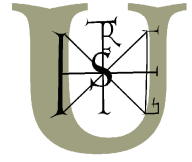




SZENT ISTVÁN EGYETEM  
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR  
ÁLLATTENYÉSZTÉSI, TAKARMÁNYOZÁSTANI  
ÉS LABORÁLLAT-TUDOMÁNYI INTÉZET



## **Mitokondriális polimorfizmusok kiterjesztett vizsgálata a mangalica sertésfajtában**

Salgóné Rasztik Viktória  
szigorló állatorvostan-hallgató

Témavezetők:  
Zenke Petra, PhD.  
Maróti–Agóts Ákos, PhD.

Budapest

2011

## Tartalom

1. Bevezetés .....	3
2. Irodalmi áttekintés .....	4
2.1 A mitokondrium .....	4
2.2 A sertés ( <i>Sus scrofa</i> ) domesztikációja .....	5
2.3 A mangalica .....	8
2.3.1 A mangalica fajta kialakulásának története .....	8
2.3.2. Fajtaleírás és típusok .....	10
3. Anyag és módszer .....	13
3.1. Mitokondriális vizsgálatok mintavételi szempontjai .....	13
3.2. Vizsgálatba vont minták .....	15
3.3. Agarózgél elektroforézis .....	15
3.4. A polimeráz láncreakció, PCR .....	17
3.5. PCR termék tisztítás .....	19
3.6. Szekvenálási PCR és a kapott termékek tisztítása, analízise .....	20
3.7. Szekvenálás: ABI Prism 310 Genetic Analyzer típusú géppel .....	21
4. Eredmények .....	23
4.1. Molekuláris genetikai eredmények .....	23
4.2. Statisztikai elemzés .....	23
4.3. Haplotípusok összehasonlítása .....	25
5. Következtetések .....	27
6. Összefoglalás .....	29
7. Summary .....	30
8. Köszönetnyilvánítás .....	31
9. Felhasznált irodalom .....	32
10. Függelék .....	35
10.1. Reagensok összefoglaló táblázatai .....	35
10.2. Genetikai fogalomtár .....	36
10.3. Rövidítések jegyzéke .....	38

## 1. Bevezetés

A modern fajtatiszta sertés tenyésztés igényei, a „hungarikum”-ok kialakítása és megőrzése, a védett állatfajok fenntartása (illetve tiltott kereskedelme és orvvadászata elleni harc), a génmegőrzési programok, a szigorú élelmiszerhigiéniai minőségi követelmények, a rohamosan fejlődő kriminalisztika és a szerteágazó kutatások megkövetelik az egyre korszerűbb módszerekkel történő, megbízható eredményeket produkáló és széles körben informatív (a pontos egyed azonosítástól, a származás ellenőrzésén át, a faji eredet meghatározásáig) vizsgálatok elvégzését. Ezen követelmények tudományos kielégítésére a modern biotechnológiai és molekuláris genetikai technikák – manapság kiemelten a DNS polimorfizmusok vizsgálata – szolgálnak, kiegészülve az informatikai rendszerek egyszerű, ámde gyors és széleskörű elérhetőségével.

Munkám során érintem az egyed azonosítás, a származás ellenőrzés és a faji eredet meghatározás összetett feladatának különböző részeit. Egyed azonosításnál, értékes állatok esetén, vizsgálható, hogy az adott állat valóban rendelkezik-e a vélt genetikai teljesítménnyel, valóban mentes-e bizonyos genetikai terheltségektől, illetve a kriminalisztikában is jelentős szerepe van. Származás ellenőrzésnél arra ellenőrizhető, hogy tényleg azokkal a felmenőkkel rendelkezik-e a vizsgálat alanya, mint azt szóban vagy írásban állítják, faji eredet meghatározásakor pedig vizsgálható, mely vonalak hogyan alakultak ki, mely fajtákkal kerültek kapcsolatba, mely területről származó ősökkel mutatható ki hasonlóság, egyezés.

Célkitűzésem az volt, hogy a mitokondriális örökítőanyag hipervariábilis (HV) régiójának kiterjesztett vizsgálatával feltérképezsem a mangalica fajtaváltozatok közti hasonlóságokat és különbségeket valamint az esetleges egyedi jellegzetességeket. Továbbá célom volt a mangalica és vadsertések közti, a vizsgált szakaszban fellelhető különbség(ek) kimutatása is.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 A mitokondrium

A mitokondrium a biológiai oxidáció, tehát az energiatermelés központja az eukarióta sejtekben. Igen változatos számban – 1-től akár 100000-ig – jelen lehet a különböző sejtípusok citoplazmájában. 2 µm hosszúságú és 0,5 µm átmérőjű sejtorganellumok, melyeket kettős membrán határol. Funkcionálisan négy térre osztható: külső membrán, belső membrán, a két membrán közti tér és a mátrix. A mátrixban található a mitokondriális DNS (mtDNS). (VERESEGYHÁZY, 2003.) A mitokondriális genom gyűrűs szerkezetű, amely hasonlóságot mutat a bakteriális genommal, ugyanakkor a gereincesek törzsén belül is homológ, így ősi jellegére következtetnek a tudósok.(ZÖLDÁG, 2008.) Az endoszimbionta elméletet, miszerint az eukarióta szervezetbe integrálódott ősi prokarióta sejtről van szó, támasztja alá, hogy van saját nukleinsav és riboszóma készlete, illetve az aerob prokarióták anyagcsere-folyamataiban résztvevő enzimrendszerek szerkezete ugyan némileg eltérő az eukarióta sejtek ma ismert mitokondriális enzimrendszereitől, mégis szerveződésük nagyon hasonló. (VERESEGYHÁZY, 2003.)

A mitokondriális DNS is kódoló és nem kódoló szakaszokból épül fel. Az egyik ilyen gyakran vizsgált kódoló szakasz a cytochrom-b (CYT-B) gén enzimeket kódoló része, mely fajok megkülönböztetésére is alkalmazható. A mitokondriális DNS által kódolt genetikai információ emlősökben: 2 rRNS- t, 13 fehérjét (enzimeket), 22 tRNS- t határoz meg. Fontos nem kódoló szakasz a kontroll régió vagy más néven D-hurok/ D-loop, melynek nagymértékű polimorfizmusa az egyedazonosításban használatos. A mtDNS a sejtmagi DNS-nél ellenállóbb, stabilabb, konzerválódott molekula. Ez teszi alkalmassá, hogy kriminalisztikai vizsgálatok alapjául szolgáljon. Az egyes kódoló szakaszainak változása nagyon lassú, kismértékű folyamat; „egyes becslések szerint  $10^6$  évente 2-4%-os mutációs aránnyal számolhatunk”. (ZÖLDÁG, 2008.)

A mtDNS kizárólag a petesejt révén jut át a zigótába, tehát csak maternálisan (anyai ágon) öröklődik, így vizsgálata az anyai vonalak feltárására is használható. A mtDNS változatai, az úgynevezett haplotípusok, a mutációk felhalmozódása által jönnek létre. A haplotípusok földrajzi előfordulásának és leszármazási kapcsolatainak vizsgálatával foglalkozik a filogeográfia, melynek segítségével a különböző populációk esetében vizsgálható, hogy honnan indultak el a kolonizációs folyamataik, milyen útvonalon jutottak el

a mai élőhelyekre és hogyan alakult ki a jelenlegi genetikai struktúra az adott csoportban. (PECSENYE, 2006.)

A mtDNS effektív populációmérete alacsonyabb, mint a magi DNS-nek, így téve alkalmassá közeli rokon populációk közti genetikai kapcsolatok felderítésére és a palacknyak hatás populációkra gyakorolt következményeinek prezentálására, viszont hátránya, hogy nem mutatja a hím-mediált génáramlást, ami viszont egy erőteljes hatás volt a sertések modern kori fejlődésére, írták le Leutkemeier és társai 2009-ben megjelent cikkükben, melyhez 149 nem rokon (közös nagyszülővel nem rendelkező) európai és ázsiai sertés egyedet vontak be munkájukba (három európai vadsertés populációból, öt európai házi sertés fajtából, kettő ázsiai vadsertés populációból és három ázsiai házi sertés fajtából), mtDNS és mikroszatellita vizsgálatokat végezve el. (LEUTKEMEIER et al., 2009.)

A sejtmagi, másnéven nukleáris genom méretarányait tekintve 18000-szerese a mitokondriális genomnak. Az emlősök átlagos genomja 2,3-3 milliárd bázispárból (bp) áll, a sertéseké 2,3 milliárd bp. A nukleáris genom a mtDNS gyűrűs szerkezetével szemben kromoszómákba rendeződik. A házi sertés  $2n$  kromoszómaszáma 38, míg az európai (*Sus scrofa*) és ázsiai (*Sus vittatus*) vadsertésé kelet felé haladva 36, 37 és 38 is lehet (az akrocentrikus kromoszómák összeolvadásával /fúziójával/ és a metacentrikus kromoszómák szétválásával /fissziójával/ változhat meg a kromoszómaszám). (ZÖLDÁG, 2008.)

## **2.2 A sertés (*Sus scrofa*) domesztikációja**

A domesztikáció (házasítás) lényegét Bartosievicz László két fő pontban látja: „szimbiózis, azaz kölcsönös előnyökön alapuló együttélés, mely során az emberek hasznot húznak háziállataikból, de védelmezik is őket a szigorú természetes szelekció számos hatásával szemben és a fogságban szaporítás, amelynek révén az ember tartósan beavatkozhat a természetes kiválasztódás folyamatába többé-kevésbé alakítva egy-egy vadállatfaj házasított formáit.” (BARTOSIEVICZ, 2006.) Az újkőkorig az emberek legjelentősebb állati fehérje forrását a vadászattal elejtett állatok húsa képezte, az újkőkorból azonban valami új vette kezdetét: a termelő gazdálkodás. Mi is vezetett az állatok házasításához? Legfőbb kezdeti (tehát elsődleges) ok gazdasági haszonállatok esetében az állandó húsellátás igénye, hogy a táplálék az ember számára ne a vadászat sikerén múljon, illetve a hús tárolásának akkor még megoldhatatlan mivolta is döntő volt. Ehhez a későbbiekben a különböző állatfajok esetében még számos ok csatlakozott úgymint kultikus tényezők, kedvtelés, egyéb; másodlagos gyakorlati hasznosítás – pl.: zsír, tej, gyapjú, bőr, tojás, fizikai erő, etc. –

kialakítva a domesztikáció első mozgató rugóit. A három fő tényező (tehát az elsődleges és másodlagos gyakorlati hasznosítás, a vallási szempontok és a kedvtelés) szerepe és súlya kultúránként és állatfajonként más és más volt. Sertés esetében, bár mindenevő létére táplálék-konkurens az embernek, a hústermelési képessége meghatározó volt; „a felvett takarmányt (energiában kifejezve 35%-ot elérő mértékben) alakítja hússá”.(BARTOSIEVICZ, 2006.) Bökönyi Sándor ezt a következőképpen fogalmazta meg: „kezdetben minden állatot a húsáért tartottak, de a sertés bizonyult a legalkalmasabbnak”. (BÖKÖNYI, 1988.) Másodlagos hasznosíthatóságként leírták a termőföldek sertésekkel való túratását, ami által a pihentetett föld tápereje nőtt, illetve Franciaországban a jó szaglását szarvasgomba felkutatására használták. Ma már hobbiállatként és laboratóriumi kísérleti modellként is tartanak bizonyos sertésfajtákat. Az egyes állatok vad őseinek házasítása állatfajonként és kultúránként többféle módon történhetett:

1. szakosodott, csordák követésén alapuló vadászati módból továbblépve, a vad nyájak egyedeit vagy kisebb csoportjait elszigetelték, ezáltal durván beavatkozva a természetes szaporodási rendszerbe,

2. az egyedek befogása, amely a kelepcés vadászatból alakulhatott ki, de a legtöbb háziállatfaj őseire jellemző fejlett csordaösztönt áttörve kellett ezen állatokat betörni, megszelídíteni,

3. szoktatás, azon állatfajok esetében történhetett ezen módszerrel a házasítás, melyek maguk is az ember nyomába szegődtek.

Utóbbi csoportba sorolható a kutyák és a macskák ősei mellett a házi sertés őse is, amit vonzott a települések környékén felhalmozódott ételhulladék, sőt az ürülék is, ami számára még hasznosítható, félig feltárt tápanyagokat tartalmaz. A sertések rendszertanilag a párosujjú patások (Artiodactyla) rendjébe, azon belül a nem kérődzők (Nonruminantia, Suiformes) alrendjébe, a disznófélék (Suidae) családjába tartoznak. „A házi sertés vad őse az eurázsiai vaddisznó (*Sus scrofa* L. 1758.), amelynek számos, földrajzi térségenként eltérő változata van. A palearktikus elterjedésű, tehát a csaknem egész Euráziában és Észak-Afrikában egyaránt előforduló vaddisznó házasításának Európa szerte számos központja létezhetett. Mai ismereteink szerint a Kr.e. VII. évezredre az óvilág több lelőhelyén (a Balti- és a Fekete-tenger partvidékén, Anatóliában, a Vaskapu környékén, az Ibériai-félszigeten) megjelentek a korai házasítás csonttani jeleit is mutató alakok. A legkorábbi leletek a délkelet-anatóliai Çayönü és Hallan Çemi lelőhelyekről (Kr.e. 8000- 7000) ismertek.”(BARTOSIEVICZ, 2006.) Eltérő nézőpontba helyezi a sertés házasítását Amills és társai 2010-ben megjelent cikke, melyben munkájuk eredményei alapján feltételezik, hogy a *Sus scrofa* Délkelet-

Ázsiából származik, majd innen terjedt át Indiába és Kelet-Ázsiába, nyugat felé haladva pedig elérte Európát. A későbbiekben a keleti és nyugati állomány genetikailag elszigetelődött egymástól. Kínát nevezik meg a háziasítás egyik legfőbb központjának, kiemelten a Mekong és Yangtze régiót, bár elismerik, hogy a távol-keleti sertések domesztikációja több központú eredettel rendelkezhetett. Az európai házi sertések eredetét tisztázatlannak ítélik, mivel a mitokondriális markerek elemzése a közel-keleti haplotípusok hiányát mutatta az európai házi sertések genetikai készletében (ami ahhoz a következtetéshez vezetne, hogy az Európában függetlenül történt a háziasítás), míg az autoszómális és Y-kromoszóma markerek vizsgálata az európai és közel-keleti sertéspopulációk közeli rokonsági viszonyát tükrözte. A háziasítás után éveken keresztül Kína és Európa vált a két fő sertéstartó központtá az Óvilágban, kialakítva sokféle variációját a helyi környezeti tényezőkhöz tökéletesen alkalmazkodott típusoknak. Ezek a sertések a szárazföldi, majd a kezdetleges tengeri kereskedelem révén az egész eurázsiai kontinensen szétterjedtek, a 15-17. században pedig a tengeri kereskedelem fellendülésével eljutottak Amerikába és Afrikába is az európai népekkel. Az afrikai igen diverz génállományú sertések kapcsán munkájukban rámutattak, hogy Afrika keleti partjait az európai népek előtt már a kínaiak is elérték, így fordulhatnak elő abban a térségben távol-keleti és európai allélok egyaránt. A nyugat afrikai területeken európai ősokeket mutató fajtákat találtak. Cikkükben kitérnek még arra is, hogy egyes fajták mára az egész világon elterjedtek (pl.: Nagy fehér, Lapály, Hampshire, Duroc), mások pedig megmaradtak helyi fajtaként (pl.: Ibériai, Normand, Szicíliai, Mangalica, Tamworth, Taihu, Jinhua, stb.) (AMILLS et al., 2010.). Larson és társai 2005-ben publikált munkája szerint a sertés háziasítása Kr.e.9000 körül a Közel-Keleten történhetett meg először, majd ettől függetlenül végbement egy második domesztikációs hullám a Távol-Keleten, viszont az európai *Sus scrofa* független háziasítását nem látja kellőképpen tisztázottnak, bár vizsgálataiban az európai fajtákból származó minták egy klaszterbe tartoztak. (LARSON et al., 2005.) A Sárga folyó mentén több területről kiinduló, a helyi vadsertés populációkból eredő sertés háziasítást feltételezi Larson és társai 2010-ben megjelent cikkében. (LARSON et al., 2010.)

A sertések domesztikációját lehetővé tette, hogy fejlett társas ösztönű lények és jó alkalmazkodó képességgel rendelkeznek. A háziasítás következményeként küllemileg a gerinc vonalán futó sertetaréj kisebb lett, a test (az értékes húsrészeket adó hátizmok miatt a hosszabb törzsű egyedeket előnyben részesítették a tenyésztésben, így egyes sertésfajták hátcsigolyáinak száma eggyel több a vad ősnél) és az emésztőrendszer (hatékonyabb emésztést szolgálva) megnyúlt, a koponya arciori része megrövidült, a fülek gyakorta lelógóvá váltak, a testméret csökkent (a jó takarmányozás és az intenzív növekedés

elősegítése a csontnövekedés korai lezáródásához vezetett, így létrejött egy zömökebb testméret) és számos színváltozat alakult ki.(BARTOSIEVICZ, 2006.) Ezt a felsorolást Bökönyi Sándor könyve alapján kiegészíthetjük: a szaporaság nőtt, a szőrzet rövidebb, sokszor ritkásabb, finomabb lett, pl. mangalica esetében göndörség alakult ki, a páncél eltűnt, gyakorivá vált a természetben nem létező fehér kültakaró szín, a malacok esetében néhány kivételtől (pl.: mangalica) eltekintve eltűnt a csíkozottság, kialakult a kunkorodó farok, az álkapocsont is jelentősen kisebb lett és kevésbé robosztus, a fogazatot tekintve pedig a 1-es premoláris fog hiánya és az agyar méretének csökkenése jellemző. (BÖKÖNYI, 1988.) Zöldág László könyvét olvasva pedig még a csökkent érzékszervi működés, a csökkent életképesség és ellenállóképesség, a nagytermelésű fajták és kiváló értékmérő tulajdonságok megjelenése, a faji diverzitás szélsőséges növekedése (új allélok megjelenése által) és a szelídség is a háziasítás következményei közé sorolhatók. (ZÖLDÁG, 2008.)

Bár a történelem során a sertések megítélése igencsak változott („a kelták szent vadkanjaiból, a római és germán hősök veszedelmes ellenfeleiből mulatságos, szánandó, kissé gusztustalan figurákká váltak”(BÖKÖNYI, 1988.)) és a humán táplálkozásban való szerepük is gyakran váltott nézőpontot (állati zsiradék kontra növényi olajok egészséges mivolta, triglicerid- és koleszterin pánikok, vallási megítélések, stb.), mégis szaporasága és hústermelési hatékonysága a világon az emberi húsfogyasztás nélkülözhetetlen alanyává teszi ezt az állatfajt.

## **2.3 A mangalica**

### **2.3.1 A mangalica fajta kialakulásának története**

A törökök kiűzése után az egykori hódoltsági területeken kevés sertés maradt, mivel a törökök vallási okokból nem fogyasztottak sertéshúst. A sertésenyésztés szinte csak a Felvidékre és az erdélyi területekre korlátozódott. „Az 1700-as évek második felétől a burgonya és a kukoricatermesztés szélesebb körű elterjedésével és az erdők, legelők feltörésével, szántóterületté alakításával kezdtek megváltozni a tartás, takarmányozás feltételei. Ezek a változások az 1800-as években felgyorsultak, a folyók szabályozásával hatalmas mocsarak szűntek meg, és a helyükön előállított gabona lehetővé tette az abrakos hizlalás bevezetését.” (RADNÓCZY, 2002.) E folyamat kedvezően segítette az ekkortájt felmerülő új igényeket a sertéshús iránt; egyre inkább a magas zsír- és szalonnahozamú, lágyabb, zsírral átszöttebb húst termelő fajták felé fordult az érdeklődés, az addig hazánkban elterjedt bakonyi és szalontai sertésfajták szárazabb húsa helyett. Szerbia fejedelme, Milos



Obrenovics a szerb, az ún. sumadia sertésekkel kezdett kereskedni, melyből József Nádor is vásárolt kisjenői uradalmába, ahol ezekkel a kiváló zsírsertésekkel elkezdtek keresztezni a honos bakonyi és szalontai sertésfajtákat. Az így átalakult, új fajta lett a mangalica, mely nagyon gyorsan el is terjedt, kiszorítva az eddigi sertésfajtákat. A lakosság körében egyre népszerűbb lett ez a zsírsertésfajta, amit akkor törökfajtának, rátnak, mangaritzának vagy mangalitzának is neveztek. A második világháborúig tekintélyes állományok léteztek országszerte, a háború után azonban drasztikusan lecsökkent a létszámuk. Az 1950-es évektől megőrzési programok indultak, melyek során főleg a fenotípusos jegyek alapján tenyésztették tovább a fajtákat. Az 1990-es évektől újra felfedezték, jó stressztűrő tulajdonsága, betegségekkel szembeni ellenálló mivolta és ízletes húsa által, írta le Zsolnay és társai 2006-os cikkükben. 15 farmról 282 mangalica egyedből (73 fecskehasú mangalica, 86 vörös mangalica és 123 szőke mangalica) és 50 Duroc sertésből vett mintákból 132 nem rokon állatot vontak be munkájukba, melyben mikroszatellita markerekkel dolgoztak. Analíziseik eredményeként azt találták, hogy a három különböző kültakaró színnel rendelkező egyedek három különböző klaszterba tartoznak, így feltehetően három külön fajtáról van szó. (ZSOLNAY et al., 2006.)

*1. Táblázat: A magyarországi mangalica kocák létszámának 1927 és 2001 közti változásairól. (EGERSZEGI et al., 2003.)*

év	vörös	fecskehasú	szőke	összesen	forrás	
1927	*	*	*	1000	BALTAY, 1983	
1930	*	*	*	1920		
1935	*	*	*	6500		
1940	*	*	*	20000		
1943	*	*	*	30000		
1955	*	*	*	17691		
1959	*	*	*	4091		
1965	*	*	*	922		
1970	*	*	*	243		
1975	*	*	*	34		
1980	*	*	*	244		
1988	46	61	222	329		ZENGŐ, 1997; OMMI, 2002
1989	64	73	201	338		
1990	62	62	224	348		
1991	66	28	128	222		
1992	43	25	175	243		
1993	31	32	138	201		
1994	28	20	106	154		
1995	20	18	170	208		
1996	38	42	266	346		
1997	32	46	315	393		
1998	39	60	299	398		
1999	50	64	491	605		
2000	75	74	616	765		
2001	179	145	1001	1325		

\*hivatalos nyilvántartásokban nincs adat

Napjainkra a mangalica iránti kereslet ismét fellendülőben van a zsíros és ízletes húsa miatt, így a tenyésztők a húsát jó áron tudják eladni, ráadásul tartása környezetvédelmi szempontból is előnyös és a tradicionális tartási mód, mint turista látványosság is szerepet kap. (RÁTKY et al., 2007.)

Az 1994-ben megalakult Mangalicatenyésztők Országos Egyesülete mindezen szempontokat figyelemmel kísérve eredményesen fogja össze és szervezi a mangalica sertés tenyésztését az országban. (Forrás: [www.mangold.hu](http://www.mangold.hu)) Értékes információkat szolgáltat a magyarországi mangalica kocák létszámának 1927 és 2001 közötti változásairól Egerszegi István és társai összefoglaló táblázata (lásd: 1. Táblázat). (EGERSZEGI et al., 2003.)

### **2.3.2. Fajtaleírás és típusok**

A fej kicsi, a fülei nagyok és előre lógóak. A profilvonal enyhén homorú, a torokjázat széles, a toka nagy és a nyak rövid, hengeres. A törzs közepesen hosszú, a hát egyenes, de nem ritka a pontyhát sem (ami fajtajelleg hibának számít). A mellkas dongás és mély, a has közepesen nagy. A váll és a csapott far erős, telt, de csak közepesen izmolt. A végtag rövid, finom csontozatú és szilárd. A bőr és a szaruképletek palaszürkék. Csecsbimbók száma 5-5 általában.

#### **2.3.2.1. Szőke mangalica**

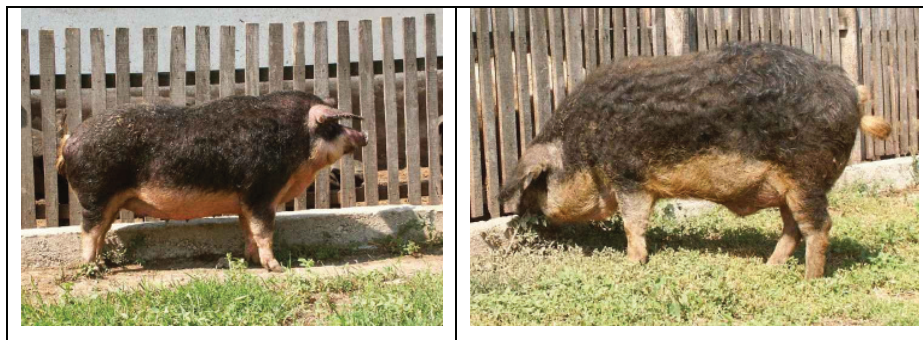
A magyar őshonos bakonyi, szalontai és alföldi sertésfajták szerb Sumadia sertéssel való keresztezése által alakult ki. A szőrzet finomszálú, télen gyaluforgácsszerűen göndör, nyáron ritkább, rövid és sima, színe a takarmány minőségétől függően a szürkétől a sárgáspirosig minden árnyalat előfordul, a pillaszőrök és a túrókarima fekete. Jelenleg a legelterjedtebb színváltozat, ami valószínűleg a kiváló anyai tulajdonságainak és a megfelelő hízekonysági mutatóknak köszönhető.



1. kép: Szőke mangalica koca malacaival (bal oldali kép) és kan (jobb oldali kép).

### 2.3.2.1.1. Fecskehasú mangalica

A szőke és fekete mangalica kereszteződéséből jött létre. A háta fekete, de a has és a combok belső oldala szőke színű. Egyéb tulajdonságaiban megegyezik a szőke mangalicával, egy kicsit kisebb rájájú, szaporább és talán kissé ellenállóbb. 1993-ra csaknem kihalt, mindössze 32 db koca volt belőle. Napjainkban szerencsére bővülni kezdett a létszám.



2.kép: Fecskehasú mangalica koca (bal oldali kép) és kan (jobb oldali kép).

### 2.3.2.1.2. Vörös mangalica

A szalontai sertés és a szőke mangalica kereszteződéséből az 1910-es években jött létre. A régebbi szakirodalom inkább javított szalontainak nevezi, de az 1960-as évekre teljesen mangalicává alakult, csak a színe maradt vöröses. 1993-ra alig maradt belőle élő példány, 31 koca volt a teljes törzskönyvezett állomány. Ma lassan gyarapszik a létszámuk.



3.kép: Vörös mangalica koca (bal oldali kép) és kan (jobb oldali kép).

### **2.3.2.2. Fekete mangalica**

A dunántúli részeken a fekete színű mangalica volt elterjedt. Őse a horvát-szerémségi fekete- azaz a nápolyi sertés, mely időnként keveredett a mangalicával, így külleme hasonult a mangalicáéval, de megőrizte fekete színét. Valamivel lassabban, de nagyobbra növekedett, mint szőke rokona és a betegségekkel szemben is ellenállóbb volt. Sajnos csak volt, ugyanis a fekete mangalica az 1970-es években kihalt, utolsó példányait a Duna szerbiai szigetein látták.

(Forrás: [www.mangold.hu](http://www.mangold.hu))

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Mitokondriális vizsgálatok mintavételi szempontjai

Fontos említést tenni arról, hogy az irodalmi áttekintésben idézett tudományos cikkek szerzői kevés, vagy pedig semmiféle adatot nem közölnek az általuk alkalmazott mintavételi eljárás körülményeiről, pedig számos tényező meghatározó lehet a vizsgálat eredményét illetően. Így a vizsgálatokba bevonandó egyedek kiválasztásának és a mintavétel döntő kritériumai:

##### a) Rokonsági fok

A minta szelekció fontos szempontja a vizsgálatokba bevonandó egyedek minél kisebb genetikai rokonsága, melyet a mangalica sertések esetén a különböző telepekről való mintagyűjtés és a dokumentációk áttekintése, vadsertések esetén (génbanki adatokra támaszkodva) a földrajzi távolság biztosított. Az egyedek közti lehető legnagyobb genetikai értelemben vett távolság a vizsgálatok reprezentatív mivolta végett szükséges. Ugyanis, amennyiben az egyedek azonosítása a cél, bár a mtDNS HV régiójának változékonysága által ez lehetséges, mégis abban az esetben, ha a minták közti rokonsági fok alacsony, sokkal informatívabb következtéseket vonhatunk le a tenyésztői munka, tartástechnológia, takarmányozás és egyéb környezeti tényezők egyedeket befolyásoló komplex hatásairól. Amennyiben származási viszonyokat, anyai felmenő ágakat, fajta eredetet szeretnénk vizsgálni, nyilvánvaló, hogy a közeli rokon egyedektől vett minták semmiképpen sem fognak széles körben értelmezhető eredményt szolgáltatni, esetleg fals következtetések levonásához vezethetnek. Ezzel szemben, ha az a vizsgálat indoka, hogy igazoljuk egy adott egyed tényleges származását, rokoni kapcsolatát egy bizonyos egyeddel, akkor természetesen a mintavételi eljárásnak a minél szorosabb rokon állatok kiválogatására kell irányulnia. Az egy fajta tartozó egyedek mitokondriális haplotípusának megállapításával kapcsolatban Dr. Maróti-Agóts Ákos 2010-es PhD értekezésében a következő mintavételi anomáliákra világít rá: (MARÓTI-AGÓTS, 2010.)

- „Random egyed.” Miszerint alacsony (1-3) mintaszám mellett, az egy fajta- egy minta rendszerben történő mintavétel esetén a véletlenszerű mintavétellel csupán a véletlenül múlik, hogy az egyed melyik mitokondriális haplotípusba tartozik. Ennek ellensúlyozása bizonyos fokban a mintaszám emelésével volna lehetséges.

- „Random pedigré.” Ez a módszer a véletlenszerűen kiválasztott egyedek származási lapját is ellenőrzi, amely már kiküszöböli a nőági rokonság átfedő hatását, de mégsem akadályozza meg az azonos vonalból származó egyedek kiválasztását, mert ahhoz legalább 4 felmenő generációt kellene vizsgálni.

- „Random founder.” „Founder” alatt az anyai alapítót kell érteni. Ez esetben a vizsgálatokba bevonandó egyedek kiválasztásakor a törzskönyvi adatok alapján igyekeznek a mintavételt végző személy a vonal alapítóját felderíteni és csak különböző alapítóktól származó állatokat kiválasztani. Ennek korlátot a tenyésztési dokumentumok elérhetősége szabhat.

#### b) Mintavétel körülményei

A mintavétel alapvető feltétele az állatok megfelelő rögzítése. A minták egytől-egyig vérminták, amik megszerzése bizonyára nem lehetett egyszerű feladat a félintenzíven illetve külterjesen tartott, emberek közelségéhez nem szokott mangalicák esetében. Ahhoz, hogy a szakma szabályai szerint sterilen, illetve az állatok szempontjából lehetőleg felesleges fájdalom és félelem okozása nélkül, szövődménymentesen lehessen vért venni, mindenképpen szükséges a helyi állatgondozók bevonása a szakszerű rögzítéshez, a gyors, precíz csapatmunka és a megfelelő higiéniai követelmények betartása. A minta szennyeződése más élőlényektől származó DNS tartalmú anyaggal a minták értékelését igencsak megnehezítheti, akár el is lehetetleníti. Szennyezőként bekerülhetnek proteolitikus (fehérjebontó) és egyéb litikus (bontó) hatású enzimek, például az emberi kéz bőrfelületéről DN-ázok (DNS-t bontó enzimek), melyek a DNS-t random módon hasítják, majd használhatatlan termékékké alakítják. Ez a veszély a laboratóriumi munka során is végig fennáll, tehát érdemes gumikesztyűt használni ennek elkerülése végett. Előfordulhat a minták különböző hatóanyagú vegyszerekkel való érintkezése, amely szintén döntő befolyással lehet a minta minőségére; például sósavval való keveredés a minta elbomlásához, a további feldolgozás lehetetlenné válásához vezet. Szerencsére az ilyen jellegű szennyeződések nagyon ritkán, véletlen „balesetek” során következhetnek be megfelelő körültekintéssel végzett munka esetén. Ami még szerepelhet az idegen anyagok skáláján; például por, állatok bőrfelületén lévő szennyeződések, alomanyag, stb., bár megjegyzendő, hogy a modern vérvételi technikákkal nagymértékben elkerülhető a mintába kerülésük, illetve a minták feldolgozása során alkalmazott tisztítási eljárások képesek ezeket kellő biztonsággal kiszűrni.

### c) Minták feldolgozása

Bár a steril vérvételi csövek K-EDTA bevonatot tartalmaznak, ami a vér alvadását meggátolja, de a vér homeosztatisz állapotja felborul, a sejtes alkotóelemek lassú bomlási folyamata elkezdődik, ezért a mintákat hűtve tárolva, mielőbb érdemes laboratóriumba szállítani és feldolgozni, illetve mélyhűtve tárolni későbbi felhasználáshoz.

## 3.2. Vizsgálatba vont minták

2. Táblázat: A vizsgálatba vont minták felsorolása

Sertés fajta:	Minták jelölése:
Vörös mangalica:	S1, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S12
Szőke mangalica:	S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S22, S23
Fecskéhasú mangalica:	S24, S25, S26, S27, S28, S29, S30, S31, S32, S33
Pietrain:	S34, S35, S36, S37, S38, S39, S40, S41, S42, S43, S44
Magyar Lapály:	S44, S45, S46, S47, S48, S49, S50, S51, S52, S53
Magyar Nagy Fehér:	S54, S55, S56, S57, S58, S59, S60, S61, S62

Mintáim mélyhűtve tárolt, tisztított DNS oldatok, melyeket Konecsni Judit (2008-as szakdolgozatához) és Dr. Zenke Petra készített elő, illetve bocsátott rendelkezésemre. A minták egy részét Konecsni Judit maga szerezte be, különböző sertéstartó telepeken végzett vérvételek által, a minták másik részét pedig a herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet bocsátotta a SZIE-ÁOTK genetika laboratóriumának rendelkezésére 2008-ban.

## 3.3. Agarózgél elektroforézis

A DNS kinyerési és tisztítási folyamatok eredményessége ellenőrizhető ezen módszerrel. Laboratóriumi munkám első lépéseként a felolvasztott tisztított DNS oldatok DNS tartalmának (mennyiségi és minőségi) ellenőrzését végeztem el. A gélhez kevert interkaláló festékek segítségével nem csupán a DNS jelenléte igazolható, hanem áteső UV fényben a szemikvantitatív meghatározása is lehetséges, mivel az interkaláló festékek fényintenzitása a DNS koncentrációval egyenes arányban összefügg.

Kétféle változatot alkalmaztam:

1) A gél készítéshez:

- 50 ml TEB puffer
- 0,75 mg por formájú agaróz
- 20 µl etidium-bromid

Az összetevőket Erlenmeyer-lombikba összemértem, mikrohullámú sütőben celofánnal lefedve háromszor felforraltam, a forralások közt óvatos rázogatóssal történő keverésekkel.

Majd az előkészített tálcába a 60°C-ra hűtött gélt kiöntöttem, a fésűt belehelyeztem, dermedés után pedig további 5 percig hűtőbe helyezve hagytam teljesen megszilárdulni a gélt.

Parafilmre mintánként, kellő távolságban elhelyezve, pipettával kimértem 2 µl bróm-fenol-kék oldatot, majd ezekhez a cseppekhez kevertem az 5 µl mintát. Alapos összekeverés után az elektroforetizáló gépbe helyeztem és TEB pufferrel elfedett agaróz gél zsebekbe töltöttem egyenként az így előkészített mintákat. A futtatás végeztével a gélben lévő DNS mintákat UV lámpa segítségével láthatóvá tettem.

Electrophoresis Power Supply – EPS 3500 XL, Pharmacia Biotech készüléken a következő programmal történt a futtatás: 98V feszültség, 74 mA áramerősség, 7W teljesítmény, futási idő: 30 perc.

2) Összetevők:

- 40 ml TEB puffer
- 0,6 mg por formájú agaróz
- 1- 2 µl GR Safe oldat
- 2 µl bróm- fenol- kék mintánként
- 5 µl minta
- parafilm

Az elkészítés megegyezik az előző eljárásnál leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy az interkaláló festéket – ez esetben a GR Safe oldatot – a 60°C-ra hűtött, még folyékony halmazállapotú gélbe kell keverni.



### 3.4. A polimeráz láncreakció, PCR

PCR= Polimerase Chain Reaction; polimeráz-láncreakció: egy olyan reakciósorozat, mely a DNS adott szakaszának enzimatis amplifikálására (kópiák megsokszorozására) szolgál, mely által az eredetileg akár szubanalitikus mennyiségű DNS-t tartalmazó minták is vizsgálhatóvá válnak.

A reakció komponenseinek rövid ismertetése:

- DNS-templát: ez tartalmazza a vizsgálandó DNS-szakaszt; a mi esetünkben ez a mtDNS HV régiója.
- Primerek: meghatározzák az amplifikálandó szakasz elejét és a végét, ezen szakaszokkal való komplementerítésük által; ezek: SW L15433 és SW H16108 voltak.
- DNS-polimeráz enzim: lemásolja az amplifikálandó szakaszt; ez a munkánk során a hőstabil Taq gold polimeráz volt.
- Nukleotidok: amelyekből a DNS-polimeráz felépíti az új DNS szakaszokat, jelölt dNTP-k.
- Puffer: amely biztosítja a reakciónak megfelelő kémiai környezetet, ezt a funkciót a PCR Gold Buffer mellett a BSA töltötte be, de szintén elengedhetetlen a reakcióhoz a  $Mg^{2+}$  ionok jelenléte, amit a  $MgCl_2$  oldat biztosított.

A PCR folyamata 3 fő szakaszra tagolható. Az első a denaturáció, mikor a reakcióelegyet 94-96 °C-ra hevíti a gép, így a két DNS-szálat összekötő hidrogénhid-kötések felbomlása által a duplaszálú DNS szálat szétválnak, mind a templát DNS-t, mind a primereket tekintve. A következő lépést anellációs vagy kapcsolódási szakasznak nevezik, amikor is a hőmérséklet csökkentésével (általában 45-60 °C-ra) a primerek hozzá tudnak kapcsolódni a DNS-szálakhoz. A harmadik, befejező lépés a lánchosszabbítási szakasz, amely során a hőstabil (Thermus aquaticusból származó, akár 110°C-on is stabil) Taq nevű DNS-polimeráz enzim, a primerektől elindulva lemásolja és szintetizálja az amplifikálandó DNS szakaszt.

Ezen enzimmel kapcsolatban a következő olvasható Sambrook és Russell könyvében: „A Taq hátránya, hogy időnként hibázik a DNS másolásakor, és ez mutációhoz (hibához)

vezet a DNS-szekvenciában. Az ok az, hogy a Taq nem rendelkezik a 3'→5' hibajavító exonukleáz aktivitással. Az Archaea organizmusból nyert Pwo vagy a Pfu nevű polimerázok rendelkeznek a hibajavítás képességével, és ez szignifikánsan lecsökkenti a másolt DNS-szekvenciák mutációs rátáját. Sajnos azonban ezek az enzimek sokkal lassabbak, mint a Taq. Ma már elérhető a Taq és a Pfu kombinációja, amely egyszerre biztosítja a gyors polimerizációt és a pontos duplikációt.” (SAMBROOK and RUSSEL, 2001.)

PCR reakcióelegy komponensei mintánként:

- UP: 9,8 µl
- MgCl<sub>2</sub>: 2,5 µl
- PCR Gold Buffer: 2,5 µl
- dNTP (10 nmol-os koncentrációjú): 2 µl
- BSA (2 ng/ µl-es koncentrációjú): 1 µl
- primerek (1,6 pmol/ µl koncentrációjú) : 1 + 1 µl
- Taq gold polimeráz: 0,2 µl
- minta (1 ng/ µl- es koncentrációjú DNS- oldat): 5 µl

### 3. Táblázat: A PCR reakcióban használt primerek

Név:	Szekvencia:
SW L 15433	TGCAACCAAAACAAGCAT
SW H 16108	GCACCTTGTTTGGATTGTCG

A fenti primerpár egy 638 bp hosszú terméket – a referencia szekvencia (Ursing and Arnason, 1998.) 15450-as és 16088-as pozíciója között – fog közre a sertés mitokondriális DNS-ének hipervariábilis régiójában. A megelőző vizsgálatokban (KONECSNI, 2008.) csak 250 bp hosszú szakasz került meghatározásra.

Az összes mintára számított UP-t, MgCl<sub>2</sub>-ot, dNTP oldatot, BSA-t, PCR Gold Buffer-t, Taq gold polimerázt és a primereket jégen összemértem ún. MM/ Master Mix/ Mester Mixet készítve. Ebből 20µl-eket kimértem az egyes előre megjelölt csövekbe, majd az 5µl-nyi mintákat hozzáadva megkaptam a 25µl-es reakcióterfogatot.

2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) típusú PCR gépben, a pig cr short programmal dolgoztam.

4. Táblázat: A PCR short program szakaszai ciklusonként (36 ciklus)

Hőmérséklet:	Időtartam:	Szakasz megnevezése:
95°C	10 min.	denaturáció
94°C	30 sec.	DNS szálak szétválasztása
60°C	2 min.	anelláció
72°C	10 min.	végso lánchosszabbítás
10°C	∞	tárolási hőmérséklet

### 3.5. PCR termék tisztítás

A felszaporított DNS szakaszokat meg kell tisztítani a képződött melléktermékektől, reagensektől, egyéb DNS fragmensektől, enzimektől a további felhasználhatóság és tárolhatóság érdekében. A PCR termék szekvenálási folyamathoz való előkészítéséhez két tisztítási módszert is kipróbáltam, alkalmaztam:

#### 1) QIAquick PCR purification KIT (50)

Lépései mintánként:

- A minta mennyiségét egy egységnek tekintve ötszörös PBI oldatot mértem hozzá, Eppendorf csőben, majd rápipettáztam a szűrőoszlopra. Ezt a lépést minden mintával megismételtem.
- Ezután centrifugálás 13000 RPM vagy 18000 RCF fordulatszámon 1 percen keresztül. A gyűjtőcsőben összegyűlt szűrletet elöntöttem, a szűrőoszlopot visszahelyeztem.
- 0,730 ml (etanolos) PE Buffer oldatot mértem rá a szűrőoszlopra.
- Ezt is centrifugáltam (13000 RPM vagy 18000 RCF fordulatszámon) 1 percen keresztül, a szűrletet elöntöttem és ismét lecentrifugáltam.
- 30 µl EB oldatot mértem rá, majd lecentrifugáltam (13000 RPM vagy 18000 RCF fordulatszámon) 1 percen keresztül. A kapott szűrlet tartalmazta a tisztított PCR terméket.

## 2) GenElute Clean – up Kit SIGMA

Lépései mintánként:

- A kékperemű elválasztó oszlopot gyűjtőcsőbe helyeztem, majd rámértem 500 µl Column Preparation Solution oldatot, amit 12000 RPM-en történő 1 perces centrifugálás követett.
- A PCR termék mennyiségét egy egységnek tekintve ötszörös mennyiségű Binding Solution oldatot mértem sorban a minták után a szűrőoszlopra ( amit előzőleg jelöléssel ellátott Eppendorf csőbe helyeztem), ezt is lecentrifugáltam 12000 RPM-en 1 percig, a szűrletet elöntöttem, a szűrőoszlopot visszahelyeztem a gyűjtőcsőbe.
- A szűrőoszlopra 500 µl (etanolos) Wash Solution oldatot mértem, majd 12000 RPM-en 1 percig centrifugáltam, a szűrletet elöntöttem, szűrőoszlopot a gyűjtőcsőbe visszahelyeztem.
- Ezután egy 2 perces 12000 RPM-en történő centrifugálás következett.
- A szűrőoszlopot egy jelöléssel ellátott Eppendorf csőbe áttettem, 50 µl Elution Solution oldatot pipettáztam rá, amit 2 perc hatásidő után 1 percen keresztül 12000 RPM-en lecentrifugáltam. A kapott szűrlet tartalmazta a tisztított PCR terméket.

### 3.6. Szekvenálási PCR és a kapott termékek tisztítása, analízise

Szekvenálási PCR reakció komponensei: - jégen összemérve, az első négy komponensből MM-et képezve;

- UP: 5,5 µl
  - Buffer: 1 µl
  - Primer: 1 µl (SW L 15433; SW H 16108)
  - Big Dye: 2 µl
- + 0,5 µl tisztított PCR termék

A 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) típusú PCR gépben, a Big Dye short programmal dolgoztam.

### 5. Táblázat: A Big Dye short program szakaszai

Hőmérséklet:	Időtartam:	Szakasz megnevezése:
96°C	10 sec.	denaturáció
96°C	10 sec.	DNS szálak szétválasztása
50°C	0,05 sec.	anelláció
60°C	1,50 min.	lánchosszabbítás
10°C	∞	tárolási hőmérséklet

#### Szekvenálási PCR utáni tisztítási eljárás: Big Dye X Terminator Purification Kit

A szekvenálási PCR reakciótérfogata 10 µl volt, így jégen összemérve a mintánként szükséges komponensek:

- 40 µl SAM Solution
- 10 µl Big Dye X Terminator Purification Solution

A PCR termékhez hozzámértem a felsorolt oldatokat és 10 másodpercen keresztül vortexeltem, az alapos elkeverés végett. Ezután 20 percen keresztül hűtőben rázógéppel folyamatos működése biztosította a leülepedés elkerülését, 4 percenként megszakítva egy-egy 10 másodperces alapos vortexeléssel. A 20 perc elteltével 1000 G-n 2 percig centrifugáltam, a tisztított PCR terméket a felülúszó tartalmazta, melyet pipettával előre megjelölt Eppendorf csőbe áthelyeztem.

### 3.7. Szekvenálás: ABI Prism 310 Genetic Analyzer típusú géppel

Az automata és a hozzá tartozó vezérlő számítógép bekapcsolása után az automata ellenőrzése, az általa használt oldat frissen elkészített (1,5 ml Nalgene Buffer + 13,5 ml UP) oldattal való cseréje az első feladat. Ezután a számítógép beprogramozása következik. A szekvenálandó mintákat vortexelés, majd azt követően 1000 G-n való 2 perces lecentrifugálás után helyeztem be a megfelelő tálcában a gépbe, az ajtók zárása után pedig a számítógép segítségével lehet elindítani a szekvenálási folyamatot. A szekvenátor gép a beépített lézer segítségével olvassa le a mintában lévő DNS fragmensek nukleotid sorrendjét. Az eredeti, mintául szolgáló DNS, a primerek által meghatározott szakaszon a hőstabil Taq polimeráz enzim segítségével másoltatható le több cikluson keresztül a PCR reakció során. Mivel a PCR reakcióhoz (különböző színű fluoreszcens festékekkel) jelölt dNTP-k biztosítottak az enzim számára, így ezek épültek be az új kópiákba. A gép felszívja a mintát a mikropillárisába,

majd a lézeres detektor előtt felhevíti és a kibocsátott fény hullámhossza alapján azonosítja a nukleotidokat. Mindezt a számítógépes program grafikonon is ábrázolva megjeleníti. (A DNS-ben előforduló négy nukleotidnak /adenin, timin, citozin és guanin/ megfelelően négy színnel csúcsokat rajzol ki a grafikonon az egyes detektált nukleotidoknak megfelelően.) A mintákat 3'→5' és 5'→3' irányban is szekvenáltam a két primer segítségével.

A kapott szekvenciákat a Sequencing Analysis Software 3.4.1 és a Seqscape 2.1 szekvencia analízáló számítógépes programot alkalmazva illesztettem egymáshoz, így kaptam meg a munkám alapvető eszközeit; az illesztett szekvenciákat, melyek ezután egymással és vadsértés szekvenciákkal lettek összehasonlítva, illetve elemezve.

## 4. Eredmények

### 4.1. Molekuláris genetikai eredmények

A szekvenálási reakciókat követő kapillár-elektroforézises vizsgálatokkal sikerült, két irányban, 55 minta szekvenciáját meghatározni. Ezeket a szükséges taxonómiai és molekuláris biológiai információkkal ellátva előkészítettem az NCBI génbankba történő feltöltésre.

A sikertelen szekvenálások oka legtöbbször a szekvenátor (ABI 310) váratlan üzemzavara okozta hibás futások során tönkrement szekvenálási termék volt. További kutatások során a hiányzó minták vizsgálatának megisméltése javasolható.

5. Táblázat: Mangalica minták eredményei n=26 (vörös n=6, szőke=10, fecskehasú=10), vizsgált pozíciók száma: 638

Variábilis pozíciók száma:	2	
Nukleotid hiányos pozíciók száma:	3	
Monomorfikus pozíciók száma:	633	
Polimorf pozíciók	szőke mangalicában:	0
	vörös mangalicában:	2
	fecskehasú mangalicában:	3
Nucleotide változatosság (Pi):	0,00270	
Haplotípusok száma, h:	3	
Haplotípus diverzitás, Hd:	0,5262	

### 4.2. Statisztikai elemzés

A vizsgált mintákat fajtánként csoportosítva az Arlequin szoftverrel ki lett számítva a csoportok páronkénti egymástól számított genetikai távolsága (6. Táblázat).

A fajta típusainak jellemzésére használhatók a Mangalica nevű csoporttól — amelyben az összes egyed együtt volt található — számított távolságadatok. Ebből megfigyelhető, hogy a vörös típus távolsága meghaladja a két másik típus távolságát a poolozott (összesített) csoporttól, ez a polimorf helyek előfordulásának tulajdonítható, de alapos széles körben végzett founder minták elemzése nélkül messzemenő következtetések levonása elhamarkodott volna, bár ezt magyarázhatná a duroc fajtától mért távolságok összehasonlítása.

6. Táblázat: A fajtánként csoportosított minták páronkénti genetikai távolsága (Fst)

	Mangalica vörös	Mangalica szőke	Mangalica fecskehasú	Pietrain	Magyar lapály	Magyar nagyfehér	vaddisznó	Iberico	Duroc	Landrace	Nagyfehér	Meishan	referencia	Mangalica
Mangalica vörös	0													
Mangalica szőke	0,46531	0												
Mangalica fecskehasú	0,43284	0,16035	0											
Pietrain	0,08325	0,33692	0,2446	0										
Magyar lapály	-0,02226	0,18018	0,09639	0,00993	0									
Magyar nagyfehér	0,38616	0,45706	0,44065	0,39038	0,26904	0								
vaddisznó EU	0,03571	0,10533	0,10245	0,09524	0,07885	0,08222	0							
Iberico	0,50746	0,53058	0,54733	0,07463	0,05001	0,38013	0,00505	0						
Duroc	0,44008	0,55291	0,55429	0,55146	0,52339	0,5137	0,24122	0,39827	0					
Landrace	0,66365	0,75364	0,75475	0,75198	0,73039	0,72197	0,41222	0,62743	-0,06422	0				
Nagyfehér	0,83077	0,88042	0,88137	0,87875	0,86578	0,85814	0,55813	0,8095	0,16363	-0,07521	0			
Meishan	0,9994	0,99764	0,99858	0,99604	0,9927	0,98506	0,68439	0,99916	0,34088	0,10946	-0,09091	0		
referencia	0,8	0,63834	0,73545	0,06513	-0,1413	0,03153	-0,7686	0,66667	-0,20045	0,16361	0,56529	1	0	
Mangalica	0,22139	0,05689	-0,0084	0,23307	0,12295	0,55875	0,23916	0,39111	0,74604	0,87903	0,9441	0,99752	0,59266	0



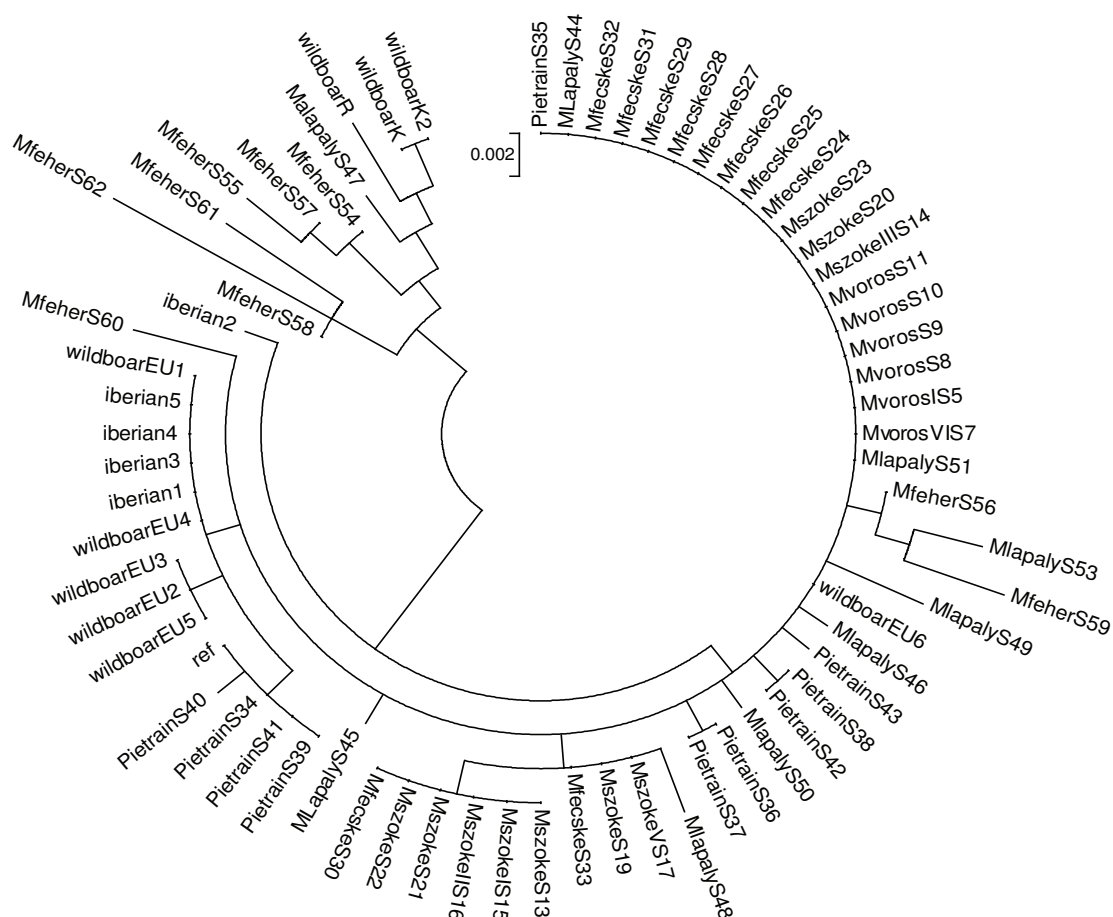
A távolkeleti Meishan fajta távolsága a magyar állományokból származó mintáktól jóval nagyobb mint a külföldön vett minták GenBankból származó mintáitól, ez is további vizsgálatokat igényelhet.

Az európai vaddisznó minták főleg egy spanyol vizsgálat eredményeképpen kerültek a GenBankba ez talán valamelyest magyarázza az Iberico fajtától mért extrém kis Fst értéket.

### 4.3. Haplotípusok összehasonlítása

A vizsgált minták haplotípusainak összehasonlítása és annak vizualizációja legegyszerűbben egy kör alakban felrajzolt fa ábrán tehető meg. A fa ábrát egészen a közelmúltig széleskörűen használták vélt vagy valós filogenetikai eredmények levonásához.

1. ábra: Vizsgált minták haplotípusainak Neighbour Joining módszerrel készített összehasonlító fa-ábrája



(Mfeher: Magyar Nagy Fehér, Mlapály: Magyar lapály, Mszöke: Szöke Mangalica, Mvörös: Vörös Mangalica, Mfecske: Fecskehasú Mangalica, wild boar EU: európai vadsertés, wild boar K: kínai vadsertés, wild boar R: orosz vadsertés, Iberian: Iberico)

Mintáim összetétele semmiképpen nem teszi lehetővé az ilyen célú felhasználást, így hangsúlyozottan csak a haplotípusok áttekintésére készítettem el a Neighbor-Joining módszerrel az 1. ábrát. Az eltérő pozíciókban lévő polimorfizmusok elágazódásokkal vannak jelölve. Az azonos vonalon elhelyezkedő azonosítók azonos haplotípusba tartoznak.

Az ábrán jól látható, hogy a Kínából származó vadsertés minták, mintegy különálló csoportot alkotnak, de ehhez a csoporthoz legközelebb mégis az általunk vizsgált nemzetközi modern fajták magyar populációjából származó mintákat találhatjuk. Ennek okát csak találgatni lehetne.

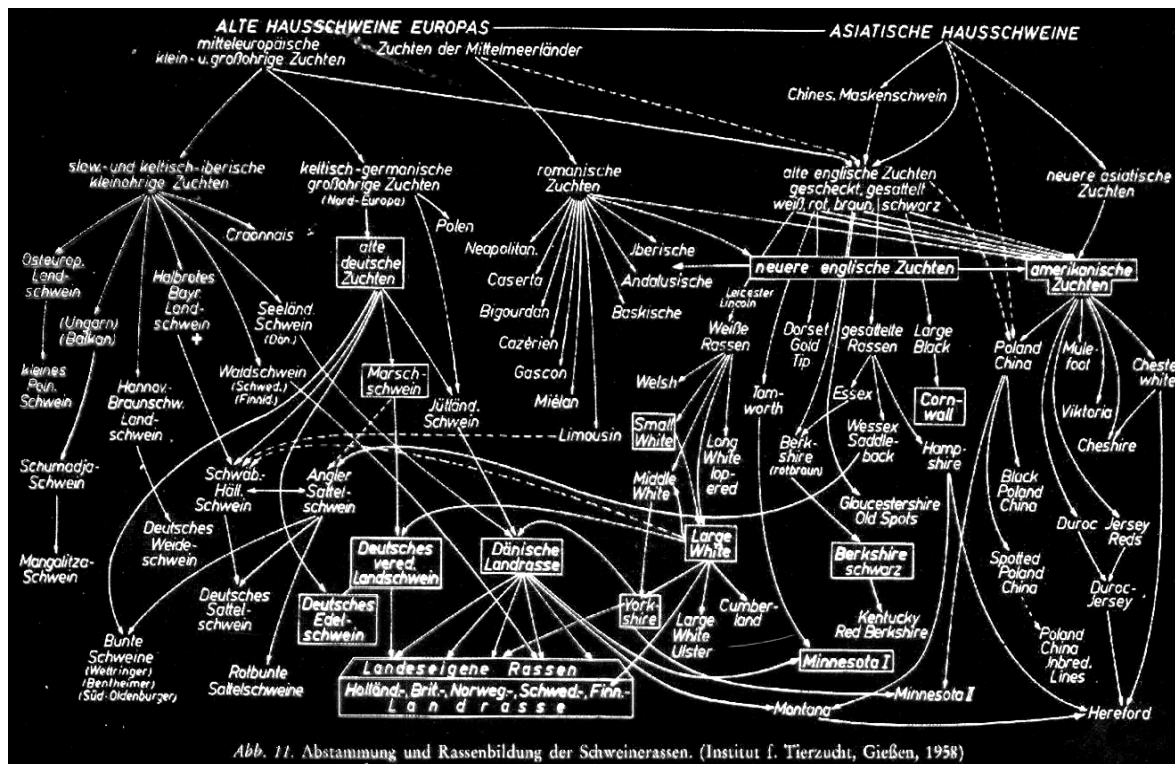
Ugyanakkor a mangalica mintánkban tapasztalt alacsony diverzitási értékek jól tetten érhetők a csoportosuló mintákban.

Az európai vadsertés minták bár jórészt egy kisebb elkülönült csoportban találhatóak a spanyol Iberico fajtához talán a legközelebb, de egy képviselőjük megtalálható a legnépesebb mangalica haplocsoportban is. Azt fontos megjegyezni, hogy mint azt korábban már említettem, visszakeresve az Iberico fajtához közel álló vadsertés minták eredetét, azok egytől egyig azonos spanyol szerzőségű cikkhez tartoztak, így joggal feltételezhető, hogy a helyi populációk akár véletlen akár szándékos keveredésének nyomait sikerült feltárni.

## 5. Következtetések

A vizsgálat eredményeinek és a mintakiválasztás bizonytalanságainak számbavételével a következőkre juthatunk:

- A mangalica fajta vizsgált mintájának mitokondriális sokszínűsége alacsony, ezért indokolt lenne génmegőrzési célból az anyai vonalak felkutatása és a mitokondriális vizsgálatok kiterjesztése esetleges további haplotípusok azonosítása érdekében.
- Hangsúlyozva a mintavétel hiányosságait, igazolódni látszik az, hogy a vizsgált mitokondriális DNS szakasz alapján a mangalica fajta azonosítása nem lehetséges. A vizsgálatba vont modern sertésfajtákkal történt összehasonlítás alapján lényegi eltéréseket nem találtam.
- Ennek lehetséges okait keresve fontos kiemelni a szakirodalomban említett, a teljesítmény javítását célzó keresztezéseket. Ha csak a dokumentált keresztezések során létrejött bonyolult rokonsági kapcsolatok összetettségét szeretném érzékeltetni, az alábbi, a sertésfajták kialakulását szemléltető ábra nagy segítség lehet.



2. ábra: A sertésfajták eredete és felépítése a Giessen-i egyetem állat-tenyésztési jegyzetében jól érzékelteti a hálózatos összefüggéseket a fajták kialakulásával kapcsolatban.

Célkitűzésem utolsó pontjával kapcsolatban, amely az európai vadsertés és a mangalica eredetű minták mitokondriális alapon történő esetleges megkülönböztethetőségének vizsgálata volt, kijelenthető, hogy ez nem lehetséges. Ennek okait vizsgálva utalhatok a faábrán megmutatkozó jelenségre, hogy az európai sertésfajták közé szinte teljesen belesimulnak a kontinens belső részéről származó vadsertés minták. A viszonylagos földrajzi elszigeteltséget biztosító Ibériai-félszigetről származó minták, mintegy az előző állítást alátámasztva, elkülöníthetőek a kontinens belső részéből származóktól, de a helyi vaddisznó populációval szintén szoros rokonságot mutatnak.

Munkámmal kapcsolatos legfontosabb további feladat, hogy a nyert kiterjesztett szekvenciákat a törvényszéki adatbázisokba továbbítva azok a bünyügyi szakértői gyakorlatban felhasználhatóak legyenek. Állattenyésztési szempontból fontos lenne founder mintázással megismételni a hipervariábilis szakasz vizsgálatát, a tényleges diverzitási értékek és lehetséges filogenetikai kapcsolatok feltárása érdekében.

## 6. Összefoglalás

Munkám során a magyarországi mangalica sertés populáció mitokondriális örökítőanyagát vizsgáltam. A fajta vörös, szőke és fecskehasú típusából, meghatározó tenyészetekből random módon vett minták alapján vizsgáltam a genetikai diverzitási értékeket, a DNS alapú fajta vagy típusfelismerés lehetőségét a hazai modern sertésfajtákból származó minták tekintetében, valamint az esetleges a fajta eredetével kapcsolatos információkat.

A GenBankból származó szekvenciákkal együtt 68 vizsgálatba vont mintából – melyből 26 mangalica minta volt – meghatároztam a mitokondriális örökítőanyag hipervariábilis régiójának kiterjesztett (638 bázispár hosszú) szakaszának szekvenciáját.

A kapott eredmények statisztikai elemzésével megállapítottam a mintán mérhető diverzitási értékeket, melyeket a 6. táblázattal kívántam szemléltetni.

A más fajtába tartozó hazai populációkból vett mintákkal és a GenBank-ból letöltött minták segítségével végzett összehasonlítás alapján meghatároztam a mangalica fajta és a külön-külön típusok más fajtától, illetve a vadsertés mintáktól mérhető genetikai távolságát. A legalacsonyabb értéket (Fst: 0,00505) a vadsertés – Iberico minták között, a legmagasabb értéket (Fst: 0,99916) pedig a Meishan – Iberico minták között találtam.

Következtetésként megállapítható, hogy:

A mangalica fajta vizsgált mintáinak mitokondriális sokszínűsége alacsony, ezért indokolt lenne génmegőrzési célokból az anyai vonalak felkutatása és a mitokondriális vizsgálatok kiterjesztése esetleges további haplotípusok azonosítása érdekében.

Továbbá az is megállapítható, hogy az európai vadsertés és a mangalica eredetű minták mitokondriális alapon történő vizsgálattal egymástól nem megkülönböztethetőek.

## 7. Summary

The aim of this study was the investigation of hyper variable region of mitochondrial DNA in Mangalica swine breed. The diversity indices of all the three type (red, blond, swallow bellied) was determined. The possible mtDNA based breed and wildboar recognition was also tested. Based on this information also the phylogenetic context of this typical Hungarian breed was also calculated.

An extended (638 bp) region of mtDNA of 26 Mangalica and 30 other international breed samples from Hungarian stocks were sequenced.

The diversity indices showed the low diversity in Mangalica breed and types on mitochondrial level.

The comparison of Mangalica and the commercial breeds (Hungarian stocks and GenBank downloaded) was showed the low chance of successful breed recognition based on the sequenced mtDNA sequences. Not any unique polymorphism were detected which exclusive for Mangalica breed.

The genetic distances were calculated between the involved samples, and the highest value was ( $F_{st}$ : 0,99916) between Meishan – Iberico breeds, the lowest value was ( $F_{st}$ : 0,00505) between wild boar – Iberian breeds.

The identification of European wildboar samples was also unsuccessful, presumably the separation of this two pool was not strict in the past.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet, Állattenyésztési és Genetika Osztályának, hogy engedélyezték szakdolgozatom megírását.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Zöldág László osztályvezető úrnak, hogy minden anyagi és szellemi eszközt biztosított a szakdolgozatomhoz kapcsolódó laboratóriumi munka kivitelezéséhez.

Óriási köszönettel tartozom két témavezetőmnek: Dr. Zenke Petrának és Dr. Maróti-Agóts Ákosnak lelkes segítőkészségükért, hasznos útmutatásaikért, végtelen türelmükért, hogy mindig minden kérdésemnél rendelkezésemre álltak, hibáimnál kijavítottak és bátorítottak.

Hálás köszönettel tartozom Solymosi Norbertnek a statisztikai elemzésekhez nyújtott segítségéért.

Külön köszönetet szeretnék mondani Keindl Ágnes laborasszisztensnek, aki végig óvó figyelmével kísérte, segítette laboratóriumi munkálkodásaim minden apró részletét, és kellemes társaságával derűs hangulattal töltötte meg a laboratóriumot.

És legjobban kisfiamnak köszönöm, hogy mindvégig kitartásra ösztönzött és végtelen szeretetével erőt ad mindenhez.

## **9. Felhasznált irodalom**

### **Könyvek:**

Bartosievicz László: Régenvolt háziállatok, Bevezetés a régészeti állattanba; L'Harmattan Kiadó, Budapest 2006., 223 p.

S. Bökönyi: History of domestic mammals in Central and Eastern Europe, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1988., 596 p.

Pecsenye Katalin: Populációgenetika, Pars Kft., Nagykovácsi, 2006., 401 p.

Dr. Veresegyházy Tamás: Összehasonlító biokémia II. Az intermedier anyagcsere, Egyetemi jegyzet, Felelős kiadó: Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Budapest, 2003., 221 p.

Dr. Zöldág László: Állatorvosi genetika és állattenyésztés, Egyetemi tankönyv, Felelős kiadó: Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, 2008., 376 p.

Molecular cloning : A lab manual, Sambrook and Russell, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001., 691. p.

### **Tudományos folyóiratokból származó cikkek:**

Attila Zsolnai, László Radnóczy, László Fésüs, István Anton: Do mangalica pigs of different colours really belong to different breeds? Archiv Tierzucht, Dummerstorf, Vol. 49 (2006) 5., 477-483. p.

István Egerszegi, József Rátky, László Solti and Klaus-Peter Brussow : Mangalica - an indigenous swine breed from Hungary (Review) , Archiv Tierzucht, Dummerstorf Vol. 46 (2003) 3, 245-256. p.



### **Internet segítségével letöltött cikkek:**

Erin S. Leutkemeier, Monika Sodhi, Lawrence B. Schook, Ripan S Malhi: Multiple Asian pig origins revealed through genomic analyses, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2010. Mar;54(3):680-6

Marcell Amills, Alex Clop, Oscar Ramírez, Miguel Pérez-Enciso: Origin and genetic diversity of pig breeds, Published online: September 2010.,  
DOI:10.1002/9780470015902.a0022884

Greger Larson, Keith Dobney, Umberto Albarella, Meiyang Fang, Elizabeth Matisoo-Smith, Judith Robins, Stewart Lowden, Heather Finlayson, Tina Brand, Eske Willerslev, Peter Rowley-Conwy, Leif Andersson, Alan Cooper: Worldwide Phylogeography of Wild Boar Reveals Multiple Centers of Pig Domestication, *Science*. 2005 Mar. 11;307(5715):1618-21.

Greger Larson, Ranran Liu, Xingbo Zhao, Jing Yuan , Dorian Fuller, Loukas Barton, Keith Dobney, Qipeng Fan, Zhiliang Gu, Xiao-Hui Liu, Yunbing Luo, Peng Lv, Leif Andersson and Ning Li: Patterns of East Asian pig domestication, migration, and turnover revealed by modern and ancient DNA, 2010. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 27;107(17):7686-91. Epub 2010 Apr 19.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* doi: 10.1093/molbev/msr121.

Librado, P Rozas J 2009. DnaSP v5 A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452

Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567. p.

### **Tudományos ülés, konferencia:**

Tudományos ülés / [Szerk.: Jávor András, Mihók Sándor]. - Debrecen : DE AC , 2002. 232p.  
Radnóczy László: A mangalica fajta kialakulása és értékei, 1-5. p., letöltés helye:  
[www.agr.unideb.hu/kiadvany/bodo/Radnoczi.pdf](http://www.agr.unideb.hu/kiadvany/bodo/Radnoczi.pdf), letöltés dátuma: 2011.07.29.

József Rátky, Peter Tóth, István Egerszegi, Péter Sarlós, Noboru Manab, Klaus-Peter Brüssow : Multifunctional aspects of mangalica breeding, Proceeding of the 5th Vietnamese-Hungarian International Conference on „Animal Production and Aquaculture for Sustainable Farming”, Can Tho University, Can Tho, Vietnam, 11-15 aug. 2007., 42-44. p.

### **PhD- és szakdolgozatok:**

Dr. Maróti-Agóts Ákos: A magyar szürke szarvasmarhafajta fenotípusos és genotípusos vizsgálata, PhD értekezés, 2010., Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskola, 68-69. p.

Konecsni Judit: Mitokondriális DNS kontroll régió vizsgálata tenyész- és vadsertéseken, szakdolgozat, Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, 2008.

### **Internetes oldal:**

Mangalicatenyésztők Országos Egyesületének (MOE) honlapja;  
<http://www.mangold.hu/egyesulet/fajtak.php>, letöltés ideje: 2011.07.23

## 10. Fűggelék:

### 10.1. Reagensek összefoglaló táblázatai

All solutions were made up using deionised ultra pure Water (UP) from a water purification system (Millipore).

Table 1: General buffers and stock solutions

	Solution Names	Components
1	PBS (10 u)	80 g of NaCl, 2.0 g KCl, 11.5 g of Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , and 2.0 g of NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 litre of UP, pH 7.2. The solution was sterilised by autoclaving and stored at room temperature.
2	PBS	10 fold dilution of stock PBS (u10) in UP.
3	PBST	0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.2
4	Trypan blue solution	0.5 g of trypan blue and 0.8 g of NaCl in 100 ml UP. The Stock solution was filter sterilised and stored at 4°C.

Table 2: Buffers and stock solutions for molecular biology

	Solution Names	Components
1	TAE (50 u)	121 g of Tris-base in 50 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0), and 28.6 ml glacial acetic acid. Adjusted volume to 500 ml with UP.
2	TAE	50 fold dilution of TAE (u50) in UP.
3	TBE (10 u)	Dissolving 108 g of Tris-base, <b>55</b> g of boric acid and 40 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0) in 1000 ml of UP.
4	TBE	Dilute 10 fold of TBE (u 10) in UP.
5	DNA loading buffer (10 u)	0.25% (w/v) bromophenol blue and 0.25% (w/v) xylene cyanol in 30% (v/v) glycerol in UP
6	Solution I	50 mM glucose, 25 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0) and 4 mg/ml lysozyme.
7	Solution II	0.2 M NaOH and 1% (w/v) SDS.
8	TE buffer	10 mM Tris (pH 8.0) and 1 mM EDTA.
9	Phenol/chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1), pH 8.0	Purchased from Research Organics

Table 3: SDS PAGE and Western Blot buffers and solutions

	Solution Names	Components
1	SDS-PAGE running buffer (10 u)	30 g Tris-base, 144 g glycine and 10 g SDS were dissolved in 1 litre of UP. The 10 u concentrated running buffer was diluted 1:10 with UP before use.
2	SDS-PAGE sample buffer (5 u)	1 g SDS, 0.01 g bromophenol blue, 3 ml of 1M Tris-HCl (pH 6.8), 5 ml of glycerol and 1 ml of UP. The buffer was stored at 4qC.
3	Transfer buffer	3 g Tris-base and 14.4 g glycine in 200 ml of methanol was made up to a final volume of 1 litre with UP. The buffer was stored at 4qC.
4	Bicarbonate buffer	0.84 g NaHCO <sub>3</sub> and 0.023 g MgCl <sub>2</sub> (1 mM) were dissolved in 100 ml of UP. The buffer was stored at 4qC.

Table 4: Protein silver staining solutions

	Solution Names	Components
1	Fixing solution	10% (v/v) acetic acid, 40% (v/v) of ethanol in UP.
2	Sensitising solution	0.5% (v/v) of glutaraldehyde, 30% ethanol, 0.2% (w/v) thiosulfate and 6.8% (w/v) CH <sub>3</sub> COONa in UP.
3	Silver staining	0.2 % (w/v) AgNO <sub>3</sub> , 2.9 mM formaldehyde
4	Developing solution	1.74 mM formaldehyde, 0.01% (w/v) Thiosulfate and 2.5% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .in UP.
5	Stop solution	5% (w/v) Tris and 2% (v/v) acetic acid in UP.

## 10.2. Genetikai fogalomtár

*Genetika:* Másszóval öröklődéstan. Az átöröklés törvényszerűségeivel foglalkozik.

*Genom:* Az örökletes anyag összessége, eukarióták esetében ez kettős: sejtmagi vagy nukleáris és citoplazmaikus vagy mitokondriális genom.

*Genotípus:* A szervezet genetikai és örökletességi alapjainak összessége, olyan genetikai jellemző, amely rendszerint egy vagy több génhelyen lévő gén - allél állapotot jellemez.

*Fenotípus:* A genotípus és a környezet interakciójában manifesztálódott, megfigyelhető vagy vizsgálható jelleg, lényegében expresszállódott génműködések és géntermékek összessége.

*Paratípus:* Csak tisztán a környezet által okozott fenotípusos hányadot jelenti.

*Palacknyak effektus:* Ennek során a populáció egyedszáma lecsökken valamilyen katasztrófa (pl. tűz vagy árvíz) hatására, ami lényegében egy genetikai mintavételi folyamatot eredményez. A környezet változását az eredeti nagy populációnak csak néhány egyede éli túl, melyeknek allélkészlete nem reprezentálja az eredeti populáció genetikai összetételét. A legvalószínűbb változás a ritka allélok elvesztése, a genetikai variabilitás csökkenése.

*Allél:* A gén egy adott konkrét változata, ami az egyedekben megjelenik. Egy meghatározott bázisszekvenciát jelent, ami egy adott aminosav-sorrenddel rendelkező fehérjét kódol. Bizonyos esetekben fenotípusosan is megnyilvánulhat.

*Haplotípus:* A mtDNS valamelyik génjének vagy szakaszának egy adott szekvenciaváltozata, lényegében egy allélja. Mivel a mtDNS nem rekombinálódik, a különböző haplotípusok a mutációk felhalmozódásának eredményeként jönnek létre.

*Mutáció:* A sejt vagy a szervezet genetikai anyagának – és ezáltal természetesen a benne tárolt információknak – hirtelen, ugrásszerűen bekövetkező és maradandó megváltozása. A mutáció révén tulajdonságaikban, gyakran látható, külsőleges megjelenési formájukban is eltérő egyedek, mutánsok jönnek létre. Ezen változások kialakulhatnak spontán vagy mutagén tényezők hatására is. (A mutáció formái: genommutáció, kromoszóma mutáció, génmutáció, pontmutáció. A génmutációnak három alapvető típusa van: helyettesítéses vagy szubsztitúciós mutáció /ennek két formája a tranzíció és a transzverzió/, törléses vagy deléciós mutáció és beékelődéses vagy inszerciós mutáció. A mutáció következményét tekintve lehet értelmetlen vagy nonszensz, téves értelmű vagy misszensz és néma mutáció.)

*Populációgenetika:* A populációk genetikai szerkezetével foglalkozik.

*Molekuláris genetika:* Molekuláris szinten foglalkozik az öröklődés alapjaival. Többek között vizsgálja a gén bázis- és nukleotidszintű sorrendiségét, működését, a DNS, az RNS felépítését, a DNS önmásolását, javítását, a benne foglalt információ átírását, megvalósítását és a génexpresszió jellegzetességeit. Elemzi az örökítő anyagban bekövetkező mutációk molekuláris alapjait, hatását és következményeit. A molekuláris (vagy biokémiai) genetika feladata a gének, a génműködések, a géntermékek teljes megismerése, a gének bázissorrendjének és a géntermékek aminosav- sorrendjének a feltárása (szekvenálás).

### 10.3. Rövidítések jegyzéke

mt = mitokondrium

DNS = dezoxi- ribonukleinsav

mtDNS = mitokondriális DNS

HV régió = hipervariábilis régió, másnéven D-loop / D-hurok

UP = ultra pure water / speciális berendezéssel desztillált, lágy víz

dNTP = dezoxi - ribonukleotid - trifoszfát

BSA = bovine serum albumin / szarvasmarha szérum albumin

PCR = polimerase chain reaction / polimeráz – láncreakció

bp = bázispár

K- EDTA = kálium- diamin- tetraecetsav

SDS = Sodium- Dodecil- Sulfate / nátrium- dodecil- szulfát

NaCl = nátrium- klorid

Mg<sup>2+</sup> = magnézium – ion (kétszeresen pozitív töltésű)

MgCl<sub>2</sub> = magnézium – klorid

MM = Master Mix/ mester mix / törzsoldat

UV fény = ultraviola fény (692 nm hullámhosszúságú)

RNS = ribonukleinsav

rRNS = riboszómális RNS

tRNS = transzfer RNS