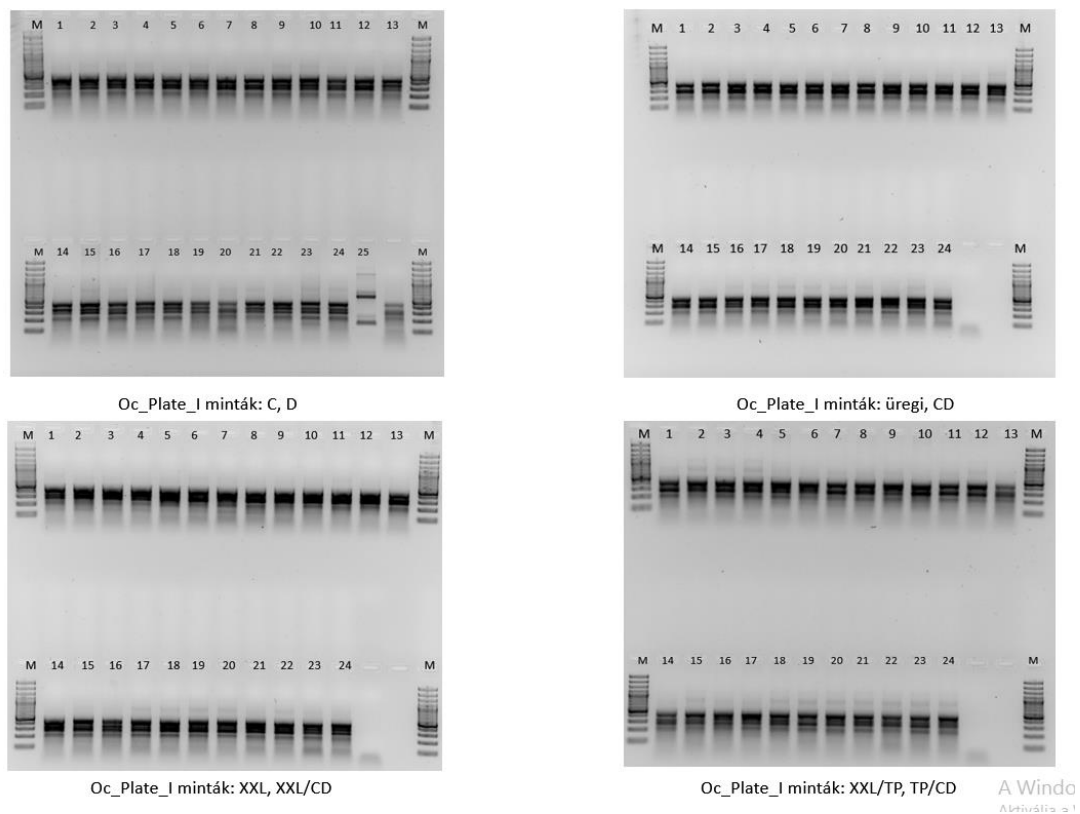
PCR		
95C°	15:00	
94C°	0:30	35x
60C°	0:40	
72C°	0:01:00	
60C°	0:30	

3. Táblázat: Optimalizált Orycun Tetra Multiplex_I PCR összemérője és PCR programja

5.3 Tetranukleotid STR markerek alkalmazása házinyulakban

5.3.1 Referencia mintaszett vizsgálata

A 16 tetranukleotid STR markert tartalmazó Orycun Tetra Multiplex_I szétválasztó erejét a 96 egyedből álló (Plate_I) referencia mintaszetten vizsgáltam meg. A gélképen (15. ábra) láthatóak a sikeresen amplifikált fragmentek az üregi nyúlban, illetve a házinyúl fajtákban és fajtahibridekben.



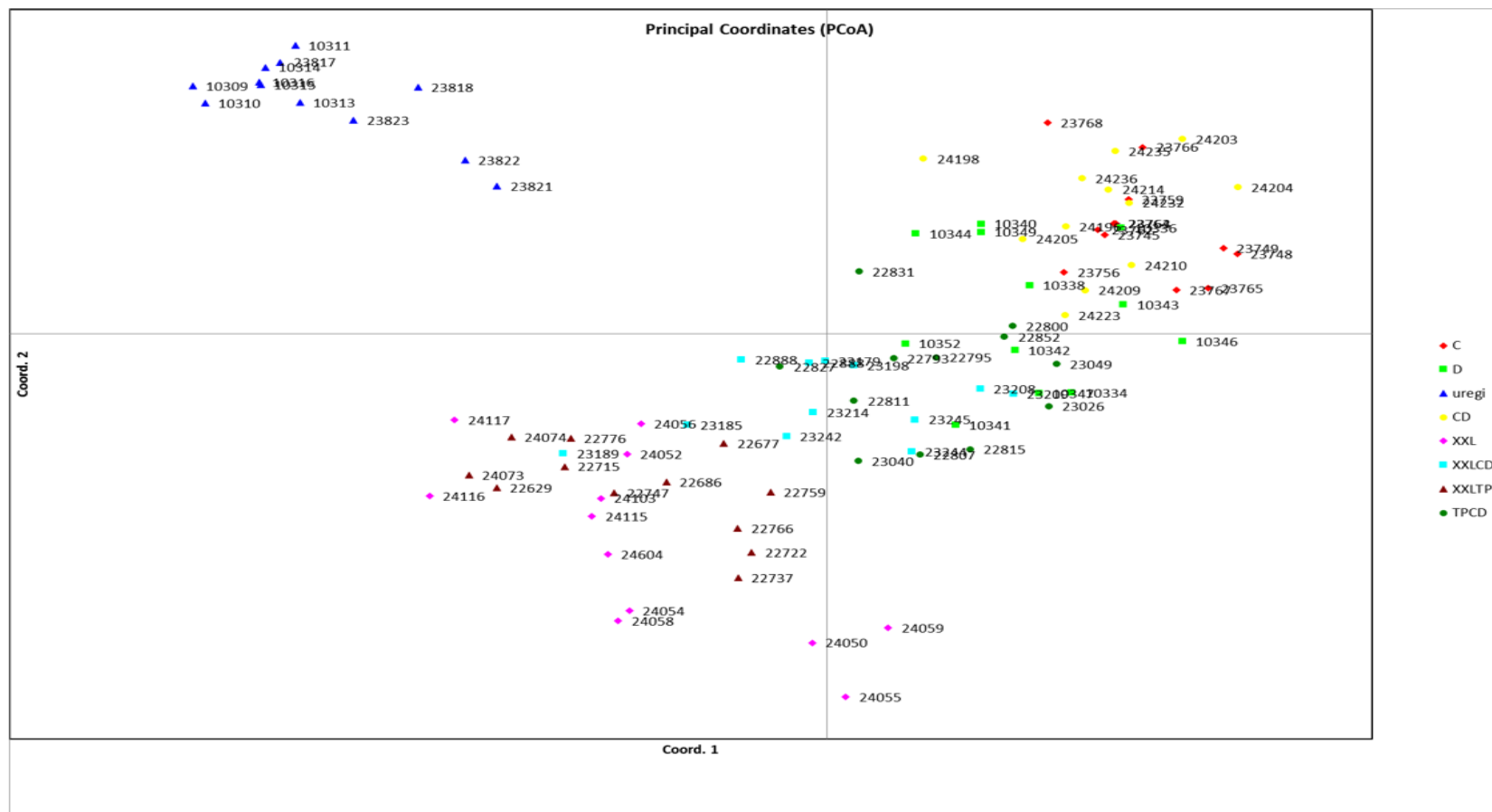
15. ábra: Orycun Tetra Multiplex_I gélképei a 96 darab mintával (Oc_Plate_I). Az „M” betű 100 bp plusz molekula tömeg markert jelent. A gél 1,5%-os volt.

A genetikai diverzitásvizsgálat eredménye (4. Táblázat) alapján genetikailag legtávolabb az üregi nyúlhoz képest a C nyúlfajta van, ennek eredménye 0,788. Legközelebb a C és a D fajták állnak egymáshoz. A nyúl állományunk többvonalas hibridekből áll, így ezek genetikailag közel állnak egymáshoz, aminek eredményét a genetikai diverzitás vizsgálata is alátámasztja.

Mean Population Genetic Distance Matrix for Codominant Genotypic Distance							
üregi	C	D	XXL	CD	XXLCD	XXLTP	TPCD
0,000							üregi
0,788	0,000						C
0,759	0,248	0,000					D
0,723	0,624	0,525	0,000				XXL
0,640	0,106	0,149	0,599	0,000			CD
0,600	0,288	0,189	0,224	0,237	0,000		XXLCD
0,612	0,572	0,426	0,179	0,525	0,174	0,000	XXLTP
0,699	0,222	0,210	0,337	0,197	0,192	0,209	0,000 TPCD
Mean Population Genetic Distance Matrix for Codominant Genotypic Distance							
üregi	C	D	XXL	CD	XXLCD	XXLTP	TPCD
1,000							üregi
0,455	1,000						C
0,468	0,780	1,000					D
0,485	0,536	0,591	1,000				XXL
0,527	0,899	0,862	0,549	1,000			CD
0,549	0,750	0,828	0,800	0,789	1,000		XXLCD
0,542	0,564	0,653	0,836	0,592	0,840	1,000	XXLTP
0,497	0,801	0,810	0,714	0,821	0,826	0,811	1,000 TPCD

4. Táblázat: Genetikai diverzitás vizsgálat eredménye (GenAlex Peakall & Smouse 2012)

A Főkoordináta-analízis (PCoA) eredményét a 16. ábra mutatja, ahol egyből észrevehető az üregi nyulak teljes elkülönülése a házinyúl fajtákhoz és azok hibridjeihez képest. A koordináta rendszerben egymáshoz közel álló egyedek és csoportok genetikailag is közel állnak egymáshoz. Az eredmények azt mutatják, hogy sikerült a fajtákat, illetve azok hibridjeit szétválasztani egymástól, így kimutattuk a fajták közötti kapcsolatot az általunk tervezett tetranukleotid markerszettel.



16. ábra: Főkoordináta analízis PCoA eredménye az általunk vizsgált referencia mintaszettben (GenAlex Peakall & Smouse 2012)

5.3.1.1 Rokonsági kapcsolatok vizsgálata

A rokonsági kapcsolatok vizsgálatát a Colony számítógépes programmal végeztem. Az eredmények szerint (5. táblázat) az üregi nyulak között sikerült édestestvéreket találni, melyeknek az anyjuk és apjuk is a minták között volt, illetve féltestvéri kapcsolatokat is sikerült azonosítani.

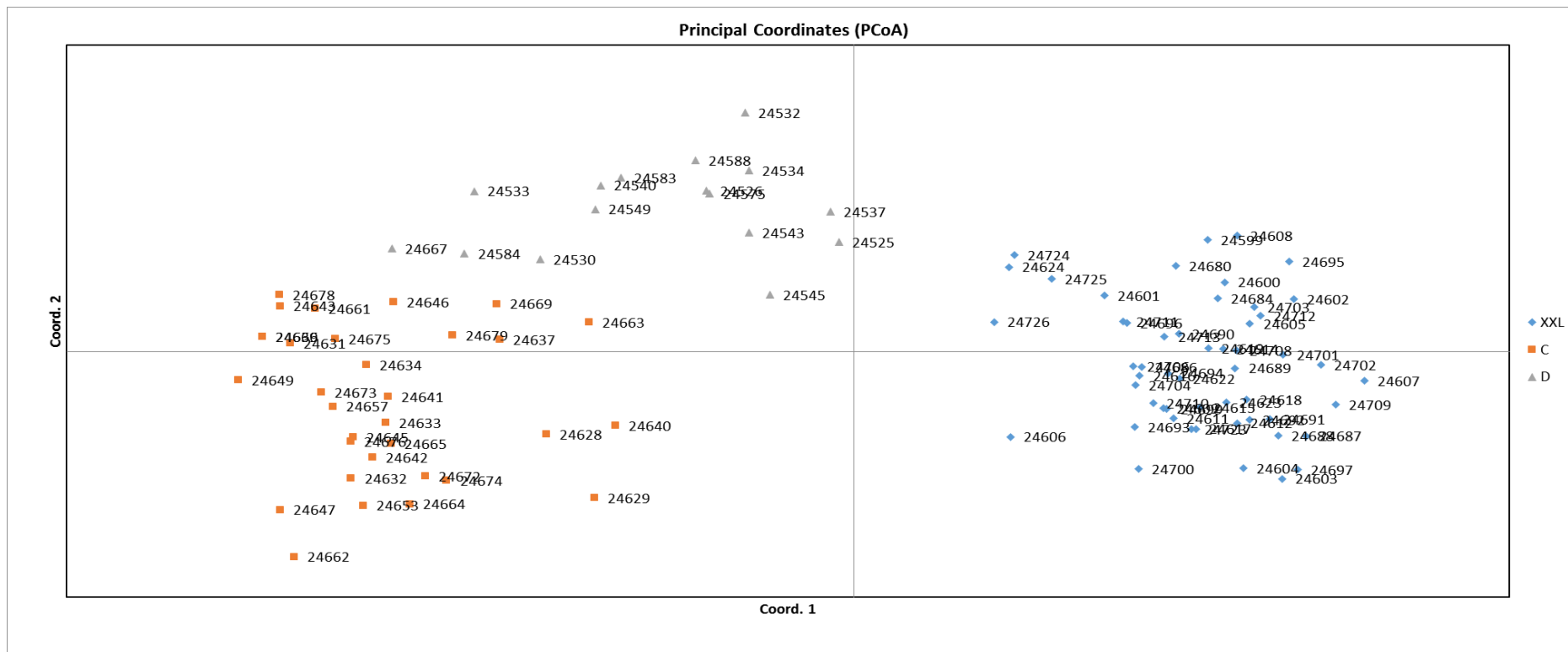
Üregi nyúl rokonsági kapcsolatok															
utód	10309	utód	10311	utód	10314	utód	23817	utód	23818	utód	23821	utód	23822	utód	23823
Apa	10316	Apa	-	Apa	10316	Apa	10316	Apa	10316	Apa	23817	Apa	10316	Apa	10316
Anya	10315	Anya	10315	Anya	-	Anya	10315	Anya	-	Anya	-	Anya	-	Anya	-
testvérek	10309	23817	91%												

5. Táblázat: Üregi nyúl rokonsági kapcsolatok vizsgálata Colony Version 2.0.6.5. programmal
(Wang, 2018)

A Best_FS_Family adataival meg tudjuk nézni szintén százalékos értékekkel, hogy melyek azok az egyedek, amelyek egy családba tartoznak. Ennek köszönhetően visszaigazolást kaptunk a markerek megfelelő működésére, hiszen az XXL/CD egyedek rokoni kapcsolatok alapján állítottuk össze és a program eredménye is azt mutatja, hogy 99%-os valószínűséggel rendelkeznek azok, akik egy családba tartoznak. Tehát az általunk tervezett és optimalizált tetranukleotid STR markerek alkalmasak a rokoni kapcsolatok kimutatására is.

5.3.2 Tetranukleotid markerek alkalmazása a tenyésztésben

Az előzőekben működő 96 darabból álló referencia minták után szeretnénk volna megvizsgálni, a markerszettünk elválasztó képességét a tenyésztésben fontos C, D és XXL fajtájú nőtény nyulakon is. A Főkoordináta analízis (PCoA) eredménye (17. ábra) azt mutatja, hogy sikerült elkülöníteni egymástól a C; D; XXL fajtájú nőtény nyulakat. A genetikai diverzitás eredményét megerősíti a PCoA ábrája, mivel a C és D fajtájú nyulak itt is szemmel láthatóan közelebb vannak egymáshoz, mint az XXL fajtájú nyulak. A genetikai diverzitás eredményéből (6. táblázat) az következik, hogy a legtávolabb egymástól az XXL és C fajtájú nyulak, legközelebb pedig a C és D fajtájúak állnak.



17. ábra: Főkoordináta analízis PCoA eredménye az általunk vizsgált C; D; XXL nőstény nyulakon (GenAlex Peakall & Smouse 2012)

Genetic Distance Matrix for Codominant Genotypic Distance					
	XXL	C	D		
	0,000			XXL	
	0,772	0,000		C	
	0,490	0,260	0,000	D	
Genetic Distance Matrix for Codominant Genotypic Distance					
	XXL	C	D		
	1,000			XXL	
	0,462	1,000		C	
	0,613	0,771	1,000	D	

6. Táblázat: Genetikai diverzitás vizsgálat eredménye (GenAlex Peakall & Smouse 2012)

5.3.2.1 Rokonsági kapcsolatok vizsgálata

Az eredmények (7. táblázat) azt mutatják, hogy nagy százalékos valószínűséggel vannak olyan nőstények, amik egy családba tartoznak, illetve vannak olyanok, amik édestestvérek egymással sok esetben pedig azt tapasztaltam, hogy a vizsgált nőstény állatok féltestvéri kapcsolatban állnak egymással.

Édestestvérek			Egy család		
24711	24712	97%	24711	24712	97%
24608	24599	99%	24608	24599	97%
24647	24631	97%	24617	24689	90%
24678	24661	99%			
24678	24639	91%			
24678	24666	91%			
24661	24666	98%			
24675	24641	94%			
24641	24665	99%			
24525	24526	98%			

Féltestvérek					
24709	24686	89,00%	24623	24689	92%
24709	24618	88%	24691	24700	95%
24711	24724	94%	24691	24694	96%
24686	24602	90%	24643	24663	88%
24686	24618	93%	24642	24633	88%
24713	24706	86%	24642	24639	95%
24710	24612	90%	24642	24666	95%
24724	24712	98%	24642	24631	92%
24684	24619	92%	24678	24633	87%
24708	24618	89%	24669	24632	93%
24708	24691	88%	24633	24632	95%
24708	24687	87%	24663	24641	87%
24616	24601	91%	24657	24632	87%
24608	24701	89%	24664	24649	91%
24605	24694	88%	24641	24649	89%
24609	24688	91%	24632	24540	90%
24609	24618	90%	24543	24584	96%
24609	24687	92%	24575	24534	95%
24599	24694	88%	24532	24534	92%
24604	24688	93%	24532	24537	94%
24624	24695	87%	24525	24534	90%
24624	24691	92%	24534	24537	93%
24622	24694	94%			
24688	24699	98%			

7. Táblázat: Rokonsági vizsgálatok eredményei Colony Version 2.0.6.5. programmal (Wang, 2018)

5.4 A két mintaszett összehasonlítása

A referencia mintaszettet, illetve a tenyésztésben fontos nőtény nyulak adatait is összevettem egymással. A Főkoordináta analízis (PCoA) eredményéből látható (18. ábra), hogy az üregi nyulak ebben az esetben is teljes mértékben elkülönültek a házinyúl fajtáktól, illetve azok hibridjeitől. Az XXL és C fajtájú nyulak között pedig észrevehető az átmenet, illetve az is, hogy a hibridek mely fajtához állnak közelebb. Az ábra alapján legtávolabb egymástól a C és az XXL fajtájú nyulak vannak, míg nagyjából a kettő között helyezkednek el a D fajtájú nyulak.

A 8. táblázatban látható az általam megvizsgált 197 minta lókuszonkénti allélok (N_a) és az effektív allélok (N_e) száma. Az eredmények alapján a legkevesebb allélt (2db) az ürge nyúlban a 9_831; 7_319; 4_730; 14_276 lókuszonkon, a C nyúlfajtában a 8_521, az XXL nyúlfajtában 9_376, a CD-ben a 17_341; 1_836, míg az XXLTP esetében pedig 9_376-os lókuszon találtam. A legtöbb allélt (6db) tartalmazó lókuszok a különböző nyúl fajták esetében: C nyúlfajtában a 15_416-os; a D esetében a 14_158; az XXL-nél 17_753, 8_521, 3_946; az XXLCD-ben a 17_753; az XXLTP-ben pedig a 8_521-es volt. Az átlagos allél szám az üreginél és a CD-nél 3; a C, D, XXLCD, XXLTP, TPCD esetében 4, míg az XXL-nél 5 volt.

A 9. táblázat mutatja, hogy az üregi nyúlban a privát allélok jelenléte magasabb, mint a házinyúl fajtákban és azok hibridjeiben, ezt a beltenyésztettség okozza.

Locus	üregi(n=12)		C(n=44)		D(n=28)		XXL(n=65)		CD hibrid(n=12)		XXLCD hibrid(n=12)		XXLTP hibrid(n=12)		TPCD hibrid(n=12)	
	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne	Na	Ne
9_376 - 1	4	3,84	3	2,26	3	2,10	2	1,51	3	1,88	3	2,88	2	1,80	3	2,57
17_753 - 1	4	2,42	5	2,17	5	4,32	6	3,37	5	2,77	6	4,72	3	2,80	5	3,74
8_521 - 1	3	2,27	2	1,82	4	2,56	6	2,44	3	1,52	5	2,82	6	3,03	5	3,27
15_859 - 1	4	2,40	4	2,55	4	1,96	4	3,17	4	3,03	5	3,39	4	3,43	4	3,16
15_416 - 1	3	2,17	6	3,75	5	2,54	5	3,69	5	3,10	4	3,06	5	4,17	5	3,65
17_341 - 1	4	3,31	3	1,20	3	1,91	3	2,35	2	1,88	4	2,42	3	2,27	4	2,22
1_836 - 1	3	2,17	3	1,73	3	2,10	4	2,92	2	1,99	4	3,27	3	2,74	2	1,99
14_467 - 1	3	2,88	3	2,90	3	2,08	4	1,49	3	2,97	3	2,67	3	2,13	3	2,46
3_719 - 1	3	2,07	3	1,80	3	2,12	4	2,73	3	2,13	3	2,46	4	2,55	3	2,64
14_158 - 1	3	1,95	4	2,63	6	3,30	5	2,09	4	1,96	4	2,55	4	2,42	5	4,17
9_831 - 1	2	1,18	3	2,42	5	1,91	5	3,08	4	3,39	4	3,03	3	2,57	4	1,70
7_319 - 1	2	1,18	3	1,40	4	3,07	5	2,46	3	2,27	3	2,64	4	3,16	5	4,50
3_946 - 1	3	2,80	4	2,53	5	3,82	6	3,38	4	2,53	5	2,77	5	2,97	5	3,13
4_730 - 1	2	1,38	5	2,88	5	3,82	4	2,80	3	1,52	4	2,38	4	3,03	5	3,39
14_276 - 1	2	1,09	4	1,94	5	3,59	5	2,97	4	2,38	4	3,51	5	2,77	4	3,13
1_150 - 1	3	2,13	3	2,07	5	2,51	5	2,78	3	2,57	5	2,85	3	2,18	3	2,13
Overall	3	2,20	4	2,25	4	2,73	5	2,70	3	2,37	4	2,96	4	2,75	4	2,99

8. Táblázat: N=vizsgált minták száma;N_a=talált allélek száma;N_e=effektív allélok száma; Overall=Populációban lévő átlagos allél szám

Summary of Private Alleles by Population			
Pop	Locus	Allele	Freq
C	7_319 - 1	101	0,011
C	1_150 - 1	417	0,023
D	8_521 - 1	264	0,036
D	14_158 - 1	329	0,018
D	9_831 - 1	387	0,018
üregi	9_376 - 1	154	0,250
üregi	9_376 - 1	158	0,208
üregi	15_416 - 1	257	0,167
XXL	8_521 - 1	274	0,008
XXL	9_831 - 1	407	0,008
XXLCD	1_836 - 1	424	0,083

9. Táblázat: Privát allélok összefoglalása populációnként (GenAlex Peakall & Smouse 2012)

A célkitűzéseinknek eleget téve sikerült a genomszekvenálásból származó adatokból bioinformatikai módszerekkel feldolgozni és tervezni olyan markereket, amelyek polimorfak, multiplex környezetben alkalmazhatóak, ezáltal a velük való vizsgálatok költséghatékonyabbá tehetők, így lehetőségünk van vele a populációk genetikai diverzitását vizsgálni. Az Orycun Tetra Multiplex_I-nek köszönhetően lehetőségünk van a különböző fajták és fajtahibridek mikroszatellit marker alapú elkülönítésére, illetve populációgenetikai vizsgálatára, úgymint rokonságvizsgálatra fajtákon belül és genetikai távolság becslésére. Továbbiakban szükség lesz egy ivarhatározó marker beillesztésére a multiplexbe, ami lehetőséget nyújt a fiatal egyedek nemének meghatározására is.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A tenyésztők legfőbb feladata az, hogy minél nagyobb genetikai értékű állományokat hozzanak létre és ezt hosszú távon fent tudják tartani. Abban az esetben, ha az előzőekben említett feltételek nem teljesülnek, akkor beltenyésztettség alakulhat ki, vagyis a nemkívánatos géneket homozigóta formában fixálhatjuk a populációban (Szabó 2004). Az ilyen információkhoz a származás ismeretében, pedigre analízissel vagy genetikai markerek segítségével végzett vizsgálatok során jutunk (Gyovai 2011).

Genetikai vizsgálataink alapján elmondható, hogy a húshibrid vonalak erős beltenyésztettség alatt állnak. Előzőekben már kidolgozására került egy mikroszatellit markerszett, mely mikroszatellitek irodalmi markerekből kerültek kigyűjtésre (Alves et al. 2015, Sternstein et al. 2015), azonban ezeket a mikroszatelliteket három multiplexben sikerült csak összesíteni, valamint dinukleotid ismétlődést mutattak, így kevésbé voltak informatívak és gazdaságilag hasznosak. Ezért úgy döntöttünk, hogy olyan markereket alkalmazunk, melyek tetranukleotid ismétlődést mutatnak, 100-500 bázis pár hosszúság között helyezkednek el, polimorfak és egy multiplexbe összeállíthatóak. A tetranukleotidok így sokkal költséghatékonyabbak, illetve az egyedazonosítás szempontjából is jobbnak bizonyultak, mint a dinukleotidok.

Az általunk kiválogatott és optimalizált 16 tetranukleotid STR segítségével történt a különböző fajtájú minták genotipizálása, ami lehetőséget nyújt többek között tenyésztési vizsgálatokhoz, illetve populációk diverzitásának vizsgálatára is.

Összesen 197 mintát vizsgáltam meg az általunk tervezett és optimalizált 16 mikroszatellitből álló markerszettel. Első körben egy 96 egyedből álló mintaszettel dolgoztam melyben, négy fajtát és azok hibridjeit vizsgáltam meg, majd ezt követően különböző populációgenetikai programmal végzett vizsgálatok alapján azt az eredményt kaptam, hogy sikerült olyan tetranukleotid STR markerszettet létrehozni, ami képes különválasztani az üregi nyulakat a házinyúl fajtáktól és azok hibridjeitől, illetve meg becsültem a genetikai távolságukat és a rokonsági kapcsolatukat is. Ezek alapján végeztem el a tenyésztésben fontos nőtények, az XXL, C és D fajtájú nyulak vizsgálatát is. Az eredmények azt mutatták, hogy a markerek külön választották a különböző csoportokat egymástól, illetve a rokonsági viszonyokat és a genetikai diverzitást megvizsgálva tanácsot adtunk a nyúltelepnek a további tenyésztésekhez, csökkentve a beltenyésztettséget az adott populációkban.

Az eredmények azt bizonyítják, hogy az általunk fejlesztett tetranukleotid STR markerek alkalmasak a vonalakon belüli genetikai távolságok felmérésére. Továbbiakban szükség lesz egy ivarhatározó marker beillesztésére a multiplexbe, ami lehetőséget nyújt a fiatal egyedek nemének meghatározására is.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

- Alves, J. M., Carneiro, M., Afonso, S., Lopes, S., Garreau, H., Boucher, S., ... & Ferrand, N. (2015): Levels and patterns of genetic diversity and population structure in domestic rabbits. *PloS one*, 10(12), e0144687.
- Andersson L, Georges M. (2004): Domestic animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nat Rev Genet.* 5:202–12.
- Balázs, E., & Kutatóintézet, B. S. (2007): Mitokondriális DNS és mikroszatellita polimorfizmusok igazságügyi genetikai aspektusú vizsgálata a magyar népességben (Doctoral dissertation, PhD értekezés, ELTE TTK Biológiai Doktori Iskola).
- Bleyer F. (2002): A nyúlágazat helyzete és fejlesztésének lehetőségei az EU követelményrendszerének való megfelelés figyelembevételével. Kaposvár, 14. Nyúltenyésztési Tudományos Nap Konferencia Kiadványa, 1-5. oldal
- Bleyer, F., & Szendrő, Z. (1999): A nyúltenyésztés helyzete Magyarországon. PATE Kaposvár Állattudományi Kar, Kisállattenyésztési Tanszék, Tanulmány, 6-7.
- Bodnár K., Tóth I., Balázs Á., Badacsonyi A. (2003): A hazai-nyúlhús fogyasztás vizsgálata a fogyasztói szokások tükrében. Kaposvár, XV. Nyúltenyésztési Tudományos Nap Konferencia Kiadvány.
- Buduram, P.; van Wyck, J.B.; Kotze, A. (2005): Genetic characterization of indigenous Southern African Sheep breeds using DNA markers. EAAP-56th Annual Meeting, Uppsala. 96. p.
- Szabó F. (szerk.) (2004): Általános állattenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 460.
- Bogó Z. (2013): Ökológiai szemléletű nyúltenyésztés és bionyúlhús előállítás (Doctoral dissertation).
- Bosze Z, Hiripi L, Carnwath JW, Niemann H. (2003): The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins, *Transgenic Res*, vol. 12 (pg. 541-553)
- Builes, J. J., Castro, J. F., Velilla, C. M., Bastidas, L. A., Afanador, C. H., Manrique, A., ... & Bravo, M. L. J. (2013): A new 15 autosomal STRs multiplex for domestic horse genotyping. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e95-e96.
- BURLANDO B., ARILLO A., SPANO S. & MACHETTI M. (1996): A study of the genetic variability in populations of the European woodcock (*Scolopax rusticola*) by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Ital. J. Zool.* 63(1): 31-36.
- Cai G., Leadbetter C.W., Muehlbauer M.F., Molnar T.J., Hillman B.I. (2013): Genome-wide microsatellite identification in the fungus *Anisogramma anomala* using Illumina sequencing and genome assembly. *PloS ONE* 8(11): e82408.

- Cardia P., Ferrero M. E., Gonçalves D., Dávila J. A. & Ferrand N. (2007): Isolation of polymorphic microsatellite loci from Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*) and their cross-utility in related species. *Mol. Ecol. Notes* 7: 130-132.
- Carneiro, M., Afonso, S., Geraldés, A., Garreau, H., Bolet, G., S. Boucher, S., Tircazes, A., Queney, G., Nachman, M. W., Ferrand, N. (2011): The genetic structure of domestic rabbits. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 1801–1816 (2011). doi:10.1093/molbev/msr003 pmid:21216839.
- Carneiro, M., Rubin, C. J., Di Palma, F., Albert F. W., Alföldi, J., Martínez Barrio, A., Pielberg, G., Rafati, N., Sayyab, S., Turner-Maier, J., Younis, S., Afonso, S., Aken, B., Alves, J. M., Barrell, D., Bolet, G., Boucher, S., Burbano, H. A., Campos, R., Chang, J. L., Duranthon, V., Fontanesi, L., Garreau, H., Heiman, D., Johnson, J., Mage, R. G., Peng, Z., Queney, G., Rogel-Gaillard, C., Ruffier, M., Searle, S., Villafuerte, R., Xiong, A., Young, S., Forsberg-Nilsson, K., Good, J. M., Landier, E. S., Ferrand, N., Lindblad-Toh, K., Andersson L. (2014): Rabbit genome analysis reveals a polygenic basis for phenotypic change during domestication. *Science*. 345(6200):1074-1079. doi: 10.1126/science.1253714.
- Castle, E., Eisenberger, N. I., Seeman, T. E., Moons, W. G., Boggero, I. A., Grinblatt, M. S., & Taylor, S. E. (2012): Neural and behavioral bases of age differences in perceptions of trust. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), 20848-20852.
- Castoe T.A., Poole A.W., de Koning A.P.J., Jones K.L., Tomback D.F., OylerMcCance S.J., Fike J.A., Lance S.L., Streicher J.W., Smith E.N., Pollock D.D. (2012): Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS ONE* 7(2): e30953.
- Chantry-Darmon, C., Urien, C., De Rochambeau, H., Allain, D., Pena, B., Hayes, H., ... & Rogel-Gaillard, C. (2006): A first-generation microsatellite-based integrated genetic and cytogenetic map for the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and localization of angora and albino. *Animal genetics*, 37(4), 335-341.
- Cherel, P., Glénisson, J., & Pires, J. (2011): Tetranucleotide microsatellites contribute to a highly discriminating parentage test panel in pig. *Animal genetics*, 42(6), 659-661.
- Clutton-Brock, J. A. (1999): *Natural History of Domesticated Mammals* (Cambridge Univ. Press, Cambridge).
- Cullere, M., & Dalle Zotte, A. (2018): Rabbit meat production and consumption: State of knowledge and future perspectives. *Meat science*, 143, 137-146.
- Craighead, L., Paetkau, D., Reynolds, H. V., Vyse, E. R., & Strobeck, C. (1995): Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Arctic grizzly bears. *Journal of Heredity*, 86(4), 255-261.
- Csilléry K., Johnson T., Beraldi D., Clutton-Brock T., Coltman D., Hansson B., Spong G. & Pemberton J. M. (2006): Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics* 173: 2091-2101.
- Dallas, J. F. (1992): Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, 3(8), 452-456.

- DeWoody, J. A., & Avise, J. C. (2000): Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of fish biology*, 56(3), 461-473.
- Dovich, N. J., & Zhang, J. (2000): How capillary electrophoresis sequenced the human genome. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(24), 4463-4468.
- dr. Bakonyi Gábor, dr. Juhász Lajos, dr. Kiss István, dr. Palotás Gábor (1995): *Állattan, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 699p.*
- 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: 746-756
- Edwards, A. L., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, C. T., & Chakraborty, R. (1992): Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12(2), 241-253.
- Emam A., Azoz A., Mehaisen G., Ferrand N., Ahmed N. (2017): Diversity assessment among native Middle Egypt rabbit populations in North Upper-Egypt province by microsatellite polymorphism. *World Rabbit Sci.*, 25: 9-16
- Fan JL, Watanabe T., (2003): Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models, *Pharmacol Therapeut*, vol. 99 (pg. 261-282)
- Fernandez-Silva I., Whitney J., Wainwright B., Andrews K.R., Ylitalo-Ward H., Bowen B.W., Toonen R.J., Goetze E., Karl S.S (2013): Microsatellites for next-generation ecologists: A post-sequencing bioinformatics pipeline. *PLoS ONE* 8(2): e55990.
- Fox R.R. (1994): Taxonomy and genetics. In: *The Biology of the Laboratory Rabbits*, 2nd edn (Ed. by P.J. Manning, D.H. Ringler & C.E. Newcomer), pp. 1–25. Academic Press, San Diego, CA.
- Francisco, L. V., Langsten, A. A., Mellersh, C. S., Neal, C. L., & Ostrander, E. A. (1996): A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, 7(5), 359-362.
- Goldstein D., Schlötterer C. (1999): *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford Univ. Press Oxford
- Gyovai Petra (2011): A CT vizsgálat alapján végzett szelekció genetikai elemzése házinyulakban. *Doktori értekezés, Kaposvári Egyetem Állatudományi kar.* 149p
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
- Harangi Sándor (2005): *Nyúltenyésztés. Debreceni Egyetem, Mezőgazdaságtudományi Kar, Állattenyésztési és Takarmányozástani Tanszék*, 185p.
- Hidas, A. (2002): DNS markerek vizsgálata a baromfi állományok génmegőrzésében. *Génmegőrzés, Kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről*, 207-214.
- Holdas Sándor (1985): *Nyúltenyésztők kézikönyve*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó, 425. oldal

- Holdas Sándor (2000): Nyúltenyésztés–Fajták és fenntartásuk. Budapest, Gazda Kiadó, 288p.
- Holdas Sándor (2012): Húsnyúl-termelés kisüzemtől-nagyüzemig. Budapest, Agroiinform Kiadó, 178p.
- Honnen A.-C., Hailer F., Kenntner N., Literák I., Dubská L. & Zachos F. E. (2010): Mitochondrial DNA and nuclear microsatellites reveal high diversity and genetic structure in an avian top predator, the white-tailed eagle, in central Europe. *Biol. J. Linn. Soc.* 99: 727-737.
- Houdebine LM, Jolivet G, Ripoli PJ. Houdebine LM, Fan J (2009): Transgenic rabbits to prepare pharmaceutical proteins, *Rabbit Biotechnology: rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*, New YorkSpringer (pg. 65-75)
- Jacob, H. J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Y. P., ... & Lander, E. S. (1991): Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*,67(1), 213-224.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985): Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature*,314(6006), 67-73.
- Juráskó R. (2017): A magyar nyúltenyésztés helyzete 2016-ban. In *proc.*: 29. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvári Egyetem, Kaposvár, 2017. május 31., 3-11
- Kalia K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. (2011): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.
- Kimberly A. & Tonnen R. J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9: 615-629.
- Kiss E. 2005. Növényi biotechnológia és molekuláris növénynevelés. XI-XII. fejezetek. In: Heszy L., Fésüs L., Hornok L. (szerk.) (2005): *Mezőgazdasági biotechnológia*. Agroiinform Kiadó, Budapest. pp. 194-225
- Korstanje R., Gillissen G.F., den Bieman M.G., Versteeg S.A., van Oost B., Fox R.R., van Lith H.A. & van Zutphen L.F. (2001): Mapping of rabbit chromosome 1 markers generated from a microsatellite-enriched chromosome-specific library. *Animal Genetics* 32, 308–12.
- Lai, F. Y., Ding, S. T., Tu, P. A., Chen, R. S., Lin, D. Y., Lin, E. C., & Wang, P. H. (2018): Population structure and phylogenetic analysis of laboratory rabbits in Taiwan based on microsatellite markers. *World Rabbit Science*,26(1), 57-70.
- Lebas F, Coudert P, Rouvier R, Rochambeau H. (1997): The rabbit: husbandry, health and production, RomeFAO Animal Production and Health Series No 21, FAO Publications
- Lebas, F., Coudert, P., Rouvier, R., & De Rochambeau, H. (1986): The rabbit. Husbandry, health and production. FAO Animal Production and Health Series, (21).
- Lindsey J, Fox R. Manning P, Ringler D, Newcomer C. (1994): The biology of the laboratory rabbit, Inherited disease and variations, San Diego (CA) Academic Press (pg. 293-319)

- 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.
- Lugasi A. (2007): A nyúlhús szerepe az egészséges táplálkozásban. *A hús*, 3.157-164.o.
- Maignel, L., Boichard, D., Verrier, E. (1996): Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. *Interbull Bull.* 14: 49–54.
- Mardis, E. R. (2008): Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
- Mardis, Elaine R. (2011): A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470.7333 198-203.
- Mihály Zs., Györfy B. (2011): Következő generációs szekvenálási technológiák kifejlődése és alkalmazásai.
- Mugel, D. N. (1997): Geohydrology of the Weldon Spring Ordnance Works, St. Charles County, Missouri (Vol. 96, No. 4171). US Department of the Interior, US Geological Survey.
- O'Connell M.M., Dillon C., Wright J.M. (1998): Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring. *Mol. Ecol.*, 7: 357-363
- O'Reilly P., Wright J.M. (1995): The evolving technology fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.*, 47: 29-55.
- Olsen J.B., Bentzen P., Seeb J.E. (1998): Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon. *Mol. Ecol.*, 7: 1083-1090.
- Peakall R. & Smouse P. E. (2012): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- Pellegrino I., Cucco M., Follestad A. & Boos M. (2015): Lack of genetic structure in greylag goose (*Anser anser*) populations along the European Atlantic flyway. *PeerJ* 3: e1161.
- Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. J. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- ROBERT F. W. & PHILIPP W. H. (1997): Genetics – Third edition, The McGraw-Hill Companies
- Rogel-Gaillard C, Ferrand N, Hayes H, Cockett NE, Kole C. Rabbit, (2009): Genome mapping and genomics in domestic animals, Heidelberg Springer (pg. 165-230)
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using

- and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*,9(5), 615-629.
- Senthil, R., Prabakar, K., Rajendran, L., & Karthikeyan, G. (2011): Efficacy of different biological control agents against major postharvest pathogens of grapes under room temperature storage conditions. *Phytopathologia Mediterranea*,50(1), 55-65.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012): Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*,21(8), 1794-1805.
- Sternstein, I., Reissmann, M., Maj, D., Bieniek, J., & Brockmann, G. A. (2015): A comprehensive linkage map and QTL map for carcass traits in a cross between Giant Grey and New Zealand White rabbits. *BMC genetics*,16(1), 1-12.
- Szabolcsi Z., Egyed B., Zenke P., Pádár Zs., Borsy A., Stéger V., Pásztor E., Csányi S., Buzás Zs., Orosz L. (2014): Constructing STR multiplexes for individual identification of Hungarian red deer. *Journal of Forensic Sciences* 59(4): 1090-1099.
- SZENDRŐ K. – SZENDRŐ ZS. (2010): Kínában jártunk. *Baromfi ágazat*, 10 (2) 75-80. pp.
- Szendrő Katalin. – Szendrő Zsolt. (2012): Trade balance of Hungarian rabbit meat. In *Proc. 10th World Rabbit Congress*, Egypt, Sharm El-Sheikh, 749-753. pp.
- Szendrő Zs. (1998): A világ nyúltenyésztése. *A Baromfi*, 1. 1. 76-78.o.
- Szendrő Zsolt, Matics Zsolt, Gerencsér Zsolt, Radnai István (2010): Nyúltenyésztés. Kaposvári Egyetem.
- Szendrő, K. (2014): Effect of genotype and management systems on performance, economics and societal perceptions in rabbit meat production. PhD Dissertation, Kaposvár University, Kaposvár 1-186.
- Szendrő, K. (2015): A világ és Magyarország nyúlhústermelése és külkereskedelme. *GAZDÁLKODÁS: Scientific Journal on Agricultural Economics*,59(80-2016-1005), 114-126.
- Tanai A. (2007): Nyúlhús n-3 zsírsav tartalmának növelése takarmányozás útján. Diplomamunka, Mosonmagyaróvár.
- Tautz, D., & Renz, M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*,12(10), 4127-4138.
- Toro M.A., Fernández J., Caballero A. (2009): Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Liv. Sci.*, 120: 174-195.
- Valdes A.M., Slatkin M., Freimer N.B. (1993): Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133: 737-749.
- Virág Gy. (1996): A nyúlhústermelés jelenlegi helyzete. *Kistermelők lapja*, 0238-9533. 40/11. 20.o.
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009): Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*,55(4), 641-658.

- Wang, J. (2018): User's guide for software COLONY Version 2.0. 6.5. London: Zoological Society of London.
- Weaver R. F., Hedrick P. W. (2000): Genetika. Panem. 384-387.
- 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.
- Weisbroth SH. Weisbroth SH, Flatt RE, Krauss AL. (1974): Neoplastic diseases, Biology of the laboratory rabbit, New York Academic Press (pg. 332-369)
- Wooliams, J. A., Pong-Wong, R., Villaneueva, B. (2002): Strategic optimisation of short and long term gain and inbreeding in MAS and non-MAS schemes. Proc. 7th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Montpellier, France, CD-ROM, Commun. No. 23. 02
- Wunderlich, L. (2014): Molekuláris biológiai technikák. Typotex kiadó, Budapest. 193p.
- Yao B., Zhao Y., Zhang H., Zhang M., Liu M., Liu H., Li J. (2012): Sequencing and de novo analysis of the Chinese Sika deer antler-tip transcriptome during the ossification stage using Illumina RNA-Seq technology. *Biotechnology Letters* 34: 813-822.
- YU T., HU C., CHANG Q., YANG R., DONG W. & XIE W. (2016): The complete mitochondrial genome of *Scolopax rusticola* (Charadriiformes: Scolopacidae). *Mitochond. DNA Part A* 27(3): 1800-1801.
- Zoltán, S. (2013): Gímszarvasok egyedazonosítása és populációgenetikai vizsgálata autoszómás tetranukleotid mikroszatellita markerekkel.
- Zsolnai A., Lehoczky I., Gyurmán A., Nagy J., Sugár L., Anton I., Horn P., Magyary I. (2009): Development of eight-plex microsatellite PCR for parentage control in deer. *Archiv Tierzucht* 52(2): 143-149.
- Zsolnai, A., Lehoczky, I., Gyurman, A., Nagy, J., Sugar, L., Anton, I., ... & Magyary, I. (2009): Development of eight-plex microsatellite PCR for parentage control in deer. *Archives Animal Breeding*, 52(2), 143-149.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. J. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Internetes források
- http1: <https://nyuszinfo.webnode.hu/mi-a-kulonbseg-nyul-es-nyul-kozott/> (Utolsó elérés: 2021.10.26.)
- http2: <https://www.nak.hu/kiadvanyok/kiadvanyok/3861-tanulmanyok-a-ketreces-allattartasrol-iv/file> (Utolsó elérés: 2021.10.26.)
- http3: <http://www.ifarm.hu/hycole/hun/> (Utolsó elérés: 2021.10.26.)
- http4: <https://software.broadinstitute.org/software/igv/home> (Utolsó elérés: 2021.10.26.)
- http5: <https://en.farmforage.com/7011-hyplus-rabbit-how-to-care-and-how-to-feed-at-home.html> (Utolsó elérés: 2021.10.26.)

http6: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/capillary-electrophoresis-information/what-is-fragment-analysis.html>(Utolsó
elérés:2021.10.26.)

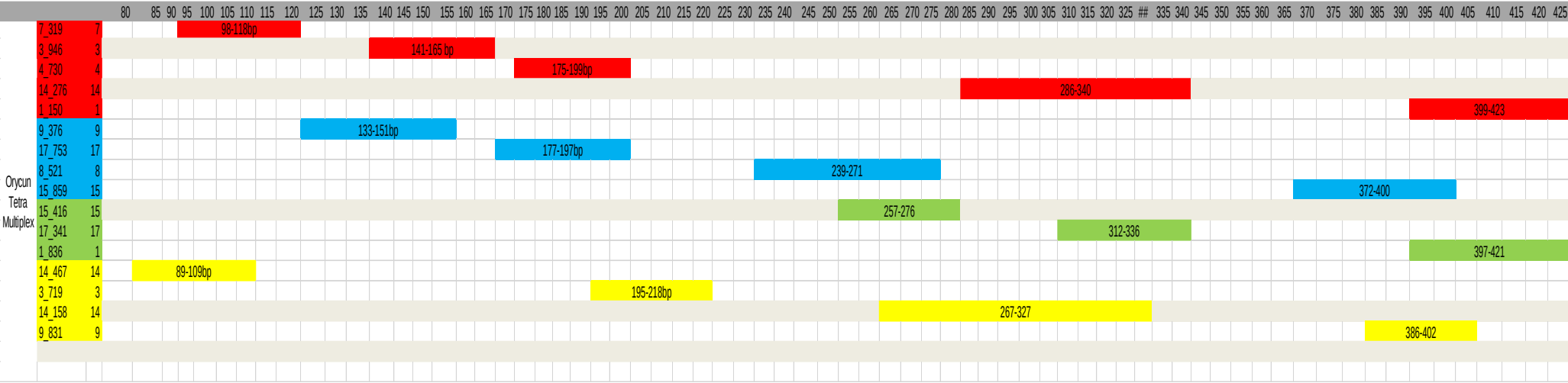
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Varga László Andrásnak, a Genetika és Biotechnológiai Intézet igazgató helyettesének és Dr. Stéger Vikornak, a Genetika és Biotechnológia Intézet tanszékvezetőjének a laboratóriumi munkában nyújtott sok segítségért és türelemért, valamint a dolgozat javításában való segítségért, irányításért.

Hálás köszönet továbbá Ninausz Nórának és Fehér Péter Árpádnak az Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola doktorandusz hallgatóinak az elméleti és gyakorlati tanácsokért, útmutatásokért és támogatásáért.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani az S&K-LAP Nyúltenyésztő Kft. –nek, illetve Dr. Német Zoltán Lászlónak és Mohaupt Mónikának a mintákért, amik alapjául szolgáltak a diplomadolgozatomban elvégzett kísérleteknek. Munkám anyagi fedezetét a 2017-1.3.1-VKE-2017-00026 pályázat biztosította.

IX. MELLÉKLETEK



1. Melléklet: A működő 16 tetranucleotid STR marker allélméretei és fluoreszcens jelöléseik

	ng/ul	Bioban k	Tetovál ás	Fajta	Var	Minta
1	224,81	23745	P313158	C	M	vér
2	349,1	23748	P313101	C	M	vér
3	306,64	23749	P313082	C	M	vér
4	336,86	23756	P313230	C	M	vér
5	314,95	23759	P313079	C	M	vér
6	316	23762	P313005	C	M	vér
7	325,81	23763	P313012	C	M	vér
8	344,03	23764	P313042	C	M	vér
9	235,8	23765	P313050	C	M	vér
10	340,49	23766	P313085	C	M	vér
11	418,92	23767	P313096	C	M	vér
12	350,63	23768	P313103	C	M	vér
1	545,24	10334		D	M	tetem
2	569,48	10336		D	F	tetem
3	602,09	10338		D	M	tetem
4	264,96	10340		D	M	tetem
5	491,01	10341		D	M	tetem
6	168,33	10342		D	F	tetem
7	111,15	10343		D	F	tetem
8	227,52	10344		D	F	tetem
9	507,2	10346		D	F	tetem
10	544,68	10347		D	F	tetem
11	477,66	10349		D	M	tetem
12	305,31	10352		D	M	tetem
1	198	10309		üregi nyúl	F	fülcshipke
2	60,93	10310		üregi nyúl	F	vér
3	175,92	10311		üregi nyúl	F	vér, szőr
4	140,86	10313		üregi nyúl	M	vér, fülcship
5	69,76	10314		üregi nyúl	F	vér, fülcship
6	129,78	10315		üregi nyúl	F	vér, fülcship
7	158,57	10316		üregi nyúl	M	fülcshipke
8	128,83	23817		üregi nyúl	M	fül
9	151,39	23818		üregi nyúl	M	fül
10	100,98	23821		üregi nyúl	F	fül
11	115,03	23822		üregi nyúl	M	fül
12	141,79	23823		üregi nyúl	M	fül
1		24196	6047001	CD	F	vér
2		24198	6047068	CD	F	vér
3		24203	6047079	CD	F	vér
4		24204	6047297	CD	F	vér
5		24205	6046176	CD	F	vér
6		24209	6047735	CD	F	vér
7		24210	6047374	CD	F	vér
8		24214	6047858	CD	F	vér
9		24223	6047286	CD	F	vér
10		24232	6047260	CD	F	vér
11		24235	6047857	CD	F	vér
12		24236	6047674	CD	F	vér
1	179,24	24050	0016016	XXL	F	vér
2	211,67	24052	0016004	XXL	F	vér
3	254,85	24054	0016028	XXL	F	vér
4	165,02	24055	0016013	XXL	F	vér
5	235,16	24056	0016006	XXL	F	vér
6	201,75	24058	0016018	XXL	F	vér
7	204,82	24059	0016001	XXL	F	vér
8	253,96	24064	0016121	XXL	F	vér
9	461,71	24103	0016041	XXL	F	vér
10	286,16	24115	0016047	XXL	F	vér
11	239,14	24116	0016031	XXL	F	vér
12	287,36	24117	0016102	XXL	F	vér
1	192,15	23179	8349258	XXLCD	M	fül
2	170,5	23185	8349389	XXLCD	F	fül
3	172,6	23189	8349298	XXLCD	M	fül
4	164,55	23198	8349270	XXLCD	F	fül
5	303,77	23208	8329142	XXLCD	M	fül
6	228,11	23209	8329188	XXLCD	M	fül
7	121,38	23214	8329057	XXLCD	M	fül
8	95,52	23242	8329049	XXLCD	F	fül
9	243,47	23244	8329058	XXLCD	F	fül
10	87,6	23245	8329186	XXLCD	F	fül
11	173,66	22888	8509453	XXLCD	F	fül
12	198,28	22894	8509495	XXLCD	M	fül
1	325,25	22629	8466052	XXL/TP	M	vér
2	198,79	22677	9036163	XXL/TP	F	vér
3	177,94	22686	8466074	XXL/TP	F	vér
4	285,32	22715	8466063	XXL/TP	F	vér
5	198,23	22722	8466069	XXL/TP	F	vér
6	160,21	22737	9036073	XXL/TP	F	vér
7	103,88	22747	9036151	XXL/TP	F	vér
8	238	22759	9036134	XXL/TP	F	vér
9	104,07	22766	9036106	XXL/TP	F	vér
10	286,65	22776	9036194	XXL/TP	F	vér
11	265,01	24073	0016220	XXL/TP	F	vér
12	269,76	24074	0016075	XXL/TP	F	vér
1	81,44	22793	8509171	TPCD	M	fül
2	90,23	22795	8509177	TPCD	M	fül
3	177,46	22800	8509336	TPCD	M	fül
4	186,6	22807	8449424	TPCD	M	fül
5	232,57	22815	8449423	TPCD	F	fül
6	258,65	22811	8449193	TPCD	F	fül
7	158,84	22827	8449190	TPCD	F	fül
8	258,98	22852	8529129	TPCD	F	fül
9	93,51	23026	8289847	TPCD	M	fül
10	168,47	23040	8289765	TPCD	M	fül
11	99,32	23049	8289842	TPCD	M	fül
12	201,65	22831	8449289	TPCD	F	fül

2. Melléklet: Referencia szetthez használt minták adatait tartalmazó táblázat

	ng/ul	Bioban k	Tetová- ás	Fajfajta	Var	Minta	Minta helye
1	199,92	24709	R466233	XXL	F	Vér	258"/D"
2	190,66	24711	R466237	XXL	F	Vér	258"/D"
3	217,96	24686	R466209	XXL	F	Vér	258"/D"
4	182,35	24725	R466220	XXL	F	Vér	258"/D"
5	173,12	24713	R466241	XXL	F	Vér	258"/D"
6	231,89	24723	R466210	XXL	F	Vér	258"/D"
7	144,11	24710	R466234	XXL	F	Vér	258"/D"
8	161,13	24724	R466211	XXL	F	Vér	258"/D"
9	179,61	24684	R466207	XXL	F	Vér	258"/D"
10	142,05	24680	R466201	XXL	F	Vér	258"/D"
11	243,09	24708	R466232	XXL	F	Vér	258"/D"
12	146,3	24726	R466221	XXL	F	Vér	258"/D"
13	133,13	24712	R466240	XXL	F	Vér	258"/D"
14	142,52	24616	R096332	XXL	F	Vér	258"/D"
15	70,07	24619	R096275	XXL	F	Vér	258"/D"
16	250,44	24615	R096085	XXL	F	Vér	258"/D"
17	265,3	24608	R096343	XXL	F	Vér	258"/D"
18	172,27	24605	R096534	XXL	F	Vér	258"/D"
19	224,63	24609	R176112	XXL	F	Vér	258"/D"
20	135,05	24599	R096345	XXL	F	Vér	258"/D"
21	245,94	24611	R176101	XXL	F	Vér	258"/D"
22	217,22	24612	R176439	XXL	F	Vér	258"/D"
23	197,98	24614	R176155	XXL	F	Vér	258"/D"
24	132,84	24604	R096248	XXL	F	Vér	258"/D"
25	175,56	24701	R446096	XXL	F	Vér	258"/D"
26	73,66	24602	R096125	XXL	F	Vér	258"/D"
27	182,94	24624	R096118	XXL	F	Vér	258"/D"
28	230,53	24704	R446103	XXL	F	Vér	258"/D"
29	174,27	24706	R446121	XXL	F	Vér	258"/D"
30	198,61	24693	R446322	XXL	F	Vér	258"/D"
31	129,06	24622	R096039	XXL	F	Vér	258"/D"
32	124,43	24688	R446356	XXL	F	Vér	258"/D"
33	190,01	24696	R446245	XXL	F	Vér	258"/D"
34	131,39	24699	R446330	XXL	F	Vér	258"/D"
35	116,85	24606	R096233	XXL	F	Vér	258"/D"
36	235,25	24600	R096098	XXL	F	Vér	258"/D"
37	281,47	24603	R096153	XXL	F	Vér	258"/D"
38	180,13	24702	R446097	XXL	F	Vér	258"/D"
39	212,85	24617	R096569	XXL	F	Vér	258"/D"
40	118,28	24623	R096378	XXL	F	Vér	258"/D"
41	240,07	24618	R176341	XXL	F	Vér	258"/D"
42	140,12	24695	R446228	XXL	F	Vér	258"/D"
43	83,87	24691	R446251	XXL	F	Vér	258"/D"
44	156,41	24697	R446240	XXL	F	Vér	258"/D"
45	195,58	24700	R446328	XXL	F	Vér	258"/D"
46	167,69	24690	R446351	XXL	F	Vér	258"/D"
47	186,34	24601	R096284	XXL	F	Vér	258"/D"
48	157,62	24694	R446204	XXL	F	Vér	258"/D"
49	171,88	24607	R096482	XXL	F	Vér	258"/D"
50	179,5	24689	R446213	XXL	F	Vér	258"/D"
51	196,78	24692	R446359	XXL	F	Vér	258"/D"
52	217,76	24703	R446192	XXL	F	Vér	258"/D"
53	160,45	24687	R446353	XXL	F	Vér	258"/D"
54	101,15	24643	R153092	C	F	Vér	258"/D"
55	98,8	24628	R093114	C	F	Vér	258"/D"
56	137,93	24647	R093116	C	F	Vér	258"/D"
57	135,26	24634	R093066	C	F	Vér	258"/D"
58	256,69	24679	R093822	C	F	Vér	258"/D"
59	167,2	24642	R153097	C	F	Vér	258"/D"
60	71,19	24646	R093089	C	F	Vér	258"/D"
61	139,21	24678	R093766	C	F	Vér	258"/D"
62	171,88	24629	R093035	C	F	Vér	258"/D"
63	108,49	24661	R093024	C	F	Vér	258"/D"
64	64,36	24645	R093230	C	F	Vér	258"/D"
65	140,19	24669	R093892	C	F	Vér	258"/D"
66	105,97	24675	R093443	C	F	Vér	258"/D"
67	87,07	24674	R093784	C	F	Vér	258"/D"
68	74,97	24633	R153123	C	F	Vér	258"/D"
69	24663	24663	R093662	C	F	Vér	258"/D"
70	204,72	24639	R093181	C	F	Vér	258"/D"
71	163,55	24666	R093115	C	F	Vér	258"/D"
72	112,68	24640	R093672	C	F	Vér	258"/D"
73	172,96	24657	R093855	C	F	Vér	258"/D"
74	144,51	24664	R093314	C	F	Vér	258"/D"
75	166,95	24637	R093900	C	F	Vér	258"/D"
76	126,6	24641	R093778	C	F	Vér	258"/D"
77	27,03	24676	R153254	C	F	Vér	258"/D"
78	125,44	24672	R093785	C	F	Vér	258"/D"
79	145,27	24653	R093234	C	F	Vér	258"/D"
80	210,39	24673	R093191	C	F	Vér	258"/D"
81	138,78	24632	R093435	C	F	Vér	258"/D"
82	222,91	24665	R093374	C	F	Vér	258"/D"
83	205,66	24662	R093235	C	F	Vér	258"/D"
84	205,02	24649	R093859	C	F	Vér	258"/D"
85	102,18	24631	R093117	C	F	Vér	258"/D"
86	183,68	24667	R093577	C	F	Vér	258"/D"
87	338,77	24543	R081018	D	F	Vér	258"/D"
88	223,55	24583	P181007	D	F	Vér	258"/D"
89	162,13	24549	P482010	D	F	Vér	258"/D"
90	557,23	24584	P182003	D	F	Vér	258"/D"
91	176,81	24530	R023040	D	F	Vér	258"/D"
92	172,82	24540	R023001	D	F	Vér	258"/D"
93	284,44	24575	P484026	D	F	Vér	258"/D"
94	208,01	24532	P425045	D	F	Vér	258"/D"
95	184,97	24533	P485012	D	F	Vér	258"/D"
96	181,42	24525	R026026	D	F	Vér	258"/D"
97	143,2	24526	R026007	D	F	Vér	258"/D"
98	315,49	24534	R027035	D	F	Vér	258"/D"
99	187,12	24537	P487019	D	F	Vér	258"/D"
100	404,16	24545	P128002	D	F	Vér	258"/D"
101	286,85	24588	P128001	D	F	Vér	258"/D"

3. Melléklet: Tenyésztésben használt C; D; XXL fajtajú nőtény nyulak adatait tartalmazó táblázat

HÁZINYÚL TETRANUKLEOTID STR MARKERSZETT FEJLESZTÉSE POPULÁCIÓGENETIKAI VIZSGÁLATOKHOZ

Development of a tetranucleotide STR marker set for population genetics studies in domestic rabbits

Készítette: **Pásztor Adrienn**, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő, Mezőgazdasági biotechnológus, MSc, II. évfolyam

Témavezető: **Dr. Stéger Viktor**, Tanszékvezető MATE-GBI, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő

Témavezető: **Dr. Varga László András**, Intézetigazgató helyettes MATE-GBI, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő

TDK dolgozatomban a Házinyúl tetranukleotid STR fejlesztésével foglalkoztam populációgenetikai vizsgálatokhoz. Előzőekben már kidolgozására került egy molekuláris marker szett, melyek irodalmi adatokból lettek kigyűjtve (Alves et al. 2015, Sternstein et al. 2015), azonban ezeket a mikroszatelliteket három plexben sikerült csak összesíteni, valamint dinukleotid ismétlődést mutattak, így kevésbé voltak informatívak és gazdaságilag hasznosak. Ezért úgy döntöttünk, hogy olyan markereket alkalmazunk, melyek tetranukleotid ismétlődést mutatnak, 100-500 bázis pár hosszúság között helyezkednek el, polimorfak és egy plexbe összeállíthatóak. A tetranukleotid markerek így sokkal költséghatékonyabbak lehetnek, illetve az egyedazonosítás szempontjából is jobbnak bizonyulhatnak, mint a dinukleotidok. Célunk az volt, hogy a genomszekvenálásból származó adatokat bioinformatikai módszerek segítségével feldolgozzuk, ezt követően primereket tervezzünk, hogy a populációk diverzitását faj specifikus plexek segítségével továbbiakban vizsgálhassuk. Így lehetőségünk nyílik a különböző fajták és fajtahibridek mikroszatellit marker alapú elkülönítésére, illetve populációgenetikai vizsgálatokra, úgymint rokonságvizsgálatra fajtákon belül és genetikai távolság becslésére.

Összesen 197 mintát vizsgáltam meg az általunk tervezett és optimalizált 16 mikroszatellitből álló markerszettel. Első körben egy 96 egyedből álló mintaszettel dolgoztam melyben, négy fajtát és azok hibridjeit vizsgáltam meg, majd ezt követően különböző populációgenetikai programmal végzett vizsgálatok alapján azt az eredményt kaptam, hogy sikerült olyan tetranukleotid STR markerszettet létrehozni, ami képes különválasztani az üregi nyulakat a házinyúl fajtáktól és azok hibridjeitől, illetve meg becsültem a genetikai távolságukat és a rokonsági kapcsolatukat is. Ezek alapján végeztem el a tenyésztésben fontos nőtények, az XXL, C és D fajtájú nyulak vizsgálatát is. Az eredmények azt mutatták, hogy a markerek külön választották a különböző csoportokat egymástól, illetve a rokonsági viszonyokat és a genetikai diverzitást megvizsgálva tanácsot adtunk a nyúltelepnek a további tenyésztésekhez, csökkentve a beltenyésztettséget az adott populációkban.

Az eredmények azt bizonyítják, hogy az általunk fejlesztett tetranukleotid STR markerek alkalmasak a vonalakon belüli genetikai távolságok felmérésére. Továbbiakban szükség lesz egy ivarhatározó marker beillesztésére a multiplexbe, ami lehetőséget nyújt a fiatal egyedek nemének meghatározására is.