

Állatorvostudományi Egyetem
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállattudományi Intézet
Állattenyésztési és Genetikai Tanszék



A citokróm b gén teljes reprezentatív vizsgálata a magyar szürke szarvasmarha hortobágyi családjaiban

A complete representative study of the cytochrome b gene in the Hortobágy families of Hungarian Grey cattle

Készítette:
Vásárhelyi Anna Mária

Témavezető:
Dr. Gáspárdy András, egyetemi docens, tanszékvezető
Állattenyésztési és Genetikai Tanszék

2024.

Absztrakt

A magyar szürke szarvasmarha nagy múltú, ikonikus háziállatfajtánk, az alföldi puszták jelképe.

Jelen kutatásban a magyar szürke szarvasmarha hortobágyi állománya genetikai sokféleségének a felmérését céloztuk meg, a citokróm b gén vizsgálatával.

A vizsgált állomány törzskönyvvvel és leszármazási adatokkal vészelte át az elmúlt évszázad fajtát ért megpróbáltatásait, így elsőként sikerült az ismert 109 család mindegyikéből mintát venni, hogy az eredmények a teljes állományt reprezentatívan leképezzék.

Azt reméljük, hogy e kutatás és a kapott eredmények kiegészítik eddigi nukleáris genomon alapuló ismereteinket és hozzájárulnak a fajta genetikai sokféleségét felmérő további kutatások létrejöttéhez, továbbá, a jellegzetességeket megőrizni kívánó tenyésztési programok fejlesztéséhez az állomány fennmaradását és megőrzését elősegítendő. Mivel ezek az állatok az élő örökség szerepén túl ma is képesek gyakorlati szempontból értékelhető módon, a márkázott hústermelés, a természetvédelem és a turizmus területein helytállni.

Abstract

The Hungarian Grey Cattle is an iconic domestic animal breed with a long history, a symbol of the Great Plain steppes.

In this research, we aimed to assess the genetic diversity of the Hortobágy herd of Hungarian Grey Cattle by examining the cytochrome b gene.

The studied herd survived the trials of the breed over the past century with herd-book and pedigree data, so we were the first to take samples from each of the 109 known families so that the results would represent the entire herd.

We hope that this research and the results obtained will complement our previous knowledge based on nuclear genomes and contribute to the creation of further research assessing the genetic diversity of the breed, as well as to the development of breeding programs that aim to preserve the characteristics in order to promote the survival of the herd. In addition to their role as living heritage, these animals are still able to perform in a practically valuable way in the areas of branded meat production, nature conservation and tourism.

Rövidítések jegyzéke

Cyt b	citokrómb gén
mtDNS	mitokondriális DNS
ATP	adenozin-trifoszfát
PCR	polimerase chain reaction, polimeráz-láncreakció
Bp	bázispár
CR	kontroll régió

Tartalomjegyzék

Absztrakt	1
Abstract	2
Rövidítések jegyzéke.....	3
1 Bevezetés.....	6
2 Irodalmi áttekintés.....	7
2.1 Mitogenom.....	7
2.2 Citokróm b gén	8
2.3 Citokróm b gén felhasználási területei	9
2.3.1 Filogenetikai kutatások	9
2.3.2 Fajazonosítás	10
2.3.3 Hatóanyag rezisztencia.....	10
2.3.4 Igazságügyi felhasználás	10
2.3.5 Húsipari, élelmiszer-biztonsági kérdések.....	10
2.3.6 Biodiverzitás megőrzése	11
2.4 Magyar szürke szarvasmarha.....	12
2.4.1 A fajta története	12
2.4.2 Jellemzői.....	13
2.4.3 Felhasználása.....	15
2.4.4 Génmegőrzés	16
3 Célkitűzések	17
4 Anyag és módszer	18
4.1 Mintagyűjtés	18
4.2 DNS tisztítás, a mitokondriális citokróm-b gén szakaszának amplifikálása	18
4.3 Szekvenálás	20
4.4 Szekvenciák értékelése	21

5	Eredmények és megbeszélésük	22
6	Következtetések.....	25
7	Összefoglalás	26
8	Köszönetnyilvánítás	27
9	Irodalomjegyzék	28
10	Konzultációs lap	35

1 Bevezetés

A magyar szürke szarvasmarha az alföldi puszták ikonikus háziállat-fajtája, Hungarikumként védett nemzeti értékünk. Mint azt a későbbiekben látni fogjuk, a fajta évszázados történelme összefonódott a Kárpát-medencében élő emberekével: hosszú időn keresztül nélkülözhetetlen szerepet töltött be a pusztai állattartásban, de az elmúlt évszázad viszontagságai, különösen a második világháború utáni évek megtizedelték az állományt, amely az 1960-as években csaknem kihalt.

Szerencsére a hortobágyi állományt a régmúlt időkre visszanyúló törzskönyvekkel és leszármazási adatokkal együtt sikerült tiszta vérben megőrizni.

Ezeket az állatokat vizsgáltuk e kutatás keretein belül.

Most először sikerült a hortobágyi magyar szürkék családjait reprezentatív, mind a 109 családot átfogó vizsgálatnak alávetni, a citokróm b gén elemzésén keresztül a genetikai változatosságukat felmérni.

Ez a kutatás eredményeivel hozzájárulhat ahhoz, hogy e nemes és nagy múltú, ikonikus fajtát megőrizzük az utókor számára, átmentve a régmúlt élő örökségét a következő generációnak. A fajta hagyományos hasznosítása átformálódott, és jórészt megszűnt ugyan, de a mai kor fontos kérdéseiben: a természeti értékek védelmében, a hagyományos értékek megőrzésében és bemutatásában, és a háziállatfajok genetikai sokféleségének fenntartásában, úgy gondolom, igenis helye van ezeknek az ősi, nemzeti jelképnek számító állatoknak.

2 Irodalmi áttekintés

Ebben a fejezetben a témához tartozó szakirodalmi adatokat és forrásokat mutatom be, négy fejezetben, a mitogenom általános jellemzésétől a cyt b gén gyakorlati felhasználásán keresztül a magyar szürke szarvasmarha-fajta jellemzőiig.

A cyt b gyakorlati felhasználási területeire is kitérek hat alfejezetben. A filogenetikai és fajazonosítással foglalkozó kutatásoktól kezdve, az igazságügyi és élelmiszerbiztonsági kérdéseken át, a történelmi háziállatfajták általi biodiverzitás megőrzésig.

2.1 Mitogenom

A mitogenom a mitokondriumok saját genetikai anyagát jelenti, amely evolúciós szempontból egy endoszimbionta baktérium őstől származik [1].

A mitogenom általános szerkezetéről elmondható, hogy egy körkörös, kettős szálú DNS [2]. A legtöbb állati mitogenom kicsi (16-17 Kb), cirkuláris és az oxidatív foszforilációhoz nélkülözhetetlen komponenseket kódol, ez a szerkezet öröklődik meg a kétélűektől fogva [3].

Maga az mtDNS 37 gént kódol, ezek közül 13 fehérjét, 22 transzfer RNS-t és 2 riboszomális RNS-t, amelyek az energiatermeléshez és a proteinszintézishez szükségesek [4]. Egyes taxonok, mint például a cidariák és a protisták, fragmentált vagy lineáris mtDNS-sel rendelkeznek, amely szerkezeti változatosságra utal [1, 5].

Az mtDNS elsősorban az oxidatív foszforilációhoz szükséges fehérjéket kódolja, amely a sejtek energiatermelésében, ATP előállításában játszik szerepet [6]. Ezen túl regulációs szerepet is betölt: hatással van az apoptózisra, az öregedésre és egyes metabolikus útvonalakra [1].

Az mtDNS kétféle, könnyű és nehéz szálból áll, amelyek asszimetriát mutatnak: a nehéz szál kódolja a fehérjéket kódoló gének többségét [2]. Nem kódoló régiókat, úgynevezett kontroll régiót, vagy D-hurkot is tartalmaz, amely a replikáció és transzkripció szabályozásában játszik kulcsszerepet [4]. A kódolás hatékonyságának maximalizálása érdekében az mtDNS nem tartalmaz intronokat, és egyes gének átfedik egymást [3].

Replikáció esetén az iniciáció a nehéz szálon kezdődik (OH), a könnyű szál szintézise időben eltolva, az ehhez szükséges régió (OL) elérhetővé válása után indul meg [4]. A transzkripció során két promóter régió (HSP, LSP) segíti elő a folyamatot, melynek végén a transzkriptumok funkcionális RNS-ekké alakulnak a fehérjeszintézishez [6]. Az mtDNS a legtöbb állatban maternálisan, vagyis anyai ágon öröklődik [7], amely azt jelenti, hogy a paternális, vagyis apai mtDNS különféle folyamatok (ubiquitináció, autofágia) során, a megtermékenyítést követően, eliminálódik [6]. Az mtDNS jellemzője a magas mutációs ráta, ami a korlátozott javítási mechanizmusok és a reaktív oxigéngyökök következménye [8]. Ezek a mutációk akár heteroplazmiához – különböző genetikai összetételű mitokondriumok egy szervezetben – is vezethetnek.

Az állatok mtDNS-e a fajok között szerkezeti hasonlóságot mutat, a növény és protista fajok esetén jelentős eltéréseket láthatunk [5], amely vélhetően evolúciós és ökológiai okokra vezethető vissza [9].

2.2 Citokróm b gén

A citokróm b jelentős szerepet játszik az elektrontranszport-láncban, azon belül is annak III. komplexében, amelyet más néven ubiquinol:citokróm c oxidoreduktáz komplexnek neveznek. Ez a molekula komplex szerepet játszik az ubiquinol és a citokróm c közötti elektrontranszferben, miközben hozzájárul a mitokondrium membránján keresztül zajló protonpumpához [10].

A cyt b gén nagyjából 1140 bázispárt foglal magába, és egy 380 aminosavból álló fehérjét kódol. A mitokondriális genomban található, szerkezete az egy fajba tartozó állatok között jellemzően konzervált. A kódolt fehérje számos transzmembrán hélixet tartalmaz, több hem b kötőhellyel együtt, amely az elektrontranszport-folyamatokhoz nélkülözhetetlen. Ezek a struktúrák teszik lehetővé a mitokondriális energia metabolismus szempontjából központi szerepet játszó redox-reakciókat [10]. A cyt b gén bizonyos régiói a rendszertani csoportokon belül nagymértékben konzerváltak, ami megbízható célpontot jelent olyan molekuláris vizsgálatokhoz, mint a filogenetika és az evolúcióbiológia [11]. A gén szekvenciájában fajspecifikus változásokat is mutat, amelyek széles körben hasznosíthatóak fajazonosításra és populációgenetikai vizsgálatokra [12]. Ezek a variációk gyakran a gén kevésbé konzervált régióiban koncentrálnak.

A cyt b gén általánosan megbízhatónak tekintett molekuláris marker a filogenetikai kapcsolatok rekonstruálásához különböző rendszertani szinteken [13]. Kettős tulajdonságai, a fajon belüli konzerváltság és a fajok közötti variabilitás, megkönnyítik az evolúciós különbségek vizsgálatát [11]. Szekvenciáit anyai vonalak azonosítására és a populációs szerkezetek értékelésére használják [14].

A cyt b gén PCR-alapú sokszorosítása és szekvenálása a különböző élőlények esetében az elemzés kifejezetten előnyös módszertani megközelítése lehet [11]. Így betekintést nyerhetünk a gén konzervált és változó régióiba egyaránt, és egyes módszerekkel a rokon fajok vagy populációk megkülönböztetésére is lehetőség nyílik, ami különösen hatékony igazságügyi és természetvédelmi összefüggésben [15].

2.3 Citokróm b gén felhasználási területei

2.3.1 Filogenetikai kutatások

A cyt b megbízható és hasznos markernek számít a közeli taxonómiai csoportokat vizsgáló filogenetikai kutatásokban, de evolúciós mélységekben elveszíthetjük a vizsgálat pontosságát [16].

Számos faj esetén végeztek mitogenomra alapozott filogenetikai vizsgálatokat: tengeri [17] és édesvízi halak [18], tarajos sül [19], kérődzők (európai bölény [20], jak [21], juh [22], szarvasmarha [23, 24].

Kikkawa és munkatársai [25] elvégezték a mitokondriális citokróm b alapján a taurin, zebu és bali marhák filogenetikai besorolását. Az eredmények arra utalnak, hogy mindhárom fajnak körülbelül 3 millió éve volt utoljára közös őse, és a taurin és a zebu szarvasmarha vadon élő ősei körülbelül 1 millió évvel ezelőtt váltak el egymástól. A legtöbb szarvasmarhaszerű Dél- és Kelet-Ázsiai fajok különböző mértékben hibridizálnak egymással, így az Indonéziában élő házi marhák *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos javanicus* és *Bos grunniens* hibridizációjából származnak [14]. Cai és munkatársai (2007)[26] különböző kínai, valamint Husszain és munkatársai (2018)[27] különböző pakisztáni házi marha fajták *Bos taurus* és *Bos indicus* vegyes anyai hátterét tárták fel a citokróm b génre alapozva.

2.3.2 Fajazonosítás

A cyt b gént alkalmazták emberi és állati vér [28], illetve állati termékek faj szintű meghatározására: jégkorszaki szarvas leletet soroltak be sikeresen ma élő leszármazottak mtDNS-e alapján [29], illetve különféle húsfajtákból származó mintákat sikerült hatékonyan azonosítani [30].

A cyt b gént sikeresen alkalmazták hal fajok taxonómiai elkülönítésére is [31]: az eredmények megegyeztek a morfológiai bélyegek alapján történt besorolással. A fajok elkülönítése az élelmiszerláncba bekerült halak esetén is kivitelezhető [32].

Rovarok esetében is alkalmazható a megközelítés, egy kutatásban [33] filogenetikai kapcsolatokat is sikerült feltárni, csakúgy mint egyes énekesmadarak esetén [34].

2.3.3 Hatóanyag rezisztencia

Ali és munkatársai (2022)[35] azonosították a cyt b gén mutációs pontjait, amely által rezisztensekké váltak a szarvasmarhák a Theileria annulata kezelésére használt buparvaquone-nal szemben.

2.3.4 Igazságügyi felhasználás

Igazságügyi, vagyis forenzikus genetikai célra is fel lehet használni mtDNS markereket állatok által vagy állatok sérelmére elkövetett cselekmények felderítése céljából. Sikeresen alkalmazható a módszer például orvvadászatból származó hús, és tiltott vadászati eszközök felderítésére [36].

Faj azonosításhoz a kontrollrégió két hipervariábilis szakasza (HVR1/HVR2) mellett a cyt b és citokróm-oxidáz 1-es alegység mitokondriális DNS-en kódolt szekvenciái is eredményesen használhatóak igazságügyi kérdésekben. Például az illegális tevékenységből származó állati termékek földrajzi eredetének, a hús és a hústermékek kvalitatív minőségének elbírálása során [37]. Akár a kereskedelmi forgalomba kerülő, feldolgozott húsok, húskészítmények vizsgálata is lehetséges, a házi és vad fajok elkülönítésével [38]

2.3.5 Húsipari, élelmiszer-biztonsági kérdések

A cyt b gén alkalmazható élelmiszerbiztonsági kérdésekben is: vizsgálható az adott hústermék összetétele frissen, fagyasztva, vagy hőkezelés után egyaránt [39].

Egy *cyt b* felhasználásával, PCR technikával végzett vizsgálat során sikeresen elkülönítették a sertés, marha és vadhúsokat egymástól [40]. Lehetőség van a génkópiák kvantitatív vizsgálatára is, fajspecifikus primerekkel már 0,5%-ban jelenlévő húst is megbízhatóan ki lehet mutatni az adott termékből [41].

Egy kutatásban a liba [42], egy másikban [43] a ló- és szamárhús kimutathatóságát vizsgálták, és azt találták, hogy a szamár- már 1pg, a lóhús pedig 25 pg mennyiségben kimutatható laboratóriumi körülmények között, és az eredményeket valós termékek megfelelőin is demonstrálták, bizonyítva a módszer gyakorlati felhasználhatóságát.

A vallási előírásoknak (halal) való megfelelés szempontjából is folytattak vizsgálatokat [44, 45]: vaddisznó illetve kutya húst kerestek húskészítményekben, és a negatív eredményekkel sikerült eloszlatni az élelmiszerminőségi gyanút.

Ehhez hasonlóan sikeresen különítették el egymástól marha illetve bivalyhúst [46], és sikerült sertéshússal kontaminált csirkehús-készítményt is felderíteni [47].

2.3.6 Biodiverzitás megőrzése

Több történelmi lófajta esetén alkalmaztak mtDNS markereket a kancacsaládok azonosítására: a székely ló esetén D-hurok [48], míg a hucul fajta esetén *cyt b* markerrel [49] vizsgálták a kancákat. Ezek az eredmények a veszélyeztetett, alacsony egyedszámú háziállatfajták genetikai sokszínűségének a megőrzését, és ezáltal a fajták fennmaradását szolgálják [49]. A háziállatok genetikai sokféleségének megőrzése azért is fontos, mert szükség esetén ezekből a régi fajtákból meríthetünk az elterjedt kultúrfajták javítására, betegségekkel, környezeti tényezőkkel szemben ellenállóbbá tételére irányuló tenyésztési programokhoz.

Ide vehetjük tágabb értelemben a matrilinearis vonalak azonosítását a *cyt b* haplotípusokra nézve [50], illetőleg szűkebben és szigorúbban értelmezve a törzskönyv összetartozó anyai vonalainak (családok) meghatározásában [51] végzett vizsgálatokat.

2.4 Magyar szürke szarvasmarha

2.4.1 A fajta története

A magyar szürke szarvasmarha (*Bos primigenius taurus hungaricus*) vitatott eredetű szarvasmarha-fajta [52]. Genetikai szempontból a podóliai fajtakörbe tartozik, rokona például az olasz maremmana, a román sura de stepă és a bulgár szürke szarvasmarha [53, 54].

Egyesek szerint a honfoglalókkal, mások szerint a késő középkorban betelepülő kunokkal érkezett, vagy a középkori domesztikáció következtében itt, a Kárpát-medencében alakult ki az őstulokból [52, 55]. Archeozoológiai és genetikai eredmények nem támasztják alá egyértelműen egyik elméletet sem a másik kettővel szemben [55]. Feltételezhető, hogy az őstulokkal való keveredés szerepet játszott a fajta korai történelmében [56].

A 14. századra általánosan elterjedt a Kárpát-medencében, és fontos exportértéket képviselt [57]. Rendkívüli ellenállásáról volt híres, lábon hajtották a nyugat-európai piacokra [58], évente akár 100-200 ezer állatot is. Főleg a német területekre, például Nürnbergbe irányult a kereskedelem, de Velencében is értékesítették őket. E piacokon jó minőségű húzáért és nagy méretéért kedvelték, az ökrök 300-500 kg-ra is megnőhettek, ami a korabeli 200 kg-hoz képest kirívónak számított [59]. Külön szabályok vonatkoztak a vágásra és az értékesítésre a minőség fenntartása érdekében. A Magyar Királyság fontos bevételi forrása volt így a szarvasmarha-kereskedelem [52].

Sajnos az ezt követő évszázadok, a török hódoltság és a változó piac nem kedvezett a fajtának, a 18. századra a nagy marhahajtások befejeződtek [52]. A 19. században az ipari forradalom hatására intenzívebbé váló mezőgazdasági termelés hatására a specializált hús- illetve tejhasznú (például szimentáli) szarvasmarhák terjedtek el, háttérbe szorítva a kevésbé termelékeny magyar szürkét. Az 1863-as nagy aszály ugyancsak megtizedelte az állományt [58].

A fajta hanyatlását aztán az első és második világháború hozta el, a második világháború és az ezt követő kollektivizálás következtében néhány száz egyed maradt az országban. Az 1960-as években a fajta csaknem kihalt, 200 tehén és 6 bika maradt csak fenn [52].

Szerencsére szelektív tenyésztéssel néhány évtized alatt sikerült visszahozni az állomány méretét egy fenntartható szintre, de az 1800-as évek közepi állomány szintjét még mindig nem éri el [52].

A fajta megőrzésében fontos lépés volt a Magyar Szürke Szarvasmarhát Tenyésztők Országos Egyesületének megalakulása, amely azóta is jelentős szerepet tölt be e fajta tenyésztői és génmegőrzési munkájában [58].

2.4.2 Jellemzői

A fajta különös ismertetőjegye a hosszú szarv és a robosztus felépítés [57]. Jó anyai tulajdonságokkal rendelkezik, az anya borját erősen védelmezi [58].

A fajtára jellemző a korral járó színátmenet (1. ábra): a borjak vöröses, úgynevezett pirók színnel születnek (2. ábra), hat-tizenkét hónapos korra érik el a fajtára jellemző szürke színt. Ivari dimorfizmus is megfigyelhető, a bikák jellemzően sötétebb színezetűek, a nyaki és mellkas tájékon kifejezetten sötét, füstös színűek (3. ábra)[52, 60]. Feltételezhető, hogy a szürke szín előnyös, mivel több napfényt ver vissza, és segíti az állat termoregulációját, ehhez a pigmentált bőr is hozzájárul [60]. Az állatok szőrköntöse az évszakokkal is változik, télen tömöttebb, sűrűbb lesz, így biztosítva az időjárási viszonyokkal szembeni ellenálló képességet [58].



1. ábra: A gulyában megfigyelhető az egyedek közötti szín-, illetve szarvalakulás-beli különbség. (Forrás: <https://www.magyarkincsek.hu/kulonleges-latnivalok/magyar-szurke-szarvasmarhak-terelese-a-hortobagyon/>)



2. ábra: Jellegzetes pirók színű fiatal borjú (Forrás: <https://www.agroinform.hu/allattenyesztes/szurkemarha-az-alfold-vilagszerte-ismert-jellegzetessege-13098>)



3. ábra: A bikákon megfigyelhető az elülső testfél sötétszürke, kormos színeződése és a szem körüli folt, az ókula (Forrás: <https://www.agroinform.hu/allattenyesztes/szurkemarkarha-az-alfold-vilagszerte-ismert-jellegzetessege-13098>)

Az évszázadok során legeltető, rideg tartáshoz szokott fajta a betegségekkel szemben rendkívül ellenálló, különösen hagyományos tartási körülmények között [52].

Tejtermelése közepes-csekély, nagyüzemi tejelő hasznosításra alkalmatlan. Ugyanakkor a múltban egyes vonalakat szelektáltak ebbe az irányba, és használták is őket, rövid ideig, mérsékelt sikerrel [52].

A tehenek átlagsúlya 535, a bikáké 700 kg, a tehenek marmagassága 135, a bikáké 150 cm [61].

2.4.3 Felhasználása

Régen elsősorban ígás állat volt, a húsát is hasznosították és tejtermelésre is használták egyes vonalakat [52]. Húsát jellegzetes, kellemes ízéért és soványságáért kedvelik, hagyományos hízalás mellett a hús sötétvörös, nem márványozott [62].

A múltban az állat minden részét hasznosították, a szarvából, csontjaiból, bőréből különféle használati tárgyakat készítettek [58, 62]. Ma is találunk faluhelyen szarufaragással foglalkozó mestereket.

A fajta rendkívül alkalmas a hagyományos, legelő alapú állattartási rendszerekben való tartásra [52]. A magyar szürkék modern hasznosítása lehet a fás legelők biodiverzitásának a biztosításában betöltött szerep: a legeltetés hatására hosszú távon a mozaikos, fás, bokros, füves élőhelyek változatosságának és arányának növekedése várható egy kutatás alapján [63].

Törvényileg védett nemzeti értékünk, a hungarikumok közé tartozik [64], így a turizmus és vendéglátás fellendítésébe is be lehet vonni.

2.4.4 Génmegőrzés

A 20. század közepétől a fajta genetikai tartalék szerepe egyre inkább felismerésre került [62], állami gazdaságokban is foglalkozni kezdtek a tenyésztésével. Ma a fajta reneszánszát éli, a kormány és a mezőgazdasági szervezetek támogatják az őshonos, veszélyeztetett fajták megőrzését [52].

A populáció stabilnak tekinthető, ami biztosítja az állomány fennmaradását és a hagyományos gazdálkodásban betöltött szerepének a folytatódását. Kihívást jelent a genetikai sokszínűség fenntartása a fajtát ért palacknyak-hatások után [52], de a beltenyésztettség szerencsére egyelőre nem jellemző a fajtára [65].

A gazdasági, természetvédelmi és génmegőrzési szempontokat hosszú távon egyensúlyba kell hozni annak érdekében, hogy e fajta az eredeti környezetében még évek hosszú során keresztül fennmaradhasson.

3 Célkitűzések

A tanulmány célja a magyar szürke szarvasmarha kihalástól megmentett hortobágyi törzsállománya genetikai diverzitásának megállapítása. Ehhez a mitokondriális DNS citokróm b génszekvenciáját használtuk fel és elemeztük.

Feltételeztük, hogy viszonylag egyöntetű lesz az állomány erre a génre nézve, mivel ez kódoló régió, a mutánsokról feltételeztük, hogy nagy valószínűséggel nem élnek túl és nem tudják tovább örökíteni a mitokondriális DNS-üket.

Az eredményektől azt várjuk, hogy elősegítsék a tenyésztési törekvéseket a családok génállományának megőrzése érdekében, illetve hozzájáruljanak további, a fajta genetikai sokféleségével foglalkozó kutatások létrejöttéhez.

4 Anyag és módszer

4.1 *Mintagyűjtés*

A hortobágyi magyar szürke marha állomány a törzskönyvi adatok alapján összesen 109 családra osztható, ennyi családalapító anyától élnek ma leszármazottak. Valamennyi családból egy képviselőt választottunk ki a mintavételre. A mintavétel e módját alapító mintavételnek (founder sampling method) neveztük el és a tanszék korábbi feldolgozásaiban is már alkalmazták [66]; [67]. A genetikai feldolgozásunkhoz szükséges biológiai minták a tenyészetből évente a NÉBIH számára kötelezően levett vérmintákból származtak, így külön állatkísérleti engedélyt nem volt szükséges beszerezni. A mintákat 2023-ban vették át és -18 °C-on tárolták a feldolgozásig.

4.2 *DNS tisztítás, a mitokondriális citokróm-b gén szakaszának amplifikálása*

A minták előkészítése a Tanszék genetikai laboratóriumában folyt 2024 elején.

A DNS-t a GenElute Blood Genomic DNS kit által előírt protokoll szerint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ennek segítségével nyertük ki és tisztítottuk.

Az extrahált DNS minőségi és szemikvalitatív meghatározására 2,5%-os agaróz gélt (50mL pufferhez 1,25gr BIO-41025 jelű agaróz gélt, Agarose Molecular Grade, Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, USA) használtunk GelGreen Nucleic Acid Stain interkaláló festékkel (10,000X in DMSO; Cat:41004 Lot:19G0227; Biotium, Fremont, CA, USA).

A tisztított mintákat 4 °C-on tároltuk a további elemzésig.

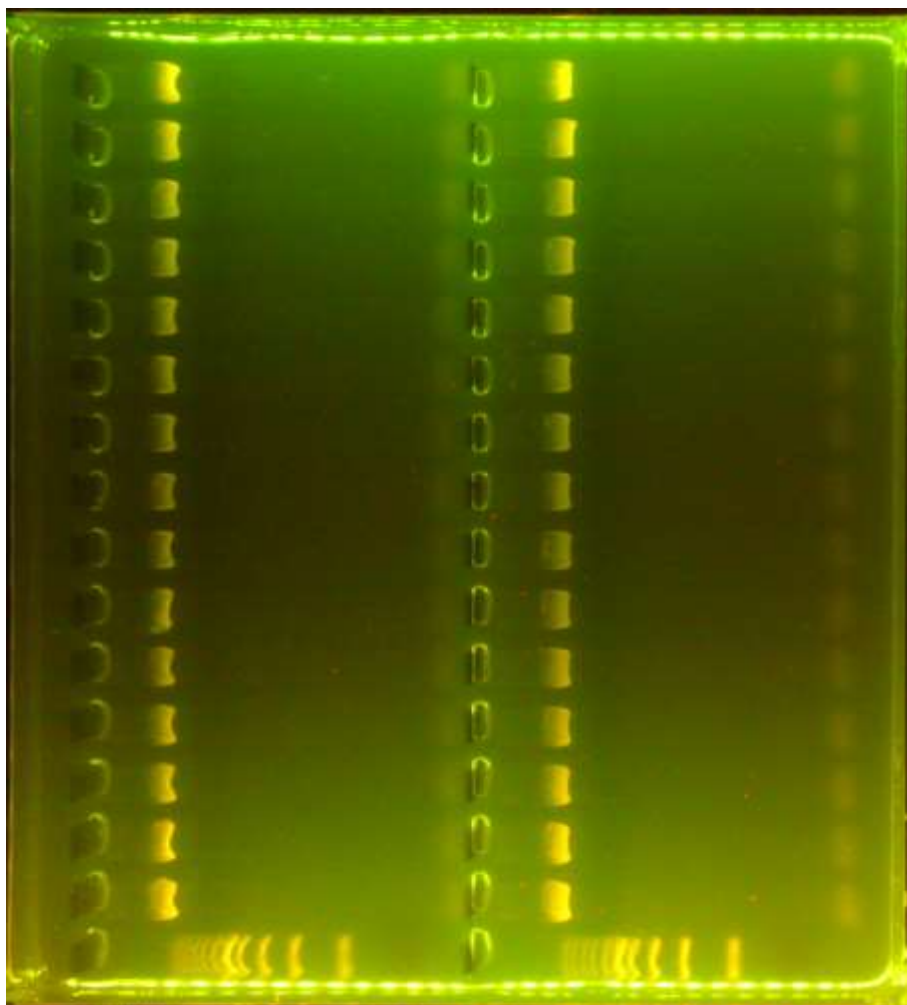
A minták citokróm b génjének PCR (polymerase chain reaction) sokszorozásához 25 µL PCR reakcióelegyet készítettünk, amely a következő összetevőket tartalmazta: 2 µL DNS templát DNS, 2 µL PrimerMix (1,0-1,0 µL forward és reverse primerekből (10µM)), 5 µL Green Master Mix (10x DreamTaq Green Buffer, 2mM dNTP, DreamTaq DNA Polimerase 5U/µL) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) és 1 µL BSA (20 mg/ml) kiegészítve 17 µL PCR-minőségű (ultra pure) vízzel.

Két, korábban leírt primerpárt használtunk két külön reakcióban a vizsgálandó szegmens sokszorozására [68]:

forward primer (Bo_CytB_Kim_F: 5'-TTCTTACATGGAATCT AACCATGA-3' és reverz primer (Bo_CytB_Kim_R: 5'-GGGAGGTTAGTTGTTCTCCTTCTC-3'.

A DNS-szekvencia amplifikálására a programozható Thermal Cycler 2720-típusú PCR berendezést (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA) használtunk az alábbi körülményekkel: 1 perc denaturálás 94 °C-on, majd 30 mp 94 °C-on, 30 mp 51 °C-on, 60 mp 72 °C-on és végül 5 perc 72 °C-on 30-as ciklus számokkal, amit 4 °C-ra történő visszahűtés követett.

A PCR-termék jelenlétét 2,5%-os agaróz gélen (lásd korábban BIO-41025 jelű Agarose Molecular Grade) mutattuk ki GelGreen Nucleic Acid Stain festékkel (lásd korábban Cat:41004 Lot:19G0227) (4. ábra).



4. ábra: A magyar szürke szarvasmarha (5-34 családjai) citokróm *b* génszekvenciáinak gélképe, a *Bo_CytB_Kim_F* és a *Bo_CytB_Kim_R* primerekkel végzett PCR reakció terméke agaróz gélen.

A PCR-termékeket SIGMA GenElute™ PCR Clean Up Kit-tel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tisztítottuk, a protokoll előírását betartva.

4.3 Szekvenálás

A szekvenálási reakcióhoz, egy BigDye® Terminator 3.1-es verziójú Cycle Sequencing Kit-et (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk a gyártó által javasolt módon. A szekvenciák detektálására az ABI Prism 3130XL típusú Genetic Analyzer-t (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtuk, a gyártó útmutatásai szerint. A szekvencia adatokat a Sequencing Analysis Software 5.1 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével elemeztük ki, és

ezt követően a SequencherTM 4.1.2 szoftverrel (Gene Codes Corp, Ann Arbor, MI, USA) igazítottuk.

4.4 Szekvenciák értékelése

A mutációk kiértékelését a FU és LI által fejlesztett teszttel végeztük el [69], majd populációgenetikai értékelési módszerként a TAJIMA által javasolt D-tesztet [70] alkalmaztuk a kimutatott mutációk elemzésére.

A teljes vizsgálati minta polimorf bázishelyeinek számát, a haplotípus diverzitást (H_d), az átlagos nukleotid diverzitást (π) és az átlagos nukleotid eltérések számát (k) a DNAsp 6.0-s szoftver segítségével határoztuk meg [71]. Az átlagos nukleotid diverzitás (π) a mintázott állomány két véletlenszerűen kiválasztott bázishelyén található különböző nukleotidok száma. Ez egyúttal meghatározza az állomány genetikai változatosságát.

Grafikusan mutatjuk be a családok megoszlását haplotípusonként.

5 Eredmények és megbeszélésük

A teljes vizsgálati minta száma 109, a cyt b teljes szakaszának hossza 1140; a szakasz hossza a hiányos bázishelyek kizárásával 1134 bázispár.

A monomorf bázishelyek száma 1118 volt, míg a sokalakú (polimorf) bázishelyeké 16.

Az utóbbi vonatkozásában 9 egyedüli (szingleton, két változattal, bázishelyek: 31, 135, 198, 610, 684, 730, 880, 1041 és 1074) és 7 több változattal előforduló (párszimon, bázishelyek: 102, 342, 675, 678, 801, 1044 és 1104) informatív mutációt találtunk.

Az 1. táblázat mutatja be a genetikai diverzitást jellemző mutatókat. A haplotípus diverzitás (H_d) 0,469 ($\pm 0,059$ szórással) volt. Az átlagos nukleotid diverzitás (π) és az átlagos nukleotid eltérések száma (k) $0,5 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 0,008 \cdot 10^{-3}$ szórással), illetőleg 0,572 ($\pm 0,468$ szórással) volt.

1. táblázat: A haplotípus diverzitás, valamint a π és k értékei a magyar szürke marha hortobágyi gulyájában

Megnevezés	Hortobágy
haplotípus diverzitás, H_d	0,469
nukleotid diverzitás, π	$0,5 \cdot 10^{-3}$
átlagos nukleotid eltérések száma, k	0,572

Tarekegn és munkatársai (2019)[72] Etiópia négy eredeti marha állományában (teljes cyt b gén: 1140 bp, összesen 76 egyed) a haplotípus diverzitást 0,709 és 0,833, a nukleotid diverzitást $0,8 \cdot 10^{-3}$ és $1,3 \cdot 10^{-3}$, az átlagos nukleotid eltérések számát 0,910 és 1,422 közöttinek találták, vagyis a magyar szürkénél változatosabb cyt b gént írtak le.

Kim és munkatársai (2013)[68] Korea veszélyeztetett szarvasmarha fajtájában, a chiksoban (teljes cyt b gén, összesen 239 egyed), a magyar szürkééhez hasonló értékeket állapítottak meg: haplotípus diverzitás 0,4709, nukleotid diverzitás $0,55 \cdot 10^{-3}$, és 13 haplotípus szám mellett.

A haplotípus diverzitás és az átlagos nukleotid eltérések száma az indonéz marha fajtákban (pasundan és pacitan; rövidebb, 464 bp szakasz és 21 állat) alacsonyabb volt ($H_d = 0,1818$ és $0,3778$; $k = 0,182$ és $0,400$) mint a magyar szürkében [73].

Az egyik hazai juhajtában, a cikóban [51] a citokrómb b génre elvégzett Tajima-teszt szerint a páronkénti nukleotid eltérések átlagos száma (k) $2,926$, a nukleotid diverzitás (π) $3,13 \cdot 10^{-3}$ volt, magasabb, mint a magyar szürke fajtában. Egy másik őshonos juhajtában, a cigájában a cikóhoz közelítő értékek jellemzők, bár kevésbé diverz állományt tükrözve [74].

A teljes vizsgálati állományban elvégzett TAJIMA D-teszt értéke $-2,24672$ lett, statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,01$). A szignifikáns negatív érték a ritka változatok nagyfokú megjelenésének, akár mentesítő (nemkívánatos géntől megválni szándékozó) szelekciónak, vagy alkalmasint demográfiai expánzióknak a jelzője. A szignifikáns pozitív érték az adott fajta al-populációkra való széthasadásának indikátora lenne.

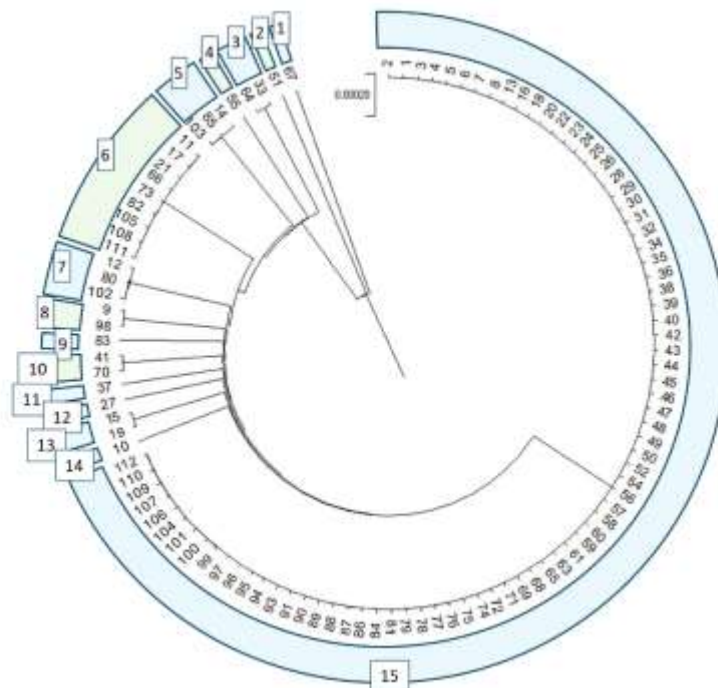
A FU és LI féle D^* teszt $-3,13273$ ($p < 0,05$) értéket, a FU és LI féle F^* teszt $-3,34889$ ($p < 0,02$) értéket eredményezett a teljes vizsgálati állományban; mindkettő szignifikáns volt.

A FU féle F_s statisztika értéke $-16,419$ erősen szignifikáns ($p < 0,001$). Az érzékenyebb Fu F_s statisztikája is megerősítette a haplotípus szekvenciák elkülönülését. A Fu-féle F_s statisztika szignifikáns negatív értékei idegen génbeáramlásra hívhatják fel a figyelmet. Ez a magyar szürke fajta hortobágyi állományának esetében azt jelentheti, hogy az egységes anyai háttér más nőivarú ősökkel egészült ki.

Tajima D $-0,93613$, a Fu-féle F_s $0,01635$ volt Irán helyi marhájában (1250 bp, 10 egyed) [75]. Tarekgn és munkatársai (2018)[72] a vizsgált etióp fajták közül csak az abigarban észleltek szignifikáns, és a magyar szürkéhez hasonlóan alacsony negatív Tajima D ($-1,7278$, $p = 0,017$) és Fu-féle F_s ($-3,3289$, $p = 0,002$) értékeket, amiből a fajta expánziójára következtettek.

A Fu-féle F_s statisztika értéke a mi vizsgálatunkban közepesnek tekinthető, mivel több hasonló kutatás klasztereiben ennél alacsonyabb (pl.juh $-7,48$, $p = 0,001$ [76]; juh: $-10,88$, $p < 0,001$ [77] és magasabb (juh: $-76,28$, $p < 0,001$ [22] negatív értékeket is talált.

A haplotípusok száma 15 volt. A 109 család így mindössze 15 haplotípuson osztozik. Az 5. ábra szemlélteti a magyar szürke családok megoszlását haplotípusok szerint. A 109 családból 79 citokróm b szekvenciasorrendje teljesen azonos volt. Ezekből a maradék 30 család egy-három mutációval tért el és összesen 14 haplotípust képvisel. Ezen haplotípusok között találunk családokban gazdagabbat, a 6-os haplotípust 9 családdal és olyanokat is (1-től 5-ig és 7-től 14-ig), amelyekhez csak 1-3 család tartozik. Felmerül a kérdés, hogy a hortobágyi mintában talált 15 haplotípus egyúttal ugyanennyi „ősanyát” is feltételez, amiktől a teljes populáció származna? A válasz valószínűleg nem; mert az egyöntetűség a cyt b génben a fehérjét kódoló feladatával magyarázható. Néhány csendes (*silent*) mutáció előfordulhat, de a fehérje működésének megváltozásával járó (*missence*) pontmutációk nagy valószínűséggel nem élnek túl, így kiszelektálódnak.



5. ábra: A magyar szürke családok megoszlása haplotípusonként. A haplotípus azonosítókat a haplotípusba tartozó családok azonosítója követi.

6 Következtetések

A vizsgált 109 egyedből 79 állat (a minták 72%-a) egyöntetű, míg 30 állat (a minták 28%-a) mutáns génnel rendelkezett. A mutációk jellemzően egy-egy bázispárt érintettek egyedenként.

További vizsgálatra javasolható a kontroll régió: várhatóan ennek a génszakasznak nagyobb az állományon belüli változatossága, nem kódoló génszakaszról lévén szó, a mutációk kiszelektálódásának kisebb az esélye. Egy cigája és cikta juh fajtákban végzett kutatásban [74] azt találták, hogy a kontroll régió több, mint kétszer annyi mutációt tartalmazott, mint a cyt b. A vizsgált populációban 40 cyt b és 94 CR haplotípust (családot) tudtak elkülöníteni, a cyt b haplotípusok közül a cigájában 33, a ciktaban 11, míg a CR haplotípusok közül 66 a cigája és 28 a cikta fajtában volt jelen.

Egy román szürke szarvasmarhában végzett kutatás [54] érdekes módon ennek ellentmondó eredményt állapított meg: feltételezhető, hogy az alacsony mintaszám lehet az oka annak, hogy közel azonos, cyt b tekintetében kissé változatosabb haplotípus-összetételt állapítottak meg.

7 Összefoglalás

Összegzésésképpen megállapíthatjuk, hogy a magyar szürke évszázados múltú szarvasmarha-fajtánk, amely hosszú időn keresztül fontos szerepet játszott az ország gazdaságában. Sajnos a múlt század második felében csaknem kipusztult, de szerencsére sikerült megmenteni a fajtát, és ma kiemelt figyelem és védelem övezi.

A kutatási eredményeink alapján a populáció cyt b génje viszonylag egyöntetűnek tekinthető, a vizsgált egyedek több, mint kétharmadában azonos, ez feltételezhetően a gén kódoló jellegéből adódik. Az eredményeket szakirodalmi forrásokkal összevetve nagyjából hasonló eredményeket kaptak más, hagyományos szarvasmarha fajták esetében is: érdekes módon a közeli rokon román szürke esetében változatosabb cyt b gént írtak le, ami a kutatás alacsonyabb mintaszámának a következménye is lehet.

Javasolható a további vizsgálatok szempontjából a kontroll régió kutatása, hagyományos juh fajtákból származó eredmények alapján ez a régió várhatóan nagyobb változatosságot mutat majd, mint a cyt b.

A magyar szürke hagyományos, ősi haszonállatfajtánk, nemzeti kincsként a fajta megőrzése közös érdekünk, nemes feladatunk. Reméljük, hogy jelen kutatás hatására a fajta genetikai sokféleségét feltáró további vizsgálatok folynak majd, illetve az eredmények hozzájárulnak a családok génállományának a megőrzését célzó tenyésztési törekvések sikerességéhez.

A fajta múltbeli felhasználása jórészt eltűnt ugyan, de azt gondolom, hogy a modern, fenntarthatóságra törekvő mezőgazdaságban, a természetvédelemben, a háziállatfajok genetikai sokféleségének megőrzésében, a turizmusban és a hagyományaink ápolásában azt gondolom, méltó helye van ezeknek a nemes állatoknak.

8 Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket szeretnénk kifejezni Kaltenecker Endrének, a Magyar Szürke Szarvasmarhát Tenyésztők Egyesülete ügyvezetőjének, a tenyésztési adatok rendelkezésünkre bocsájtásáért.

Dr. Józsa Csillának, a Nébih-Ádi Kaposvári Állategészségügyi Diagnosztikai Osztály referensének, a Nébih-minták átadásáért.

A DNS minták laboratóriumi előkészítésében nyújtott segítségért hálánkat fejezzük ki Keindl Ágnes laboratóriumi asszisztensnek.

A genetikai vizsgálatok elvégzése és feldolgozása a Budapesti Állatorvostudományi Egyetem stratégiai kutatási alapja (SRF-001 sz. támogatás) támogatásával valósult meg.

9 Irodalomjegyzék

1. Burger G, Gray M, Lang B (2004) Mitochondrial genomes: anything goes. Trends in genetics : TIG 19:709–716. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.012>
2. Taanman J-W (1999) The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. Biochimica et biophysica acta 1410:103–23. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)
3. Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Research 27:1767–1780. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>
4. Clayton D (1992) Structure and function of the mitochondrial genome. Journal of inherited metabolic disease 15:439–47. <https://doi.org/10.1007/BF01799602>
5. Lavrov D, Pett W (2016) Animal Mitochondrial DNA as We Do Not Know It: mt-Genome Organization and Evolution in Nonbilaterian Lineages. Genome Biology and Evolution 8:evw195. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw195>
6. Chen X, Butow R (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. Nature reviews Genetics 6:815–825. <https://doi.org/10.1038/nrg1708>
7. Ladoukakis M, Zouros E (2017) Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: Rules and exceptions. Journal of Biological Research-Thessaloniki 24:. <https://doi.org/10.1186/s40709-017-0060-4>
8. Allio R, Donegà S, Galtier N, Nabholz B (2017) Large Variation in the Ratio of Mitochondrial to Nuclear Mutation Rate across Animals: Implications for Genetic Diversity and the Use of Mitochondrial DNA as a Molecular Marker. Molecular biology and evolution 34:. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx197>
9. Tan MH, Gan HM, Lee YP, Bracken Grissom H, Chan T-Y, Miller A, Austin C (2019) Comparative mitogenomics of the Decapoda reveals evolutionary heterogeneity in architecture and composition. Scientific Reports 9:. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47145-0>
10. Gutiérrez-Merino C, Martínez-Costa O, Monsalve M, Samhan-Arias A (2021) Structural Features of Cytochrome b5–Cytochrome b5 Reductase Complex Formation and Implications for the Intramolecular Dynamics of Cytochrome b5 Reductase. International Journal of Molecular Sciences 23:118. <https://doi.org/10.3390/ijms23010118>
11. Kartavtsev Y (2021) Some Examples of the Use of Molecular Markers for Needs of Basic Biology and Modern Society. Animals 11:1473. <https://doi.org/10.3390/ani11051473>
12. Kartavtsev Y, Redin A (2019) Estimates of Genetic Introgression, Gene Tree Reticulation, Taxon Divergence, and Sustainability of DNA Barcoding Based on Genetic Molecular Markers. Biology Bulletin Reviews 9:275–294. <https://doi.org/10.1134/S2079086419040042>

13. Naue J, Hansmann T, Schmidt U (2014) High-Resolution Melting of 12S rRNA and Cytochrome b DNA Sequences for Discrimination of Species within Distinct European Animal Families. *PloS one* 9:e115575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115575>
14. Prihandini P, Primasari A, Luthfi M, Efendy J, Pamungkas D (2020) Genetic Diversity of Mitochondrial DNA Cytochrome b in Indonesian Native and Local Cattle Populations. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 25:39. <https://doi.org/10.14334/jitv.v25i2.2496>
15. López-Oceja A, Gamarra D, Borragan S, Jiménez-Moreno S, de Pancorbo MM (2016) New cyt b gene universal primer set for forensic analysis. *Forensic Science International: Genetics* 23:. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.001>
16. Ray S (2014) Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology* 02: <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
17. Jenkins TL, Castilho R, Stevens JR (2018) Meta-analysis of northeast Atlantic marine taxa shows contrasting phylogeographic patterns following post-LGM expansions. *PeerJ* 6:e5684. <https://doi.org/10.7717/peerj.5684>
18. Megarani D, Nugroho H, Andarini Z, Surbakti Y, Widayanti R (2020) Genetic characterization and phylogenetic study of Indonesian indigenous catfish based on mitochondrial cytochrome B gene. *Veterinary World* 13:96–103. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.96-103>
19. Rovie-Ryan J, Khan F, Zainuddin Z, Ahmad A, Gani M, Julaihi A, Saaban S (2017) Molecular phylogeny of the Old World porcupines (Family Hystricidae) using mitochondrial cytochrome B gene. *Journal of Sustainability Science and Management* 12:1–11
20. Radu D, Ciorpac M, Cojocaru D, Ghiorghita G, Deju R, Cătănoiu S, Simon D, Gorgan D (2016) The investigation of cytochrome b gene in order to elucidate the taxonomic uncertainties between European bison (*Bison bonasus*) and its relatives. *Romanian Biotechnological Letters* 22:
21. Wang X, Pei J, Bao P, Cao M, Guo S, Song R, Song W, Liang C, PL Y, Guo X (2021) Mitogenomic diversity and phylogeny analysis of yak (*Bos grunniens*). *BMC Genomics* 22:. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07650-x>
22. Sulaiman Y, Wu C, Zhao C (2011) Phylogeny of 19 Indigenous Sheep Populations in Northwestern China Inferred from Mitochondrial DNA Control Region. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6:71–79. <https://doi.org/10.3923/ajava.2011.71.79>
23. Margawati ET, Volkandari SD, Indriawati I, Ridwan M (2017) Genetic Diversity of Bali cattle from several locations in Indonesia Based. In: *Proceedings the 7th ISTAP The 7th International Seminar on Tropical Animal Production*. Faculty of Animal Science, universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Indonesian Society for Sustainable Tropical Animal Production (ISSTAP), Yogyakarta, Indonesia

24. Firdhausi N, Farajallah A, Perwitasari D (2021) Phylogenetic Study of Madura Cattle Based on Mitochondrial Cyt b and D-loop Sequences. *Buletin Peternakan* 45:14. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v45i1.48557>
25. Kikkawa Y, Amano T, Suzuki H (1995) Analysis of genetic diversity of domestic cattle in east and Southeast Asia in terms of variations in restriction sites and sequences of mitochondrial DNA. *Biochem Genet* 33:51–60. <https://doi.org/10.1007/BF00554558>
26. Cai X, Chen H, Lei C, Wang S, Xue K, Zhang B (2007) MtDNA Diversity and genetic lineages of eighteen cattle breeds from *Bos taurus* and *Bos indicus* in China. *Genetica* 131:175–83. <https://doi.org/10.1007/s10709-006-9129-y>
27. Hussain T, Babar M, De Donato M, Wajid A, Nadeem A, Ahmad Z, Khan W, Peters S, Imumorin I (2018) Phylogeny of Pakistani Cattle Breeds using Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Pakistan Journal of Zoology* 50:. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.6.2029.2035>
28. Widodo WT, Furqoni AH, Yudianto A, Wahyuningsih SPA (2018) The Identification of Human and Animal Blood Mixtures Using Human Cytochrome b Gene. *Advances in Social Science, Education and Humanities Research (ASSEHR)* 371–373. <https://doi.org/10.2991/icpsuas-17.2018.81>
29. Olivieri C, Marota I, Rizzi E, Ermini L, Fusco L, Pietrelli A, De Bellis G, Rollo F, Luciani S (2014) Positioning the Red Deer (*Cervus elaphus*) Hunted by the Tyrolean Iceman into a Mitochondrial DNA Phylogeny. *PloS one* 9:e100136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100136>
30. López-Oceja A, Núñez C, Baeta M, Gamarra D, de Pancorbo MM (2017) Species identification in meat products: A new screening method based on high resolution melting analysis of cyt b gene. *Food Chemistry* 237:. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.004>
31. Čekovská K, Sanda R, Ašenbrenerová E, Kassar A, Zogaris D, Pappalardo A, Tarkan A, Vasil'eva E, Santos D, Vukić J (2023) Cytochrome b Sequencing as a Tool for Identification of Morphologically Similar Mediterranean Gobies *Gobius incognitus* and *Gobius bucchichi* (Actinopterygii: Gobiidae). *Journal of Marine Science and Engineering* 11:2289. <https://doi.org/10.3390/jmse11122289>
32. Fernandes T, Amaral J, Mafra I (2020) DNA barcode markers applied to seafood authentication: an updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61:1–32. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1811200>
33. Seddigh S, Darabi M (2017) Functional, structural, and phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b (cytb) in insects. *Mitochondrial DNA Part A* 29:1–17. <https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1275596>
34. Arnold A, Andersen E, Taylor M, Steidl R (2017) Using cytochrome b to identify nests and museum specimens of cryptic songbirds. *Conservation Genetics Resources* 9:. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0680-2>
35. Ali Q, Zahid O, Mhadhbi M, Jones B, Darghouth M, Afshan K, Birtles R, Sargison N, Betson M, Chaudhry U (2022) Genetic characterisation of the *Theileria annulata*

cytochrome b locus and its impact on buparvaquone resistance in bovine. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 20:.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2022.08.004>

36. Zenke P, Egyed B, Pádár Z (2017) A vadászható fajok védelme: az orvvadászat bizonyíthatósága az igazságügyi genetika segítségével: Eseti alkalmazások. *Magyar állatorvosok lapja* 139:631–639
37. Iyengar A (2013) Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review. *Journal for Nature Conservation* 22:195–205.
<https://doi.org/10.1016/j.jnc.2013.12.001>
38. Farag M, Bohi K, Khalil S, Alagawany M, Arain M, Khan S, Tiwari R, Dhama K (2020) Forensic applications of mitochondrial cytochrome b gene in the identification of domestic and wild animal species. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 8:1–8. [https://doi.org/10.18006/2020.8\(1\).1.8](https://doi.org/10.18006/2020.8(1).1.8)
39. Czeglédi L, Sziszkosz N, Kusza S (2018) Molekuláris biológiai technikák az élelmiszer eredetvizsgálatban, 3. kiadás. Debreceni Egyetem, Debrecen
40. Jánosi A, Horváth-Szancsics E, Nagy A, Szerdahelyi E, Szabó E, Takács K (2019) Bioaktív molekulákra alapozott kutatások a NAIK ÉKI-ben (Második rész): Fehérje- és DNS-alapú vizsgálatok. *Magyar kémikusok lapja* 74:9–12
41. Dooley J, Paine K, Garrett S, Brown H (2004) Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat science* 68:431–8.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.04.010>
42. Colombo F, Marchisio E, Pizzini A, Carlo C (2002) Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian “Mortara” salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. *Meat science* 61:291–294.
[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00195-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00195-4)
43. Chisholm J, Conyers C, Booth C, Lawley W, Hird H (2005) The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Science* 70:727–732.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.009>
44. Aina G, Erwanto Y, Hossain MA, Johan M, Ali M, Rohman A (2019) The employment of q-PCR using specific primer targeting on mitochondrial cytochrome-b gene for identification of wild boar meat in meatball samples. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 6:300. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f348>
45. Rohman A, Pebriyanti N, Siswindari S, Windarsih A, Kurniawati D, Larasati R, Yulisa H (2020) Real-time polymerase chain reaction for identification of dog meat in adulterated beef meatball using specific primer targeting on cytochrome-b for halal authentication. *International Journal of Food Properties* 23:2231–2241.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1844748>
46. Munira S, Jahura F, Hossain M, Bhuiyan M (2016) Molecular detection of cattle and buffalo species meat origin using mitochondrial cytochrome b (Cyt b) gene. *Asian Journal of Medical and Biological Research* 2:177.
<https://doi.org/10.3329/ajmbr.v2i2.29008>

47. Yacoub H, Sadek M (2016) Identification of Fraud with Pig stuffs in chicken processed meat through information of mitochondrial cytochrome b. *Mitochondrial DNA* 28:1–5. <https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1197220>
48. Gáspárdy A, Wagenhoffer Z, Fűrlinger D, Halmágyi M, Bodó I, Lancioni H, Maróti-Agóts Á (2023) Matrilineal Composition of the Reconstructed Stock of the Szekler Horse Breed. *Agriculture* 13:456. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020456>
49. Sziszkosz N, Kusza S, Jávör A, Mihók S (2014) A hucul kancacsaládok azonosítása mtDNS markerrel. *Agrártudományi Közlemények* 57:75–79
50. Mkize L, Zishiri O (2020) Population genetic structure and maternal lineage of South African crossbred Nguni cattle using the cytochrome b gene in mtDNA. *Tropical Animal Health and Production* 52:. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02231-8>
51. Kovács E, Harmat L, Tempfli K, Sáfár L, Becskei Z, Maróti-Agóts Á, Gáspárdy A (2020) Ergebnisse der Sequenzanalyse des mitochondrialen Gens Cyt-b von Cikta Schafen. *Danubian Animal Genetic Resources* 5:19–25
52. Bodó I, Gera I, Koppány G (2004) *The Hungarian Grey cattle breed*, 2nd edition. Association of the Hungarian Grey Cattle Breeders (A Magyar Szürke Szarvasmarhát tenyésztők Egyesülete), Budapest
53. Grădinaru A, Petrescu-Mag I, Oroian F, Balint C, Oltean I (2018) Milk Protein Polymorphism Characterization: a Modern Tool for Sustainable Conservation of Endangered Romanian Cattle Breeds in the Context of Traditional Breeding. *Sustainability* 10:534. <https://doi.org/10.3390/su10020534>
54. Davidescu M, Simeanu D, Gorgan D-L, Ciorpac M, Creanga S (2022) Analysis of Phylogeny and Genetic Diversity of Endangered Romanian Grey Steppe Cattle Breed, a Reservoir of Valuable Genes to Preserve Biodiversity. *Agriculture* 12:2059. <https://doi.org/10.3390/agriculture12122059>
55. Csippán P, Ferenczi L (2020) Fifty shades of grey? The impact of the Hungarian cattle trade on cattle breeding in the late medieval and early modern period. *Journal of Archaeological Science: Reports* 29:. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2019.102031>
56. Janák V, Novak K, Kysely R (2024) Late History of Cattle Breeds in Central Europe in Light of Genetic and Archaeogenetic Sources—Overview, Thoughts, and Perspectives. *Animals* 14:645. <https://doi.org/10.3390/ani14040645>
57. Bodó I (2000) A magyar szürke marha. In: Bodó I (ed) *Eleven örökség - Régi magyar háziállatok*. Agroinform Kiadó, Budapest, pp 40–43
58. Baracskaý L (2017) A magyar szürke szarvasmarha. *Östermelő plusz* 2–3
59. Fara A (2015) *An Outline of Livestock Production and Cattle Trade from Hungary to Western Europe in late Middle Ages and early Modern Period (XIVth-XVIth centuries)*. CRISIA 87–95
60. Senczuk G, Guerra L, Mastrangelo S, Campobasso C, Kaouadji Z, Imane M, Marletta D, Kusza S, Karsli T, Gaouar SBS, Pilla F, Ciani E, Consortium T (2020) Fifteen

Shades of Grey: Combined Analysis of Genome-Wide SNP Data in Steppe and Mediterranean Grey Cattle Sheds New Light on the Molecular Basis of Coat Color. *Genes* 11:932. <https://doi.org/10.3390/genes11080932>

61. (2021) Hungarian Grey Cattle. In: Department of Animal & Food Sciences, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University. <https://breeds.okstate.edu/cattle/hungarian-grey-cattle.html>. Accessed 25 Nov 2024
62. Bartosiewicz L (1997) The Hungarian Grey cattle: A traditional European breed. *Animal Genetic Resources Information* 21:.. <https://doi.org/10.1017/S1014233900000924>
63. Penksza K, Saláta D, Fűrész A, Penksza P, Fuchs M, Pajor F, Sipos L, S.-Falusi E, Wagenhoffer Z, Szentes S (2024) Are Hungarian Grey Cattle or Hungarian Racka Sheep the Best Choice for the Conservation of Wood-Pasture Habitats in the Pannonian Region? *Agronomy* 14:846. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040846>
64. (2015) The Hungarian Grey cattle. In: Collection of Hungarikums – Collection of Hungarian Values, Hungarikum Committee, Ministry of Agriculture. <https://www.hungarikum.hu/en/content/hungarian-grey-cattle>. Accessed 25 Nov 2024
65. Zsolnai A, Maróti-Agóts Á, Kovacs A, V. B, E. K, Anton I (2020) Genetic position of Hungarian Grey among European cattle and identification of breed-specific markers. *animal* 14:.. <https://doi.org/10.1017/S1751731120000634>
66. Maróti-Agóts Á, Zoldag L, Solymosi N, Egyed B (2008) Effect of different sampling methods on cattle mtDNA phylogenetic studies. In: Book of Abstracts of the 59th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Book of abstracts No. 14 (2008) Vilnius, Lithuania 24–27 August 2008. Animal Genetics Session 15, Poster 49, Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, pp 130
67. Annus K, Maróti-Agóts Á, Pásztor K, Vada E, Sáfár L, Gáspárdy A (2015) Hazai cigájaváltozatok jellemzése a mitokondriális DNS kontrollrégiója alapján. *Magyar Állatorvosok Lapja* 137:625–631
68. Kim J-H, Byun MJ, Kim M-J, Suh SW, Ko Y-G, Lee CW, Jung K-S, Kim ES, Yu DJ, Kim WH, Choi S-B (2013) mtDNA Diversity and Phylogenetic State of Korean Cattle Breed, Chikso. *Asian-Australas J Anim Sci* 26:163–170. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12499>
69. Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693–709. <https://doi.org/10.1093/genetics/133.3.693>
70. Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
71. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins S, Sánchez-Gracia A (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular biology and evolution* 34:.. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

72. Tarekegn G, Ji X, Bai X, Liu B, Zhang W, Birungi J, Djikeng A, Tesfaye K (2018) Variations in mitochondrial cytochrome b region among Ethiopian indigenous cattle populations assert *Bos taurus* maternal origin and historical dynamics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 31:. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0596>
73. Hartatik T, Nur D, Hariyono DNH, Adinata Y (2018) Short Communication: Genetic diversity and phylogenetic analysis of two Indonesian local cattle breeds based on cytochrome b gene sequences. *Biodiversitas* 20:17–22. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200103>
74. Gáspárdy A, Zenke P, Kovács E, Annus K, Posta J, Sáfár L, Maróti-Agóts Á (2022) Evaluation of Maternal Genetic Background of Two Hungarian Autochthonous Sheep Breeds Coming from Different Geographical Directions. *Animals* 12:218. <https://doi.org/10.3390/ani12030218>
75. Owaid J, Yheia A, Ahmed F (2021) Genetic variation analysis of cytb gene of cattle bred in Iraq. *University of Thi-Qar Journal of agricultural research* 9:2020. <https://doi.org/10.54174/utjagr.v9i1.103>
76. Jianbin L, Ding X, Zeng Y, Yaojing Y, Guo X, Tingting G, Chu M, Wang F, Han J, Feng R, Sun X, Niu C, Yang B, Guo J, Yuan C (2016) Genetic Diversity and Phylogenetic Evolution of Tibetan Sheep Based on mtDNA D-Loop Sequences. *PloS one* 11:e0159308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159308>
77. Guo J, Du L-X, Ma H-Y, Guan W, Li H-B, Zhao Q-J, Li X, Rao S-Q (2005) A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Animal genetics* 36:331–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01310.x>



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Vásárhelyi Anna Mária.....

Neptun-kódja: WVN6Q.....

A témavezető neve és beosztása: Gáspárdy András, egyetemi docens, tanszékvezető.....

Tanszék: Állattenyésztési és Genetikai Tanszék (Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállattudományi Intézet).....

A diplomadolgozat címe: A citokróm b gén teljes reprezentatív vizsgálata a magyar szürke szarvasmarha hortobágyi családjaiban.....

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					

Érdemjegy az első félév végén:

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2024	09	09	A szakdolgozati téma megbeszélése, a szükséges feladatok egyeztetése a témavezetővel	Dr. Gáspárdy András
2.	2024	10	7	A szakirodalmi forrásmunkák kiválasztása, azok feldolgozásának megkezdése, valamint a cyt b szekvenciák statisztikai értékelése; a hallgató jelenlétével, részben önálló munkájával	Dr. Gáspárdy András
3.	2024	10	28	A dolgozat megírásának megkezdése, a szekvencia-analízis eredményeinek szóveges és ábrán való elkészítése; szorgalmas, körültekintő önálló munka	Dr. Gáspárdy András
4.	2024	11	14	A dolgozat véglegesítésének megkezdése, konzultáció	Dr. Gáspárdy András

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



5.	2024	12	06	A dolgozat lezárása, konzultáció	Dr. Farkas András
----	------	----	----	----------------------------------	-------------------

Érdemjegy a második félév végén: ...5 (jeles).....

A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: ...

Dr. Farkas András
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása:

Átvétel dátuma: