

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Genetikai diverzitás és filogenetikai kutatások Közép- és Dél-Európában élő
domesztikált és vadon élő állatfajokban**

Dr. Kusza Szilvia

**Debrecen
2019**

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	2
1.1. Kutatásaim előzményei	3
1.2. Általános célkitűzések.....	4
2. ESETTANULMÁNYOK DOMESZTIKÁLT ÁLLATFAJOKBAN	5
2.1. Juh	5
2.1.1. Cigája, ruda, pramenka és egyéb kelet-, délkelet-európai juhajták.....	5
2.1.2. Hortobágyi racka	18
2.2. Szarvasmarha	27
2.2.1. Román szürke marha	27
2.3. Ló	37
2.3.1. Hucul	37
3. ESETTANULMÁNYOK VADON ÉLŐ ÁLLATFAJOKBAN	45
3.1. Vaddisznó.....	45
3.2. Mezei nyúl.....	58
3.3. Sakál.....	71
3.4. Dámszarvas	77
Irodalomjegyzék	86
Köszönetnyilvánítás.....	114

1. BEVEZETÉS

Ma már szinte közhelynek számít, hogy Földünk klímaváltozása milyen súlyos meteorológiai, biológiai, és ezek által társadalmi hatásokkal jár. Mindezzel párhuzamosan a számos újonnan megjelenő betegség, illetve az egyre növekvő emberi népesség biztonságos élelmezésének problematikája is előre nem látható kockázatokat és kihívásokat rejt. Ebből következően az emberiségnek bolygónk lehetőség szerint minél nagyobb mértékű megóvásának dilemmái mellett súlyos népélelmezési kérdésekre is választ kell találnia. Az élővilág sokszínűségének megőrzése, valamint a változó környezethez sikeresen alkalmazkodó növény és vadon élő állatfajok, illetve haszonállat fajták jobb megismerése olyan kutatói feladat, mely egyszerre szolgálja az emberiség hosszú távú jövőjét, és ígér az állattenyésztés mindennapjaiban is hasznosítható eredményeket. Mindebből az is következik, hogy az állatállomány genetikai sokféleségének fenntartása a jelen és a jövő egyik kulcskérdése.

A különböző fajok és fajták genetikai összetétele, szerkezetük és a helyi környezeti viszonyokra adott válaszaik még kevésbé ismertek, pedig olyan genetikai variánsokat tartalmazhatnak melyek a megváltozó környezeti feltételekhez, illetve betegségekhez való adaptáció szempontjából értékesek lehetnek. Szakmai körökben ma már köztudott az élelmiszerbiztonság, valamint a helyi, őshonos fajták egyedi genetikai változatai és tulajdonságaik közötti kapcsolat, azonban számos genetikai kérdés továbbra sem pontosan tisztázott. Pedig az éghajlatváltozáshoz való alkalmazkodás kulcsát lehet sejteni ezekben a fajtákban, melyeket megfelelő tenyésztési programok révén az intenzív termelésben használt fajtákba is át lehetne ültetni. Mindezek miatt igen fontos az őshonos fajták védelme és adaptációs tulajdonságuk vizsgálata genomikai és bioinformatikai módszerek alkalmazásával.

Mindeddig a legtöbb vizsgálat a klímaváltozás fajokra gyakorolt hatásaira összpontosított, azonban ugyanilyen jelentőséggel bír a fajokon belüli genetikai diverzitás felmérése is, mivel a fajokon belüli változatosság azok környezethez való alkalmazkodóképességének alapját képezi. A csökkent genetikai diverzitás már középtávon is veszélybe sodorhatja a fajokat és fajtákat, hiszen a genetikai diverzitásukkal együtt alkalmazkodóképességük is gyengül. Egyre nyilvánvalóbb tehát, hogy a genetikai diverzitás önmagában is jelentős természeti erőforrást jelent. A klímaváltozás közvetlenül veszélyezteti ezt a genetikai változatosságot, még akkor is, ha maguk az adott fajok fenn is maradnak. A klímaváltozás a továbbiakban várhatóan különösen súlyos hatással lesz a genetikailag változatos fajokra, továbbá azon populációkra, melyek nem képesek könnyen élőhelyet változtatni. Az élőhely fragmentáció, izoláció csak tovább súlyosbítja ezt a helyzetet, mert az itt élő populációk nagyobb eséllyel pusztulnak ki, mivel csökken, de akár meg is szűnik közöttük a génáramlás, továbbá a megváltozott körülmények között nem képesek új, megfelelő élőhelyeket találni. Ez természetesen magával vonja genetikai örökségük végleges és visszafordíthatatlan eltűnését is.

Nem szabad azonban elfelejteni, hogy napjainkban a biológiai diverzitás rohamos csökkenése közvetett vagy közvetlen módon az emberi tevékenységre vezethető vissza. Sok faj fennmaradásához vagy fenntartható hasznosításához pedig elengedhetetlen az emberi beavatkozás. A célzott, fenntartásra és hosszú távú megőrzésre irányuló munka számos faj/fajta létezésének zálogát is jelenti, és a genetikai sokféleség kulcsfontosságú szerepet játszik a megőrzéshez kapcsolódó prioritások kijelölésében.

A fenti kérdések vizsgálata tekintetében igen értékes földrajzi egységnek számít Közép- és Dél-Európa, azon belül is a Kárpát-medence. E térség a nedves óceáni, a száraz kontinentális és a mediterrán éghajlati régiók határán helyezkedik el, így az éghajlati

övek már kisebb eltolódása is oda vezethet, hogy országunk és annak közvetlen földrajzi környezete átcusúszhat a három régió valamelyikének domináns hatása alá. A Kárpát-medencét érő hatásokkal foglalkozó tanulmányok fő állítása az, hogy az üvegházhatás erősödésével a hazai éghajlat szárazabbá és napfényben gazdagabbá fog válni, legalábbis a melegezés kezdeti, néhány évtizedében.

A fajok genetikai szerkezetére számottevően hatnak a földtörténeti közelmúlt eseményei, mindenekelőtt a nagy klimatikus változások által befolyásolt areadinamikai folyamatok. A Kárpát-medencében is a legutóbbi eljegesedés maximuma (LGM), és az azt követő felmelegedés volt az az utolsó, jelentős földtörténeti esemény, amely alapjaiban meghatározta a különböző fajok jelenkori populációinak képét. Az eddigi eredmények alapján a Kárpát-medence változatos természetföldrajzi viszonyai, mozaikossága lehetővé tette ezen időszak alatt is a különböző menedékek, refúgiumok kialakulását, mely számos faj számára biztosította a túlélést a kedvezőtlen viszonyok közepette. Később ezekből a menedékekből indultak az újránépesedési folyamatok. Ezen túl a medence jelleg, valamint a Kárpát-medence központi elhelyezkedése okán, a távolabbi refúgium területekről kiinduló vándorlások is érintették ezt a területet, amely fajtól függően segítette, vagy éppen gátolta a további terjedést. Mindezekből fakadóan a Kárpát-medencében kimagasló szintet ért el a biodiverzitás, ami páratlan lehetőséget, de egyben felelősséget is jelent számunkra.

Hiba lenne azonban, ha a Kárpát-medencét közvetlen földrajzi környezetéből kiszakítva tennénk vizsgálataink tárgyává. Sok vadon élő állatfaj jelenlegi diverzitását itt a Kárpát-medencében ugyanis a dél-európai refúgium területekről való visszatelepülés befolyásolja, emellett a közép- és dél-európai térség egyes régiói évszázadok óta intenzív gazdasági, kereskedelmi (és alkalmanként politikai) kapcsolatban álltak és állnak egymással, így a domesztikált állatfajok elterjedése, illetve diverzifikálódása tekintetében is komoly hatást gyakoroltak egymásra. Szükséges tehát e nagyobb térség kapcsolódási pontjainak és kölcsönhatásainak összefüggéseket is számba vevő kutatása, hiszen ezek következménye az az egyedi vadon élő és házasított fauna, mely Közép- és Dél-Európa – s ezen belül a Kárpát-medence – sajátja.

Ennek a gazdag örökségnek azonban csak elenyésző százalékát sikerült mindeddig vizsgálat tárgyává tenni a genetikai diverzitás szempontjából. Mivel a populációs szinten folytatott vizsgálatok elterjedésével egyre szorosabbá vált a kapcsolat az evolúciobiológia és az ökológia között is, természetszerűen kiszélesedett a megválaszolandó kérdések köre is.

A demográfiai és a genetikai módszerek kombinációjával olyan alapvető, populációs szintű folyamatok vizsgálata vált lehetővé, mint a migráció, a génáramlás, a szelekció és a véletlenszerű génsodródás (drift), vagy a populációk túlélése, illetve kipusztulása. Ezen folyamatok megértése által tárható fel az elterjedési területeken élő állományok genetikai szerkezete és történeti-evolúciós dinamikája. A megválaszolható kérdések körének a módszertan fejlődése általi jelentős bővülése, valamint a Kárpát-medence biodiverzitásával és biogeográfiájával kapcsolatos ismerethiány jelentette kutatási potenciál egyértelművé tette számomra, hogy vizsgálataimat a lehetőségekhez mérten erre a kutatási területre kell összpontosítanom.

1.1. Kutatásaim előzményei

Kutatásaim első éveiben kiskérődzők (kecske, juh) tejfehérjéjén polimorfizmusainak és kecske állományok Caprine arthritis encephalitis (CAE) fertőzöttségének genetikai hátterével foglalkozó kutatásokban vettem részt. Majd egy Marie Curie ösztöndíj segítségével Swine Leukocytia Antigen (SLA) gének polimorfizmus és transzkriptom

vizsgálatával foglalkoztam. PhD disszertációm egyik részében őshonos juhajtók genetikai diverzitás vizsgálatával foglalkoztam, mely kutatási területet ekkor nagyon megszerettem. Így fokozatszerzésem után, elsődlegesen ezen a kutatási területen maradtam, bővítve a fajok/ajtók (juh, pulyka, ló, szarvasmarha, házi méh, aranyakál, ázsiai elefánt, balkáni gerle, dámszarvas, fécán gímszarvas, házi egér, mezei nyúl stb.) körét, újabb markereket, módszereket, statisztikai értékeléseket használva. Több állatfaj esetén elsőként határoztam meg a genetikai szerkezetet, diverzitás fokát.

Több hazai és külföldi ösztöndíjat nyertem, külföldi egyetemekre, kutatóintézetekbe, illetve hazai és nemzetközi pályázatokat vezettem, vettem részt bennük. Kutatásaim sok esetben hazai és nemzetközi együttműködések keretében zajlanak, különböző markerekkel, genomikai módszerekkel, illetve archaikus DNS bevonásával. Ezek közül MTA doktori disszertációm az így kapott eredmények egy részét mutat be, azokat, melyek nem PhD disszertáció eredményeként születtek és Közép-, Dél-Európában, elsődlegesen a Kárpát-medencében élő domesztikált, valamint vadon élő állatfajok genetikai diverzitását, szerkezetét vizsgálta. A kutatások módszereit, legfőbb eredményeit esettanulmányokkal szemléltetem.

1.2. Általános célkitűzések

Közép- és Dél-Európa, benne a Kárpát-medence élővilága a biológiai sokféleségét tekintve egyedülálló a világon. Ennek ellenére csak nagyon kevés tudományos szakcikk, kutatás von be állatfajokat erről a területről, pedig az itt élő domesztikált és vadon élő állatfajok genetikai diverzitásáról szóló kutatási eredmények nemzetközi érdeklődésre is számot tartanak. Ezáltal az itteni populációk vizsgálata és sokféleségének megőrzése nem csak erkölcsi, de fontos tudományos feladatot is jelent az ezzel foglalkozó kutatók számára.

A fentiek alapján MTA doktori értekezésem céljául tűztem ki, hogy PhD fokozatom megszerzése utáni kutatómunkám azon eredményeit mutassam be, melyek Közép- és Dél-Európában élő domesztikált (juh, szarvasmarha, ló) és vadon élő állatfajok (vaddisznó, mezei nyúl, sakál, dámszarvas) genetikai sokféleségének jellemzésével (diverzitás, szerkezet, demográfiai változások) foglalkozott.

Azonban szeretném arra is felhívni a figyelmet, hogy egy-egy kutatómunka sohasem teljesen befejezett. A kapott eredményekre alapozva minden esetben további kérdések merülnek fel és azokat új módszerekkel, más megközelítéssel, további területek és minták bevonásával próbáljuk megválaszolni. Az esettanulmányaim végén ezekre is kitérek.

Bízom benne, hogy eredményeimmel hozzájárultam a vizsgált régió biodiverzitásának feltárásához, fenntartásához, hosszú távú megőrzéséhez és a gyakorlat számára is alkalmazható tudományos megállapításokat sikerült tennem mind a domesztikált, mind a vadon élő állatfajokkal végzett kutatómunkám során.

2. ESETTANULMÁNYOK DOMESZTIKÁLT ÁLLATFAJOKBAN

2.1. Juh

2.1.1. Cigája, ruda, pramenka és egyéb kelet-, délkelet-európai juhajták

Irodalmi áttekintés

2006-ban megvédett PhD-értekezésem nagyobb részében foglalkoztam a cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhok genetikai diverzitás becslésével. A későbbiekben ennek fő eredményeire alapozva, de más megközelítésben folytattam vizsgálatokat különböző közép-, kelet-európai, kis-ázsiai őshonos juhajtakkal.

A juhok (*Ovis aries*) igen változatos megjelenésű állatok, melyeket húrukért, tejükért és gyapjukért tartanak világszerte. A Kárpát-medence legjelentősebb őshonos juhajtái a cigája, zackel fajtakörbe tartoznak és Európa örökségének, kulturális tájképének lényeges elemei (**Jávor és mtsai**, 1998; **Kukovics és mtsai**, 2003, 2004; **Kusza és mtsai**, 2008; **Savic és mtsai**, 2013). Ezen túl a közép és délkelet-európai juhok talán legfontosabb filitikus csoportjai, melyek az alacsony befektetési igényű, fenntartható tartási formához jól adaptálódtak, így jelenleg is fontos részét képezik a terület gazdasági és ökológiai rendszerének (**Kukovics és Jávor**, 2001; **Padeanu**, 2010; **Kawecka és Krupinski**, 2014). A helyi ajták genetikai összetétele és azok helyi környezethez való alkalmazkodása során bekövetkezett szelekciója kevésbé ismert, ami viszont azért is kiemelkedően fontos, mivel növelheti a ajták jövőbeli környezeti változásokhoz -beleértve az éghajlatváltozáshoz- való alkalmazkodó képességét (**Groeneveld és mtsai**, 2010). A helyi extenzív környezeti feltételekhez alkalmazkodott, őshonos ajták egyre nagyobb mértékű használata révén biztosítható a tájkép fenntartása, miközben a fajta *in situ* megőrzése is megoldott lenne. Ezekkel a ajtakkal kiválóan lehetne modellezni a változó környezeti viszonyokhoz való alkalmazkodás folyamatát is.

A ajták azonosítása, elnevezése és ajtacsoportba történő sorolása főként morfológiai alapokon történt, juhok esetén főleg a farok, a gyapjú típus, illetve a szarv összehasonlító morfológiáját használták (**Draganescu és Grosu**, 2010). Azonban az elmúlt 100 év történelmi, politikai és környezeti változásai megváltoztatták ezeket a ajtákat (**Kusza**, 2006).

Albániában a cigáját elsősorban keresztezésekhez használták a dombos, illetve hegyes területeken élő helyi ajták termelőképességének fejlesztésére. Az albán cigája kialakítása során a volt Jugoszláviából importáltak kosokat (**Kukovics és Jávor**, 2002; **Kume és Pape**, 2006). Az albán cigája korábbi vizsgálatainkban legközelebbi rokonságot két magyar őshonos cigája állományhoz mutatott, annak ellenére, hogy nem ismert múltbeli kapcsolat közöttük. Az albán ruda állományt sem találtuk közeli rokonságban a román rudához, annak ellenére, hogy egy fajtakörbe tartoznak (**Kusza**, 2006; **Kusza és mtsai**, 2008). **Mason** (1967) szerint a minden balkáni országban megtalálható finom gyapjas ruda a román cigájából származik, míg **Draganescu** (2003) véleménye szerint a román ruda ajtából alakult ki a cigája. Ezeket a feltételezéseket korábbi eredményeink nem támasztották alá határozottan (**Kusza**, 2006; **Kusza és mtsai**, 2008).

Horvátországban a cigája a kilenc védett juhajta egyike, mely Romániából és Szerbiából származik. Kelet-Horvátországban kb. 3500 példányos állománya lehető fel (**Ivankovic és mtsai**, 2005).

Románia az Európai Unió (EU) harmadik legnagyobb juhtenyésztő országa, azonban a fajtaösszetétel nem kedvező. A teljes állomány 95 %-a a cigája és zackel fajtakörbe

tartozik (**Gavojdian és mtsai**, 2016). A cigája Romániában fekete, fehér, vörösbarna és szürke színváltozatban fordul elő (**Kukovics és Jávör**, 2002).

A görög szigeteken chios, törökül sakiz fajta valószínűleg a görög zackel és a török zsírfarkú karamán keresztezésével jött létre (**Elmaci és mtsai**, 2006). Nagyon szapora és jól alkalmazkodott a helyi éghajlathoz (**Veress és mtsai**, 1982). Közeli rokona az awassi fajtának (**Veress és mtsai**, 1995). A gokceada egy hármás hasznosítású, és egyben a legkisebb méretű török juh fajta. A kivircik egy közepes méretű, tej- és húshasznú juh fajta, melyet Északnyugat-Törökországban tartanak (**Elmaci és mtsai**, 2006). Ez is szintén a cigája fajtakörbe tartozik. Több színváltozata van és meglehetősen hasonlít a karnobathoz és a cigájához. A tejtermelőkéesség javítása céljából keletfrízzel javították (**Sönmez**, 1977).

Szerbiában a cigája az egyik legrégebbi hármás hasznosítású juh fajta. A bácska-bánati területen a csókai és a zombori változatot tenyésztik. A zackel fajtakörbe tartozó pramenka pedig a fő tejelő típusú fajta. Korábbi vizsgálatok két szerb pramenka állomány közeli rokonságát, míg a zombori és a csókai cigája állományok genetikai különbözőségét állapították meg (**Cinkulov és mtsai**, 2003; **Kusza és mtsai**, 2008).

Napjainkban egyre több genetikai kutatás zajlik az őshonos fajták védelmének érdekében, azonban az egyes fajtacsoportba sorolt fajták genetikai szerkezete és azok egymáshoz viszonyított volta még mindig kevésbé ismert. Vizsgálatunkban célunk volt korábbi eredményeink kiegészítése a kelet- és dél-európai helyi, sok esetben veszélyeztetett létszámú juh fajtákkal, azok genetikai szerkezetének, egymáshoz való viszonyuknak további statisztikai módszerekkel való vizsgálata.

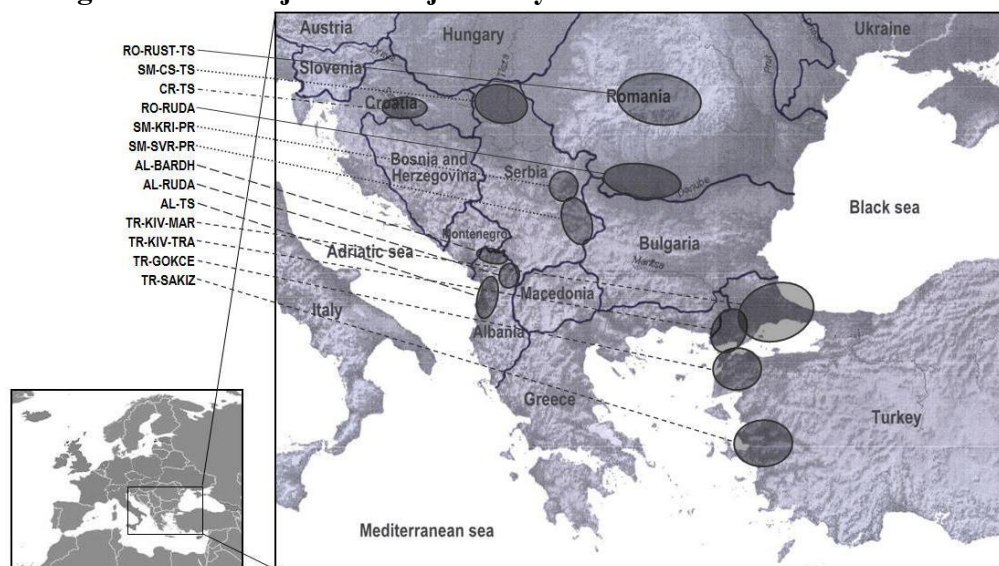
Anyag és módszer

Mintavétel és genomiális DNS izolálás

Összesen 489 gyapjúmintát használtunk vizsgálatunkban, Albániából (cigája-AL-TS n=39; bardhoke-AL-BARDH n=31; ruda-Al-RUDA n=37), Romániából (rozsdás cigája- RO-RUST-TS n=39; ruda- RO-RUDA n=39), Törökországból (sakiz- TR-SAKIZ n=49; kivircik Marmara régióból- TR-KIV-MAR n=38; kivircik Trákia régióból- TR-KIV-TRA n=52; gokceada- TR-GOKCE n= 39), Horvátországból (cigája-CR-TS n=47) és Szerbiából (csókai cigája- SM-CS-TS n=12; svrjig pramenka- SM-SVR-PR n=36; krivovirska pramenka- SM-KRI-PR n=31) (**1. ábra**). A gyapjúminták vétele tépéssel történt, annak érdekében, hogy a szőrhagymák a szálak végén minél nagyobb számban, épen megmaradjanak. Az egyes állatoktól származó gyapjúcsomók egyesével nejlon- vagy papírzacskóba kerültek. A minták szállítása a laboratóriumig, illetve tárolásuk szobahőmérsékleten történt.

A genomiális DNS izolálása a **FAO/IAEA** (2004) protokollja szerint történt. Mivel nem módszert fejlesztettünk, nem részletezem a módszer lépéseit.

1. ábra: Vizsgálatba vont fajták földrajzi elhelyezkedése



Mikroszatellit vizsgálat

Az egyedek genotipizálása tizenhat, FAO és ISAG által juh fajra javasolt polimorf, a kromoszómákon elszórtan elhelyezkedő mikroszatellit bevonásával történt: BM6506, OarFCB20, MAF70, MCM527, INRA127, ILSTS11, TGLA53, TGLA357, MAF65, OarCP49, OarAE119, OarCP20, BM1314, MAF35, MCMA7, CSSM43. A mikroszatellitekről több információ, illetve a PCR amplifikáció, genotipizálás megegyezett a PhD-munkámban, illetve az abból született publikációban leírtakkal (Kusza, 2006; Kusza és mtsai, 2008).

Statisztikai értékelés

A mikroszatellit lókuszok diverzitás mutatóinak meghatározása, mint az allélok száma (n_o), lókuszonkénti átlagos allélszám (MNA), a megfigyelt (H_o) és várt (H_e) heterozigotitás **Weir és Cockerham** (1984) módszere alapján a FSTAT v2.9.3 (**Goudet**, 1995) programmal történt. Akárcsak a Wright-féle statisztika (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) (**Wright**, 1978) értékeinek kiszámítása, melyek a populációk közti genetikai struktúrára, illetve különbözősége utalnak. A Hardy-Weinberg egyensúlytól (HWE) való eltérés és a heterozigóta hiány meghatározásra a GENEPOP v3.4 (**Raymond és Rousset**, 1995) programot használtuk. A polimorfizmus információ tartalom (PIC) **Botstein és mtsai** (1980), míg a génáramlás értéke (N_m) **Slatkin és Barton** (1989) módszere alapján került kiszámításra. Meghatároztuk a Nei-féle torzítatlan D_A -távolság értékeit (**Nei és mtsai**, 1983), majd ezeket felhasználva filogenetikai fán ábráztuk a populációk közti genetikai viszonyokat a SPLITSTREE4 v4.9.1 (**Huson és Bryant**, 2006) programmal. Az assignment teszttel (illeszkedés vizsgálat) (**Paetkau**, 1995), a DOH (**Brzustowski**, 2002) programot használva ellenőriztük, hogy milyen pontossággal tartoznak az egyedek az általunk feltételezett populációkba. A STRUCTURE v 2.0 (**Pritchard és mtsai**, 2000) szoftvert alkalmaztuk a vizsgált állományok klaszteranalíziséhez, azok genetikai szerkezetének, eredetének meghatározásához. Az allélmintázatok összehasonlítását a következő beállítások mellett végeztük el: 20 000 burn in lépés, 150 000 iteráció, 1 000 000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) lépés. Az egyes genotípusok csoportokba való besorolása előfeltételezés nélkül történt. A STRUCTURE szoftver eredményeit minden K csoportra a DISTRUCT program (**Rosenberg**, 2004) segítségével vizualizáltuk.

Eredmények és azok megvitatása

A vizsgált 16 lókuszon összesen 200 allélt határoztunk meg, átlagban 12,5 allélt lókuszonként. A legkevesebb allélt (6) az OarCP20 lókuszon, míg a legtöbbet (21) a MAF70 lókuszon azonosítottunk. A BM1314, BM6506, MAF65, MCM527 és OarCP20 lókuszokon **Cinkulov és mtsai** (2003) 11, 5, 5, 9 és 8 allélt talált a szerb csókai cigája állományban, míg mi ugyanazt a fajtát ugyanazon a lókuszokon vizsgálva 5, 2, 4, 6 és 2 allélt. A pramenka eredetű pag-szigeti juhban az MCM527, MAF65 és OarCP49 lókuszokon 9 allélt, a TGLA53 lókuszon 8-at, míg az OarAE119 lókuszon 10 allélt írtak le (**Ivankovic és mtsai**, 2005). Az átlagos lókuszonkénti allélszám vizsgálatunkban 4,0 és 10,69 között változott. Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés volt kimutatható mind a 16 lókuszon ($p < 0,001$). A genetikai diverzitás vizsgálatok fontos mutatója a heterozigotizáció meghatározása. A populáción belüli heterogenitás jellemzésére leggyakrabban a heterozigoták arányát adják meg. A beltenyésztés, a hosszú időn át történő vérfrissítés nélküli tenyésztés különösen kis egyedszámú populációkban jelentősen csökkentheti a genetikai variabilitás szintjét, és alacsony heterozigotizációs értéket eredményez. A várt heterozigotizációs értéket (H_E) az allélfrekvencia értékekből számoljuk Hardy-Weinberg egyensúlyt feltételezve. A megfigyelt heterozigotizációs érték (H_O) pedig a tényleges heterozigoták aránya a vizsgált állományokban. Jelen vizsgálatunkban az átlagos várt heterozigotizációs érték a 16 lókuszon 0,758 volt. A legkisebb értéket (0,605) a MAF35, míg a legnagyobb értéket (0,913) a BM1314 lókusz esetén kaptuk. Az összes vizsgált lókusz esetén a várt heterozigotizációs érték nagyobb, mint a megfigyelt heterozigotizációs érték. Az átlagos megfigyelt heterozigotizációs érték az összes vizsgált lókuszra 0,492. Értéke 0,318 (MAF65) és 0,629 (ILSTS11) között változott. A polimorfizmus információ tartalom (PIC) minden lókuszon nagyobb volt, mint 0,500, magas polimorfizmust jelezve, értéke 0,605 (MAF35) és 0,913 (BM1314) között mozgott.

A Wright- féle statisztika átlagos F_{IT} értéke 0,391, míg az átlagos F_{IS} 0,301, mely nagyobb az F_{ST} értéknél (0,142). A legnagyobb heterozigoták hiányát a MAF65 (0,540), míg legkisebb az ILSTS11 (0,108) lókuszon találtuk. A multilókusz F_{ST} azt mutatja, hogy a teljes genetikai variancia 14,2 %-a a populációk közti különbségből adódik, a többi az egyedek közti különbségből. Spanyol, alpesi, balti és európai juhok esetén még kisebb értéket kaptak (6-8 %); azonban északi spanyol fajták között a mienkhez hasonlót (15 %) (**Alvarez és mtsai**, 2004; **Dalvit és mtsai**, 2008a; **Tapio és mtsai**, 2005a,b; **Peter és mtsai**, 2007). A lókuszokon az átlagos génáramlás mértéke 1,511 volt, 0,766 (BM6506) és 3,718 (INRA127) között mozogva. Ha az N_m értéke kisebb, mint 1, már kismértékű génáramlásról beszélünk (**1. táblázat**).

1. táblázat: Megfigyelt allélszám (n_o), lókuszonkénti átlagos allélszám (MNA), megfigyelt (H_o) és várt (H_e) heterozigotizáció, polimorfizmus információ tartalom (PIC), Wright F-statisztika értékei (F_{ST} , F_{IS} , F_{IT}) és génáramlás értéke (Nm) a vizsgálatba vont lókuszoson

Lókuszt	n_o	MNA	H_o	H_e	PIC	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	Nm
MAF35	7	4,08	0,374	0,605	0,605	0,097	0,394***	0,437***	2,328
CSSM43	16	8,77	0,400	0,796	0,796	0,134	0,487***	0,553***	1,614
MCM527	13	7,31	0,488	0,802	0,802	0,118	0,328***	0,399***	1,877
TGLA53	12	7,62	0,601	0,863	0,863	0,116	0,227***	0,306***	1,899
MCMA7	16	7,46	0,605	0,853	0,853	0,137	0,211***	0,315***	1,573
OarFCB20	13	6,85	0,402	0,612	0,612	0,112	0,404***	0,465***	1,982
TGLA357	13	7,85	0,581	0,851	0,851	0,124	0,290***	0,372***	1,762
INRA127	15	5,92	0,596	0,664	0,664	0,063	0,118***	0,156***	3,718
MAF70	21	10,69	0,411	0,781	0,781	0,133	0,472***	0,540***	1,627
MAF65	12	5,77	0,318	0,614	0,614	0,151	0,540***	0,610***	1,409
ILSTS11	12	5,23	0,629	0,827	0,827	0,165	0,108***	0,252***	1,262
OarCP20	6	4,00	0,325	0,792	0,792	0,243	0,428***	0,554***	0,779
OarCP49	10	5,08	0,589	0,715	0,715	0,124	0,140***	0,213***	1,760
BM1314	16	8,46	0,617	0,913	0,913	0,136	0,255***	0,356***	1,591
BM6506	10	5,00	0,542	0,768	0,768	0,246	0,109***	0,311***	0,766
OarAE119	8	4,15	0,415	0,673	0,673	0,161	0,300***	0,418***	1,299
Átlag	12,5		0,493	0,758	0,758	0,142	0,301***	0,391***	1,511

*** $p < 0,001$

A genetikai diverzitás, variabilitás fő indexei minden vizsgált állomány viszonylagos magas szintű genetikai variabilitását mutatták. A teljes allélszám populációnként 84 (szerb csókai cigája és svrjik pramenka) és 125 (török kivircik Trákia régióból) között változott. Ha fajtacsoportot vizsgáltunk, a legtöbb allélt (432) a cigája, majd 223 allélt a ruda, 179 allélt a pramenka és végül 521 allélt a többi fajtacsoportéhoz tartozó állományokban mutattunk ki. Az átlagos allélszám a szerb csókai cigája és svrjik pramenka állományokban volt a legkisebb (5,25), míg a legnagyobb (7,81) a török kivircik (Trákia régióból) juhban. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy az MNA értéke nagymértékben függ az elemszámtól és a szerb csókai állományban csupán 12 egyedet vizsgáltunk. A román rozsdás cigája esetén kapott értékünkhöz (7,56) közeli értéket (7,52) kapott egy korábbi tanulmány is ugyanerre a fajtára (Peter és mtsai, 2007). Azonban az észak-európai juhokra kisebb (2,62-6,26 Tapio és mtsai, 2005a), míg a pramenka eredetű pag-szigeti juhra nagyobb MNA értéket kaptak (8,71 Ivankovic és mtsai, 2005). A genetikai diverzitás másik indikátora a várt heterozigotizációs érték (H_e). A vizsgált állományok mindegyike kevésbé heterozigóta, mint ahogy azt vártuk ($H_o < H_e$). A H_e 0,618 (török sakiz) és 0,747 (török kivircik Trákia régióból); a H_o 0,392 (szerb svrjik pramenka) és 0,596 (horvát cigája) között változott. Ez azt jelenti, hogy a horvát cigája esetén kell legkevésbé tartani a beltenyésztettségűtől. Három mikroszatellit vizsgálatával Soysal és mtsai (2005) is 0,7 értéket kapott őshonos fajták, köztük a kivircik esetén. Az albán ruda (0,731) esetében is hasonló eredményt kaptunk (0,77) mint Peter és mtsai (2007). Ez a kis különbség adódhat a különböző markerekből, azok számából vagy az eltérő elemszámból. De akár a mintázott populációk eltérő tenyésztési programjából, beltenyésztettségű fokából vagy más fajtákból történő génáramlásból is eredhet (Laval és mtsai, 2000). A populációkon belüli beltenyésztési együtthatót (F_{IS})

is vizsgáltuk, legnagyobb értéke (0,433) a szerb svrjig pramenka, a legkisebb (0,120) pedig a horvát cigája állományban volt (**2. táblázat**).

2. táblázat: Fő diverzitás mutatók a vizsgált 13 populációra: megfigyelt összállékszám (n_O), átlagos állékszám (MNA), megfigyelt és várt heterozigotitás (H_O és H_E) és populáción belüli beltenyésztési együttható (F_{IS})

Populáció	Jelölés	n_O	MNA	H_O	H_E	F_{IS}
albán bardhoke	AL-BARDH	106	6,63	0,508	0,714	0,306***
albán cigája	AL-TS	122	7,63	0,526	0,710	0,276***
albán ruda	AL-RUDA	112	7,0	0,498	0,731	0,334***
horvát cigája	CR-TS	105	6,56	0,596	0,664	0,120***
román rozsdás cigája	RO-RUST-TS	121	7,56	0,575	0,763	0,262***
román ruda	RO-RUDA	111	6,94	0,493	0,728	0,339***
szerb csókai cigája	SM-CS-TS	84	5,25	0,512	0,680	0,300***
szerb svrjig pramenka	SM-SVR-PR	84	5,25	0,392	0,660	0,433***
szerb krivovirska pramenka	SM-KRI-PR	95	5,94	0,417	0,686	0,412***
török sakiz	TR-SAKIZ	92	5,75	0,429	0,618	0,318***
török kivircik (Marmara régió)	TR-KIV-MAR	98	6,13	0,477	0,733	0,370***
török kivircik (Trákia régió)	TR-KIV-TRA	125	7,81	0,504	0,747	0,338***
török gokceada	TR-GOKCE	100	6,25	0,487	0,653	0,269***

*** $p < 0,001$

Ha az országokénti csoportosítást (ugyanazon fajta, de más országba tartozók) vizsgáltuk, a legnagyobb H_O (0,536) és H_E (0,769) értéket a román populációkra kaptuk, míg a legkisebb H_O (0,423) a szerb, a H_E (0,695) pedig a török populációkban volt. Fajtacsoportonkénti megosztásban a pramenkákban kaptuk a legkisebb H_O (0,402) és H_E (0,699) értékeket. A heterozigóták hiánya a cigája fajtacsoporthoz tartozó állományokban volt a legkisebb (0,557). A csoportokon belüli beltenyésztési együttható (F_{IS}) értéke 0,303 (román) és 0,400 (szerb), illetve a cigája és a pramenka fajtacsoport állományainak értéke között változott (0,228-0,425). Ez azt jelenti, hogy leginkább a szerb állományokban, illetve a pramenka fajtacsoportban kell tartani a beltenyésztéses leromlástól. Az F_{ST} -értékekre, mely az állományok és a teljes populáció közötti kapcsolatra utal, országokénti csoportosítást tekintve a legnagyobb értéket (0,159) a török, a legkisebbet a román (0,062) csoportok adták, míg a fajtacsoportokat nézve a leg értéket (0,154) az egyéb (kivircik, sakiz, bardhoke), majd a cigáják (0,124), a ruda (0,154) és a pramenka (0,059) csoport adott (**3. táblázat**).

3. táblázat: Heterozigotizási és F_{IS} , F_{ST} értékek országokénti és fajtacsoportonkénti megosztásban

Országokénti csoportok	H_o	H_E	F_{IS}	F_{ST}
albán (AL-TS; AL-BARDH; AL-RUDA)	0,506	0,736	0,312	0,101
román (RO-RUST-TS; RO-RUDA)	0,536	0,769	0,303	0,062
szerb (SM-CS-TS; SM-SVR-PR; SM-KRI-PR)	0,423	0,705	0,400	0,090
török (TR-SAKIZ; TR-KIV-MAR; TR-KIV-TRA; TR-GOKCE)	0,472	0,695	0,322	0,159
	NS	NS	NS	NS
Fajtacsoportok				
cigája (AL-TS; CR-TS; RO-RUST-TS; SM-CS-TS)	0,557	0,722	0,228	0,124
pramenka (SM-SVR-PR; SM-KRI-PR)	0,402	0,699	0,425	0,059
ruda (AL-RUDA; RO-RUDA)	0,499	0,751	0,335	0,090
egyéb (AL-BARDH; TR-SAKIZ; TR-KIV-MAR; TR-KIV-TRA; TR-GOKCE)	0,481	0,703	0,316	0,154
	**	NS	*	NS

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, NS-nem szignifikáns

A fajta párokra vonatkozó F_{ST} érték szerint legkisebb a különbség a két szerb pramenka között (0,059) – hasonlóan **Cinkulov és mtsai** (2008) nyugat-balkáni pramenka fajtára vonatkozó eredményéhez –, míg legnagyobb a török gokceada és sakiz között (0,265). A páronkénti F_{ST} értékek három kivétellel (albán bardhoke - cigája, albán cigája – szerb krivovirska és albán barhoke – török kivircik Marmara régióból) mindenhol szignifikánsan eltért 0-tól ($p < 0,5$ vagy $p < 0,01$). A 0,05 értéket, mint az elhanyagolható mértékű különbség értéke, minden populáció pár meghaladja. Ötvennégy esetben az F_{ST} értékek 0,05 és 0,015 között vannak, mérsékelt differenciáltságot jelezve. Kiemeljük a két szerb pramenka (0,059), a két török kivircik (0,067), a szerb csókai-albán ruda (0,062) és a román ruda-román rozsdás cigája (0,062) párokat, melyek értékei éppen meghaladták az elhanyagolható távolsági limitet. Huszonnégy esetben nagy genetikai távolságot határoztunk meg (0,15-0,25), míg egy esetben a török gokceada és sakiz között igen nagy különbséget (0,265) találtunk. Ez utóbbi esetben a magas F_{ST} érték kismértékű génáramlással párosult (0,69). A fajtapárok között az N_m értékek 0,69 és 4,01 között változtak (**4. táblázat**).

4. táblázat: A 13 vizsgált fajta közti populációs differencia értékek, F_{ST} (átló felett) és N_m (átló alatt)

	AL-TS	CR-TS	AL-BARDH	TR-SAKIZ	TR-KIV-MAR	TR-KIV-TRA	TR-GOKCE	RO-RUST-TS	RO-RUDA	AL-RUDA	SM-CS-TS	SM-SVR-PR	SM-KRI-PR
AL-TS	-	0,154**	0,100 ^{NS}	0,136**	0,0635*	0,089**	0,161**	0,072**	0,097**	0,096**	0,089	0,105*	0,138 ^{NS}
CR-TS	1,37	-	0,167**	0,199**	0,140**	0,117**	0,193**	0,137**	0,154**	0,155**	0,169	0,170**	0,150*
AL-BARDH	2,24	1,25	-	0,178**	0,106 ^{NS}	0,113**	0,178**	0,107**	0,118**	0,110**	0,108	0,147**	0,153**
TR-SAKIZ	1,59	1,01	1,16	-	0,140**	0,184**	0,265**	0,150**	0,154**	0,184**	0,215	0,198**	0,194**
TR-KIV-MAR	3,69	1,54	2,10	1,54	-	0,067**	0,152**	0,069**	0,094**	0,096**	0,091	0,093**	0,104**
TR-KIV-TRA	2,55	1,88	1,96	1,11	3,46	-	0,093**	0,063**	0,087**	0,088**	0,086	0,095*	0,091**
TR-GOKCE	1,30	1,05	1,16	0,69	1,39	2,44	-	0,137**	0,140**	0,129**	0,161	0,207**	0,204**
RO-RUST-TS	3,22	1,57	2,10	1,42	3,36	3,73	1,58	-	0,062*	0,088**	0,068	0,103**	0,100**
RO-RUDA	2,34	1,37	1,87	1,38	2,40	2,64	1,54	3,76	-	0,090**	0,112	0,141**	0,110**
AL-RUDA	2,36	1,36	2,02	1,11	2,36	2,58	1,68	2,59	2,54	-	0,062	0,140**	0,135**
SM-CS-TS	2,56	1,23	2,07	0,91	2,51	2,65	1,30	3,40	1,98	3,80	-	0,111**	0,132**
SM-SVR-PR	2,12	1,22	1,45	1,01	2,44	2,39	0,96	2,18	1,53	1,54	2,01	-	0,059**
SM-KRI-PR	1,56	1,42	1,38	1,04	2,15	2,50	0,98	2,26	2,02	1,61	1,65	4,01	-

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, NS – nem szignifikáns

SM-CS-TS populáció kis elemszáma miatt, a "p" értékeket nem jelöltük

Az illeszkedési vizsgálat eredménye szerint legkisebb mértékben (66,67%) a szerb csókai cigája, legnagyobb mértékben (96,77%) az albán bardhoke fajtába sorolt egyedek tartoznak ténylegesen fajtájukba (**5. táblázat**).

5. táblázat: Az illeszkedési vizsgálat eredménye

Populáció	n	N	%
AL-TS	39	4	89,74
CR-TS	47	2	95,74
AL-BARDH	31	1	96,77
TR-SAKIZ	49	8	83,67
TR-KIV-MAR	38	9	76,32
TR-KIV-TRA	52	9	82,69
TR-GOKCE	39	4	89,74
RO-RUST-TS	39	2	94,87
RO-RUDA	39	6	84,62
AL-RUDA	37	5	86,49
SM-CS-TS	12	4	66,67
SM-SVR-PR	36	0	72,22
SM-KRI-PR	31	7	77,42

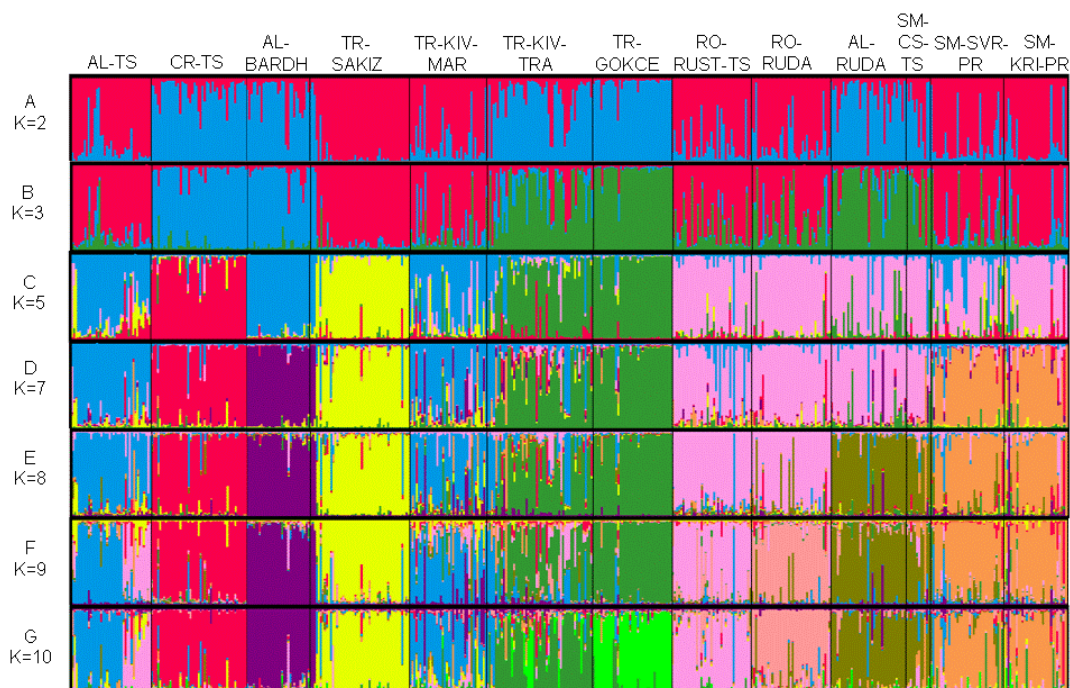
n= vizsgált egyedek száma

N= nem jól besorolt egyedek száma

%= fajtájukba jól besorolt egyedek százaléka

A **2. ábrán** a STRUCTURE klaszteranalízis eredményeit K=2-től ábrázoltuk K=10-ig, amíg következetes eredményt kaptunk. Valószínűleg több mikroszatellitet kellene használni biztosabb eredmény érdekében, szemben más fajokkal, mint a húsmarha vagy a kecske, ahol ez a mikroszatellit szám is elegendőnek bizonyult (**Dalvit és mtsai**, 2008b; **Canon és mtsai**, 2006). **Peter és mtsai** (2007) 57 európai és közel-keleti juhajtát vizsgáltak, köztük az általunk tanulmányozott román ruda, cigája és albán ruda fajtákat is, és hasonló klaszterszerkezetet kaptak. K=2 esetén egy klasztert alkot az albán cigája, török sakiz, török kivircik (Marmara régióból), román rozsdás cigája, román ruda és a két szerb pramenka. Míg K=3 esetén az albán ruda, török gokceada, török kivircik (Trákia régió), illetve az albán bardhoke és horvát cigája is egy klasztert alkot. K=5-től a horvát cigája és a török sakiz külön klasztert alkot K=10-ig. Három szerb, két román és az albán ruda is külön klasztert alkot, míg a török kivircik (Trákia régió) a gokceadával együtt maradt. K=7 esetén több elkülönülés következett: a két szerb pramenka elkülönült az előző klaszterben leírtaktól és az albán bardhoke is végig külön klasztert alkotott inntől. Az albán ruda és a szerb csókai is szeparálódott a következő esetben (K=8), akárcsak a román ruda K=9-nél. K=10 esetén a román rozsdás cigája elkezdett megjelenni az albán cigájában (**2. ábra**).

2. ábra: A vizsgált 13 populáció 489 egyedének klaszteranalízise (K =csoportok száma)



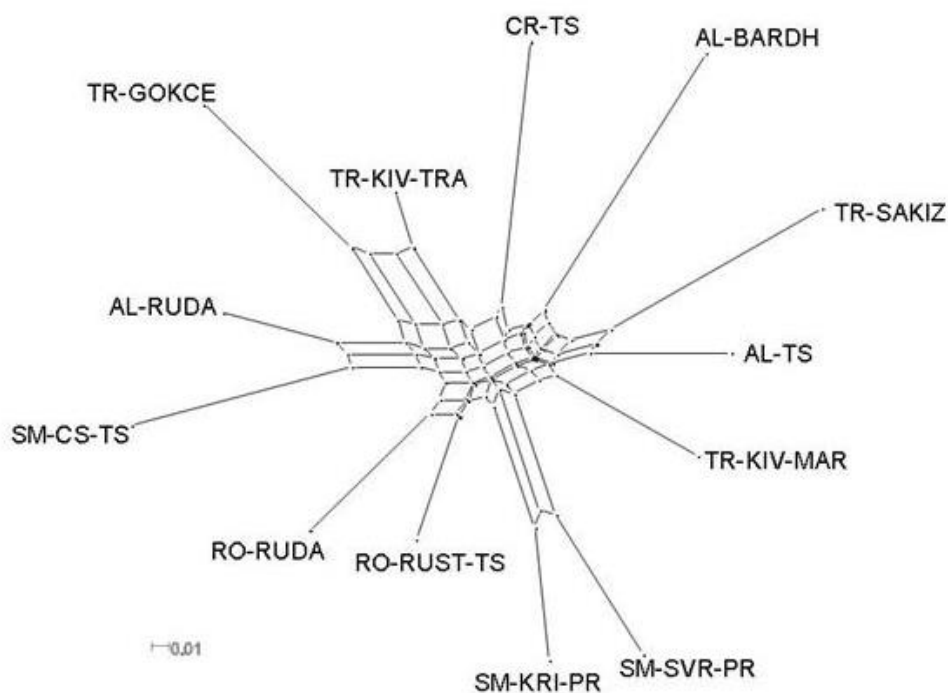
A Nei-féle genetikai távolság (D_A) alapján is a legközelebbi rokonságban a két szerb pramenka, illetve a román ruda és román rozsdás cigája (0,181) állomány áll, míg legnagyobb távolságban a török gokceada és a sakiz (0,471) (**6. táblázat**). Ezen nagyfokú elkülönülésnek történeti okai lehetnek, míg a sakiz a görög chios török változata, a gokceada egy tipikus török fajta (**Soysal**, 2005). Mind a genetikai távolság, mind a génáramlás eredményei azt mutatják, hogy a két szerb pramenka, román ruda és rozsdás cigája áll a legközelebb egymáshoz a vizsgált állományok között, ami ugyancsak történelmi okokra vezethető vissza. Kialakításukkor még nem ott húzódtak a politikai határok, mint napjainkban. A román ruda a zombori cigájából eredeztethető, és a mai Romániába a mai Bulgária területéről került 1820-ban (**Draganescu**, 2005). A román rozsdás cigája az ősi cigájából alakult ki (**Kukovics és Kume**, 2005). Azonban a román ruda és a rozsdás cigája közeli genetikai kapcsolata továbbra is talány marad, mivel állományaik több mint 300 km-re találhatók egymástól, és közöttük semminemű múltbeli tenyésztési kapcsolatról nincs tudomásunk. **Mason** (1967) állítását bizonyítottuk, miszerint a ruda fajta genetikai kapcsolatban állhat a török kivircikkel és a helyi cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhokból eredeztethető. Azonban eredményeinkkel ellentétben, **Peter és mtsai** (2007) nagyon közeli kapcsolatot találtak az albán bardhoke és ruda illetve a román cigája között.

6. táblázat: Nei-féle genetikai távolság (D_A) értékek a vizsgált populációk között

	AL-TS	CR-TS	AL-BARDH	TR-SAKIZ	TR-KIV-MAR	TR-KIV-TRA	TR-GOKCE	RO-RUST-TS	RO-RUDA	AL-RUDA	SM-CS-TS	SM-SVR-PR	SM-KRI-PR
AL-TS	-												
CR-TS	0,305	-											
AL-BARDH	0,314	0,369	-										
TR-SAKIZ	0,238	0,343	0,352	-									
TR-KIV-MAR	0,221	0,296	0,305	0,273	-								
TR-KIV-TRA	0,264	0,256	0,317	0,358	0,236	-							
TR-GOKCE	0,366	0,368	0,412	0,471	0,377	0,183	-						
RO-RUST-TS	0,231	0,306	0,331	0,320	0,234	0,211	0,321	-					
RO-RUDA	0,274	0,334	0,372	0,338	0,297	0,244	0,304	0,181	-				
AL-RUDA	0,315	0,336	0,352	0,390	0,303	0,238	0,283	0,254	0,244	-			
SM-CS-TS	0,345	0,409	0,393	0,460	0,352	0,338	0,363	0,287	0,334	0,217	-		
SM-SVR-PR	0,299	0,356	0,428	0,359	0,292	0,286	0,416	0,270	0,336	0,350	0,367	-	
SM-KRI-PR	0,327	0,330	0,397	0,365	0,268	0,250	0,416	0,247	0,270	0,333	0,370	0,181	-

A D_A távolság értékek alapján dendrogramot is szerkesztettünk, amin a fa fő struktúrája földrajzi elkülönülést mutatott (**3. ábra**). Egyértelműen látszik itt is a két pramenka állomány, illetve a román rozsdás és román ruda közeli viszonya. Ez utóbbi eset jelentheti azt, hogy volt közös ősök, de a keresztezések eredményeként mára morfológiailag teljesen különbözőekké váltak. A horvát cigája elkülönül a többi cigája állománytól annak ellenére, hogy ismereteink szerint ezt a fajtát a szerb cigájáktól származó hatások érheték. A török kivircik juhok a cigája fajtakör közeli rokonaként tartják számon, azonban a mi eredményeink ezt egyértelműen nem támasztják alá.

3. ábra: A vizsgált 13 juhállomány filogenetikai hálózata



Új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága

A magyar, illetve kelet-közép-európai országokban a kiskérődzőkkel végzett genetikai vizsgálatok háttérbe szorultak a szarvasmarha fajra irányuló kutatásokkal szemben, azonban ezek a fajok/fajták is nagy értéket képviselnek kultúrtörténeti szempontból. A történelmi adatok segítséget nyújthatnak az egyes fajták és kapcsolataik korrekt leírásához. Különböző civil szervezetek (EAAP, DAGENE, FAO stb.) segítségével korrekt, rövid, sztenderd fajtaleírásokat kellene meghatározni, nemzetközi szinten érvényes, a filétikus csoporthoz rendelhető fajtanevekkel, mindemellett olyan korrekt klasszifikációs rendszert létrehozni, ami megbízható minden egyes fajtára nézve. A klasszikus módszerek használata mellett a molekuláris genetika is segíthet a helyzet tisztázásában.

Vizsgálatunkat egy elsődlegesen a cigája fajta megismerésére irányuló nemzetközi pályázat keretében végeztük. Az eredmények igazolták, hogy a fajta tulajdonképpen egy fajtacsoport, amelybe több populációt sorolnak, és közülük több értékes, ritka genetikai variációt tartalmaz. Megállapítottam, a vizsgált állományok közötti genetikai különbségek mértékét. Eredményeim szerint vitatható **Draganescu** (2003) állítása, miszerint a cigája juh fajta a román ruda fajtaból alakult ki. Az azonban bizonyítást nyert, hogy a vizsgált állományok

közül a román ruda legközelebb a rozsdás cigájához állt. **Mason** (1967) állítását bizonyítottam, miszerint a ruda fajta genetikai kapcsolatban állhat a török kivircikkel és a helyi cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhokból eredeztethető. Országokénti csoportosításban a heterozigóta hiány a szerb állományokban volt a legnagyobb, fajtacsoportonkénti felosztásban pedig a pramenka fajtakörben. Ugyanez az érték a horvát cigájában, illetve a cigája fajtakörbe tartozó populációkban volt a legkisebb, azaz beltenyésztettségűtől ezen populációk esetében kell tartani. A különböző fajtákba (populációkba) sorolt egyedek magas százalékban ténylegesen a saját fajtájukba tartoznak, csak kis mértékben mutatható ki más fajtákra jellemző genetikai hatás. Leghomogénebb az albán bardhoke és a horvát cigája volt. A genetikai szerkezetre irányuló vizsgálattal megerősítettem, hogy a vizsgált állományok genetikai szerkezete összefüggésben van azok földrajzi elhelyezkedésével. A vizsgált állományok, fajták génrezervként kezelendők és alapul szolgálhatnak beltenyésztett, modern fajták javítására. A kapott eredmények kihathatnak az élelmiszerbiztonságra, beleértve a genetikai értékek megmentését az éghajlatváltozásra adott válaszaik által.

2.1.2. Hortobágyi racka

Irodalmi áttekintés

A cigája juh mellett másik, őshonos hasznosítású fajtánk a hortobágyi racka juh. A fajta eredete nem pontosan ismert. A Kárpát-medencében az első régészeti emlékek a 16.-17. századból származnak (**Bedő és mtsai**, 2003). A 19. század második felétől a finomgyapjas fajták, főleg a merinó kezdte kiszorítani a magyar rackát a tenyésztésből, amit 1903-ban már kipusztulófélben lévő fajtának is nyilvánítottak. Az anyajuh létszám 1911-re 15 000 egyedre, majd a II. világháború után 1450 egyedre csökkent (**Dunka**, 2002). A trianoni béke után, Magyarországon elsősorban az Alföldön (Debrecenben, Hortobágyon, Békés és Csongrád megyében) tenyésztették a fajtát, ezért terjedt el az 1950-es években a hortobágyi racka juh elnevezés (http://www.ddnp.hu/index_v.php?pg=menu_1152). A fajta megmentésére, tenyésztésére 1983-ban létrehozták a Magyar Rackajuh-tenyésztő Egyesületet 1200 anyajuhval (**Veress és mtsai**, 2002). Mára a fajtatiszta anyajuh létszám elérte a 6000 egyedet. Jelentősebb állomány a Hortobágyi Nemzeti Park Igazgatóság, a Fertő-Hansági Nemzeti Park Igazgatóság és a Körös-Maros Nemzeti Park Igazgatóság valamint a Balaton-felvidéki Nemzeti Park Igazgatóság területén található.

A fajta sikeréhez hozzájárul, a rendkívül ízletes, tápláló, faggyúval kevésbé átszőtt húsa, a tartási körülményekkel szembeni igénytelensége és a betegségekkel szembeni ellenállóképessége (**Hankó**, 1954; **Schandl**, 1959; **Bedő és mtsai**, 2003). A hortobágyi racka különleges tulajdonsága a szarv alakulása is. Valószínűleg mutáció következményeként maradt meg, mint fajtajelleg, a „V” alakban álló pödrött szarv (**Matolcsi**, 1975; **Dunka**, 2002). Napjainkban, Kínában és Afrikában ismerünk még ilyen szarvalakulású fajtákat (**1. kép; Epstein**, 1972; **Bodó**, 2000).



1. kép: Pödrött szarvú juhok Kínában (Forrás: saját fotók, 2007)

A hortobágyi rackát két színváltozatban tenyésztik: a fehér, és a fekete (**Dunka**, 2002). A fehér színváltozatú egyedek gyapja sárgásfehér, krémszínű, míg a pofa és a lábak világosbarnák. Bőrük pigmentmentes, szarvuk viaszszárga. Születéskor a bányók színe barnássárga vagy teljesen barna. A fekete színváltozatú egyedek születésüktől fekete színűek, gyapjuk rövid, göndör, bőrük, körmük és nyelvük palaszürke színű. A kor előrehaladtával megjelenhetnek a bundában ősz szálak „darusodás”, amitől az sötét színűvé válhat (**Bedő és mtsai**, 2003). A fehér szín öröklődése recesszív a feketével szemben, így a fehér egyed mindig homozigóta, míg a fekete általában heterozigóta genotípusú. A II. világháborút követően a két színváltozatba tartozó egyedek keveredhettek, azonban a Magyar Rackajuh-

tenyésztő Egyesület létrehozása után (1983) már nem, szín szerinti párosításokat végeztek (Veress és mtsai, 2002).

Jelenleg főleg genetikai tisztaságának megőrzése, genetikai varianciájának fenntartása, tejének, húsának illetve a belőlük készült termékeknek, bioélelmiszerként való hasznosítása miatt tenyésztik, de egyre több helyen turistacsalogató látványosság is. Vizsgálatunk célját az adta, hogy megállapítsuk a hortobágyi racka genetikai diverzitásának szintjét, illetve, hogy pontot tegyünk egy rég vitatott kérdésre, miszerint a két színváltozat mennyire különül el egymástól.

Anyag és módszer

Mintavétel és genomiális DNS izolálás

A gyapjú, illetve vérminták begyűjtése 2005-ben zajlott, állományonként 50 nem rokon egyedtől. Az egyedenként 2,5-3,0 ml vért az állatok torkolati vénájából (*vena jugularis*) vettük EDTA véralvadásgátlót tartalmazó csövekbe. Állatonként új injekciós tűt használtunk, a keresztszennyezések elkerülése céljából. A mintákat a vizsgálat megkezdéséig -20 °C-on tároltuk. A filogenetikai fa külsoportjaként (outgroup) egy bosnyák fajtát is bevontunk a vizsgálatba (privovirska, n=38), melyből tépett gyapjúminta került mintázásra, ugyancsak nem rokon egyedektől. A mintákat egyesével nejlonzacskóban, szobahőmérsékleten tároltuk a laboratóriumi vizsgálatokig (7. táblázat).

7. táblázat: A genetikai távolság meghatározáshoz vizsgált állományok és azok jellemzői

Mintavétel helye	Minta típusa	Gyapjú szín	Elemzés
Hortobágy	vér	fehér	48
Hortobágy	vér	fekete	46
Mátranovák	vér	fehér	45
Mátranovák	vér	fekete	22
Salföld	vér	fehér	49
Salföld	vér	fekete	43

A teljes vérből történő genomiális DNS kivonása Zsolnai és Orbán (1999) módszere, míg a gyapjúmintákból a FAO/IAEA (2004) protokollja alapján történt. Mindkét esetben pontosan a megadott módszertani lépéseket követtük.

Mikroszatellit vizsgálat

A mikroszatellit vizsgálat során 15 markert választottunk azok polimorfizmusa, elhelyezkedése (különböző kromoszómán) illetve más kutatásukban való használatuk gyakorisága szerint (8. táblázat). Figyelembe vettük az United States Department of Agriculture (USDA); Australian Gene Mapping Web Site; Food and Agricultural Organization (FAO); International Society for Animal Genetics (ISAG) ajánlásait is.

8. táblázat: Az alkalmazott mikroszatellitek főbb jellemzőikkel. Zárójelben a kromoszóma látható. A forward primerek 5' vége lett fluoreszcens festékekkel jelölve. A három multiplexbe tartozó markerek elválasztással vannak jelölve.

Lókuszt	T _m (°C)	Hossz (bp)	Jelölés	Forward primer szekvencia (5'-3')	Reverse primer szekvencia (5'-3')	Referencia
MAF35 (23)	60	94-110	NED	AGTTACAAATGCAAGCATCATACCTG	TCAAGAATTTTGGAGCACAATTCTGG	Swarbrick és mtsai, 1991
McM527 (5)	60	163-175	FAM	GTCCATTGCCTCAAATCAATTC	AAACCACTTGACTACTCCCCAA	Hulme és mtsai, 1994
TGLA53 (12)	60	117-143	FAM	CAGCAGACAGCTGCAAGAGTTAGC	CTTTCAGAAATAGTTTGCATTCATGCAG	Crawford és mtsai, 1995
OarAE119 (19)	56	145-181	FAM	CTCAGCAAATGGTTCCTGGGCACC	TTTTATAGTGAGGTGACCACTTGATG	Penty és mtsai, 1993
McM2 (4)	57	82-120	FAM	TCCAGGATTCATTATGTAGTAGAGCG	TTTCAAGTGACTTCTCCAGAGAC	Maddox és mtsai, 2001
BMS648 (4)	57	171-179	VIC	ACTTCCCATCCATCCATCAGG	CTTCCATCTCAGCCATCTAGCG	Maddox és mtsai, 2001
OarCP125 (6)	58	92-121	VIC	GCAAATAGCCTCTTGTATGATCCTTGG	ACCAAACAAGACCTTTATTTTTCATGG	http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm
DK1183A (6)	58	215-243	VIC	CCTCCTGCAAACAAGCAGCCT	TGCCTTGGGTTGAGCCTTTTCT	http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm
INRA127 (8)	54	186-208	FAM	CTACAGCTCTGATGAGAACC	CGTTTTCTCAAACCTTCATTGCC	Vaiman és mtsai, 1994
ILSTS11 (9)	58	270-284	NED	GCTTGCTACATGGAAAGTGC	CTAAAATGCAGAGCCCTACC	Brezinsky és mtsai, 1993
BMS1316 (10)	56	105-135	PET	CCTTCATGGAAGAAATTTTGTG	GGAGTTACAGTCCATGGGTTC	Maddox és mtsai, 2001
BM6506 (1)	54	189-207	NED	GCACGTGGTAAAGAGATGGC	AGCAACTTGAGCATGGCAC	Bishop és mtsai, 1994
MAF65 (15)	59	115-137	FAM	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG	CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	Buchanan és mtsai, 1992
MAF70 (4)	60	131-173	VIC	GCAGGACTCTACGGGGCCTTTGC	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC	Crawford és mtsai, 1992
CSSM43 (26)	54	235-271	FAM	AAAACCTCTGGGAACCTTGAAACTA	GTTACAAATTTAAGAGACAGAGTT	Moore és mtsai, 1994

A polimeráz láncreakció (PCR) során a következő protokollt használtuk 25 µl-re: 10mM 10x puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1% Triton X-100) (Promega, Madison, USA), 2,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, USA), 0,5U Taq polymerase, 160nM forward és reverse primer, 0,2mM dNTP és 10–50 ng genomális DNS.

A PCR kondíciók a következők voltak: 10 perc 95°C, 35 cikluson keresztül 20 másodperc 94°C, 45 másodperc X °C (**8. táblázat**) és 30 másodperc 72°C majd végül 10 perc 73°C.

Három multiplexet alakítottunk ki a fragment analízishez, ezzel csökkentve a vizsgálat költségét és idejét (**8. táblázat**).

Az elegyeket 95°C-on 2 percig inkubáltuk, majd azonnal jégre tettük 2-3 percre, az analizátorba való helyezés előtt. Az allélok detektálása és vizsgálata ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-rel történt.

Statisztikai értékelés

A GeneMapper v 3.7. (Applied Biosystems, USA) szoftvert használtuk az eredmények értékeléséhez. A GENEPOP vs 3.4. és POPGENE vs 1.3 programokat (**Raymond és Rousset**, 1995; **Yeh és mtsai**, 1999) használva határoztuk meg a lókuszonkénti allélszámokat, a várt (H_E) és megfigyelt (H_O) heterozigotitási értékeket, a génáramlási értékeket (N_m) és a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést az egyes lókuszok esetén. Az FSTAT v2.9.3 (**Goudet**, 1995) programmal határoztuk meg a Wright-féle statisztika (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) (**Wright**, 1978) értékeit. Az AMOVA analízist a genetikai variancia eredetének meghatározására végeztük el az ARLEQUIN v 3.1 programmal (**Excoffier és mtsai**, 2005), akárcsak a páronkénti F_{ST} értékek meghatározását. A POPGENE vs 1.3 szoftverrel a Nei-féle torzítatlan genetikai távolság értékeinek (**Nei**, 1987) meghatározása után azokat a filogenetikai fa létrehozására használtuk a SPLITTREE4 v4.9.1 (**Huson és Brayant**, 2006) szoftverrel. A STRUCTURE v 2.0 (**Pritchard és mtsai**, 2000) szoftverrel a vizsgált állományok klaszteranalízisét végeztük el: 20 000 burn in lépés, 200 000 iteráció, 1 000 000 MCMC lépés beállításokkal. Az egyes genotípusok csoportokba való besorolása előfeltételezés nélkül történt. A STRUCTURE szoftver eredményeinek vizualizálása minden K csoportra a DISTRUCT programmal (**Rosenberg**, 2004) történt.

Eredmények és azok megvitatása

A hortobágyi racka állományokban összesen 121 allélt azonosítottunk a 15 mikroszatellit marker alapján. Minden vizsgált lókusz polimorf volt. A legtöbb allélt a CSSM43 (14), míg a legkevesebbet az INRA127 (3) lókuszon detektáltunk. A megfigyelt heterozigotitási értékek négy lókusz kivételével (BM6506, MAF70, MAF35, TGLA53) kisebb értéket vettek fel, mint a vártak. Az átlagos várt heterozigotitási érték 0,723 volt, míg a megfigyelt 0,697. A Hardy-Weinberg egyensúlytól (HWE) szignifikáns eltérés két lókuszon volt kimutatható, az MCM527 ($p \leq 0,001$) és a MCM2 ($p < 0,05$) lókuszokon. Az átlagos F_{IT} értéke 0,053, az átlagos F_{IS} -0,009 míg az átlagos F_{ST} érték 0,061 volt. Azaz a teljes genetikai variancia 6,1 %-a a populációk közti, míg a többi az egyedek közti különbségből ered. A legnagyobb heterozigóta hiány az MCM5275 (0,137), a legkisebb az MAF35 (-0,072) lókuszon volt detektálható. A lókuszok átlagos génáramlásának mértéke 3,530, ami nagy mértékű génáramlásra utal (**9. táblázat**).

9. táblázat: A vizsgált lókuszok főbb jellemzői (megfigyelt allélszám (n_o), megfigyelt (H_o) és várt (H_e) heterozigotázis, p-érték, Wright-féle statisztika értékei (F_{ST} , F_{IS} , F_{IT}), Nei-féle N_m)

Lókusz	n_o	H_o	H_e	P- érték	F_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	N_m
OarAE119	8	0,722	0,737	0,409	0,089	-0,024	0,067	2,614
BMS648	4	0,610	0,620	0,183	0,058	-0,038	0,017*	4,556
OarCP125	9	0,734	0,752	0,712	0,075	-0,045	0,034	3,052
DK1183A	12	0,681	0,755	0,046	0,099	0,012	0,110	2,362
MCM2	11	0,854	0,855	0,048	0,040	-0,034	0,008*	4,743
BM6506	7	0,718	0,696	0,298	0,018	-0,030	-0,011*	9,168
CSSM43	14	0,745	0,808	0,715	0,079*	0,019	0,096	2,649
BMS1316	7	0,696	0,761	0,438	0,055*	0,030	0,084*	3,992
ILSTS11	8	0,668	0,699	0,315	0,069	-0,004	0,066*	3,441
INRA127	3	0,416	0,437	0,994	0,047	-0,019	0,028*	3,935
MAF65	9	0,791	0,824	0,591	0,072	-0,008	0,064	2,867
MAF70	12	0,744	0,729	0,868	0,043	-0,042	0,002*	4,702
MAF35	4	0,760	0,727	0,334	0,073	-0,072	0,006	3,103
MCM527	5	0,559	0,700	0,001	0,077	0,137	0,203	2,886
TGLA53	8	0,763	0,748	0,918	0,024	-0,019	0,006*	6,613
Átlag±s.d.	8,067±3,240	0,697±0,105	0,723±0,098		0,061	-0,009	0,053	3,530

* $p < 0,05$

Az átlagos allélszám a mátránováki fekete (5,200±1,514) állományban volt a legkevesebb, azonban ez adódhat abból, hogy itt volt a legkisebb a mintaszám. A hortobágyi állományban (7,467±2,553) volt a legmagasabb az MNA értéke, míg a salzföldiben (6,667±2,494) a legalacsonyabb. Ha színek szerint néztük az átlagos allélszámot, azt kaptuk, hogy a fehér állományban (7,667±3,155) magasabb értéket adott, mint a feketében (7,000±2,449). Az állományonkénti megfigyelt heterozigotázis érték 0,682±0,130 (salföldi fekete) és 0,719±0,102 (salföldi fehér) között, míg a várt 0,669±0,096 (hortobágyi fekete) és 0,708±0,121 (hortobágyi fehér) között változott. Az állomány szinten (fehér és feketék egyben) és színenként nézve is a megfigyelt heterozigotázis értékek kisebbek a várténál. A heterozigóták hiánya nagyobb a hortobágyi állományban, mint a mátránováki vagy a salzföldiben, illetve magasabb a fekete szín esetén, mint a fehérben. A beltenyésztési együttható értéke -0,030 (hortobágyi fekete) és 0,000 (mátránováki fehér) között változott. Az állományok földrajzi helye és színe szerinti csoportosítások szerint pozitív F_{IS} értékeket kaptunk, mely az alpopulációkon belüli beltenyésztettségére utal. Értéke állományok szerinti csoportosításban a mátránovákiban volt a legmagasabb, majd a salzföldi és hortobágyi következett. Szín szerinti megosztás viszonylatában a fekete színű állományokban kell a beltenyésztéses leromlástól jobban tartani (**10. táblázat**).

10. táblázat: Fő diverzitás mutatók a vizsgált racka populációkra különböző csoportosításokban: elemszám (n), átlagos allélszám (MNA), megfigyelt és várt heterozigotizás (H_O és H_E) és populáción belüli beltenyésztési együttható (F_{IS})

Populáció	n	MNA $\pm$ s.d.	$H_O\pm$ s.d.	$H_E\pm$ s.d.	F_{IS}
hortobágyi fehér	48	6,733 $\pm$ 2,265	0,706 $\pm$ 0,142	0,708 $\pm$ 0,121	-0,003
hortobágyi fekete	46	6,000 $\pm$ 2,000	0,688 $\pm$ 0,121	0,669 $\pm$ 0,096	-0,030
mátranováki fehér	45	6,533 $\pm$ 2,306	0,705 $\pm$ 0,167	0,705 $\pm$ 0,136	0,000
mátranováki fekete	22	5,200 $\pm$ 1,514	0,693 $\pm$ 0,118	0,690 $\pm$ 0,077	-0,003
salföldi fehér	49	6,267 $\pm$ 2,380	0,719 $\pm$ 0,102	0,703 $\pm$ 0,105	-0,024
salföldi fekete	43	5,667 $\pm$ 1,955	0,682 $\pm$ 0,130	0,676 $\pm$ 0,087	-0,010
hortobágyi egyben	94	7,467 $\pm$ 2,553	0,697 $\pm$ 0,121	0,709 $\pm$ 0,103	0,016
mátranováki egyben	67	6,800 $\pm$ 2,315	0,700 $\pm$ 0,137	0,723 $\pm$ 0,104	0,030*
salföldi egyben	92	6,667 $\pm$ 2,494	0,702 $\pm$ 0,107	0,715 $\pm$ 0,091	0,018
fehér színűek egyben	142	7,667 $\pm$ 3,155	0,710 $\pm$ 0,120	0,719 $\pm$ 0,115	0,012
fehér színűek egyben	111	7,000 $\pm$ 2,449	0,687 $\pm$ 0,103	0,704 $\pm$ 0,079	0,024

* $p < 0,05$

A vizsgált állományok genetikai szerkezetének vizsgálatakor az AMOVA teszt azt mutatta, hogy a variancia túlnyomó része az egyedek szintjén van, mind az állományok (98,02 %), mind a szín szerinti csoportosítások (96,70 %) esetén (**11. táblázat**).

11. táblázat: Az AMOVA teszt eredményei a magyar racka állományok különböző csoportosításai mellett

Variancia forrása	d.f.	Négyzet- összeg	Variancia elemek	Variancia (%)	F-statisztika
<u>Állományok között</u>					
Állományok között	2	41,355	-0,058	-1,32	$F_{CT} = -0,013$
Populációk között a 3 állományon belül	115	86,389	0,304	6,96	$F_{SC} = 0,06^*$
Egyedek között populáción belül	247	979,714	-0,160	-3,66	$F_{IS} = -0,039$
Egyedek között	253	1084,500	4,287	98,02	$F_{IT} = 0,020$
<u>Szín szerinti csoportosítás</u>					
Fekete és fehér között	1	49,878	0,119	2,69	$F_{CT} = 0,027$
Egyedek között a két színben belül	4	77,866	0,187	4,22	$F_{SC} = 0,043^*$
Egyedek között populáción belül	247	979,714	-0,160	-3,61	$F_{IS} = -0,039$
Egyedek között	253	1084,500	4,287	96,70	$F_{IT} = 0,033$

* $p < 0,001$

A páronkénti F_{ST} értékeket vizsgálva arra jutottunk, hogy a legkisebb genetikai különbség a salföldi és hortobágyi fehér állományok között (0,011), míg a legnagyobb a hortobágyi és mátranováki fekete, illetve a salföldi fehér és mátranováki fekete (0,092) állományok között mérhető. Azonban ezek az értékek – még a legmagasabb is – elhanyagolhatóak, illetve

mérsékelt genetikai különbségekre utalnak a vizsgált populációk között (**12. táblázat**). Ha a három helyről származó állományt nézzük, legnagyobb különbséget a hortobágyi és mátranováki állományok között (0,028), míg legkisebbet a hortobágyi és salzföldi (0,015) állományok között kapjuk. A mátranováki állományt a Salföldről és Hortobágyról vásárolták, míg a salzföldi állomány fekete racka állománya a Fertő-Hanság Nemzeti Parkból és a veszprémi vadasparkból származik (**Földi**, 2006 szóbeli közlés). A fekete és fehér színváltozatok között a páronkénti F_{ST} érték 0,041, ami az elhanyagolható genetikai differenciáltság felső határát jelzi. Hasonló értéket (0,042) kapott **Zsolnai és mtsai** (2014a) tanulmánya is, az egy helyről származó magyar fekete ($n=9$) és fehér ($n=22$) racka állományok között, 31 mikroszatellit felhasználásával. Az N_m értékek magasak, 4,952 (hortobágyi és mátranováki fekete között) és 45,244 (salföldi és hortobágyi fehér között) között mozognak, nagyfokú génáramlásra utalva az állományok között.

12. táblázat: Páronkénti F_{ST} értékek (átló felett) és génáramlási érték N_m (átló alatt)

	hortobágyi fehér	hortobágyi fekete	mátranováki fehér	mátranováki fekete	salföldi fehér	salföldi fekete
hortobágyi fehér	-	0,062**	0,029**	0,076**	0,011**	0,070**
hortobágyi fekete	7,560	-	0,070**	0,092**	0,057**	0,064**
mátranováki fehér	17,022	6,696	-	0,070**	0,044**	0,075**
mátranováki fekete	6,105	4,952	6,622	-	0,092**	0,034**
salföldi fehér	45,244	8,199	10,943	4,981	-	0,073**
salföldi fekete	6,619	7,315	6,184	14,080	6,361	-

** $p < 0,01$

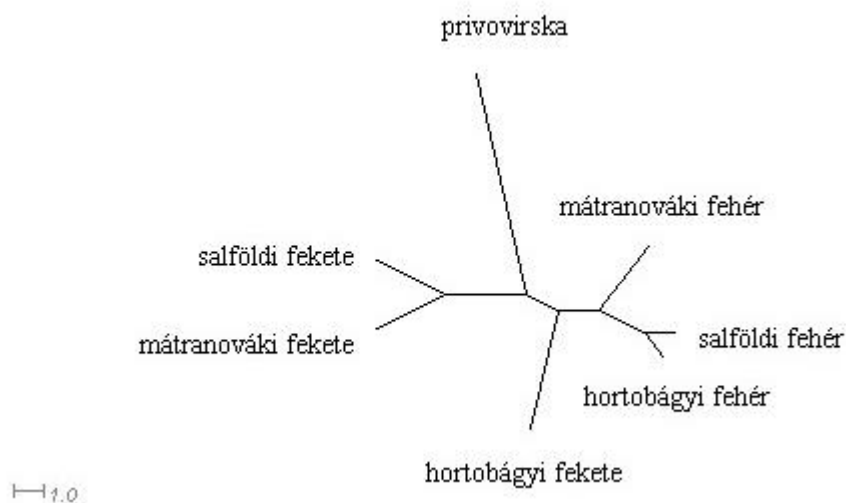
A vizsgált állományok közötti genetikai kapcsolat meghatározásához a Nei-féle torzítatlan genetikai távolság értékeit is meghatároztuk. Hasonló eredményeket kaptunk, mint a páronkénti F_{ST} értékek esetén. Legkisebb távolságot a hortobágyi és salzföldi fehér (0,037), míg legnagyobb távolságot mátranováki fekete és salzföldi fehér (0,267) állományok között mértünk (**13. táblázat**). A fekete és fehér színű állományok között ez a távolság érték 0,107 volt.

13. táblázat: Nei-féle torzítatlan genetikai távolság értékek a racka állományok között

	hortobágyi fehér	hortobágyi fekete	mátranováki fehér	mátranováki fekete	salföldi fehér	salföldi fekete
hortobágyi fehér	-					
hortobágyi fekete	0,149	-				
mátranováki fehér	0,088	0,175	-			
mátranováki fekete	0,226	0,237	0,206	-		
salföldi fehér	0,037	0,149	0,123	0,267	-	
salföldi fekete	0,180	0,148	0,189	0,100	0,183	-

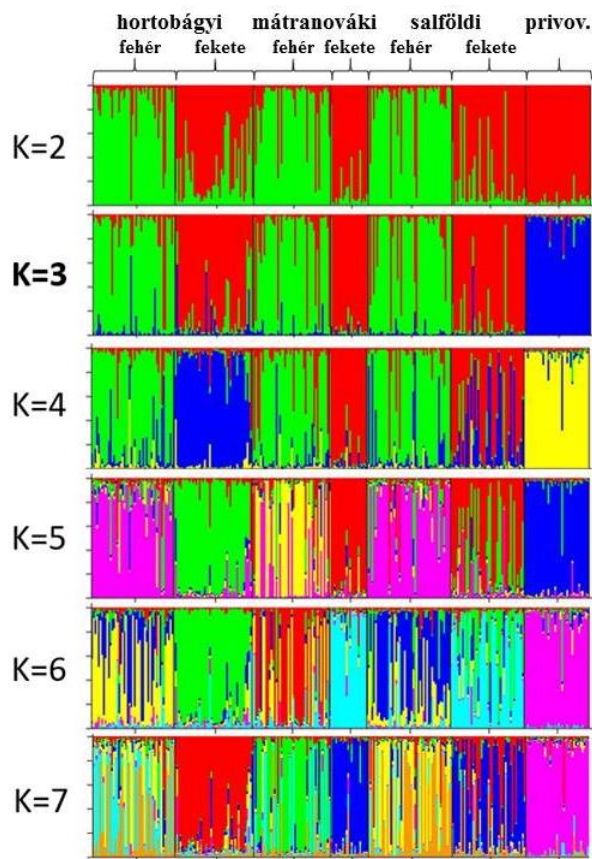
Az előzőekben bemutatott Nei-féle torzítatlan genetikai távolság értékek felhasználásával filogenetikai fát hoztunk létre az állományok közti különbségek vizualizálására. Egy, a hortobágyi rackához hasonlóan zackel fajtakörbe tartozó bosnyák fajtát, a privovirskát használtuk kulcsoportként (**4. ábra**). Jól kitűnik a privovirska elkülönülése a hortobágyi rackától, illetve azok egymáshoz való viszonya is.

4. ábra: Filogenetikai fa a magyar racka és a bosnyák privovirska állományok genetikai távolságának bemutatására Nei-féle torzítatlan genetikai távolság érték felhasználásával



A STRUCTURE szoftverrel klaszteranalízist is végeztünk K=2-K=7 csoportosítással. A K=3 csoportosítás adta a legmegbízhatóbb eredményt ($\Delta K=142,871$), ahol a három klaszter a következő: privovirska, a három fehér állomány, a három fekete állomány. K=4 esetén elkülönül a hortobágyi fekete állomány, a három fehér továbbra is egy klaszterben marad. K=5-nél a mátranováki fehér válik ki a fehéréket alkotó klaszterből, K=6 és K=7 esetén fixen klasztert alkotnak a mátranováki és salföldi fekete állományok (**5. ábra**).

5. ábra: Klaszteranalízis eredménye K=2-K=7



Új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága

A kapott eredmények szerint a vizsgálatba vont három magyar hortobágyi racka állomány genetikai diverzitása közepes, a közöttük levő genetikai különbözőség elhanyagolható, illetve mérsékeltnek tekinthető mind az állományok földrajzi helyei, mind pedig a színváltozatok között. Annak ellenére, hogy a genetikai differenciáltság jelei kis mértékben, de mutatkoznak, továbbra is a fehér és fekete színek fajtán belüli változatként való kezelését javaslom. Beltenyésztési leromlásra utaló jeleket mutattam ki, elsődlegesen a fekete színváltozatban. Az állományok teljes genetikai varianciájának túlnyomó része az egyedek között található.

Mivel az őshonos fajtákkal lehet a leggazdaságosabban természetes környezetben, ökológiai gazdálkodás keretében kimagasló minőségű élelmiszert, alapanyagot előállítani, így a fajta védelmi helyzete továbbra is indokolt és feladatot jelent a juhtenyésztő gazdáknak.

Kutatói tevékenységem alatt kutatásvezetőként, illetve hazai és nemzetközi együttműködések konzorciális partnereként több vizsgálatot folytattam/folytatok kecske és juh fajtákkal. Elsősorban különböző fajták genetikai eredetét, rokonságát próbáltuk feltárni eltérő markerek használatával, de ezeken túl tejfehérje gének és hústermelésre ható gének polimorfizmus meghatározásával közvetlenül is segítettem a kecske- és juhtenyésztők szelekciós munkáját (**Kusza és mtsai**, 2007; 2015; 2016; 2017; 2018a,b; **Ilie és mtsai**, 2018). Egy jelenleg futó kutatásban különböző éghajlati öveken (trópusi, mediterrán, kontinentális) honosodott juhajták hőstressz, tej-, és hústermelésre, immunválaszra ható gének expressziós szintjének változását mérjük (qPCR) és hasonlítjuk össze évszakonként, feltételezve, hogy eltérő éghajlaton kialakult/élő fajták másképp alkalmazkodtak a környezetükhöz és a változó hőmérsékleti viszonyokra eltérő mértékben válaszolnak. Fontos, hogy minél több markert használjunk vizsgálataink során, s ezáltal minél pontosabb eredményt kaphassunk kérdéseink megválaszolására. Így jobban megismerhetjük a fajták múltját, és ezzel hozzájárulunk azok genetikai variabilitásának megőrzéséhez a jövő számára.

2.2. Szarvasmarha

2.2.1. Román szürke marha

Irodalmi áttekintés

Az állattenyésztési ágazatok közül a szarvasmarha kiemelkedően fontos faj. Jelentős szerepet játszott az emberiség történelmében, kultúrájában, hatással volt az emberi társadalmakra. A világ szarvasmarha létszáma 1,4 milliárd egyedre tehető, ebből 159 millió (11%) található Európában és Közép-Ázsiában (**Felius és mtsai**, 2011; **FAO**, 2014). A Domestic Animal Diversity listája alapján (**FAO**, 2015), az európai országokban jelenleg 464 szarvasmarha fajta minősül helyi vagy regionális fajtának, azonban ez a szám valószínűleg magasabb, hiszen körülbelül 130 olyan szarvasmarha fajta lehet, amelyek annyira marginális helyzetbe szorultak, hogy fel sem kerültek erre a listára és a kihalás szélén állnak. Az 1950-es és 1980-as évek között az állattenyésztés termelékenységének növelése, intenzívebbé tétele és specializációja drámai hatást gyakorolt a helyi szarvasmarha fajtákra, ami a fajtadiverzitást csökkentette (**Hiemstra és mtsai**, 2012; **Magee és mtsai**, 2014). Mindazonáltal az elmúlt két évtizedben egyre nagyobb hangsúlyt fektettek a helyi viszonyokhoz alkalmazkodott fajták megőrzésére, több fajtavédelmi stratégia került megvalósításra mind Európában, mind világszerte. Több mtDNS alapú vizsgálat három meghatározó és földrajzilag strukturált haplocsoportot különböztetett meg a szarvasmarha fajon belül: az Afrikában azonosított T1-et; a Közel-Keletről és Nyugat-Ázsiából származó T2-t; és az Európában megtalálható T3-at, amely egy, a Közel-Keleten háziasított kis szarvasmarha állomány terjeszkedéséből származhat (**Troy és mtsai**, 2001; **Edwards és mtsai**, 2007; **Ginja és mtsai**, 2010; **Groeneveld és mtsai**, 2010).

A szürkemarhát a *Bos taurus primigenius* közvetlen leszármazottjának tekintik és a délkelet-európai podóliai fajtacsoportba sorolják (melyhez tartozó fajták megtalálhatóak Bulgáriában, Görögországban, Horvátországban, Magyarországon, Olaszországban, Romániában, Szerbiában, Törökországban és Ukrajnában) (**Teneva és mtsai**, 2005; **Soysal és Kök**, 2008; **Pariset és mtsai**, 2010; **Zsolnai és mtsai**, 2014b; **Porter és mtsai**, 2016; **Soliva**, 2007). Egy kisebb létszámú szürke állomány Észtországban is megtalálható, melyről genetikai módszerekkel bizonyították, hogy az őshonos populáció keveredik a modern fajtákkal (**Li és mtsai**, 2011). A szürkemarha fajta eredete mindmáig tisztázatlan, arról különböző hipotézisek léteznek. Egyes feltételezések szerint, az „ősegyed” a mediterrán térségből vagy Ázsiából származik (**Pellecchia és mtsai**, 2007), míg mások szerint Európában, az őstulokból háziasították (**Beja-Pereira és mtsai**, 2006). Mikroszatellit markerekkel végzett kutatások zebu genetikai mintázatot mutattak ki a podóliai marhában, ami a több, mint 1000 évvel ezelőtt az orosz déli sztyeppékről Közép-Európába terjeszkedő ősi sztyeppesi marháktól származhat (**Epstein és Mason**, 1984; **Pieragostini és mtsai**, 2000; **Kantanen és mtsai**, 2009).

Az 1800-as évek közepéig a mai Románia legelőit csak a primitív sztyeppesi (szürke) és a darvas színű, kis tülkű hegyi mokány marha népesítette be (**Creanga és Maciuc**, 2010). Napjainkban Románia szarvasmarha-állománya több mint két millió egyeddel az Európai Unió (EU) első tíz országa között szerepel (**FAO**, 2014). Az Országos Fajtanemesítési és Szaporodásbiológiai Hivatal (NAAIR) szerint a fajták megoszlása a következő: 30,96 % román tarka (pirostarka), amely fajtaátalakító keresztezéssel jött létre, melynek során az 1860-as évektől a helyi szürke/sztyeppesi marhákat szimentáli bikákkal keresztezték. További 20,28 % román feketetarka (holstein típusú) és 13,58 % rövidszarvú helyi román barna, mely leszármazottja a több száz évvel ezelőtt Közép-Európában elterjedt ősi barna szarvasmarhának (**ANARZ**, 2014). Bár kis létszámban, de Romániában is jelen van a sztyeppesi/szürke marha, mely őshonos fajtának, így történelmi örökségnek és értékes genetikai erőforrásnak tekinthető, és több fajtavédelmi program alapjául is szolgál. 1996-ban

a román szürke állomány mindössze 200 egyedet számlált (**Georgescu és mtsai**, 2012), és még napjainkban is nagyon alacsony egyedszámú állományai találhatók meg (<100) Jászvásáron, a Duna-deltában (Dobrudzsa) és Karácsonkőn (**Creanga és Maciuc**, 2010, 2011; **Bacila és Vidu**, 2011; **Chelmu és mtsai**, 2013). Földrajzi elhelyezkedése alapján öt ökotípust határoztak meg: erdélyi, moldáv, bucsán, iloncai és dobudzsai (**Creanga és Maciuc**, 2010; **Bacila és Vidu**, 2011; **Georgescu és mtsai**, 2012).

Vizsgálatunkban célul tűztük ki a román-szürke, barna, tarka és feketetarka szarvasmarhafajták genetikai diverzitásának meghatározását 11 mikroszatellit marker és az mtDNS D-loop régió alapján, különös tekintettel a veszélyeztetett román szürke fajtára, annak érdekében, hogy információt nyerjünk a jövőbeni tenyésztési programok és fajtamegőrzési tervek számára. Ezen felül elvégeztük a vizsgált fajták és a génbanki adatbázisban található 525, elsősorban podóliai típusú marha mtDNS szekvenciájának összehasonlító elemzését, azért, hogy elsőként tárjuk fel a genetikai kapcsolatokat a vizsgált és a többi szarvasmarhafajta között.

Anyag és módszer

Kutatásunk az állatkísérletekről szóló európai uniós irányelv (2010/63/UE irányelv) szerint lett végrehajtva. A kísérlet tervezését, a mintavételek módját és a vizsgálatokat az Aradi Szarvasmarha Kutatási és Fejlesztési Állomás Etikai Bizottsága engedélyezte (14/06.12.2012).

Mintavétel és genomiális DNS izolálás

Összesen öt fajtából, 93 nem rokon, különböző földrajzi területekről származó gulyákból, random választott egyedektől gyűjtöttünk mintát Romániában: román szürke (n=32; 6 bika és 26 tehén), román barna (n=19 tehén), román tarka (n=15; 5 bika és 10 tehén), román feketetarka (n=15; 1 bika és 14 tehén) és német tarka (n=12 bika). Román szürke tehén vérminták mindhárom földrajzi helyről, ahol a fajta jelen van Romániában, gyűjtésre kerültek. Ezek: Dancu-Jászvásár (n=16), Karácsonkő (n=5) és Pardina (Duna-delta) (n=5). Míg a bikáktól (n=6) sperma mintát a román Országos Állatfejlesztési és Szaporodásbiológiai Ügynökség bocsájtotta rendelkezésünkre.

Vérmintát (2 ml) a farki vénából (*Vena cava caudalis*) állatorvos segítségével gyűjtöttünk, EDTA véralvadástgátlót tartalmazó vérvételi csövekbe (Vacutest Kima, Olaszország). A csöveket 4°C-on tároltuk a további laboratóriumi vizsgálatokig. A vérből történő genomiális DNS izolálása DNS izoláló kit (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, USA) segítségével történt, a gyártó által ajánlott protokoll lépéseit követve. A spermából történő DNS kivonásra pedig a következő sztenderd protokoll szerint zajlott: lízis minimum 6 órán keresztül lízis pufferben (1M Tris pH 8,0; 5M NaCl; 0,5 M EDTA pH 8,0; 10 % SDS), majd hozzáadva 50 µl DTT 500 mM és 10 µl proteáz K (20 mg/ml), majd protein precipitáció 6M NaCl oldattal, precipitáció 70 % etanol és isopropanol oldattal, és végül a DNS TE (TRIS 10 mM pH 7,4 és EDTA 1 mM) pufferben való oldása. A DNS koncentrációkat minden esetben NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) készülékkel mértük.

Mikroszatellit vizsgálat

Az egyedek genotipizálása 11 mikroszatellittel – TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824 –, egy multiplex reakcióban, a StockMarks for Cattle Bovine Genotyping Kit (Applied Biosystems, CA, USA) felhasználásával történt, pontosan követve a gyártó utasításait a PCR során. A fragment

analízist a Biomi Kft. (Gödöllő) laboratóriumában szolgáltatásként végeztettük el. Az allélhosszakat a PeakScanner szoftver (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg.

Statisztikai értékelés

A fő populáció genetikai indexeket (allélszám- n_O , várt- H_E és megfigyelt- H_O heterozigotitás, beltényésztesi együtttható- F_{IS} , polimorfizmus információ tartalom- PIC) az ARLEQUIN v.3.0. (**Excoffier és mtsai**, 2005), GENEPOP v.4.2. (**Raymond és Rousset**, 1995; **Rousset**, 2008), FSTAT v. 2.9.3.2 (**Goudet**, 2002) és CERVUS v. 3.0 (**Kalinowski**, 2007) programcsomagok használatával határoztuk meg. A Hardy–Weinberg egyensúlytól (HWE) való eltérést a Markov chain módszer szerint (**Guo és Thompson**, 1992) a GENEPOP program használatával. A genetikai szerkezet meghatározáshoz a Wright-féle fixációs indexet (**Weir és Cockerham**, 1984) számoltuk ki. A közelmúltban bekövetkezett palacknyak-hatás valószínűségének meghatározásához az előjel próbát (Sign test), a standardizált különbségek tesztet (Standardized differences test) és a Wilcoxon-féle előjeles rang próbát (Wilcoxon rank test) három mutációs modell (IAM - infinite allele modell, SMM - stepwise-mutation modell, TPM - two-phased modell) alapján a BOTTLENECK v.1.2.02 (**Cornuet és Luikart**, 1996) programmal határoztuk meg. Az assignment teszt (illeszkedés vizsgálat) (**Brzustowski**, 2002) az egyedek pontos fajtába sorolásához lett felhasználva (10 000-szeres ismétlésben). A MEGA v 6.05 (**Tamura és mtsai**, 2013) program segítségével hoztunk létre Neighbour-Joining (NJ) filogenetikai fát a vizsgált fajták közötti genetikai kapcsolat bemutatására.

Mitokondriális DNS vizsgálat

A mitokondriális DNS (mtDNA) legpolimorfabbb D-loop régiójának 825 bp hosszú régióját szekvenáltuk a következő primerek használatával: forward: 5'-CAGAATTTGCACCCTAACCAA-3' és reverse: 5'-GGGGCCTGCGTTTATATATTG-3' (**Steinborn és mtsai**, 1998). A polimeráz láncreakció (PCR) 10 μ l közegben 60-80 ng genomális DNS-t, 0,1 mM dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 0,7 U GoTaq DNA Polymerase, 5X Colorless GoTaq Reaction Buffer (Promega, USA) és 10 pmol forward és reverse primert tartalmazott. A PCR kondíciók a következők voltak: 10 perc 95°C, 35 cikluson keresztül 30 másodperc 95°C, 45 másodperc 60°C és 30 másodperc 72°C, majd végül 10 perc 72°C. A szekvenálást a Macrogen Inc. (Hollandia) végezte el PCR termékből, szekvenáló primerként a PCR reakcióhoz is alkalmazott primereket használtuk.

Statisztikai értékelés

A szekvenciák ellenőrzése a BIOEDIT (Hall, 1999), illesztése a CLUSTALW (**Larkin és mtsai**, 2007) programokkal történt. A DnaSP version 5.10 (**Librado és Rozas**, 2009) és az ARLEQUIN v.3.0. (**Excoffier és mtsai**, 2005) volt segítségünkre a haplotípusok számának (H), a haplotípus (h; mely a haplotípus páros átlagos eltérését jelzi) és nukleotid diverzitás (π ; két véletlenszerűen választott szekvencia homológ nukleotid különbségének valószínűsége) és a polimorf helyek számának (S) meghatározásában. Az általunk detektált haplotípusok egymáshoz, illetve más szarvasmarhafajtákhoz viszonyított elemzéséhez az NCBI GenBankból letöltöttünk 525 szarvasmarha szekvenciát (DQ887760-DQ887768, **Qu és mtsai**, 2007; FJ815896-FJ815879, **Ginja és mtsai**, 2009; EU982211-EU982290, **Maróti-Agóts és mtsai**, nem publikált; FN556936-FN557374, FN562588, FN562599, FN557424, FN562648, FN557401, FN557432, FN562610-FN562625, FN562587, FN562589-FN562609, FN557425-FN557439, **Yakobson és Seroussi**, nem publikált; DQ124377, DQ124382-DQ124383, **Shin és Kim**, nem publikált; EU177844, FJ971087, FJ971080, EU177852, EU177830, EU177843, **Achilli és mtsai**, 2008; AY676860, AY676855, **Shahid és mtsai**, nem publikált; AF492351, **Hiendleder és mtsai**, 2008; AF022916, AF022918-AF022924, U92230-U92244, **Steinborn és mtsai**, 1998; AF034438, AF034442, **Smith és Moquin**, nem

publikált; AF016072-AF016078, **Hansen és mtsai**, nem publikált; GQ129207-GQ129208, **Zeyland és mtsai**, nem publikált; AF389171-AF389172, AF389177, AF389180-AF389182, AF389185, **Slate és Phua**, 2003; KF373013-KF373031, **Radoslavov és mtsai**, nem publikált; JQ234675-JQ234695, **Bruniche-Olsen és mtsai**, 2012; JQ437310-JQ437356, **Ivankovic**, nem publikált; HM625981-HM626011, **Withen és mtsai**, 2011; FJ815557-FJ815572, FJ815462-FJ815476, FJ815541-FJ815556, FJ815668-FJ815682, FJ815720-FJ815729, FJ815636-FJ815651, FJ815683-FJ815696, **Ginja és mtsai**, 2009; AB973232-AB973241, **Salim és mtsai**, 2014) azért, hogy a haplotípusok közötti kapcsolatrendszer megállapítsuk. A Median-Joining Network analízist a NETWORK v. 4.111 (**Bandelt és mtsai**, 1999) program segítségével végeztük el.

Eredmények és azok megvitatása

Mikroszatellit markerekkel végzett vizsgálatok

Tizenegy szarvasmarha mikroszatellit markert vizsgáltunk öt fajta tartozó 83 állat esetében: román szürke (n=29), román barna (n=16), román tarka (n=13), román feketetarka (n=13) és német tarka (n=12). A tizenegy lókuszon összesen 124 allélt találtunk. A legtöbb allélt a TGLA122 lókuszon (15) azonosítottuk, míg ugyanezen lókuszon az olasz podóliai marhában 13, a török podóliaiban 26, a szlavón podóliai marhában 11 és a horvát podóliai marhában 23 allélt detektáltak (**Moioli és mtsai**, 2004; **Keros és mtsai**, 2013, 2015; **Ozsensoy és Kurar**, 2014). Az ETH10, BM1824 és a SPS115 lókuszek esetében **Keros és mtsai** (2015) több allélt (10, 11 illetve 12) talált szlavón podóliai szarvasmarhákban, mint amit mi a román marhák vizsgálatakor (8).

A román szürke marha fő diverzitás indexeit a **14. táblázat** mutatja be. A vizsgált 11 mikroszatellit lókuszt polimorfizmus információ tartalom (PIC) értékei 0,523 (SPS115) és 0,863 (TGLA122) között változtak. Az össz allélszám 100, átlagosan 9,091 allél/lókuszt értékkel. Az allélok száma 5 (ETH225) és 15 (TGLA122) között változott. Az átlagos lókuszonkénti allélszám magasabb volt, mint az olasz podóliai (8,5) vagy a bolgár szürke (7,6) (**Moioli és mtsai**, 2004; **Teneva és mtsai**, 2005) esetében, de alacsonyabb, mint az izraeli szarvasmarháknál (12,55) (**Keros és mtsai**, 2013). **Georgescu és mtsai** (2012) tanulmányában ugyancsak román szürke szarvasmarhák (n=30) vizsgálatokor alacsonyabb lókuszonkénti allélszámot mutatott ki (6,36). Ez az eltérés annak tulajdonítható, hogy a mi vizsgálatunkban mindhárom földrajzi területről (Jászvásár, Duna-delta és Karácsonkő) származó szürkemarhák elemzésre kerültek. A legkevesebb allélt az ETH225 lókusztban találtuk (5), amely megfelel a **Georgescu és mtsai** (2012) által kapott eredményeknek. Az ETH225, BM2113, TGLA122, TGLA53 és SPS115 lókusztokban észleltünk szignifikáns eltéréseket a Hardy-Weinberg egyensúlyhoz (HWE) képest ($p < 0,001$; $p < 0,05$). Az átlagos H_E érték 0,794 volt, minimális értéke 0,574 (SPS115) míg maximuma 0,890 (TGLA122). A megfigyelt heterozigotitás (H_O) értékek 0,552 (SPS115) és 1,000 között (ETH3, BM2113, BM1824, TGLA227, TGLA126, TGLA53) voltak.

A polimorfizmus információ tartalom (PIC) mindegyik lókusztan 0,5-nél magasabb értéket mutatott, átlaguk 0,752, amely nem utal alacsony szintű genetikai diverzitásra. Az egyes lókusztok elemzése során a legmagasabb értéket a TGLA122 (0,863), a TGLA53 (0,842) és az INRA23 (0,810) esetében figyeltünk meg. A szimentáli fajta ugyanazon a 11 lókusztan végzett korábbi vizsgálatában a PIC értéke 0,58 (ETH10) és 0,88 (TGLA53) között változott (**Stevanovic és mtsai**, 2010).

14. táblázat: Allélhossz, észlelt allélszám (n_o), megfigyelt (H_o) és várt (H_E) heterozigotizáció, polimorfizmus információtartalom (PIC) a román szürke marha fajtában 11 lókuszon

Lókuszt	Allélhossz (bp)	n_o	H_o	H_E	PIC
ETH225**	136-165	5	0,966	0,712	0,645
INRA23	193-235	9	0,966	0,845	0,810
ETH10	198-234	8	0,897	0,799	0,753
ETH3	90-135	9	1,000	0,831	0,792
BM2113*	116-146	8	1,000	0,823	0,784
BM1824	170-218	7	1,000	0,788	0,737
TGLA227	64-115	13	1,000	0,811	0,775
TGLA126	104-131	8	1,000	0,786	0,744
TGLA122*	134-193	15	0,966	0,890	0,863
TGLA53*	147-197	11	1,000	0,872	0,842
SPS115*	235-265	7	0,552	0,574	0,523
Átlag $\pm$ s.d.		9,091 $\pm$ 2,745	0,940 $\pm$ 0,127	0,794 $\pm$ 0,083	0,752

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$

Az általános diverzitás indexek a vizsgált fajtára vonatkozóan a **15. táblázatban** kerülnek bemutatásra. A vizsgált fajták a genetikai variabilitás magas szintjét mutatják, amit a lókuszonkénti allélok magas száma is igazol. A genetikai szempontból leginkább változatos fajta a román szürke volt. Az átlagos várt heterozigotizáció 0,755 (román tarka) és 0,794 (román szürke) között változott, míg a megfigyelt heterozigotizáció értékei 0,895 (román tarka) és 0,966 (román barna) között mozogtak (**15. táblázat**).

15. táblázat: Egyedszám (n), allélszám (n_o), megfigyelt (H_o) és várt (H_E) heterozigotizáció és Wright-fixációs index (F_{IS}) értékei a vizsgált román szarvasmarha fajtákban

Vizsgált fajta	n	allélszám (n_o) $\pm$ s.d.	$H_o \pm$ s.d.	$H_E \pm$ s.d.	F_{IS}
román szürke	29	9,091 $\pm$ 2,745	0,940 $\pm$ 0,127	0,794 $\pm$ 0,083	-0,189
román barna	16	7,182 $\pm$ 2,037	0,966 $\pm$ 0,090	0,788 $\pm$ 0,065	-0,235
román tarka	13	6,909 $\pm$ 2,275	0,895 $\pm$ 0,183	0,755 $\pm$ 0,125	-0,194
román feketetarka	13	7,455 $\pm$ 2,271	0,930 $\pm$ 0,155	0,779 $\pm$ 0,102	-0,203

A román szürke esetén a megfigyelt heterozigotizáció magasabb volt (0,940), mint az olasz podóliai (0,73), a szlavón podóliai (0,70), a bolgár szürke (0,78) és a magyar szürke (0,658) fajták esetében (Teneva és mtsai, 2005; Manatrion és mtsai, 2008; D'Andrea és mtsai, 2011; Keros és mtsai, 2015). Egy korábbi, a román szürke fajta ugyanazon a 11 lókuszon végzett vizsgálatban a megfigyelt (0,687) és a várható (0,763) heterozigotizációs értékek is alacsonyabbak voltak, mint a jelen vizsgálatban (Georgescu és mtsai, 2009). A H_o értékek minden vizsgált fajta esetén magasabbak voltak, mint a H_E . A román barna, román tarka és

román feketetarka fajták átlagos várt (0,788; 0,755; 0,779) és megfigyelt (0,966; 0,895; 0,930) heterozigotitása magasabbnak bizonyult, mint a svájci barna (0,66; 0,67), holstein-fríz (0,64; 0,62), szimentáli (0,59; 0,69) és piemonti (0,72; 0,71) fajták esetén (**D'Andrea és mtsai, 2011**).

A heterozigóta-többség az F_{IS} értékkel mutatható ki. Minden vizsgált fajta beltenyésztési együtthatója (F_{IS}) negatív volt. Értéke -0,235 (román barna) és -0,189 (román szürke) között változott, heterozigóta többlet, beltenyésztettség hiányát jelezve a vizsgált fajtákban.

Az F_{ST} értékek szerint a teljes genetikai variáció 4,5 %-a magyarázható a fajták közötti különbségekkel, míg a fennmaradó 95,6 % az egyedek közötti különbségeknek tulajdonítható.

A palacknyak-hatás vizsgálatához 3 féle teszt 3 mutációs modelljét használtuk fel. A román szürke esetén a heterozigotitás-többséggel rendelkező lokuszok várt száma 6,57, 6,49 és 6,49 volt IAM, TPM és SMM modellek esetében. A nullhipotézist nem lehetett elutasítani az előjel próba alkalmazása során, tehát közelmúltbeli genetikai palacknyak-hatást nem jelzett a vizsgálat. A standardizált különbség teszt esetében a nullhipotézis az SMM ($P=0,001$) modellnél került elutasításra. Azonban a nagy statisztikai pontosságot nyújtó Wilcoxon teszt, amely már kisszámú polimorf lokusz (<4) esetén is alkalmazható, bármilyen egyedszám mellett, egy modellben mutatott heterozigotitás többletét, igazolva a palacknyak-hatást ($IAM=0,002$). A többi vizsgált fajta esetén, az IAM Wilcoxon-féle előjeles rang próba eredményei alapján palacknyak-hatást mutattunk ki a román barna és tarka fajták esetén (**16. táblázat**).

16. táblázat: Palacknyak-hatás vizsgálat eredményei a BOTTLENECK program 3 tesztjének 3 modellje alapján

teszt/modell	IAM	TPM	SMM
román szürke			
előjel próba	6,57 (0,115)	6,49 (0,274)	6,49 (0,113)
standardizált különbség teszt	2,175 (0,015)	0,063 (0,475)	-3,032 (0,001)*
Wilcoxon-féle előjeles rang próba	0,002*	0,207	0,897
román barna			
előjel próba	6,60 (0,004)*	6,55 (0,286)	6,55 (0,519)
standardizált különbség teszt	2,282 (0,011)*	0,903 (0,183)	-0,813 (0,208)
Wilcoxon-féle előjeles rang próba	0,000*	0,074*	0,618
román tarka			
előjel próba	6,50 (0,107)	6,51 (0,264)	6,52 (0,264)
standardizált különbség teszt	1,471(0,071)*	0,014 (0,495)	-1,698 (0,045)*
Wilcoxon-féle előjeles rang próba	0,005*	0,416	0,938
román feketetarka			
előjel próba	6,57 (0,115)	6,62 (0,097)	6,57 (0,006)
standardizált különbség teszt	0,763 (0,223)	-0,902 (0,184)	-3,017 (0,002)*
Wilcoxon-féle előjeles rang próba	0,120	0,793	0,973

* null hipotézis elvetése / palacknyak-hatás

Az illeszkedés vizsgálat segítségével meghatároztuk, hogy az egyes fajtákhoz sorolt egyedek milyen pontossággal tartoznak azokba. Eredményeink szerint a román tarka fajtához tartozó egyedek kerültek besorolásra a legkisebb (30,77 %), míg a román barna fajtához tartozó egyedek a legnagyobb (81,25 %) pontossággal (**17. táblázat**).

17. táblázat: Az illeszkedés vizsgálat (assignment teszt) eredményei a vizsgálatba vont egyedek fajta besorolásának pontosságára

Fajta	n	N	%
román szürke	29	7	75,86
román barna	16	3	81,25
román tarka	13	9	30,77
román feketetarka	13	6	53,85

n= vizsgált egyedek száma

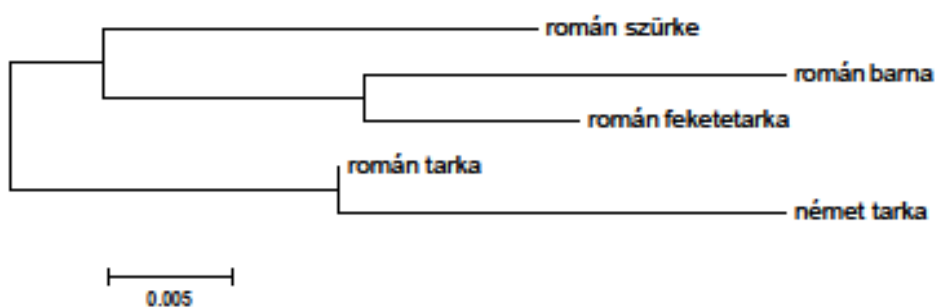
N= nem jól besorolt egyedek száma

%= fajtájukba jól besorolt egyedek százaléka

A fajtapárok közötti F_{ST} értékek meghatározásánál a román fajtákon kívül a német tarka fajtát is bevontuk, mivel az a román szürke kivételével viszonylag közel áll a román fajtákhoz. A legnagyobb genetikai különbség a román barna és tarka ($F_{ST}= 0,381$) illetve a román barna és feketetarka (0,257) között volt megfigyelhető. A román szürke a román tarkától különbözött (0,031) legkisebb mértékben. Minden fajtapárok közti F_{ST} érték szignifikánsan különbözött a nullától ($p<0,05$).

A Neighbour-Joining (NJ) módszerrel készített filogenetikai fán a vizsgált fajták megjelenése összhangban volt az eredetükre és fajtaképzésükre vonatkozó jelenlegi ismereteinkkel (**6. ábra**). A román szürke az előzetes elvárásoknak megfelelően elkülönült a többi fajtától. A román és német tarka fajták közös eredetűek a szimentáli szarvasmarha csoporton belül, azok úgy is jelentek meg a fán. A román tarka fajta kialakítása során román szürke tehének Ausztriából, Németországból, Svájcban, Csehországból, Szlovákiából származó szimentáli bikákkal voltak keresztezve. A román barna legközelebb a feketetarka fajtához áll, aminek magyarázata lehet, hogy ez utóbbi fajta helyi fajták, mint a román barna, tarka, dobudzsai vörös tehének különböző eredetű fríz típusú bikákkal való keresztezésének eredményeként jött létre (**Stanciu, 1999**).

6. ábra: NJ filogenetikai fa a vizsgált szarvasmarha fajták genetikai kapcsolatának bemutatására



mtDNA marker alapú vizsgálatok

Nyolcvanegy egyed (32 román szürke, 19 román barna, 15-15 román tarka és feketetarka) szekvenálása és 638 bp hosszra illesztése után 52 haplotípust határoztunk meg (NCBI GenBank hozzáférési szám: KR608070-KR608121). Igen magas az egy egyedet tartalmazó haplotípusok (**18. táblázat**) száma, a fajták között csak három közös haplotípus volt megfigyelhető. Az egyikbe minden fajtából 1 állat, a másodikba egy román tarka és egy román feketetarka egyed, míg a harmadikba egy román szürke és egy román barna fajta tartozott. A román szürke esetében 18 haplotípust és a fajta anyai ágának nagy genetikai variabilitását (0,927) mutattuk ki. Tíz haplotípust mutattunk ki a román barna fajtában és 14-14 haplotípust a román tarka és feketetarka fajtákban).

18. táblázat: Főbb diverzitás mutatók értékei, n=elemszám; H=haplotípusok száma; S=polimorf helyek száma, h=haplotípus diverzitás, π =nukleotid diverzitás

Fajta/Mutató	n	H	S	h (s.d.)	π (s.d.)
román szürke	32	18	27	0,927 (0,033)	0,008 (0,001)
román barna	19	10	20	0,883 (0,056)	0,007 (0,001)
román tarka	15	14	22	0,990 (0,028)	0,006 (0,001)
román feketetarka	15	14	24	0,990 (0,028)	0,007 (0,001)
Összesen	81	52	67	0,980 (0,007)	0,008 (0,000)

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$

Vizsgálatunkban a haplotípusok száma magasabb volt, mint más podóliai típusú fajtákban. Az izsriai szarvasmarhák esetében 50 egyedből 13 haplotípust, 47 szlavón podóliai szarvasmarhában 5 haplotípust (**Ivankovic és mtsai**, 2014) és 39 bolgár szürke szarvasmarhában 7 haplotípust találtak (**Hristov és mtsai**, 2014). A genetikai diverzitás azonban kisebb volt a szerb podóliai (0,709; n=11) és az ukrán szürke (0,000; n=8) (**Kantanen és mtsai**, 2009) fajták esetében, ami az alacsonyabb mintaszámmal vagy az eltérő tenyésztési eljárással magyarázható (beltenyésztés, populációs palacknyak-hatás). A vizsgált fajtákban nagyszámú (37), egy egyedet tartalmazó haplotípust találtunk, mely összhangban van **Kantanen és mtsai** (2009) eredményeivel a szerb podóliai fajtára vonatkozóan. Az átlagos haplotípus diverzitás $0,980 \pm 0,007$ volt, ami $0,883 \pm 0,056$ (román barna) és $0,990 \pm 0,028$ (román tarka és feketetarka) között változott. A nukleotid diverzitási értékek szintén magasak voltak minden vizsgált román fajtánál.

A haplotípusokat, haplocsoportokat, a variábilis nukleotidpozíciókat a GenBank V00654 szekvenciáját alapul véve határoztuk meg (**Anderson és mtsai**, 1982) (**19. táblázat**).

19. táblázat: A vizsgált szarvasmárha fajtákban megfigyelhető polimorf pozíciók a V00645 NCBI GenBank-i szekvenciához hasonlítva

[illegible]

RSZ=román szürke, RB=román barna, RT=román tarka, RFT=román feketetarka

Ahogy az európai szarvasmarhafajták esetében várható volt, a T3 haplocsoport volt a leggyakoribb (80,247 %). Összesen 65 egyed sorolható a T3 haplocsoportba, 13 a T2-be (16,049 %) és 3 a T1-be (3,704 %). A T3 haplocsoportba tartozó haplotípusokat az összes vizsgált fajtában megtaláltuk, míg T2 haplocsoportba tartozó haplotípusok (n=13) csak a szürke (10), tarka (2) és feketetarka (1) fajtákban találtunk. A T1 haplocsoportba tartozó haplotípusokat (n=3) a szürke (2) és tarka (1) fajtákban mutattuk ki. Bár a szürkemarha-állomány létszáma drámaian lecsökkent, a megmaradt és vizsgált egyedek között találtunk példát mindhárom haplocsoportba való tartozásra. Ezen eredményeink egybevágóak azzal, hogy a modern szarvasmarha-populációk nagyfokú haplotípus diverzitással rendelkeznek, bennük a T1, T2 és T3 haplocsoportok dominálnak (**Achilli és mtsai, 2008; Ginja és mtsai, 2010; Seroussiand és mtsai, 2010**).

A szekvenciáinkat a teljes genetikai átfedésben lévő 379 bp hosszúságú, a GenBank adatbázisából származó 525 mtDNS szarvasmarha szekvenciával illesztettük. A Median-Joining Network ábrán a haplotípusok között nem találtunk sem földrajzi sem fajtaeloszlást. A lecsökkentett szekvencia hossz mellett a román szürke fajtában azonosított 12 haplotípusból kettő közös volt a magyar szürke fajtáéval, egy-egy pedig a podóliai szarvasmarhák (magyar szürke, bolgár szürke, ukrán szürke, isztriai és szlavón podóliai), a brahma zebu marhafajtával (*Bos indicus*), valamint portugál és spanyol fajtákkal (maronesa, ramo grande és palmera).

Új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága

Néhány genetikai, az utóbbi években pedig néhány genomikai vizsgálat tanulmányozta a podóliai szarvasmarhafajtákat (**Moioli és mtsai, 2004; Kantanen és mtsai, 2009; Xuan és mtsai, 2010; D'Andrea és mtsai, 2011; Ivankovic és mtsai, 2014; Zsolnai és mtsai, 2014b; Magee és mtsai, 2014; Keros és mtsai, 2015; Di Lorenzo és mtsai, 2018**), azonban célzottan a román szürke marha genetikai diverzitásának meghatározásával, a fajta létszámához képest nagy elemszámmal, a fajta élőhelyének mindhárom régióját bevonva, elsőként foglalkoztam.

A veszélyeztetett román szürke szarvasmarha-állomány kis populációméretéhez képest, meglepően magas genetikai sokféleséget mutat. A magas genetikai variabilitás oka a termelési tulajdonságok fejlesztését célzó szelekciós munka hiánya, illetve annak alacsony szintje lehet. Így a tenyésztési munkában azt továbbra is kerülendőnek, míg a jelenlegi fajtavédelmi programot a jelenlegi klimatikus körülmények között még megfelelőnek tartom a fajta sokféleségének megőrzése érdekében. Eredményeimmel bizonyítottam a vizsgált fajták eredetére és fajtaképzésükre vonatkozó ismereteinket is

Javasolható, hogy további pénzügyi forrásokat és intézkedések biztosítsanak a fajta védelme érdekében. Fontos lenne például a spermatárolás, a mesterséges termékenyítés, illetve további genetikai, genomikai vizsgálatok folytatása annak érdekében, hogy még pontosabb ismereteink legyenek a fajtavédelmi stratégiák javításához. A román szürke fajta kihalástól történő megmentése nemcsak a román mezőgazdaság és kultúra, hanem a világ genetikai öröksége szempontjából is fontos feladat.

Jelen eredményeim hozzájárulnak a kelet-európai szarvasmarha-fajták genetikai sokféleségével kapcsolatos általános ismeretek gyarapításához, azonban egy kutatást sosem lehet befejezettnak tekinteni. A bemutatott eredmények publikálása óta részt veszek több veszélyeztetett szarvasmarhafajta (elsődlegesen podóliai) eredetét, genetikai szerkezetét, diverzitását célzó genetikai és genomikai vizsgálatban.

2.3. Ló

2.3.1. Hucul

Irodalmi áttekintés

A ló (*Equus caballus*) házasítása a kecske, juh, sertés, szarvasmarha és kutya domesztikációja után, i.e. 3500 körül történt Belső-Ázsiában (**Outram**, 2009). A ló gyorsasága és teherbírása által, az akkori társadalmak a korábban nehezen elérhető, távolabbi területekre is kiterjeszthették életterületüket, ezáltal felélénkült a kereskedelem, valamint a harcászatban is új módszerek terjedhettek el. A Kárpát-medencében már a rézkorból származó lómaradványokat is találtak. A feltárt archeológiai leletek szerint i.e. 2000 körül északnyugati nomád (a kárpát-medencei népességgel keveredő) népek már a kutyán kívüli öt házasított haszonállat tartásával foglalkoztak (**Bartosiewicz**, 2006; **Priskin és mtsai**, 2010).

A hucul ló az európai vadló, a tarpán (*Equus ferus seu gmelini*) legközelebbi leszármazottja, ami valaha Európa középső és nyugati részein széles körben elterjedt volt. A hucul fajta a Kárpátok erdősegeiben élő népcsoportról kapta a nevét, bár a fajta sokkal régebbi ennél a népnél. A fajtát először 1603-ban említik írott forrásban. Az eredeti élőhelyük az Osztrák-Magyar Monarchia területe volt. Az első hucul ménest Lucinában alapították (ma Románia) 10 kancával (Bukovina típusúakkal), amikor is az Osztrák-Magyar Monarchia Hadügyminisztériuma felfedezte a fajta különleges jellegeit (szívósság, terhelhetőség). Később ezt a ménest rövid időre feloszlatták, majd 1876-ban újra megnyitották a Stirbul, Mysza, Czeremosz, és Taras vérvonalból származó csődörökkel. 1915-ben a lovakat Waldorfba (ma Ausztria) szállították. Az első világháború súlyos veszteségeket okozott a lóállományban (**Mihók**, 2004). A háború után a lucinai ménest felosztották, és Romániába, Csehszlovákiába, valamint Lengyelországba szállították. Ezáltal ezekben az országokban is elkezdődött a hucul tenyésztése. A Goral, Hroby, Oușor, Pietrousu és Prislop nevű csődöröket használták a vérvonalak létrehozásához. 1922-ben létrehozták a Gurgul vonalat abból a 33 lóból, amit a második világháború után Csehszlovákiába szállítottak. A II. világháborút csupán 300 ló élte túl. 1970-ben a Murai Hucul ménes megmentésére a tenyésztők létrehozták a Hucul Klubot és 1982-ben 15 fajtatiszta állattal megalapították a méneskönyvet a régió állományának fejlesztése céljából. A fajta állományának jelenlegi becsült száma 2 000 egyed. A tenyésztőmunkát a volt Monarchia utódállamaiban, illetve Lengyelországban végzik, bár a genetikai szempontból legértékesebb ménesek a Kárpátokban találhatók. A fajta jelentőségét mutatja, hogy sok európai póniló fajtának hucul felmenői is vannak (**Mihók**, 2004, 2006).

Ma a fajta legfőbb tenyésztő központjai Lengyelországban és Romániában vannak. Lengyelországban a fajta törzsállománya 500-700, Szlovákiában és Romániában 100 alatt, Ausztriában kevesebb, mint 30 egyedet számlál (**Bodó**, 2003). A Cseh Köztársaságban 366 kanca és 35 csődör van 4 vonalból (Goral, Gurgul, Hroby, Ousor). Szlovákiában a Nemzeti Ménés felelős a fajta tenyésztéséért és a törzskönyv nyilvántartásáért (**Kovac**, 2006). Szlovákia jelentős tenyésztőnek számít, a kistapolcsányi ménesében 41 kanca és 6 csődör vesz részt a tenyésztőprogramban, azonban több csődört használnak Lucinából is (**Mihók**, 2004). Ausztriában és Németországban a számuk emelkedőben van és már lovasiskolákban is használják őket hobbilóként, vagy lovaglásra. A háborúk alatt a magyar hucul állomány jelentősen lecsökkent. Anghy Csaba 50 éven át gyűjtötte a megmaradt hucul lovakat fajtamegőrzési célból. Az Aggteleki Nemzeti Park ménesében 2005-ben 140 kanca volt. A legnépesebb családok között van az Árvácska és az Aspiráns, illetve lucinai, szlovák és lengyel kancacsaládokból származó vonalak. Története során a hucul fajtát kétszer érte palacknyak-hatás (**Mihók**, 2004), ami genetikai variabilitását csökkentette.

1979 óta az Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmézésügyi és Mezőgazdasági Szervezete (FAO) génmegőrzésre jogosult fajtái közé tartozik. 1992-ben a hucult tenyésztő országok közreműködésével, a tenyésztés koordinálása céljából létrehozták a Nemzetközi Hucul

Szövetséget (H.I.F.) (**Bodó**, 2003). A fajta fenntartása jelenleg Lengyelország, Románia, Ukrajna, Magyarország, Ausztria, Csehország és Szlovákia együttműködésével zajlik. Vizsgálatunk célja az volt, hogy a veszélyeztetett hucul lovak genetikai diverzitását meghatározzuk biparentális markerrel, illetve a fajtát ért palacknyak hatásról információt nyerjünk. A hucul, továbbá más primitív fajták, mint a lengyel konik és a przewalski vadló, valamint 200 NCBI GenBank-ból származó mtDNS szekvenciának az összevont elemzését is elvégeztük, annak érdekében, hogy a hucul ló eredetéről és genetikai kapcsolatairól is képet kapjunk.

Anyag és módszer

Mintavétel és genomiális DNS izolálás

Összesen 71 hucul lótól vettünk tépett szőrmintát, melyek Magyarországról (n=51), Ausztriából (n=3), és Szlovákiából (n=17) származtak. Az összehasonlítás vizsgálatához lengyel konik (n=7), valamint német (n=4) és magyar (n=4) przewalski vadló mintákat használtunk. A mintákat egyesével nejlon zacskóba csomagolva, a keveredést elkerülve, 4°C-on tároltuk a laboratóriumi vizsgálatokig. A szőrtüszőkből a DNS kinyerését Walsh és mtsai (1991) protokollja szerint hajtottuk végre. A DNS koncentrációkat NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) készülékkel ellenőriztük.

Mikroszatellit vizsgálat

Az egyedek genotipizálását 17 (AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3, VHL20), az International Society for Animal Genetics (ISAG) által ajánlott mikroszatellit egy multiplexben alkalmazva, StockMarks® for Horses Equine 17-plex Genotyping Kit (ABI, USA) felhasználásával végeztük el, követve a gyártó utasításait a PCR összeállításában és körülményeiben is.

Statisztikai értékelés

A statisztikai elemzések során a POPGENE v.1.31. szoftvercsomagot (**Yeh és Yong**, 1999) használtuk a fő diverzitás mutatók meghatározásához. A populáció szerkezetet a Wright-féle fixációs indexsel elemeztük (**Weir és Cockerham**, 1984). A várt (H_E) és megfigyelt heterozigotizást (H_O) **Levene** (1949) leírása szerint számítottuk ki. Az allélok valós számát (n_e) a **Kimura és Crow** (1964) formula szerint kaptuk meg. A Shannon indexet (S_I) is kiszámítottuk, hogy meghatározzuk a genetikai diverzitást (**Lewontin**, 1972). A null allél lehetséges meglétét külön teszteltük minden lókuszt a MICRO-CHECKER 2.2.3 (**Van Oosterhout és mtsai**, 2004) program segítségével. A BOTTLENECK 1.2.02. (**Cornuet és Luikart**, 1996) programmal a palacknyak hatás kimutatható voltát elemeztük a 3 teszt (előjel próba, standardizált különbség teszt és Wilcoxon-féle előjeles rang próba), 3 mutációs modelljének (IAM, TPM, SMM) felhasználásával.

Mitokondriális DNS vizsgálat

A ló mtDNS legpolimorfabb (D-loop) 338 bp hosszúságú szakaszát a következő primerekkel amplifikáltuk (**Xu és Arnason**, 1994): forward: F15444 5'-ACCATCAACACCCAAAGCTG-3' és reverse: R15742 5'-GCTGATTTCGCGGCTTGCTG-3'.

A PCR 40 µl össztérfogatban a következők szerint lett összemérve: 0,25 µM primer, 0,2 mM dNTP, 1X TaqTM puffer (AmpliTaq Gold), 1,5 mM MgCl₂, 1,5 U AmpliTaq Gold TaqTM (ABI, USA) és 4 µl DNS (50-100 ng/µl). A hőmérsékleti körülmények 94°C-on (6 percig) kezdődtek, amelyet 37 ciklus követett 93°C-on (0,30 perc), 61°C-on (0,30 perc), 72°C-on (0,40 perc), majd 72°C-on 5 perccel zárult. Az amplifikált terméket MontageTM PCR kittel (Millipore) tisztítottuk, majd 10 µl mennyiséget mindkét irányból szekvenáltuk, a PCR reakcióhoz is alkalmazott primerekkel, ABI Prism 310 szekvenálóval, ABI PRISM BigDyeTM Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI, USA) használatával.

Statistikai értékelés

A szekvenciák ellenőrzése BIOEDIT 5.0 programmal (**Hall**, 1999) történt és illesztés után 254 bp hosszúságra vágtuk (X79547 azonosítójú NCBI GenBank szekvencia 15487-15740 szakasza).

A sztenderd diverzitás indexek, mint a haplotípusok száma (H), diverzitása (h) és nukleotid diverzitás (π) a DnaSP 4.50.2 programmal kerültek kiszámolásra (**Rozas és mtsai**, 2003). A mtDNS haplotípusok, illetve a három fajta között páronkénti genetikai távolságokat (F_{ST} - fixációs index) az ARLEQUIN v.3.0. (**Excoffier és mtsai**, 2005) programcsomaggal határoztuk meg. Median-Joining hálózatot a NETWORK szoftver 4.6.0.0. verziójával készítettünk (**Bandelt és mtsai**, 1999). A saját szekvenciáink adatbázisát, a GenBank adatbázisból letöltött 200 ló szekvenciával egészítettük ki (AY246174-AY246179, AY246180-AY246181, AY246189 -AY246190, AY246195-AY246196, AY246204-AY246205, AY246209-AY246210, AY246214-AY246215, **Flannery és Cothran**, nem publikált; AF481232-AF481236, AF481247-AF481250, AF481259-AF481263, AF481272-AF481275, AF481282-AF481285, AF481300-AF481303, AF481311, AF481318-AF481325, **Hill és mtsai**, 2002; AF326676, AF326668, AF326635, **Vila és mtsai**, 2001; AY519910-AY519911, AY519871-AY519873, AY519897, AY519927-AY519928, AY519937-AY519939, AY519964-AY519966, **Royo és mtsai**, 2005; AF064627, AF064631-AF064632, **Dhar és mtsai**, nem publikált; AF132569, AF132577, AF132582, AF132590, AF168692, **Bowling és mtsai**, 2000; AF014405, AF014413-AF014415, AF056071, AF014409, AF072994-AF072995, AF014416, **Kim és mtsai**, 1999; AY997131, AF516501, AY519916-AY519917, AF516503, AF516507-AF516508, AY997158, AF516492, AF516509-AF516510, **Luis és mtsai**, 2006; EF494073, EF494077, EF495144, EF495133, EF495138, EF495140, **Ivankovic és mtsai**, nem publikált; AF072987, AF072993, AF072981-AF072982, AF072988, AF072985, AF072980, AF072975-AF072976, AF072986, **Lister és mtsai**, nem publikált; EU826536, **Jiang és mtsai**, nem publikált; AJ413684-AJ413685, AJ413720, AJ413722, AJ413731-AJ413735, AJ413830, AJ413832, AJ413694, AJ413700, AJ413703, AJ413866-AJ413869, **Jansen és mtsai**, 2002; DQ327838-DQ327844, DQ327894-DQ327898, **McGahern és mtsai**, 2006; AY136785-AY136786, **Lei és mtsai**, nem publikált; GU339388, **Georgescu és mtsai**, nem publikált; JF951834-JF951847, **Czernekova**, nem publikált; HQ153741, HQ153746, **Campana és mtsai**, 2011; AY049720, **Oh és Jung**, nem publikált; AY057408-AY057434, **Kavar és mtsai**, 2002; AF466010, **Mirol és mtsai**, 2002; AY462448, **Cozzi és mtsai**, 2004; AF055876, AF055878, **Oakenfull és Ryder**, 1998; GU014400-GU014402, **Eggert és mtsai**, 2010) és Neighbour-Joining (NJ) módszer alkalmazásával filogenetikai fát készítettünk (**Satoiu és Nei**, 1987) azért, hogy láthatóvá tegyük a vizsgált fajták más fajtákhoz való genetikai kapcsolatát (MEGA 4.0; **Tamura és mtsai**, 2007).

Eredmények és azok megvitatása

Mikroszatellit markerekkel végzett vizsgálatok

Az általunk vizsgált 17 lókuszon összesen 130 allélt találtunk, melyek mindegyike nagymértékben polimorf volt (**20. táblázat**). A megfigyelt allélok száma 4-től (HTG7) 11-ig terjedt (ASB2, CA425), és az allélok átlagos száma 2,116 (HMS1) és 8,191 (ASB2) között mozgott. Az átlagos megfigyelt allélok száma $7,647 \pm 1,998$, ami nagyobb, mint a szlovák hucul (**Trandzik és mtsai**, 2007), az indiai spiti ló (4,8), a magyar lipicai (5,778), a horvát lipicai (5,167) vagy a spanyol trotter ló (6,0) esetében (**Chauhan és mtsai**, 2004; **Achmann és mtsai**, 2004; **Azor és mtsai**, 2007), azonban alacsonyabb a pantaneiro ló (9,1), valamint mediterrán lovak esetében (10,58) (**Giacomoni és mtsai**, 2008; **Marletta és mtsai**, 2006). **Georgescu és mtsai** (2008) szintén alacsonyabb 6,666 átlagos allélszámot mutatott ki lókuszonként román hucul lovakban. Ezeknek az eltéréseknek magyarázata lehet a vizsgálatokban alkalmazott különböző mikroszatellitek száma, a vizsgálatokba vont állatok eltérő egyedszáma vagy a fajták eltérő genetikai szerkezete. Az egyes lókuszoson a várt heterozigotizás (H_E) 0,532-től (HMS1) 0,886-ig (ASB2), míg a megfigyelt heterozigotizás (H_O) 0,383 (HMS1) és 0,836 (HTG10) között változott. A H_E 10 lókuszos esetén volt nagyobb a H_O -nál. Az átlagos megfigyelt heterozigotizás értéke ($0,706 \pm 0,138$) kisebb volt a várténál ($0,747 \pm 0,099$), jelezve a populációt ért múltbeli palacknyak-hatásokat (**Cornuet és Luikart**, 1997). A Shannon-féle diverzitás index az ASB2 lókuszoson volt a legnagyobb (2,216), a legkisebb pedig a HMS1 lókuszoson (1,055).

20. táblázat: Allélméret (bp), megfigyelt (n_O) allélszám, várt (H_E) és megfigyelt (H_O) heterozigotizás, Shannon index (S_i) és Wright-féle fixációs index (F_{IS}) a hucul fajta 17 lókuszosán

Lókuszos	bp	n_O	H_E	H_O	S_i	F_{IS}
AHT4	142-160	10	0,839	0,765	1,962	-0,081
AHT5	126-140	8	0,808	0,826	1,735	-0,213
ASB17	104-120	8	0,846	0,806	1,925	-0,173
ASB2	237-257	11	0,886	0,778	2,216	-0,096
ASB23	186-212	8	0,773	0,754	1,644	-0,180
CA425	227-247	11	0,820	0,828	1,883	-0,137
HMS1	174-182	5	0,532	0,383	1,055	-0,141
HMS2	218-236	6	0,717	0,400	1,492	0,448
HMS3	148-168	8	0,777	0,776	1,693	0,050
HMS6	158-168	6	0,682	0,672	1,305	-0,164
HMS7	171-181	6	0,714	0,742	1,386	-0,275
HTG10	90-106	9	0,790	0,836	1,855	-0,176
HTG4	126-138	6	0,704	0,750	1,419	-0,276
HTG6	75-101	7	0,614	0,632	1,293	-0,118
HTG7	117-125	4	0,585	0,627	1,060	-0,154
LEX3	139-161	8	0,765	0,623	1,692	-0,016
VHL20	86-104	9	0,848	0,809	1,937	-0,179
Átlag $\pm$ s.d.		$7,647 \pm 1,998$	$0,747 \pm 0,099$	$0,706 \pm 0,138$	$1,621 \pm 0,332$	-0,128

Az F_{IS} érték átlagosan -0,128 volt a lókuszosok között, ami 0,448-tól (HMS2) -0,276-ig (HTG4) változott. Két lókuszosnál volt heterozigóta hiány (HMS2, HMS3). A vizsgált hucul populáció

Hardy-Weinberg egyensúlyban volt a HMS1, HMS2, LEX3 lókuszokon, a null allélok gyakorisága 0,158, 0,272 és 0,098 volt.

A fajta története során kétszer szenvedett palacknyak-hatást, amit különböző tesztekkel és azok mutációs modelljeivel vizsgáltunk (**21. táblázat**). A heterozigotizás többlettel rendelkező várt lókuszok száma 10,18, 10,03 és 9,96 volt az IAM, TPM és SMM modellek alapján. Míg a megfigyelt heterozigotizás többlettel rendelkező lókuszok száma 15, 14 és 3 volt a három modell esetén. Így az előjel próba használatával a null hipotézist elutasítottuk, azaz az utóbbi időben végbement genetikai palacknyak-hatás jelenlétét igazoltuk. A másik két alkalmazott teszt az IAM modell esetén igazolt palacknyak-hatást. A Wilcoxon-féle előjeles rang próba, mely már 4 polimorf lókusz és alacsony egyedszám esetén is alkalmazható, két modell esetén heterozigotizás többletet és palacknyak-hatást mutatott, 0,000 (IAM) és 0,039 (TPM) valószínűségi értékkel, ebből a TPM modell az, ami a legmegbízhatóbb eredményt adja mikroszatellitiek elemzésénél (**Luikart és mtsai, 1998**).

21. táblázat: Palacknyak-hatás vizsgálat eredményei a BOTTLENECK program 3 tesztjének 3 modellje alapján

teszt/modell	IAM	TPM	SMM
előjel próba	10,18 (0,012)*	10,03 (0,039)*	9,96 (0,001)*
standardizált különbség teszt	3,564 (0,002)*	0,541 (0,294)	-3,108 (0,001)*
Wilcoxon-féle előjeles rang próba	0,000*	0,039*	0,987

* null hipotézis elvetése / palacknyak-hatás

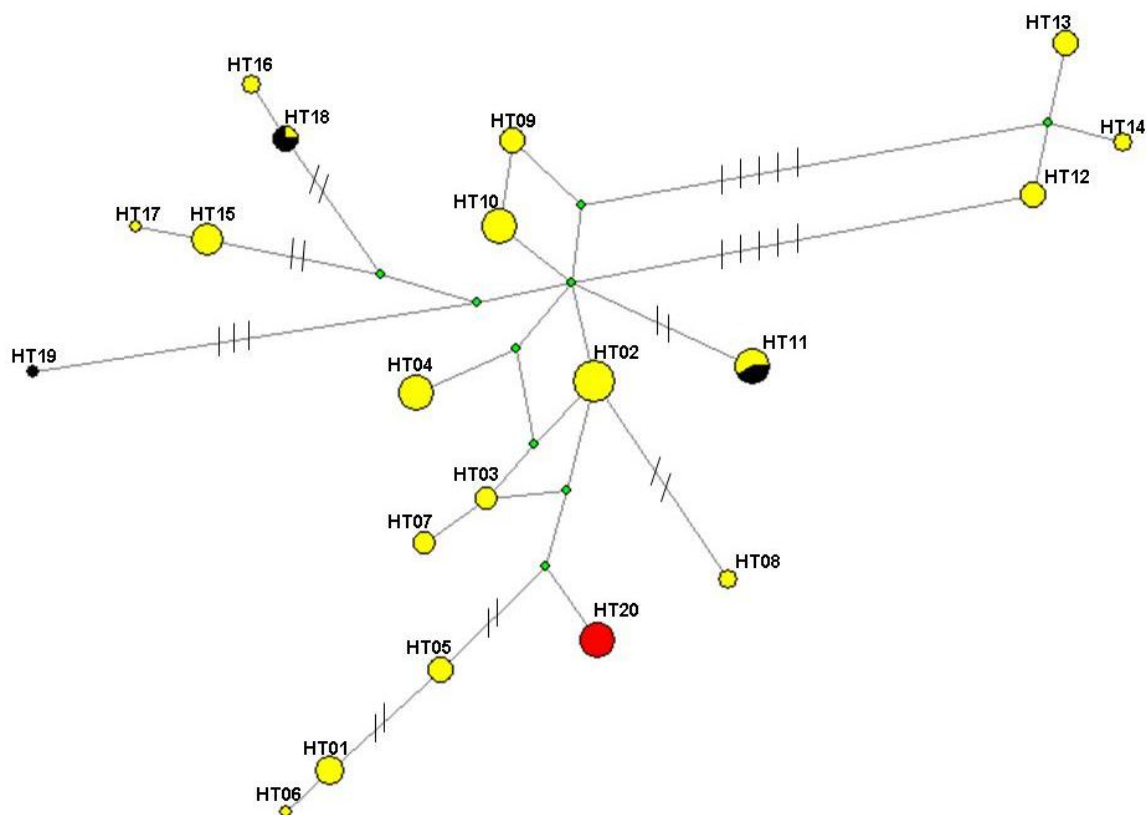
mtDNA marker alapú vizsgálatok

A 71 hucul 247 bp hosszúságú szakasza 23 polimorfikus helyet mutatott és 18 haplotípusba volt sorolható (NCBI GenBank azonosító számai: KC143336-KC143355). A nukleotidok gyakorisága a következő volt C: 26,63 %, T: 29,27 %, A: 32,49 % és G: 11,60 %. A haplotípusok páronkénti átlagos különbsége 5,629. A hucul lovakat magas genetikai diverzitás jellemzi, a haplotípus diverzitás $0,935 \pm 0,011$, míg a nukleotid diverzitás $0,022 \pm 0,012$ volt.

A minták 5 haplocsoportba sorolhatóak (**Jansen és mtsai, 2002** követve). Közel felét (48 %) az A haplocsoporthoz, 21 %-kot a „C” haplocsoporthoz, míg a többi egyedet a D (14 %), F (14 %) és B (3 %) haplocsoportokhoz soroltuk. Az „A” haplocsoportba tartozó haplotípusok voltak a leggyakoribbak a **Cieslak és mtsai (2010)** által vizsgált hucul lovak, illetve a **Cai és mtsai (2009)** által vizsgált ázsiai ősi lovakban is. Érdekességgé említem meg, hogy a Przewalski-ló kizárólag „A” haplocsoportba tartozik minden tanulmányban, akárcsak a mienkben (**Kim és mtsai, 1999; Jansen és mtsai, 2002; Cai és mtsai, 2009**). A viszonylag alacsony gyakoriságú „D” és „F” haplocsoportok jelenléte leginkább az Ibériai-félszigeten élő vagy onnan származó (berber, musztáng) és a távol-, közel-keleti lovak esetében mutatható ki (**Jansen és mtsai, 2002; Hill és mtsai, 2002; Ivanković és mtsai, 2009**). A „B” haplocsoport alacsony gyakoriságú az avar kori és a szicíliai lóban (**Priskin és mtsai, 2010; Zuccaro és mtsai, 2009**), ezzel szemben a leggyakoribb a horvát hidegvérűben (**Ivanković és mtsai, 2009**) és magas gyakoriságú az arab lóban is (**Jansen és mtsai, 2002**).

A konik ló szekvenciák 3, a Przewalski-lovaké egy haplotípust alkotott. Amikor a 2 fajta és a Przewalski-ló alkotta haplotípusok viszonyát elemeztük, azt láttuk, hogy a leggyakoribb a HT2-vel jelölt haplotípus, mely 11, csak hucul lovat foglal magába, illetve három haplotípus csak egy-egy szekvenciával volt jelen (HT06-hucul, HT17-hucul és HT19-konik). Azonban nem találtunk egy nagyon domináns, sok egyedet magába foglaló haplotípust sem (**7. ábra**).

7. ábra: A hucul, konik és Przewalski-lovak alkotta haplotípusok NETWORK ábrája. A sárga szín a hucul, a fekete, a konik és a piros a Przewalski-lovat jelenti. A haplotípusokat összekötő vonalakon található keresztvonalak a közöttük levő mutációk számát jelölik.



A páronkénti genetikai távolság azt mutatta, hogy a hucul és konik fajta jelentősen különbözik egymástól és a Przewalski-lótól: konik – Przewalski ($F_{ST} = 0,720$ $p \leq 0,001$), hucul – konik ($F_{ST} = 0,121$ $p < 0,05$) és hucul – Przewalski ($F_{ST} = 0,360$ $p \leq 0,001$).

Annak érdekében, hogy képet kapjunk a vizsgálatunkba vont egyedek, fajták más fajtákhoz való viszonyáról, az NCBI GenBank-ból letöltött 200 ló szekvenciával illesztettük sajátjainkat és NJ filogenetikai fát alkottunk (**8. ábra**). A 18 hucul haplotípus közül 8, valamint az egyetlen Przewalski vadló haplotípus a leggyakoribb „A” haplocsoportba tartozott, amelybe génbanki Przewalski lovak, a mongol vadlovak is be lettek sorolva. A három konik haplotípus a „C”, „F” és „G” haplocsoportokhoz tartozott. A „G” haplocsoport nagyon ritka (<3%), de előfordul néhány európai és ázsiai fajtában (**McGahern, 2005**). A hucul ló többi haplotípusa a filogenetikai fa különböző ágaiba, haplocsoportjaiba sorolódott, utalva a rendkívül változatos anyai eredetre.

8. ábra: NJ filogenetikai fa a 200 génbanki ló mtDNS D-loop szekvencia és a saját hucul, konik és Przewalski-lovak (●) genetikai kapcsolatának ábrázolására. Különböző színek jelölik a haplocsoportokat: A (rózsaszín), B (zöld), C (sárga), D (sötétkék), E (fekete), F (piros) és G (világoskék).



Új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága

Vizsgálatomban egy olyan, még mindig kis létszámú, hányatott sorsú, kevés genetikai kutatás alapját szolgáló lófajta vizsgálatát tűztem ki célul, amelyről tudott, hogy már többször elszenvedte a palacknyak-hatást. Mindezek ellenére, eredményeim szerint a fajta mai állománya nagy diverzitást mutat, ami valószínűleg a fajta eredetének köszönhető. Kimutatható volt múltbeli palacknyak-hatás, többes anyaaági eredet, a genetikai szerkezet strukturáltságának hiánya (sem földrajzi, sem fajtabeli) és két másik primitív lótól, a konik, illetve Przewalski lovaktól való genetikai különbözősége.

A pontos fajtavédelmi célok és módszerek – melyek eddig elsődlegesen kulturális és történelmi feljegyzéseken alapultak - kidolgozásának szempontjából fontos a fajta további vizsgálata, az arra ható természetes és mesterséges események (tenyésztés) feltárása, mivel

ilyen fajták esetén gyakori jelenség a beltenyésztettség, a genetikai változatosság hiánya, a káros allélok fixálódása vagy jelentős múltbéli demográfiai változások, melyek nagy biztonsággal csak genetikai vizsgálatokkal igazolhatóak.

Közreműködésemmel folytatódott a hucul lovak vizsgálata, melynek során több magyarországi ménesből összesen 267 kanca 202 bp hosszú mtDNS D-loop és 686 bp hosszú citokróm-b szakasza alapján végeztünk diverzitás vizsgálatot, illetve ellenőriztük a méneskönyvek kancacsalád besorolásának pontosságát.

Az elmúlt években elvégeztük a gidrán (**Sziszkosz és mtsai**, 2016), furioso-north star és magyar hidegvérű lovak (**Csizmár és mtsai**, 2018) genetikai diverzitás vizsgálatát anyai vonalon, illetve az egyedek hibás kancacsaládba való méneskönyvi besorolásának molekuláris genetikai alapú korrigálását is javasoltuk.

3. ESETTANULMÁNYOK VADON ÉLŐ ÁLLATFAJOKBAN

3.1. Vaddisznó

Irodalmi áttekintés

A vaddisznó (*Sus scrofa*) Délkelet-Ázsiából származik, ahol a *Sus* nemzetség kb. 3 millió évvel ezelőtt különvált és onnan terjedt Ázsia, Európa és Észak-Afrika felé (**Lucchini és mtsai**, 2005). Európában a vaddisznó 1,5-0,4 millió évvel ezelőtt jelent meg, attól függően, hogy ez a becslés archeológiai vagy molekuláris adatokon alapszik (**Scandura és mtsai**, 2011). Jelenlegi európai elterjedésüket elsősorban a késői pleisztocén kori eljegesedés határozta meg, melynek hatására a délkeleti területek (refúgium) felé húzódott a faj (Ibériai-félsziget, Délnyugat-Franciaország, Appennini-félsziget, illetve a Balkán térsége Görögországtól Horvátorszáig és Szlovéniáig) (**Sommer és Nadachowski**, 2006), majd onnan népesítette be a földrészt (**Scandura és mtsai**, 2011) egészen északi területekig, a 60. szélességi körig Nyugat-Oroszországban (**Danilkin**, 2001).

Az azonban még nem tisztázott, hogy mely refúgium területekről származó populációk járultak hozzá leginkább a jelenlegi vaddisznó állományok visszatelepüléséhez, különösen Európa közép és keleti térségeiben. Jelenleg Európában két fő haplocsoportba tartozó vaddisznók találhatók meg: az E1 haplocsoportba tartozóak, melyek az egész kontinensen megtalálhatóak, valamint az E2 haplocsoportba tartozóak, mely az Appennini-félszigetre, Horvátország egy részére és Szardíniára korlátozódik (**Scandura és mtsai**, 2008; 2011). Az E1 haplocsoport nem csak a legelterjedtebb, de a legsokfélebb is, két erősen megosztott klaszterrel. Az egyik ezek közül az A-klaszter, mely Franciaországban, valamint a Németország és Ausztria közötti területeken a legelterjedtebb. Ritka viszont a Balkánon és az Ibériai-félszigeten. A másik a C-klaszter, ami széles körben elterjedt Európában, különösen Ibériában és Közép-Európában, ahol majdnem 90%-os arányt ér el a vaddisznók között (**Scandura és mtsai**, 2011). A Balkánon (Görögország és Délkelet-Bulgária) új, az E1 haplocsoporthoz (W1-W6) tartozó klasztereket is kimutattak, melyek előfordulása csak erre a térségre korlátozódott (**Alexandri és mtsai**, 2012).

Az Európa keleti és északnyugati részein élő vaddisznó populációk közötti genetikai kapcsolatok feltárására kevés genetikai vizsgálatot végeztek, ebből fakadóan a vaddisznók filogenetikai kapcsolatai Oroszország európai térségére, Ukrajnára, Fehéroroszországra és Lengyelország nagy részére vonatkozóan kevésbé ismertek. Ez a térség otthont adhat a nagyban homogén C-klaszternek és keveredést mutathat a W1 és W2 klaszterek haplotípusaival, amelyek a balkáni térségből származnak (**Alexandri és mtsai**, 2012). Az utolsó jégkorszak hatásán túl a vaddisznók jelenkori filogeográfiai profilját az utóbbi idők eseményei is befolyásolhatták (**Scandura és mtsai**, 2008; 2011). Az ember által előidézett génáramlás (transzlokáció, hibridizáció) és demográfiai csökkenés, majd növekedés is hatást gyakorolt a jelenlegi populációk genetikai összetételére. A házisertés (*Sus scrofa domestica*) és vaddisznó közötti hibridizáció gyakori jelenség (**Groenen és mtsai**, 2016). Ázsiai és európai vaddisznókon és házisertéseken végzett vizsgálat a házasítás alatt és azután zajlott génáramlás jelenlétét mutatta ki (**Frantz és mtsai**, 2015). Sőt ez a génáramlás még ma is jelentős, genomikai módszerekkel kimutatható, annak ellenére, hogy a sertéstartás főleg zárt, intenzív környezetben zajlik (**Goedbloed és mtsai**, 2013; **Iacolina és mtsai**, 2016; **Manunza és mtsai**, 2016).

Kelet-Európában a 17. és 19. század között demográfiai csökkenés következett be, amely során a vaddisznók számát és elterjedését a túlzott vadászat és az időjárás lehűlése (kis jégkorszak) együttesen befolyásolták (**Danilkin**, 2001; **Apollonio és mtsai**, 2010). A faj néhány térségben, mint például a Balti államokban és Csehországban időszakosan kihalt (**Apollonio és mtsai**, 2010), míg más populációk száma csak lecsökkent (pl. Lengyelországban és Magyarországon) (**Faragó és Náhlik**, 1997; **Jędrzejewska és mtsai**,

1997) vagy a perifériára szorult (Nyugat-Oroszország, **Danilkin**, 2001). A 19. század végétől a lengyel, magyar, szlovák és valószínűleg az ukrán populációkból kiindulva visszatelepülés kezdődött meg, majd a II. világháború után a vaddisznók száma és földrajzi eloszlása egész Európában növekedésnek indult, a 20. század közepétől kezdődően populációik létszáma rendeződött (**Saez-Royuela és Telleria**, 1986; **Feichtner**, 1998; **Danilkin**, 2001). A faj jelenleg gyors ütemben terjeszkedik olyan több, számára kedvező jelenségnek köszönhetően, mint például a ragadozók hiánya, a klímaváltozás, az intenzívebb növénytermesztés, a mezőgazdasági területek újra erdősítése, a vadászati nyomás csökkenése, és a vadászati célból történő szabadon engedések növekedése (**Saez-Royuela és Telleria**, 1986; **Massei és Genov**, 2004; **Geisser és Reyer**, 2004, 2005; **Apollonio és mtsai**, 2014). Kelet-Európában öt-tízszerezésre nőtt a populáció létszáma (**Apollonio és mtsai**, 2010) az elmúlt 50 évben. Ma Európa második legnépesebb patásfaja, majdnem 4 millió egyeddel. Sok helyen kártevőnek is tekintik, elsősorban a mezőgazdasági területeken okozott kártételei miatt (**Apollonio és mtsai**, 2010, **Amills és mtsai**, 2017), azonban veszélyt jelenthetnek a haszonállatokra, a vadvilágra, sőt az emberi egészségre is (**Gortázar és mtsai**, 2007; **Bosch és mtsai**, 2017).

A vaddisznó mellett, több más vadon élő faj is átesett jelentős demográfiai változáson a múlt században, mint pl. a palacknyak hatás, beszűkülés, expanzió vagy introgresszió (**Deinet és mtsai**, 2013; **Pereira és Navaro**, 2015). A napjainkban használt modern genetikai és genomvizsgálatoknak köszönhetően új lehetőségek nyíltak ezen változások nyomomonkövetésére, a fajok evolúciós történetének, eredetének megismeréséhez (**Suchan és mtsai**, 2016; **Casas-Marce és mtsai**, 2017; **Linck és mtsai**, 2017).

Vaddisznóval végzett vizsgálatainknak több célja volt. Egyrészt mitokondriális (mtDNS) kontroll régió segítségével jellemeztük a közép- és kelet-európai vaddisznó populációk közötti genetikai diverzitást, szerkezetet és demográfiai változásokat. Különös figyelmet fordítottunk a mtDNS variabilitás leírására, az Európa és Ázsia többi részén megfigyelt haplotípus diverzitást is figyelembe véve, és célunk volt a populációk genetikai struktúrájának megállapítása, továbbá annak a megértése, hogy a jelenleg megfigyelt genetikai diverzitás és szerkezet mutat-e múltbéli, jégkorszak utáni demográfiai expanziót. Széleskörű földrajzi mintavételezést folytattunk Közép- és Kelet-Európában, összesen 6 országban, annak érdekében, hogy első ízben alkossunk átfogó genetikai jellemzést a térségben élő vaddisznó populációkról. Másrészt genomikai módszerrel vizsgáltuk, hogy múzeumban tárolt vaddisznó bőrmintákból kinyert DNS mennyire használható kereskedelmi forgalomban elérhető SNP chippekkel végzett genotipizálásokra, illetve, hogy a II. világháború előtti és jelenkori állomány diverzitásának szintjét összehasonlítsuk.

Anyag és módszer

Mintavétel és genomiális DNS izolálás mtDNS vizsgálathoz

Összesen 254 szövetmintát gyűjtöttünk hivatásos vadászok segítségével, 2007 és 2010 között, hat közép- és kelet-európai országban (Fehéroroszország n=74, Magyarország n=15, Lengyelország n=118, Ukrajna n=15, Moldova n=1, Oroszország európai része n=31; **10. ábra**). A mintázásra került állatok egyike sem csupán a vizsgálat céljából lett elejtve. A frissen gyűjtött minták 96%-os alkohollal töltött műanyag csövekben (5-30 ml) kerültek tárolásra, majd a Lengyel Tudományos Akadémia Emlős Kutatóintézetébe, Białowieżába való postázásuk után -20°C-on voltak tárolva a laboratóriumi vizsgálatokig.

A genomiális DNS-t a Qiagen DNeasy Blood és Tissue Kit (Qiagen, USA) használatával vontuk ki, a gyártó utasításait követve.

Mitokondriális DNS vizsgálat

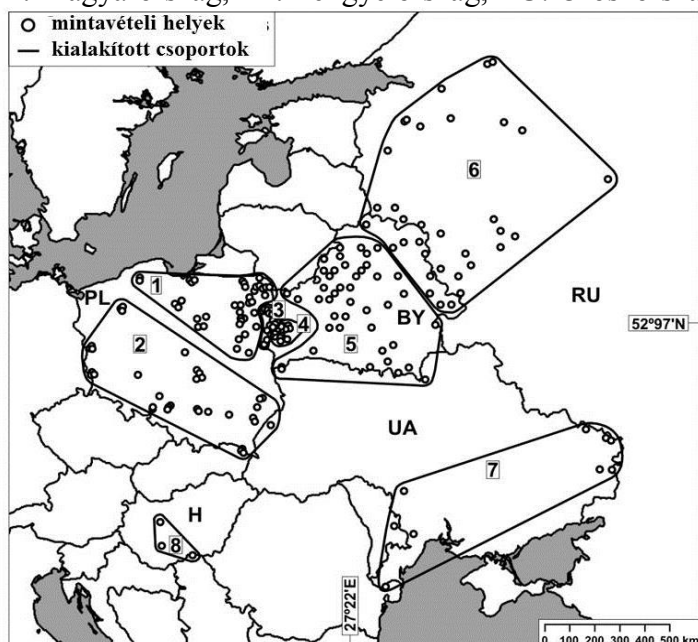
A mitokondriális kontroll régió 664 bp szakaszát polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk a következő primer pár használatával: Ss.L-Dloop: 5'-CGCCATCAGCACCCAAAGCT-3' (Alves és mtsai, 2003a) és PrR: 5'-ACCATTGACTGAATAGCACCT-3' (Montiel-Sosa és mtsai, 2000). A PCR 10 µl összmenyisége a következőkből állt: 9 µl Hot Star Taq Master Mix (Qiagen, USA), kb. 100 ng DNS, 0,5 µM forward és reverse primer. A PCR hőmérsékleti körülményei a következők voltak: 95°C 15 perc, 35 cikluson keresztül 94°C 1 perc, 55°C 1 perc majd 72°C 1 perc és végül 72°C 10 perc. Az amplifikált termékeket Clean-up kittel (A&A Biotechnology, Lengyelország) tisztítottuk. A szekvenálást a forward primer Ss.L-Dloop és a ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit segítségével készítettük elő. A szekvenálást az ABI 3100 automatizált DNS analizátorral végeztük el a białowiezai intézet laboratóriumában.

Statistikai értékelés

A szekvenciákat a BIOEDIT 7.0 szoftver segítségével illesztettük (Hall, 1999). A haplotípus és nukleotid diverzitás és a polimorfikus helyek kiszámítására DnaSP 5.0 programot használtuk (Librado és Rozas, 2009). A nukleotid szubsztitúció legjobban illeszkedő modelljét 288 jelölt modell közül választottuk ki a JMODELTEST 2.1.4 (Posada, 2008) használatával. A mtDNS alapú haplotípusokat és a földrajzi elhelyezkedést felhasználva vizsgáltuk a populációk struktúráját a SAMOVA analízissel (Dupanloup és mtsai, 2002). A SAMOVA vizsgálathoz szükség van előzetes csoportok kijelölésére (K), így az elemzést 2 és 8 közötti K értékekkel végeztük el. A SAMOVA által talált szubpopulációk közötti genetikai távolságot az ARLEQUIN 3.1 segítségével határoztuk meg (Excoffier és mtsai, 2005). A populáció szerkezet térbeli vizsgálatához, a közel azonos mintaszám figyelembevételével 8 területre osztottuk a mintavételi helyszíneinket: (1) Észak-Lengyelország, (2) Dél-Lengyelország, (3) a białowiezai erdő lengyel része, (4) a białowiezai erdő fehérorosz része, (5) Fehéroroszország nagy része; (6) Kelet-Fehéroroszország és Nyugat-Oroszország, (7) Ukrajna és Moldova, illetve (8) Magyarország (10. ábra). A białowieza-i erdőből származó mintákat (lengyel és fehérorosz területek) 2 részre osztottuk, mivel az 1981-ben itt felállított határkerítés megakadályozhatta a vaddisznók génáramlását.

10. ábra: A mintavételi helyek és a genetikai szerkezet vizsgálatához kialakított csoportok

H: Magyarország, PL: Lengyelország, RU: Oroszország, UA: Ukrajna, BY: Fehéroroszország



Ahhoz, hogy az eredményeinket szélesebb, filogeográfiai kontextusba helyezzük, az azonosított haplotípusainkat az NCBI GenBank-ban található 598 vaddisznó és házisertés szekvenciával hasonlítottuk össze (EU362409-EU362420, EU362422-EU362423, EU362425-EU362426, EU362428-EU362436, EU362438, EU362440-EU362447, EU362449-EU362456, EU362459-EU362461, EU362463-EU362464, EU362468-EU362469, EU362475-EU362476, EU362478-EU362484, EU362486-EU362492, EU362496, EU362498-EU362507, EU362509-EU362510, EU362512, EU362514-EU362515, EU362521, EU362526-EU362527, EU362529-EU362531, EU362534-EU362552, EU362557-EU362565, **Scandura és mtsai**, 2008; JF774182, JF774183-JF774189, JF774192-JF774193, JF774198, JF774204-JF774393, JF774408, **Alexandri és mtsai**, 2012; AY232846-AY232848, AY232864, AY232868-AY232870, AY232873-AY232874, AY232892, **Alves és mtsai**, 2003a; AF535163-AF535164, **Gongora és mtsai**, 2003; AY463072, **Gongora és mtsai**, 2004; GQ338953, **Gongora és mtsai**, 2011; DQ152847, DQ152853, DQ152866, DQ379027-DQ379028, DQ379062-DQ379064, DQ379077-DQ379079, DQ379229-DQ379231, **Fang és Andersson**, 2006; HM026607-HM026618, HM026639-HM026640, **Kim és mtsai**, 2011; JX894150-JX894155, JX894158-JX894188, **Ottoni és mtsai**, 2013; DQ379234-DQ379239, DQ379241, DQ379243-DQ379248, DQ379250, DQ379253, DQ379255-DQ379261, **Fang és mtsai**, 2006; AY884616, AY884619, AY884626, AY884664-AY884666, AY884669-AY884670, AY884682, AY884697, AY884716-AY884723, AY884726, AY884764-AY884787, AY884815, **Larson és mtsai**, 2005; DQ872931-DQ872932, DQ872935, DQ872940, DQ872966, DQ872969-DQ872971, DQ872975, DQ872981, **Larson és mtsai**, 2007; AB015094-AB015095, **Okumara és mtsai**, 2001; JN031156-JN031159, JN031283, JN031329-JN031335, JN031356-JN031358, JN031411-JN031512, **Van Asch és mtsai**, 2012; AF136555-AF136556, AF136564-AF136565, **Guiffra és mtsai**, 2000; AJ314542, **Randi és mtsai**, nem publikált; AJ314540, **Wu és mtsai**, 2007) és Median-Joining network hálózatot készítettünk a NETWORK 4.6.0.0 szoftverrel (**Bandelt és mtsai**, 1999). Az utóbbi két elemzéshez a szekvenciáinkat az eredeti 664 bp-ról 411 bp-ra vágtuk, hogy a GenBank-ban elérhető szekvenciákkal egyenlő hosszúságúak legyenek.

Ugyancsak az ARLEQUIN 3.1. programot használtuk a múltban történt demográfiai változások (expanzió) vizsgálatára, melynek során kiszámoltuk a F_u féle F_s és Tajima féle D értékeket (**Fu**, 1997; **Tajima**, 1989a). Ezeket túl a populáció expansziós modelltől való eltéréseit négyzetes eltérés összeggel (SSD) és a Harpending féle raggedness index-szel (r) is vizsgáltuk, több mint 1 000-es ismétléssel.

A nőivarú effektív populációméret változásainak becsléséhez a Bayes-féle skyline plot (BSP) modellt használtuk standard Markov Chain Monte Carlo (MCMC) módszerrel végzett mintavételi eljárással, szigorú molekuláris órával és $1,36 \times 10^{-8}$ mutációs rátával, 1,5 éves generációs idővel a BEAST 1.6.1. programban (**Drummond és Rambaut**, 2007; **Pesole és mtsai**, 1999). Az elemzést az összes 254 szekvencia bevonásával végeztük. Az X-tengelyek jelölik az időt millió évben megadva. Az Y-tengelyek jelentik az effektív populációméretet, millió egyedre megadva, a generációs idővel osztva logaritmus skálán. A két pontozott vonal közötti terület a 95%-os legnagyobb utólagos sűrűséget ábrázolja (HPD). Az MCMC elemzést 10 millió generációra futtatuk. A BEAST futtatás vizuális megjelenítését a Tracer 1.5 verziójával végeztük (MCMC Trace Analysis Tool) (**Rambaut és Drummond**, 2007).

Mintavétel, genomiális DNS izolálás és genotipizálás a genomikai vizsgálathoz

Európában és Közel-Keleten (Ausztria $n=4$, Magyarország $n=4$, Lengyelország $n=1$, Spanyolország $n=1$, Szardínia $n=3$ és Törökország $n=1$) 1903 és 1948 között elejtett vaddisznók bőrmintái álltak rendelkezésünkre múzeumokból. A jelenkori vaddisznó

szövetminták 2000 és 2015 között kerültek begyűjtésre (Ausztria n=17, Magyarország n=14, Lengyelország n=12, Szardínia n=25 és Törökország n=8) 96 %-os alkohollal töltött csövekbe. A különböző vegyszerekkel kezelt bőrmintákból és a jelenkori húsmintákból a genomiális DNS izolálás kisózással történt a Genoskan (Aarhus, Dánia) laboratóriumában. Akárcsak a genotipizálási munka, ami Illumina Porcine SNP60 Beadchip (60K SNP) felhasználásával történt, és minden minta duplikálva került genotipizálásra.

Statisztikai értékelés

A genotipizálási adatainkat a PLINK v 1.9. (**Purcell és mtsai**, 2007) szoftverrel szűrtük, és azokat az SNP-eket hagytuk meg, melyek pontossága $\geq 0,90$ (90 % a sikeresen lement SNP-ekből azok aránya, amelyekhez valós genotípus rendelhető), biztos kromoszóma pozícióval rendelkeznek, nem nemi kromoszómához tartoznak, és a call rate (sikeresen mért SNP-k és az összes mért SNP aránya) 0,24-0,67 közé esett. Kizártuk azokat az egyedeket melyekben > 40% a hiányzó adat. Azonban nem szűrtük a ritka allél gyakoriságot (MAF), annak érdekében, hogy maximalizáljuk az olyan allélok lehetőségének kimutatását, melyek hiányozhatnak a jelenkori mintákból.

A minőség-ellenőrzés után, kiszámoltuk a polimorfizmust (P), a ritka allél gyakoriságot (MAF), a megfigyelt (H_O) és a várt (H_E) heterozigotizációs értékeket. Ezt követően főkomponens analízissel (PCA) vizsgáltuk a populáció szerkezetet az adegenet programcsomag (**Jombart és mtsai**, 2008) segítségével az R 3.3.3-ban (**R Development Core Team**, 2017).

Eredmények és azok megvitatása

mtDNS marker alapú vizsgálatok

A Közép- és Kelet-Európából származó 254 vaddisznó 664 bp hosszú mtDNS D-loop régióiban 16 haplotípust (H1-16) és 43 polimorf pozíciót azonosítottunk (**23. táblázat**).

23. táblázat: A vaddisznókban talált polimorf nukleotid pozíciók az AJ002189 szekvenciához hasonlítva

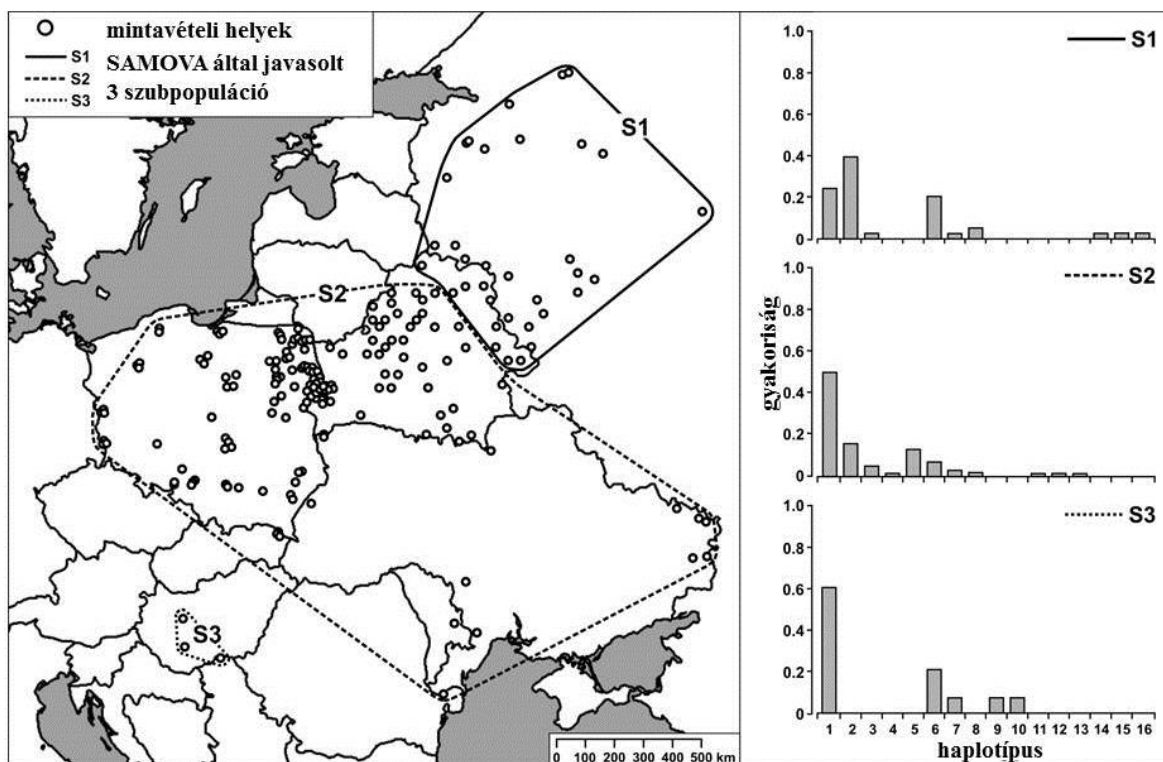
haplo- típus	15454	15469	15470	15472	15477	15488	15522	15543	15544	15550	15555	15558	15560	15562	15563	15565	15566	15569	15571	15578	15586	15591	15614	15615	15647	15706	15707	15708	15710	15719	15725	15737	15744	15754	15818	15821	15883	15932	15975	16006	16049	16068	16071	
	A	A	A	A	A	T	G	T	G	A	T	A	C	A	T	G	A	C	A	C	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A	A	C	A	T	A	C	C	A	A	A	A	G	C	
H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H9	.	G	C	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	
H14	.	.	.	.	.	C	A	C	.	C	A	T	A	C	A	T	G	A	C	.	T	.	C	C	C	A	T	A	C	.	G	.	G	.	G	.	.	.	.	G	.	A	.	
H15	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
H16	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	T	T	G	C	.	.	A	.	.	.	.	G	T	.	.	.	T	T	G	.	G	.	.	.	.

Ez az összes hely 6,17 %-át jelenti és egy InDel pozíciót is tartalmaz. A szekvenciák nukleotid összetétele 25,30 % C, 26,90 % T, 33,65 % A és 14,15 % G volt. Az átlagos nukleotid diverzitás $0,003 \pm 0,002$ volt.

A 16 azonosított haplotípust feltöltöttük az NCBI Genbank-ba, azonosítójuk: KF258877-KF258892. Hat közülük korábban már leírt haplotípusnak felelt meg: az A haplotípus a H3-mal, a C haplotípus a H1-gyel, a BA haplotípus a H2-vel, az E haplotípus a H6-tal, az EJ haplotípus a H14-gyel és a BC haplotípus a H16-tal azonos (**Larson és mtsai**, 2005, 2007). Az átlagos haplotípus diverzitás $0,714 \pm 0,023$ volt. A leggyakoribb haplotípus a H1-gyel jelölt, ami az összes minta 48 %-ban fordult elő, majd a H2 (az összes minta 19 %-ában), ami viszont messze gyakoribb volt a Kelet-Fehéroroszország és Nyugat-Oroszország által alkotott csoportunkban a többihez képest.

A SAMOVA analízis eredménye szerint az elemzett mintáink optimális térbeli szerkezete három szubpopulációra osztható: Kelet-Fehéroroszország és Nyugat-Oroszország; Magyarország és az összes többi vizsgált régió (**11. ábra**).

11. ábra: A SAMOVA eredménye a szubpopulációk térbeli bemutatásával



A csoportok közötti varianciát jelző, Φ_{CT} index a $K=2$ csoportosítás kivételével szignifikáns különbséget mutatott. A genetikai különbség a csoporton belüli populációk között $K=3$ -nál volt a legkisebb és szignifikáns ($p < 0,05$). Az S1 csoport, amiben Kelet-Fehéroroszországból és Nyugat-Oroszországból származó minták tartoztak, szignifikánsan nagyobb genetikai távolságot mutatott a többi csoporthoz viszonyítva ($\Phi_{ST} = 0,082$, $p < 0,001$). Ez annak lehet az eredménye, hogy kevés a közös haplotípus az S1-be tartozó haplotípusok és más SAMOVA csoportokba tartozó haplotípusok között.

A SAMOVA alkotta szubpopulációk fő mtDNS diverzitás mutatói közül a haplotípus és nukleotid diverzitás értékei a legnagyobbak az S1 szubpopulációban voltak, míg a legkisebbek az S3-ban (**24. táblázat**). A teljes adathalmazra közepes haplotípus diverzitás értéket mutattunk ki ($h=0,714$), mely alacsonyabb volt, mint más európai vaddisznókat vizsgáló tanulmányban (0,902 és 0,910, (**Scandura és mtsai**, 2008; **Van Asch és mtsai**, 2012) de nagyobb, mint a tunéziai vaddisznókban találtaké (0,550; **Hajji és Zachos**, 2011). A nukleotid diverzitás az egész populációra nézve alacsonyabb (0,003) volt, mint a középnyugat európai vaddisznó populációkban (0,006; **Van Asch és mtsai**, 2012), Európában Olaszországon kívül (0,005; **Scandura és mtsai**, 2008), Kelet-Ázsiában (0,004; **Wu és mtsai**, 2007) vagy a Dél-Balkánon (0,011; **Alexandri és mtsai**, 2012).

24. táblázat: Fő diverzitás mutatók a SAMOVA alkotta 3 szubpopulációra

	szubpopulációk			összes
	S1	S2	S3	
mintaszám	41	198	15	254
haplotípusok száma	9	11	5	16
polimorf helyek száma	34	9	8	41
haplotípus diverzitás (SD)	0,763 (0,042)	0,683 (0,029)	0,629 (0,125)	0,714 (0,023)
nukleotid diverzitás (SD)	0,005 (0,003)	0,002 (0,001)	0,002 (0,002)	0,003 (0,002)

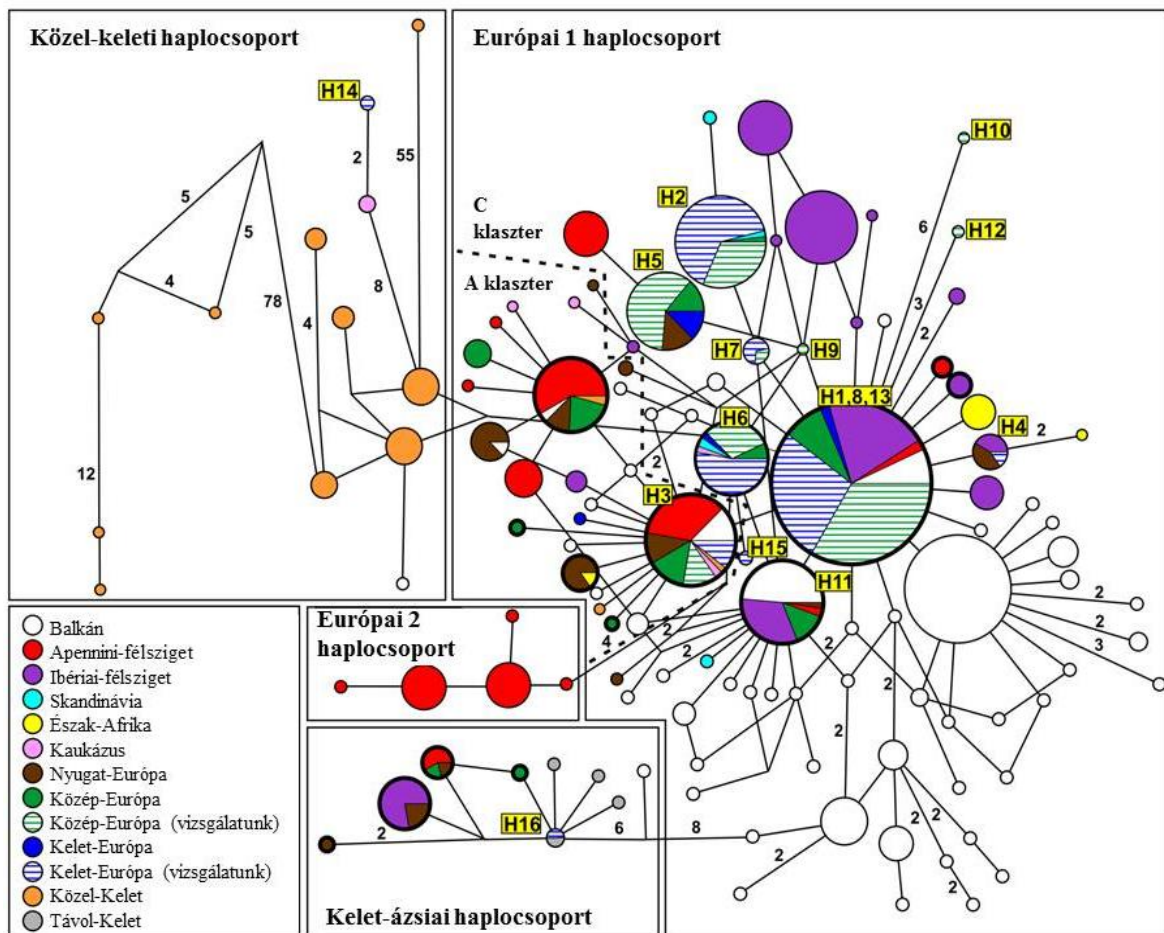
A filogeográfiai mintázatok vizsgálatára Median-Joining hálózatot készítettünk a saját szekvenciák és 598 NCBI GenBank-ból származó vaddisznó, és házisertés szekvencia letöltésével (**12. ábra**). A mintáinkban detektált 16 haplotípusból 2 egybeolvadt másokkal, a szekvenciák 664 bp-ről 411 bp-ra vágása következtében. A 14 megmaradt haplotípusból, 12 az európai E1 haplocsoporthoz, azon belül csak a H3 tartozott az európai A klaszterhez (E1-A), az összes többi az európai C klaszterhez (E1-C), melybe tartozó haplotípusok már az LGM előtt is léteztek (**Alexandri és mtsai**, 2012). Két a mintáinkban kimutatott haplotípus (mindkettő Oroszországban kimutatott) a kelet-ázsiai és közel-keleti haplocsoporthoz tartozott. Valószínűleg ez a két példa múltbeli transzlokációra utal. 1971-ben szabadon engedtek a Novgorod környéki erdőben 22 Észak-Kaukázusból (ahol közel-keleti haplotípusok vannak) származó egyedet (**Russakov és Timofeeva**, 1984; **Larson és mtsai**, 2007). 1935 és 1967 között pedig 700 vaddisznót engedtek szabadon Moszkva 150-200 km-es körzetében (**Fadeev**, 1969). Egy általunk mintázott egyed sem tartozott a jelenlegi Olaszország területére korlátozódó E2 haplocsoportba.

Egy korábbi vizsgálat a görög és dél-bolgár vaddisznók filogeográfiai struktúráját vizsgálva több új klasztert azonosított az E1 haplocsoporton belül, melyek előfordulása csak bizonyos földrajzi régiókra jellemző, arra utalva, hogy a Balkán déli része egy külön refúgium lehetett a faj számára (**Alexandri és mtsai**, 2012). Korábban azt feltételezték, hogy az utolsó eljegesedés maximuma után Közép- és Kelet-Európa a balkáni refúgium (Görögországtól északra) állományából népesedett be újra (**Hewitt**, 1999). Az általunk kapott eredmények ezt egyértelműen nem támasztják alá, de nem is cáfolják a feltételezést. Az Észak-Görögországból és Dél-Bulgáriából származó vaddisznók (ezek alkotják a jelenlegi vaddisznó populációk eredetét a Kárpátoktól északra és keletre) az E1 haplocsoport különböző klasztereibe tartozó haplotípusok keveredését jelenítik meg, azonban a vizsgálatunkban

majdnem minden haplotípus csak egy klaszterhez, a C-hez tartozott. A vaddisznók genetikai diverzitásáról kevés és kis elemszámú kutatási eredmények állnak rendelkezésünkre Bulgária nagy részéről, Románia területéről, illetve a volt Jugoszlávia utódállamaiból. A balkáni régiót legnagyobb számban mintázó kutatások megerősítették a magas genetikai diverzitást a régióban, 11 olyan új haplotípust írtak le, ami csak erre a területre jellemző, és egy kivételével az összes detektált haplotípus az E1 haplocsoportba tartozott (**Velickovic és mtsai**, 2015, 2016).

Továbbra is nyitott kérdés marad, hogy melyek voltak a refúgium területek az Európa dél-keleti régióiban (a mai Moldova, Oroszország déli részei és a Krím-félsziget) élő vaddisznók számára. Néhány fosszilis vaddisznó mintát találtak ezeken a területeken, és tudjuk, hogy foltokban előfordultak a vaddisznó számára alkalmas élőhelyek az LGM alatt is (**Markova és mtsai**, 2009). Egy nagyon gyakori haplotípus bizonyíthatná az ősi vonalat, melybe tartozó egyedek ebben a keleti refúgiumban maradtak, és innen terjedtek el Kelet-Európában.

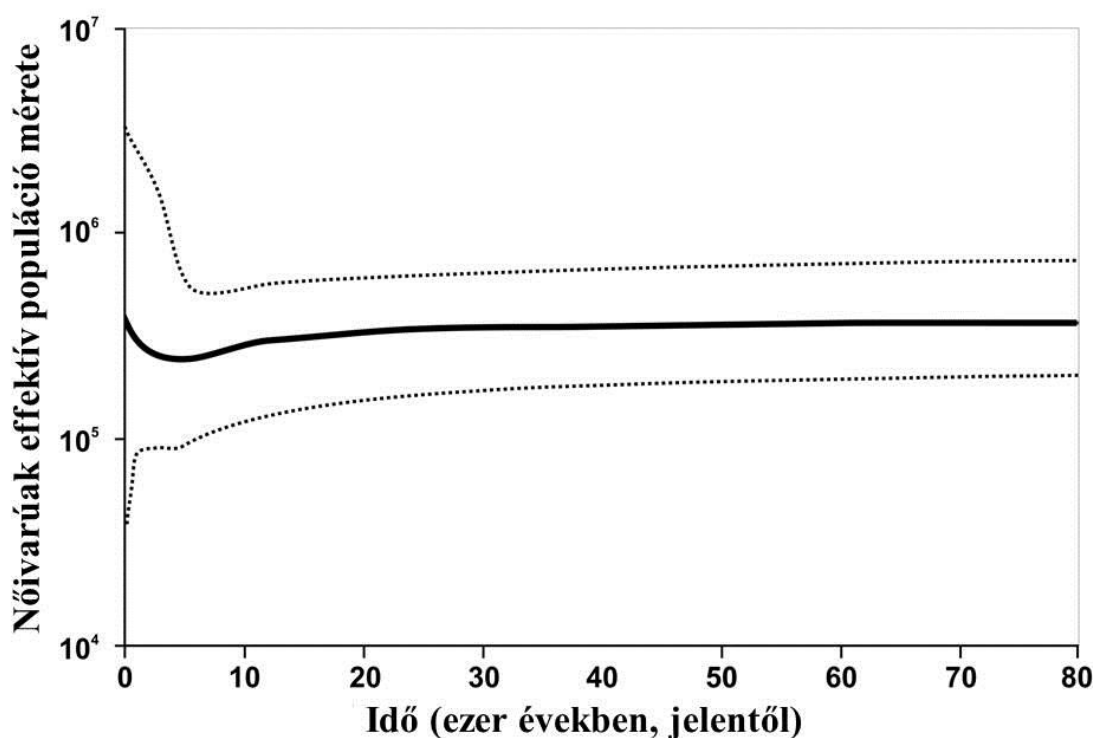
12. ábra: Median-Joining network az 598 GénBank-ból származó és a 254 saját vaddisznó szekvenciákból kapott haplotípusok felhasználásával. A körök mérete arányos a haplotípusok gyakoriságával, színük a mintavételi helyszínükre utal. Vastag külső körszegély házisertés szekvenciára utal a haplotípuson belül. A haplotípusokat összekötő vonalakon található számok a mutációk számát jelentik.



A demográfiai expanzióra utaló teszteket a H14-gyel és H16-tal jelölt haplotípusok kizárásával végeztük el, mivel azok nem európai haplocsoportba tartozó szekvenciákat tartalmaznak, így torzíthatták volna az eredményt, amit az európai állományra kívántunk levonni. A neutralitás tesztek eredményei a magas, negatív, de nem szignifikáns F_S ($-3,348$ $p \geq 0,05$), és D ($-0,877$ $p \geq 0,05$) értékekkel, illetve a nem szignifikáns SSD ($0,071$ $p \geq 0,05$) és a szignifikáns r értékkel ($0,258$ $p \leq 0,05$) utalhatnak a vizsgált populációk létszámának növekedésére, de nem hirtelen, közelmúltban bekövetkezett expanzióra (**Tajima**, 1989b; **Fauvelot és mtsai**, 2003; **Martel és mtsai**, 2004).

A nőivarú egyedek effektív populációméretének távoli múltban bekövetkezett dinamikája Közép- és Kelet-Európában lassú populációméretbeli csökkenést, majd egy hirtelen növekedést mutatott (**13. ábra**). A skyline plot azt mutatta, hogy a vizsgált terület jelenkori populációjának története az utolsó eljegesedés maximuma (LGM) után kezdődött, amikor a vaddisznók újra benépesítették ezeket a területeket a déli refúgium területekről kiindulva.

13. ábra: Bayesian skyline plot (BPS) az effektív populáció méret változásának bemutatására. A vastag vonal a medián becslés értékeit, míg a szaggatott vonalak a 95 % legnagyobb utólagos sűrűség (HPD) intervallumokat mutatja.



Az mtDNS vizsgálatunk eredményei látszólag ellentmondanak a genom szekvenciákkal nyert adatoknak (**Groenen és mtsai**, 2012). Ezek a vizsgálatok azt mutatták ki, hogy a jelenlegi holland és olasz vaddisznó állományok egyedszáma drasztikus csökkenésen esett át, ami kb. 60 000 évvel ezelőtt kezdődött és a minimumát az LGM alatt érte el (~20 000 éve). A palacknyak hatás az LGM-t követő 10 000 évig tartott (**Groenen és mtsai**, 2012). Olasz kutatók mtDNS alapú vizsgálati eredményeik alapján azt állították, hogy a demográfiai változások közül, amelyeken a jelenkori európai vaddisznó populációk keresztülmentek, még mindig az LGM utáni demográfiai expanzió hagyta a legnagyobb nyomot az európai

vaddisznók genetikai diverzitásán, kivéve az olasz populációkat (**Scandura és mtsai**, 2008). Ez utóbbi állítás vita tárgyát képezi azon kutatókkal, akik az olasz populációban is találtak bizonyítékot a palacknyak hatásra (**Groenen és mtsai**, 2012). A fosszilis adatok egyértelműen azt jelzik, hogy az utolsó eljegesedés maximuma alatt a vaddisznók földrajzi elterjedése az Ibériai-félszigetre, Délnyugat-Franciaországra, az Appennini-félszigetre, valamint a Balkánra (Észak-Görögország, Szlovénia és Horvátország) terjedt ki (**Sommer és Nadachowski**, 2006), ennél fogva eredményeink nem felelnek meg maradéktalanul előzetes várakozásainknak. Annak érdekében, hogy teljesen megértsük az európai vaddisznó populációk történetét, eredetét, szükség van szélesebb körű mintavételre, különösen olyan térségekből, mint a Dinári-hegység térsége, az észak-balkáni régió, Ukrajna déli részei valamint Oroszország európai része, amelyek feltehetően a jelenkori kelet-európai vaddisznó állományok utolsó eljegesedés alatti refugium területei lehetnek, illetve további genetikai/genomikai módszerek felhasználása, mint pl. mikroszatellit markerek és genomszekvenálás.

SNP alapú vizsgálat

Az átlagos call rate (60K SNP alapján) 0,52 volt, 0,47-0,67 között mozgó értékekkel. Az adatok minőségellenőrzése és szűrése során, a kezdeti 64 232 SNP-ből és 14 vaddisznóból, 62 637 lókuszt és 8 egyedet zártunk ki. A végső adathalmaz 6 egyedet és 1 595 SNP-t foglalt magában 0,99-es genotipizálási aránnyal. Kevesebb polimorf lókuszt figyeltünk meg a II. világháború előtti mintákban (96-382 között), mint a jelenkori mintákban (932-1 414 között) (**23. táblázat**). Hat populációban (török1, török2, szárd1, lengyel1, magyar1, osztrák1) a megfigyelt heterozigotizáció volt nagyobb a vártnál, míg három populációban (szárd2, lengyel2, osztrák2) ezzel ellentétes heterozigotizációs értékeket kaptunk. A jelenkori magyar mintákban a megfigyelt és várt heterozigotizációs értékek egyformák voltak (**25. táblázat**).

25. táblázat: Mintaszám, polimorf lókusztok számokban (P) és %-ban, megfigyelt és várt heterozigotizáció (H_O és H_E), ritka allél gyakoriság (MAF) standard hibákkal (SE). A populációkban 1: II. világháború előtti minták, 2: jelenkori minták.

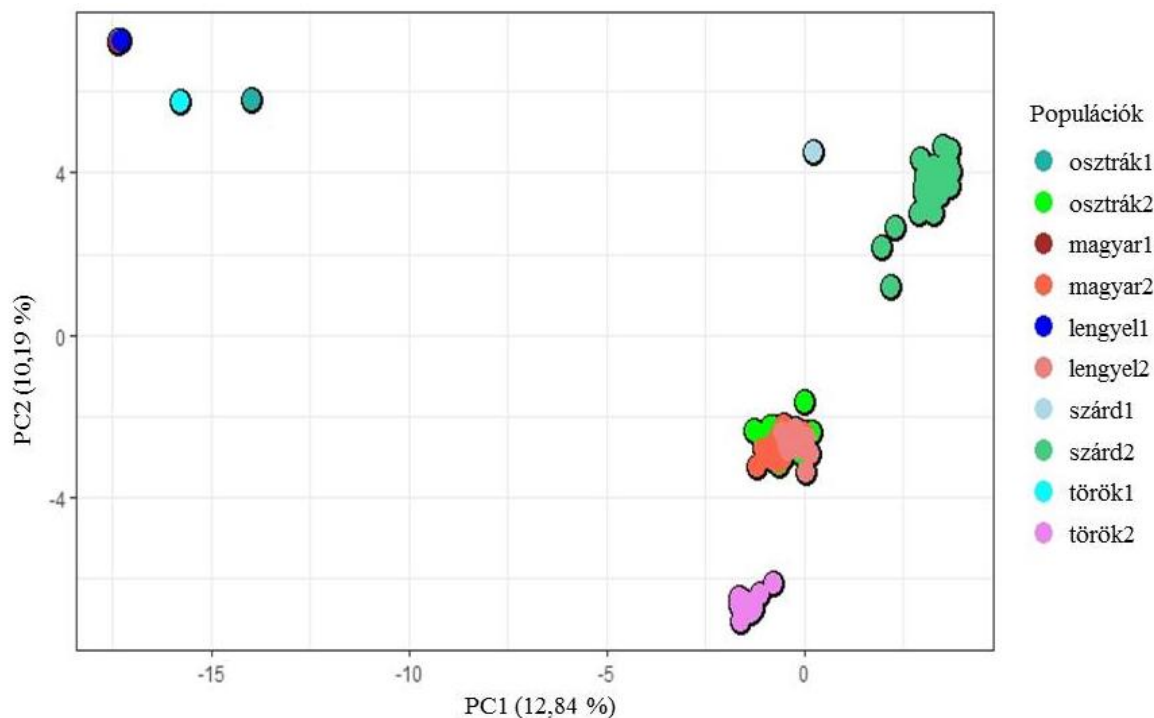
Populáció	Mintaszám	P	P (%)	H_O ($\pm$ SE)	H_E ($\pm$ SE)	MAF ($\pm$ SE)
török1	1	306	19,2	0,192 (0,010)	0,096 (0,005)	0,096 (0,192)
török2	8	932	58,4	0,202 (0,006)	0,194 (0,005)	0,144 (0,584)
szárd1	1	382	23,9	0,239 (0,011)	0,120 (0,005)	0,120 (0,239)
szárd2	25	1263	79,2	0,189 (0,004)	0,225 (0,005)	0,167 (0,791)
lengyel1	1	97	6,1	0,061 (0,006)	0,030 (0,003)	0,030 (0,061)
lengyel2	12	1199	75,2	0,254(0,005)	0,260 (0,005)	0,196 (0,751)
magyar1	1	96	6,0	0,060 (0,006)	0,030 (0,003)	0,030 (0,060)
magyar2	14	1184	74,2	0,253 (0,005)	0,253 (0,005)	0,191 (0,742)
osztrák1	2	318	19,9	0,122 (0,007)	0,081 (0,004)	0,062 (0,199)
osztrák2	17	1414	88,7	0,300 (0,005)	0,301 (0,004)	0,227 (0,886)

A genetikai diverzitást meghatározó indexek értékeit befolyásolhatja az eltérő mintaszám, vagy az expanziót követő megnövekedett génáramlás a populációk között (**Scandura és mtsai**, 2008; **Goedbloed és mtsai**, 2013). További történeti adatok szükségesek a mintázott populációkból, annak érdekében, hogy ezeket a bizonytalanságokat kiküszöböljük, emellett segíthetnének tisztázni az európai és közel-keleti vaddisznó populációk közötti kapcsolatokat (**Larson és mtsai**, 2007; **Alexandri és mtsai**, 2012), a szárd populációk eredetét (**Iacolina és**

mtsai, 2016), illetve a házisertés és a vaddisznó közötti hibridizáció helyi- és időbeli mértékét (Goedbloed és mtsai, 2013; Iacolina és mtsai, 2016) is.

A nagyobb eredeti call rate-tel rendelkező múzeumi minták (vaddisznó 0,67) közelebb csoportosultak a jelenkori mintákhoz (14. ábra). A PC1 elkülöníti a két időszakból származó mintákat. A nagyobb call rate-tel rendelkező egyedek PC1 értéke -5 feletti. A többi minta, mint a kisebb call rate-tel rendelkező egyedek, kiugróak a PCA ábrán. A PCA megerősítette a korábbi eredményeket a jelenkori mintákban (Iacolina és mtsai, 2016; Alexandri és mtsai, 2017). A kiugró egyedek kisebb call rate-tet mutattak és az eredetileg kiugrók és a gyenge eredményt adó egyedek profilja között nem volt lehetséges különbséget tenni. A DNS mennyisége, minősége vagy a kettő együtt hozzájárulhatott néhány egyed kevésbé sikeres genotipizálásához.

14. ábra: Ausztriából, Magyarországról, Lengyelországból, Olaszországból (Szardínia) és Törökországból származó II. világháború előtti (1) és a jelenkori (2) vaddisznók főkomponens analízise. A kiugró egyedek kisebb call rate-tet mutattak.



Új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága

A vadon élő állatfajok törzsfajlásának és genetikai diverzitásának ismerete a vadgazdálkodás és a vadvédelem legfontosabb alapja, különösen napjainkban, mikor talán minden eddiginél jobban hatással vagyunk létünkkel, tevékenységeinkkel az állatfajok sokféleségére.

Eredményeimmel bizonyítottam, hogy a közép- és kelet-európai vaddisznók többsége az európai E1-C haplocsoportba sorolhatóak (a vizsgált egyedek 94 %-a) és csak az egyedek 5 %-a képviselte az E1-A klasztert. Vizsgálatom elvégzésekor elsőként dolgoztunk ekkora elemszámmal a régióban. A Kelet-Ázsiára és a Közel-Keletre jellemző haplotípusokkal csak két oroszországi egyed rendelkezett, aminek magyarázatára történeti forrást találtam a

mintázott régióban. Gyenge genetikai strukturáltságot mutattam ki a vizsgálatba vont földrajzi régióban, illetve a populációk közötti, sok közös haplotípus előfordulása nem mutatott bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a holocén alatt és a holocén előtti időszakban erős demográfiai fluktuáció ment volna végbe. Ahhoz, hogy jobban megértsük, hogy a közép- és kelet-európai vaddisznó populációk LGM után mely refúgium területekről kolonizálták a régiót, elengedhetetlen, hogy több mintával rendelkezünk az eddig kevésbé vizsgált területekről, melyek refúgiumok lehettek a jelen populációink számára (balkáni területek, mai Dél-Ukrajna, Oroszország déli része), illetve mikroszatelliteket és új genomikai módszereket használjunk.

Ez utóbbiak ma még túl költségesek számunkra a nagy elemszámú kutatásokhoz, azonban elvégeztünk kisebb elemszámmal egy olyan vizsgálatot, melynek során kereskedelmi forgalomban levő SNP chipet használtunk II. világháború előtti és jelenkori vaddisznó minták genotipizálására. Egyrészt kíváncsiak voltunk, hogy múzeumi minták esetén milyen pontossággal kaphatunk eredményt, másrészt összehasonlítottuk a két korból származó állomány diverzitását. A kezdeti 64 232 SNP-ből és 14 vaddisznóból, az adatok szűrése után 1 595 SNP és 6 egyed maradt. Ezeket felhasználva azt találtam, hogy a II. világháború előtti minták kevésbé polimorfak, mint a jelenkoriak. Azonban ezt az eredményt fenntartással kell kezelni. További, jó minőségű mintákra és abból kinyert DNS-re van szükség ahhoz, hogy pontosabban össze tudjuk hasonlítani a populációk időbeli és térbeli változásait.

Mivel nem a dolgozatomban vizsgált régiót érinti, nem mutattam be eredményeinket a dél-iráni vaddisznók sokféleségéről (**Ashrafzadeh és mtsai**, 2018). Irán ugyancsak különleges földrajzi régió, mivel Európa és Ázsia határán fekszik, igen gazdag a biodiverzitása. Illetve egy másik nemrég publikált kutatásban a vaddisznó és házisertés hibridizációjának szintjét tártuk fel Európában és a Közel-Keleten (**Iacolina és mtsai**, 2018).

Résztvételemmel a vaddisznó faj diverzitására vonatkozóan több kutatás folyik jelenleg is, mind genetikai mind modern genomikai módszerekkel.

3.2. Mezei nyúl

Irodalmi áttekintés

A nyúlalakúak rendszertana a mai napig nem teljesen tisztázott (**Fontanesi és mtsai**, 2016), és a rend fajainak evolúciója, filogenetikája és populációs genetikája még kevésbé ismert (**Angermann**, 1983; **Flux és Angermann**, 1990; **Chapman és Flux**, 1990; **Hoffmann**, 1993). A fosszilis adatok azt mutatták, hogy a nyúlalakúak a közép eocénben jelentek meg Ázsiában, kb. 45 millió évvel ezelőtt. A nyúlfélék a pocokféléktől az oligocén vagy a késő eocén idején (30-40 millió éve) váltak el (**Erbajeva**, 1981; **Dawson**, 1981). A nyúlfélék családja Észak-Amerikában és Ázsiában különült el, Európába pedig a felső miocén (20 millió éve) alatti nagy vándorlás során érkezett, és később sugárszerűen innen terjedt szét (**Dawson**, 1981). A pleisztocén során a klímaváltozás a fajok elterjedésében számos változást eredményezett. Vándorlásra, terjeszkedésre kényszerítette őket, és/vagy az előfordulási területeik felaprózódását idézte elő (**Hewitt**, 1999, 2004; **Stamatis és mtsai**, 2009). Európában ez a folyamatos oszcillálás a déli félszigeteken (Ibériai, Appenini, Balkán) nagyobb fajdiverzitáshoz vezetett, így több más fajjal együtt ezek voltak a nyúlalakúak számára is a főbb refúgium területek (**Hewitt**, 1999, 2000; **Alves és mtsai**, 2008, 2010). A klímaváltozásokon túl a különböző emberi tevékenységek, az élelemért és szaporodásért folytatott verseny, a fajok közötti hibridizáció szintén erőteljesen befolyásolta a nyulak jelenlegi genetikai diverzitását (**Guberti és mtsai**, 2000; **Thulin és mtsai**, 1997; **Melo-Ferreira és mtsai**, 2005, 2007).

A mezei nyúl (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) Európa északi, középső és nyugati részén, valamint Ázsia nyugati térségében őshonos. Vadászati célra azonban további országokba is betelepítették (Argentína, Ausztrália, Barbados, Brazília, Chile, Egyesült Államok, Falkland-szigetek, Franciaország (Réunion), Kanada és Új-Zéland (**Flux és Angermann**, 1990)). Genetikai vizsgálatokkal bizonyították a transzlokáció hatását a mezei nyúl genomjára, illetve hogy a mezei nyúl és a fokföldi nyúl (*Lepus capensis*) ugyanazon faj lehet (**Ben Slimen és mtsai**, 2006; **Smith**, 2008). Az előbbi szerzők azonban később mtDNS vizsgálatokkal különbséget találtak közöttük, ezért ma két önálló fajnak tekintik őket (**Ben Slimen és mtsai**, 2008).

A mezei nyúl nagy gazdasági értékű fajnak tekinthető, ezért már több kutatásban vizsgálták a faj genetikai diverzitását és filogeográfiáját (**Pierpaoli és mtsai**, 1999; **Kasapidis és mtsai**, 2005; **Sert és mtsai**, 2005; **Stamatis és mtsai**, 2009; **Mamuris és mtsai**, 2010; **Antoniou és mtsai**, 2013; **Canu és mtsai**, 2013; **Giannoulis és mtsai**, 2018; **Djan és mtsai**, 2017). Észak-Rajna-Vesztfáliában nagy genetikai diverzitást találtak (**Fickel és mtsai**, 2005), míg a spanyol kantábriai nyúlban pedig több egyedi haplotípust határoztak meg (**Palacios és mtsai**, 2004). A korzikai mezei nyúlban (*Lepus corsicanus*) és az európai mezei nyulakban nem találtak közös haplotípust, ami arra utal, hogy nem volt köztük génáramlás a múltban, hosszú, egymástól független evolúciója volt a fajoknak és nem szaporodtak egymással (**Pierpaoli és mtsai**, 1999). A *Lepus* nembe tartozó fajok haplotípusait két fő csoportba sorolták: "A" klád (*L. granatensis*, *L. corsicanus*, *L. timidus*), és a "B" klád (*L. c. mediterraneus*, *L. habessinicus*, *L. starcki*, *L. europaeus*). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az „A” kládhoz tartozó három faj közös őssel rendelkezik és a „B” kládhoz tartozó mezei nyúltól függetlenül népesítette be a refúgium területekről Európát, ahol az, az LGM alatt elszigetelődhetett. A korzikai és havasi nyúl közötti közeli kapcsolat meglepte a kutatókat, mivel a *Lepus* nem biogeográfiai szerkezetének evolúciója Európában azt mutatta, hogy reliktumfajoknak tekinthetők, melyek még a mezei nyúl elterjedése előtről származnak Nyugat-Európában.

Az utolsó nagy eljegesedés idején Európa déli és délkeleti része lehetett a mezei nyulak refúgiuma (**Stamatis és mtsai**, 2009). Refúgium lehetett Törökország is, főleg annak a Fekete-tengertől Kaszpi-tengerig terjedő része (**Antoniou és mtsai**, 2013). Az eljegesedés után ebből a refúgiumból kiinduló terjeszkedés a korábban izolálódott vonalakkal (allopatrikus) egy másodlagos kapcsolatot eredményezett (kontaktzónák alakultak ki).

Mezei nyúl populációkon végzett mitokondriális DNS vizsgálatok viszonylag nagymértékű földrajzi elkülönülést mutattak ki (**Kasapidis és mtsai**, 2005; **Stamatis és mtsai**, 2009; **Mamuris és mtsai**, 2010; **Giannoulis és mtsai**, 2017; **Djan és mtsai**, 2017). Két nagy földrajzilag elkülönült vonalat/haplocsoportot írtak le: Európai (EUR) és Anatóliai/közel-keleti (AKK). Az európai vonalat további két alcsoportra osztották: a közép-európai (KE) és a délkelet-európai (DKE) (**Stamatis és mtsai**, 2009). Az AKK vonal az Anatóliában, Délkelet-Európában és a keleti-mediterrán szigeteken élő nyulakat foglalja magába (**Giannoulis és mtsai**, 2018). Egy szerb haplotípus kivételével, nem azonosítottak anatóliai/közel-keleti haplotípusokat Dél-, Közép- és Északnyugat-Görögországban, illetve Európa többi részén (**Djan és mtsai**, 2017). Ahogyan, a Közel-Kelet egészén nem találtak európai haplotípust (**Kasapidis és mtsai**, 2005; **Sert és mtsai**, 2009; **Stamatis és mtsai**, 2009). Az EUR és AKK vonalak kontaktzónáját Bulgáriában és Északkelet-Görögországban mutatták ki (**Kasapidis és mtsai**, 2005; **Stamatis és mtsai**, 2009; **Antoniou és mtsai**, 2013).

A mezei nyúl genetikai vizsgálatok, nagyrészt a mtDNS D-loop régiójának eredményein alapulnak, amit egyre inkább alátámasztanak a citokrómb (cyt-b) régióból származó eredmények is. Már korábban bizonyították, hogy az mtDNS alapú vizsgálatok megbízható eredményt adnak az egymáshoz közel álló fajok közötti és azokon belüli filogenetikai kapcsolatok meghatározására (**Yu és mtsai**, 2007; **Zhou és mtsai**, 2014), valamint a kontaktzónák kimutatására is (**Antoniou és mtsai**, 2013).

Összességében elmondhatjuk, hogy a mezei nyulakon végzett viszonylag nagyszámú genetikai vizsgálat ellenére is, a köztük levő filogenetikai kapcsolatok megértése még mindig kihívást jelent. Például, továbbra is kevés vizsgálat van szerb, görög és bolgár nyulakra vonatkozóan (**Hartl és mtsai**, 1993; **Vapa és mtsai**, 2002, 2007; **Djan és mtsai**, 2006, 2015, 2017; **Kasapidis és mtsai**, 2005, **Stamatis és mtsai**, 2009). Kutatásunkat széleskörű mintavételezésre alapoztuk, melybe hét, kevésbé gyakran mintázott országot vontunk be, a következő célok megválaszolására: i). a mitokondriális genetikai variabilitás meghatározása a közép- és kelet-európai, kaukázusi mezei nyulakban; és ii). a vizsgált populációk filogeográfiai kapcsolatait, kontaktzónákat meghatározni.

Anyag és módszer

Mintavétel és genomiális DNS izolálás

Összesen hét országból (Grúzia/Georgia, Lengyelország, Litvánia, Magyarország, Olaszország, Románia és Szerbia), 137, hivatásos vadászok segítségével elejtett, védelem alatt nem álló mezei nyúltól gyűjtöttünk izomszövet, illetve szőrmintákat 2010 és 2015 között. Három havasi nyúl is mintázásra került, melyek besorolása az eredményeink értékelésekor derült ki. A mintázott egyedek nem a kutatás céljára kerültek elejtésre. Az izomszövetminták 96%-os alkoholt tartalmazó műanyag csövekbe, míg a szőrminták papír vagy nejlon zacskókba kerültek, majd 4°C-on tároltuk őket a laboratóriumi vizsgálatok megkezdéséig.

A szövetekből a genomiális DNS-t E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA) és High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, USA) segítségével izoláltuk, a gyártó utasításait követve. A szőrtüszőből való genomiális DNS kivonás során a **FAO/IAEA** (2004)

protokollját követtük. A DNS koncentrációkat NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) készülékkel mértük.

Mitokondriális DNS vizsgálat

A mitokondriális DNS két különböző régióit amplifikáltuk. A D-loop régióhoz a Le.H-Dloop_F és Le.L Dloop_R primereket (**Kasapidis és mtsai**, 2005), míg a cyt-b+tRNA-Thr+tRNA-Pro+CR régióhoz a LepCyb2L_F és LepD2H_R primerpárokat használtuk (**Pierpaoli és mtsai**, 1999). A PCR-k 25 µl össztérfogatra voltak összemérve a primerpárokra megadott PCR protokollokat követve. A szekvenálást a forward primerek használatával a MacroGen Europe (Hollandia) cég végezte.

Statisztikai értékelés

A szekvenciák ellenőrzését és illesztését a Seqscape 2.6 (Applied Biosystems) és MEGA6 (Tamura és mtsai, 2013) programok segítségével végeztük el.

Két adathalmazt alkottunk: 1) 140 európai és kaukázusi minta mtDNS D-loop régiót tartalmazó 358 bp hosszú szakasza és 2) 105 európai és kaukázusi minta cyt-b+tRNA-Thr+tRNA-Pro+CR régiót tartalmazó 916 bp hosszú régiója. Az NCBI GenBank-ból a D-loop régióra a következő 306: Y15315, **Thulin és mtsai**, 1997; KC555540-KC555556, **Canu és mtsai**, 2013; DQ883196-DQ883206, **Melo-Ferreira és mtsai**, 2007; JN037377-JN037382, **Melo-Ferreira és mtsai**, 2012; HQ174275-HQ174282, **Pietri és mtsai**, 2011; GU452838-GU452946, **Strzala és mtsai**, nem publikált; AY466782-AY466853, **Kasapidis és mtsai**, 2005; KY211021-KY211034, **Giannoulis és mtsai**, 2017; DQ469642-DQ469710, **Stamatis és mtsai**, 2009, míg a cyt-b+tRNA-Thr+tRNA-Pro+CR régióra a következő 16 szekvenciákat töltöttük le a nagyobb adathalmaz érdekében: KY211021-KY211034, **Giannoulis és mtsai**, 2017; NC_004028, AJ421471, **Arnason és mtsai**, 2002. Saját szekvenciáink elérhetőek az NCBI GenBank-ban: MG865671-MG865724 a D-loop régióra és MG841060-MG841112 a cyt-b+tRNA-Thr+tRNA-Pro+CR régióra.

A polimorf helyek számát, a haplotípus és nukleotid diverzitást és a haplotípusok számát a DnaSP 5.10 programmal számoltuk (**Librado és Rozas**, 2009).

A filogenetikai vizsgálatokhoz az üregi nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) szekvenciáját (GenBank: AJ001588; **Gissi és mtsai**, 1998) használtuk külsőportként. A legmegfelelőbb partícionált séma és nukleotid helyettesítési modell kiválasztása a PartitionFinder2.1.1. szoftver segítségével (**Lanfear és mtsai**, 2016) a Bayes-féle Információ Kritérium (BIC) és a korrigált Akaike-féle Információs Kritérium (AICc) használatával történt. A Bayes-féle következtetés (BI) a BEAST v2.3 (**Bouckaert és mtsai**, 2014) alkalmazásával történt a következők szerint: 40 000 000 MCMC, mintavétel minden 100. generációban. Maximum likelihood (ML) analízist az IQ-TREE 1.6. szoftverrel (**Nguyen és mtsai**, 2015) 10 000 bootstrap lépéssel végeztük. A NJ filogenetikai fát a MEGA6 programmal (**Tamura és mtsai**, 2013), míg a haplotípusok közötti median-joining hálózatot (**Bandelt és mtsai**, 1999) a PopART 1.7 szoftverrel hoztuk létre (<http://popart.otago.ac.nz/downloads.shtml>).

A Fu-féle F_S (**Fu**, 1997) és Tajima-féle D értéket (**Tajima**, 1989a), az AMOVA és fixációs indexet 10 000 iterációval az ARLEQUIN 3.5 szoftverrel számoltuk ki (**Excoffier és Lischer**, 2010).

Genetikai szerkezet vizsgálathoz Bayes-féle populáció szerkezet analízist (Bayesian Analysis of Population Structure) BAPS v6 (**Corander és mtsai**, 2004, 2008) végeztünk kapcsolódó lokuszok klaszterezése (clustering for linked loci) módszerrel, két független futtatásban, K=10 ismétléssel. A mezei és havasi nyúl közti introgresszió kimutatására az „admixture based on mixture clustering” modellt használtuk a BAPS-on belül. Ez a modell robusztusnak tekinthető

olyan adathalmazban, ahol a hozzákeveredés (admixture) hiánya is feltételezhető (**Francois és Durand**, 2010).

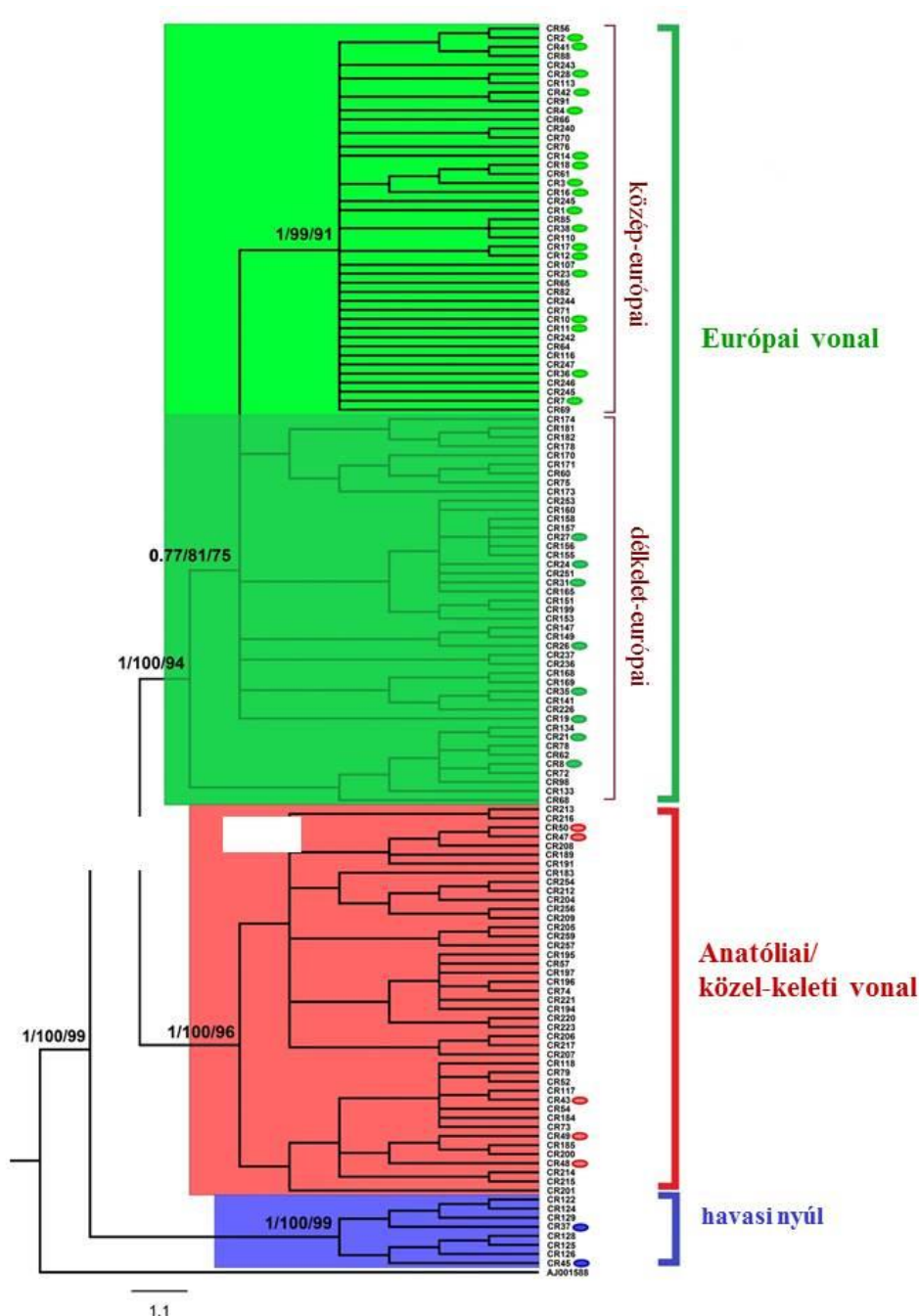
Eredmények és azok megvitatása

mtDNS D-loop marker alapú vizsgálat

A D-loop régió 358 bp hosszú szakaszának vizsgálatához a 140 (137 mezei nyúl és 3 havasi nyúl), közép-, kelet-európai eredetű mintánkat kiegészítettük 307 európai és közel-keleti mezei nyúl szekvenciával az NCBI GenBank-ból. Az így kapott, összesen 447 szekvencia 259 haplotípust (CR1-CR259) alkotott. A 137 saját szekvenciánkban 52 haplotípust azonosítottunk, melyből 40 volt újonnan detektált.

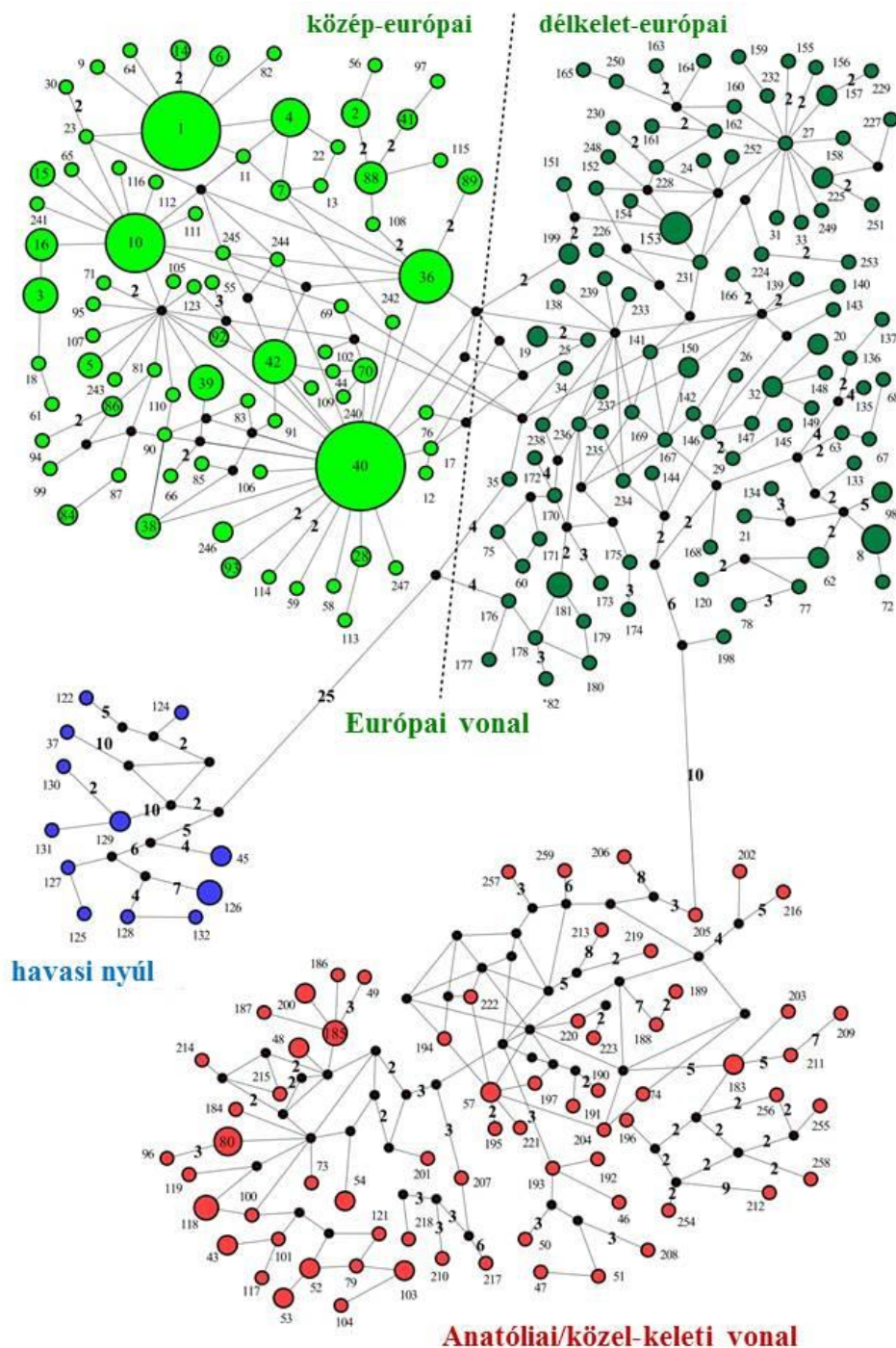
A filogenetikai vizsgálatok (BI, ML és NJ fák) szinte azonos topológiát eredményeztek. A 259 összhaplotípuszám két vonalba volt sorolható, az európaiba és az anatóliai/közel-keletibe (**15. ábra**).

15. ábra: Filogenetikai kapcsolat a közép-kelet-európai mezei nyúl haplotípusok között 358 bp hosszú mtDNS D-loop szakasz alapján. Kulcsoport (outgroup): *Oryctolagus cuniculus* (AJ001588). Az ágakon levő számok a Bayes-féle utólagos következtetés valószínűségét és a ML, NJ bootstrap értékeit (százalékosan) jelölik. A színes ellipszisek a saját mintáinkban található haplotípusokat mutatják.



A filogenetikai fán kapott klasztereket megerősítette a MJ network topológiája is (16. ábra). A haplotípusok network mintázata a KE csoportban némileg csillagszerű elrendeződést mutat, ami expanzióra utal (Slatkin és Hudson, 1991). A központi elhelyezkedésű, legnagyobb gyakoriságú haplotípusok jelenthetik az ősi haplotípusokat.

16. ábra: Median-Joining network a közép-kelet-európai mezei nyúl haplotípusok között, 358 bp hosszú mtDNS D-loop szakasz alapján. A fekete körök a szoftver által feltételezett, de nem mintázott haplotípusokat, a számok az összekötő vonalakon a mutációk számát jelentik >1 esetén.



Az európai (EUR) vonal az irodalmak alapján is várt két alcsoportra oszlik; közép-európai és délkelet-európai. A KE-hez tartozó haplotípusok szoros kapcsolatban álltak a DKE több haplotípusával is. A közép-európai csoportba tartozó minták elsősorban közép-európai országokból származtak (Ausztria, Lengyelország, Litvánia, Magyarország, Németország, Olaszország, Svájc és Észak-Szerbia), de ebbe a csoportba sorolódott néhány távolabbi vidékről származó minta is (Anglia, Franciaország, Hollandia, Skócia). Ezenek felül néhány

ebbe a csoporthoz tartozó egyed Kelet-Romániából, Dél-Szerbiából, illetve Ciprusról került mintázásra. A ciprusi minta a CR40 haplotípust mutatta, ami az egyik leggyakoribb a KE csoportban, a CR1 és CR10 mellett. A CR1 haplotípusba Olaszországból, Lengyelországból, Magyarországról, Romániából és Szerbiából, míg a CR10-be Ausztriából, Franciaországból, Lengyelországból, Litvániából, Magyarországról, Olaszországból és Szerbiából tartoztak egyedek. Ahogy azt vártuk is, a délkelet-európai csoportba főleg délkelet-európai országokból (Bulgária, Görögország, Macedónia, Szerbia) származó minták tartoztak. Azonban ebben a csoportban is megjelentek nyulak Korzikáról, Közép-Olaszországból, Magyarországról és Lengyelországból. A csoporton belül néhány haplotípus földrajzilag viszonylag távol eső egyedeket is magába foglalt, mint például a CR8 (Magyarország és Olaszország), CR32 (Olaszország és Szerbia) illetve a CR62 (Olaszország és Lengyelország). Ezek a közös haplotípusok bizonyítékai lehetnek az elmúlt évtizedekben történő áttelepítéseknek Közép-Európából Nyugat-Európába, elsődlegesen Olaszországba és Franciaországba.

Az anatóliai/közel-keleti vonalba főleg grúz, török és közel-keleti minták tartoztak, azonban találtunk egyedeket Franciaországból (Korzikáról), Lengyelországból, Litvániából, Olaszországból, Macedóniából, Romániából és Északkelet-Görögországból is. Az ebbe a vonalba tartozó haplotípusok egyedeinek mintázási helye kisebb földrajzi régiót fedett le. Azonban a CR52, 53 és 54 megtalálható volt román és olasz, a CR57 olasz és macedón, míg a CR200 török és ciprusi mintákban is.

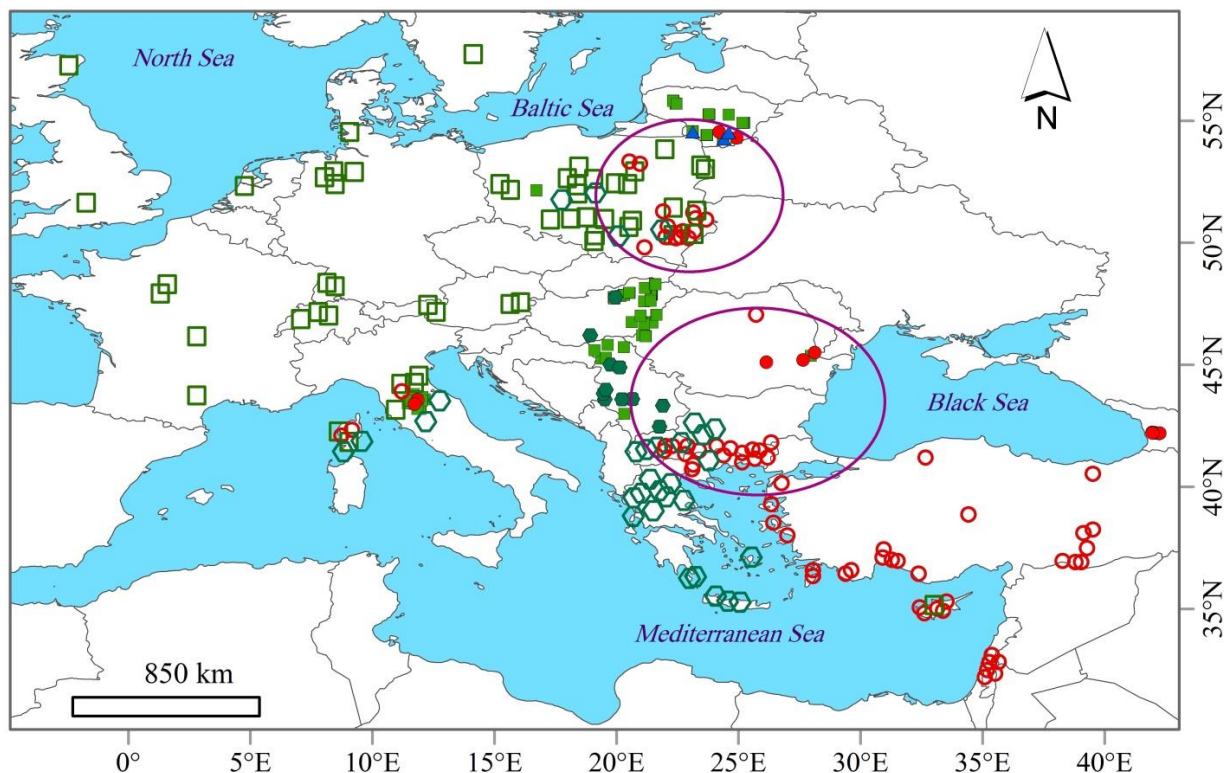
A havasi nyúl minták az Ibériai-félszigetről, Lengyelországból és Litvániából (saját minták is) származtak.

A két vonalhoz (EUR, AKK) tartozó egyedek között két kontaktzónát sikerült meghatároznunk Közép- és Kelet-Európában; az egyik Délkelet-Európában (Macedónia, Északkelet-Görögország, Bulgária és Románia), a másik pedig Északkelet-Európában (Litvánia, és Északkelet-Lengyelország) található (**17. ábra**). Macedóniában, Északkelet-Görögországban és Bulgáriában az EUR és az AKK vonalak haplotípusaink eloszlását már mások is leírták (**Kasapidis és mtsai, 2005; Stamatis és mtsai, 2009; Antoniou és mtsai, 2013**), de további területeken lévő átfedéseket nem publikáltak. A Trákiát és Bulgáriát magába foglaló régió, Európa jól ismert hibridzónája (**Hewitt, 1999**), ahol olyan fajok fordulnak elő, amelyek a pleisztocén eljegesedés idején a Dél-Balkánon és Anatóliában lévő refúgium területekre szorultak vissza (**Kasapidis és mtsai, 2005**).

A lengyel mezei nyulak között mindkét vonalhoz tartozó haplotípusokat azonosítottunk, azonban az EUR vonalon belül a KE alcsoport volt széles körben elterjedt, a másik AKK vonal csak az ország keleti részén volt megtalálható. A Nyugat-Romániában élő mezei nyulak az európai vonalhoz tartoztak (KE alcsoport), míg a kelet-romániai példányokban az AKK vonalhoz tartozó haplotípusok is megmutatkoztak. Korábbi szerzők eredményeihez hasonlóan, Litvániában az általunk mintázott mezei nyulak között is találtunk mindkét vonalhoz (EUR, AKK) tartozó egyedeket, illetve a havasi nyúl jelenlétét is kimutattuk (**Alves és mtsai, 2003b; Melo-Ferreira és mtsai, 2009, 2012; Thulin és mtsai, 2006**). Az általunk vizsgált grúz mezei nyulak nagy genetikai diverzitással rendelkeztek és mindannyian az anatóliai/közel-keleti vonalhoz tartoztak. Így nem tudtuk megerősíteni azt a korábbi feltételezést, hogy kontaktzóna létezhet a két vonalhoz tartozó egyedek számára Grúzia területén is (**Kasapidis és mtsai, 2005; Stamatis és mtsai, 2009**). Csupán csak az európai vonal, de azon belül mindkét alcsoport jelenlétét tudtuk igazolni Magyarországon és Szerbiában. Dél- és Közép-Szerbiában a DKK alcsoportoz tartozó haplotípusok, Észak-Szerbiában és Magyarországon a KE alcsoportoz tartozó haplotípusok dominálnak. Egy nemrégiben készült kutatás AKK vonalhoz tartozó haplotípusú egyedeket talált Észak-Szerbiában, feltárva az emberi áttelepítések nyomait (**Djan és mtsai, 2017**). Az

Olaszországból származó mezei nyulakban az EUR vonal két alcsoportjába és az AKK vonalhoz tartozó haplotípusok egyedeit is azonosítottuk, de a közép-európai alcsoport volt a domináns. **Fickel és mtsai** (2008) feltételezése szerint a Közép-Európa jégkorszak utáni újránépesülés az Appennini-félszigetről (olasz populációkból) történt. Mi ezt nem tudtuk egyértelműen alátámasztani. Mivel a mezei nyúl Európa egyik legfontosabb apróvad faja (**Fontanesi és mtsai**, 2016) és a fajt számos területre betelepítették, elsősorban vadászati céllal, az Olaszországban található AKK vonalhoz tartozó egyedek itt is az ember általi áttelepítések bizonyítékát jelenthetik (**Canu és mtsai**, 2013). A faj Korzikára való betelepítése viszonylag újszerű, és egyben egy jó példa arra vonatkozóan, hogy különböző nyúlfajokat napjainkban is telepítenek különböző régiókba (**Pietri**, 2007). Mivel ott is találtak mindkét vonalhoz tartozó egyedeket, ez újabb bizonyítékkal szolgál a több földrajzi forrásból történő emberi betelepítésekre (**Pietri és mtsai**, 2011).

17. ábra: A vizsgálatunkban szereplő mezei nyúl egyedek mintázási helyei (teli geometriai formák), illetve a filogeográfiai vizsgálatokhoz NCBI GenBank-ból letöltött szekvenciák helyei (üres geometriai formák). Négyzet: közép-európai; hexagon: délkelet-európai; kör: anatóliai/közel-keleti vonal; háromszög: havasi nyúl (*L. timidus*). A zöld szín az európai vonalat, a piros az anatóliai/közel-keleti vonalat és a kék a havasi nyulakat jelenti. Ellipszissel jelöltük a két kontaktzónát Észak- és Délkelet-Európában.

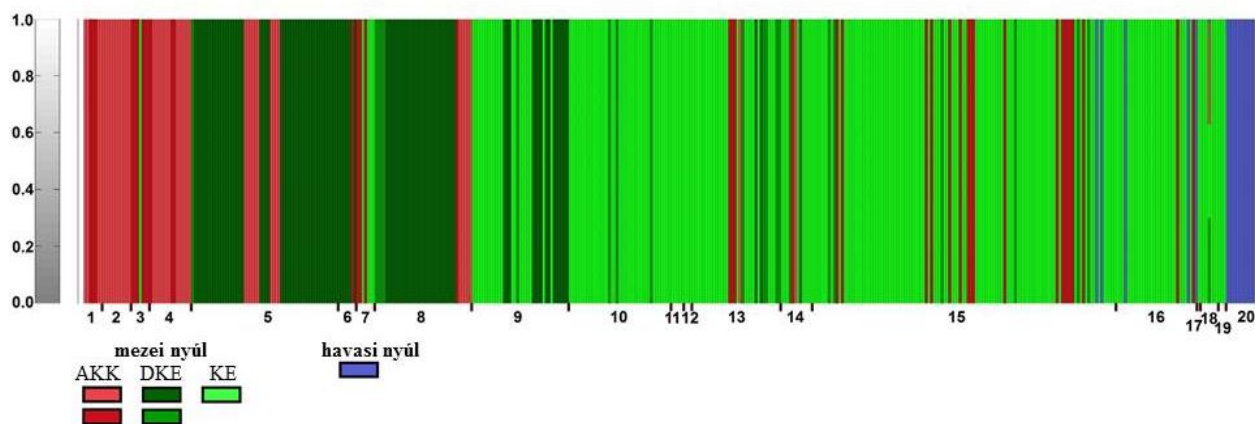


Összeségében elmondhatjuk, hogy eredményeink egybevágnak más szerzők által leírtakkal, miszerint az LGM után a déli refúgium területekről (Ibériai-félsziget, Olaszország és a Balkán, valamint Kis-Ázsia és a Kaszpi-tenger régiója) népesítették be a mezei nyulak Európát (**Taberlet és mtsai**, 1998; **Hewitt**, 2000; **Kasapidis és mtsai**, 2005; **Stamatis és mtsai**, 2009; **Djan és mtsai**, 2017). A Közép- és Kelet-Európát benépesítő mezei nyulak expanziója az Észak-Balkánról indulhatott ki az utolsó eljegesedés után, mivel az északra

irányuló terjeszkedést jelentős földrajzi akadályok nem korlátozták, nem úgy, mint az olasz és ibériai populációk esetében, ahol az Alpok, illetve a Pireneusok jelentős földrajzi akadályt (barriert) jelenthettek (**Hewitt**, 1999). A Balkán-félszigetről Közép- és Észak-Európa irányába történő terjedést más fajoknál is leírták, például a sakkjáblalepke (*Melanargia galathea*) (**Schmitt és mtsai**, 2006), vagy a vaddisznó (*Sus scrofa*) esetében (**Alexandri és mtsai**, 2012; **Velickovic és mtsai**, 2014).

A BAPS v6 szoftver klaszterelemzésével, mely nagy hatékonysággal képes a rejtett genetikai szerkezetek kimutatására is (**Corander és Marttinen**, 2006), elkülönítettük a mezei nyulát a havasi nyúlától, $K=6$ ($\ln(P) = -8954,5009$). A mezei nyúl minták 5 klaszterbe (2 klaszter AKK, 2 klaszter DKE és 1 klaszter KE), míg a havasi nyúl egybe sorolódott (**18. ábra**).

18 ábra: Bayes-féle klaszteranalízis mezei és havasi nyulak mtDNS D-loop régió 358 bp hosszú szakaszának szekvenciái alapján, $K=6$ csoportosítás szerint. A számok a mintavételi helyeket jelölik, 1: Grúzia; 2: Közel-Kelet; 3: Ciprus; 4: Törökország; 5: Görögország; 6: Bulgária; 7: Románia; 8: Macedónia; 9: Szerbia; 10: Magyarország; 11: Ausztria; 12: Svájc; 13: Olaszország; 14: Franciaország; 15: Lengyelország; 16: Litvánia; 17: Svédország; 18: Németország; 19: Hollandia, Anglia és Skócia; 20: Ibériai-félsziget.

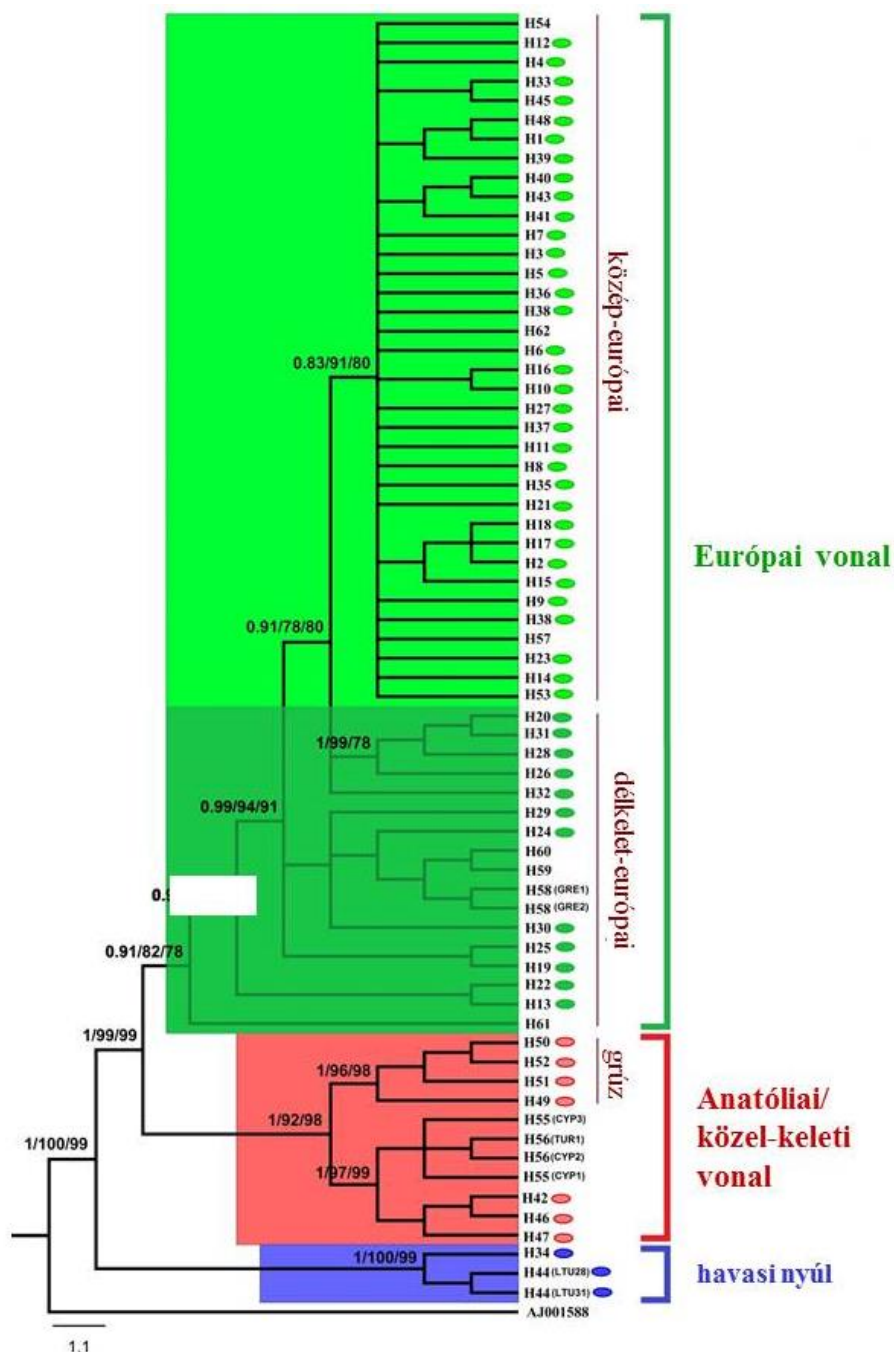


mtDNS cyt-b+tRNA-Thr+tRNA-Pro+CR marker alapú vizsgálat

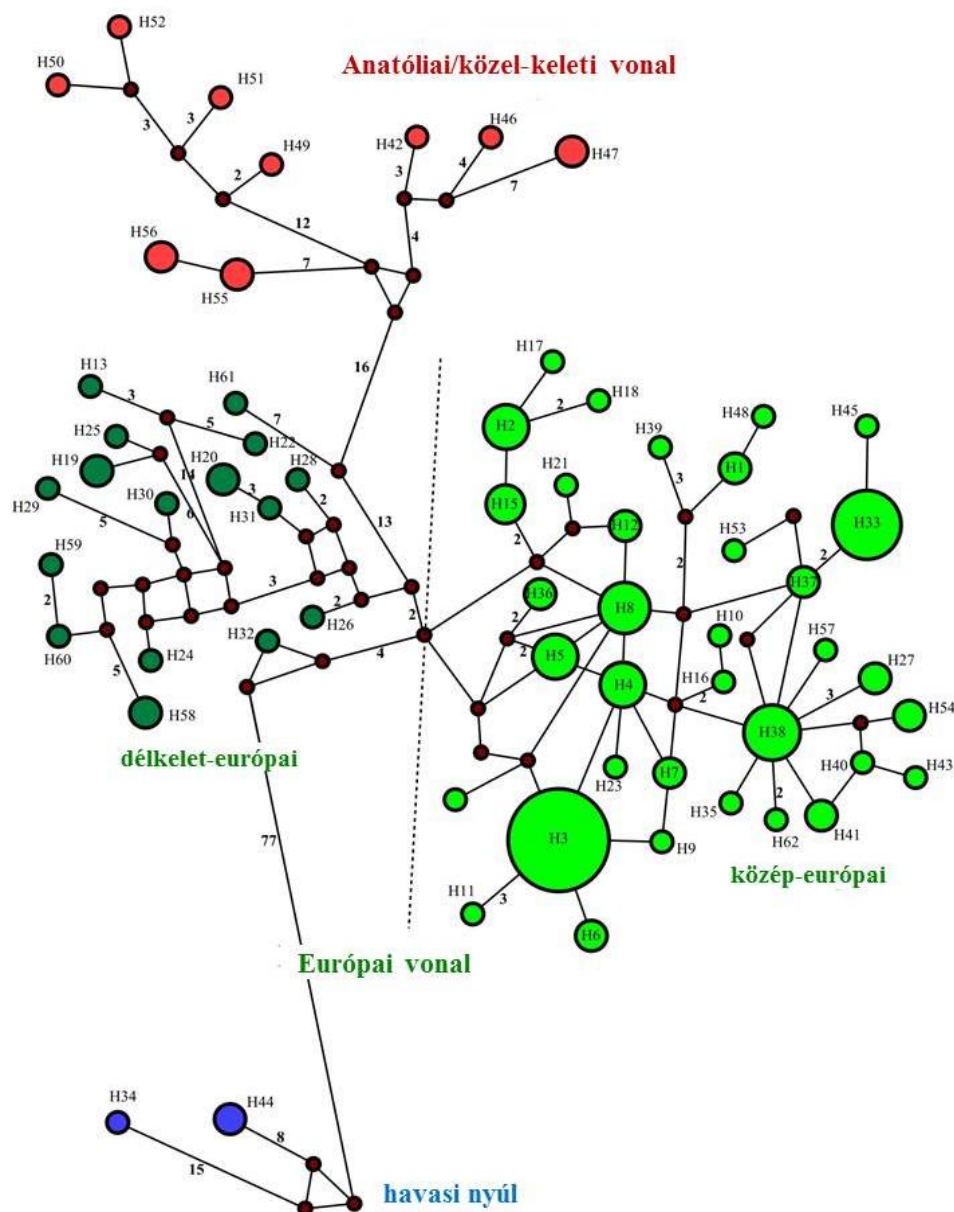
A mezei nyulak filogeográfiai szerkezetének pontosabb megismeréséhez, további mtDNS szakaszokat (cyt-b (426 bp) + tRNA-Thr (66 bp) + tRNA-Pro (66 bp)) szekvenáltunk. Saját mintáinkból Grúziából, Lengyelországból, Litvániából, Magyarországról, Olaszországból, Romániából és Szerbiából 105 egyed szekvenciáit tudtuk elemezni, és illeszteni NCBI GenBank-ból származó szekvenciákkal, melyek Ciprusról, Görögországból, Lengyelországból, Németországból, Svédországból és Törökországból eredtek. Az így kapott 124 mintában, 62 haplotípust határoztunk meg.

Ennek a 916 bp hosszú mtDNS szakasznak a vizsgálata a D-loop régióhoz hasonló eredményt adott a filogenetikai elemzésekben, azaz a mintázott mezei nyulak az EUR és AKK vonalakba tartoznak. Az EUR vonalon belül ugyanazt a két alcsoportot határoztuk meg a hozzájuk tartozó egyedekkel, illetve ugyanazt a két kontaktzónát találtuk, mint a D-loop régió esetén (**17., 19., 20. ábra**).

19. ábra: Filogenetikai kapcsolat a közép-kelet-európai mezei nyúl haplotípusok között 916 bp hosszú mtDNS (cyt-b+tRNA-Thr+tRNA-Pro+CR) szakasz alapján. Külső csoport (outgroup): *Oryctolagus cuniculus* (AJ001588). Az ágakon levő számok a Bayes-féle utólagos következtetés valószínűségét és a ML, NJ bootstrap értékeit (százalékosan) jelölik. A színes ellipszisek a saját mintáinkban található haplotípusokat mutatják.



20. ábra: Median-Joining network a közép-kelet-európai mezei nyúl haplotípusok között, 916 bp hosszú mtDNS (cyt-b+tRNA-Thr+tRNA-Pro+CR) szakasz alapján. A fekete körök a szoftver által feltételezett, de nem mintázott haplotípusokat, a számok az összekötő vonalakon a mutációk számát jelentik >1 esetén.



A nagyszámú egyedi haplotípus jelenléte, különösen Délkelet-Európában, a Balkánon és Anatóliában bizonyítékként szolgál arra, hogy ezeken a területeken a legutóbbi eljegesedés időszakában megőrződött a mezei nyúl eljegesedés előtti genetikai sokféleségének nagy része. Mindez magyarázatot ad a faj nagy genetikai diverzitására ezekben a régiókban, amit már többen kimutattak tanulmányaikban (Kasapidis és mtsai, 2005; Suchentrunk és mtsai, 2006; Stamatis és mtsai, 2009; Djan és mtsai, 2017). Valószínűleg a mezei nyúl akkor népesítette be jelenlegi elterjedési területeit, amikor az ökológiai körülmények ebben a térségben megfelelőek lettek a faj számára az LGM után (Corbet, 1986; Stamatis és mtsai, 2009).

Összesen 51 haplotípust azonosítottunk a közép-kelet-európai mezei nyulakban, melyek közül 50 új haplotípus volt. A havasi nyúl 3 egyede két haplotípust (H34 és H44) alkotott. Nagy haplotípus diverzitás értékeket (0,927-0,978), és viszonylag alacsony vagy mérsékelt nukleotid diverzitás értékeket (0,005-0,020) határoztunk meg a különböző vonalakhoz tartozó egyedekben. A polimorf helyek száma az AKK esetében volt a legkevesebb, míg a legtöbb a DKE csoportokban volt azonosítható. A semlegességi tesztek, a Fu féle F_S és a Tajima-féle D értékek az európai vonal két alcsoportjában negatív értékeket mutattak, azonban csak a közép-európai csoportban volt szignifikáns is mindkét érték, jelezve ezzel a közelmúltban bekövetkezett expanziót (26. táblázat).

26. táblázat: Főbb diverzitás mutatók értékei a mezei nyúl 916 bp hosszú mtDNS (cyt-b+tRNA-Thr+tRNA-Pro+CR) szakasza alapján. n=elemszám; H=haplotípusok száma; h=haplotípus diverzitás, π =nukleotid diverzitás, S=polimorf helyek száma, F_S = Fu-féle F_S érték, D= Tajima-féle D érték.

Vonalak	n	H	h (s.d.)	π (s.d.)	S	F_S	D
közép-európai	83	32	0,927 (0,019)	0,005 (0,000)	41	-15,340**	-1,455*
délkelet-európai	14	12	0,978 (0,035)	0,015 (0,002)	52	-1,567	-0,593
anatóliai/közel-keleti	8	7	0,964 (0,077)	0,020 (0,003)	40	-0,607	0,623
havasi nyúl	3	2	-	-	24	-	-

*p<0,05; **p<0,01

Az AMOVA eredményei szerint a teljes genetikai varianca nagyobb része (67,59%) a csoportok között van, és nem a csoportokon belül (32,41%). Ezt a filogenetikai struktúráltságot támasztotta alá a fixációs index szignifikáns értéke is a haplocsoportok között (Φ_{ST} =0,676; P=0,000) (27. táblázat).

27. táblázat: Az AMOVA eredményei a fő vonalakra/haplocsoportokra (AKK, DKE és KE).

Variancia forrása	d.f.	Variancia (%)	Φ_{ST}	p érték
Vonalak között	2	67,59	0,676	p<0,000
Vonalakon belül	101	32,41		
Teljes	103			

Új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága

Több, korábban elvégzett vizsgálatban is tanulmányozták a mezei nyúl populációk közötti filogenetikai/geográfiai kapcsolatokat Európában és a Közel-Keleten, azonban a hiányos mintavétel miatt viszonylag nagy feltérképezetlen régiók maradtak a faj elterjedési területén, különösen Közép-Kelet-Európában. Ez megakadályozta, hogy átfogó képet kapjunk a faj genetikai sokféleségéről és filogeográfiai szerkezetéről, helyzetéről. Tanulmányunkkal ezt az űrt kívántuk kitölteni, az anyai vonalak vizsgálatával, melyhez az mtDNS D-loop és cyt-b markereket használtuk.

Eredményeim arra utalnak, hogy az észak-, közép- és nyugat-európai mezei nyúl populációk forrása Dél- és Délkelet-Európában, a balkáni régióban található, és egy délről északra történő

génáramlás történt a jégkorszak utáni újranepesülés során. Két kontaktzónát határoztam meg Közép-Kelet-Európában: az egyik Délkelet-Európában (Macedónia, Északkelet-Görögország, Bulgária és Románia), míg a másik Északkelet-Európában (Litvánia, és Északkelet-Lengyelország) van. A genetikai szerkezet és filogenetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a közép-, kelet-európai mezei nyúl állományok az EUR és AKK vonalba tartoznak, és több esetben kimutattam az emberi tevékenységek (áttelepítések) hatását. Magyarországon csak európai vonalba (azon belül mind a közép-európai, mind a délkelet-európai alcsoportba) tartozó egyedeket találtam. Minden vonalban nagy haplotípus diverzitást mértem, míg közelmúltban bekövetkezett expanzió nyomait csak a közép-európai alcsoportban mutattam ki.

Eredményeimmel nagyrészt korábbi eredményeket, feltételezéseket erősítettem meg, azonban pontosabb képet kaptunk a közép-kelet-európai mezei nyúl állomány genetikai háttéréről anyai vonalon, amit remélhetőleg mind a vadgazdálkodás, mind a konzervációbiológia hasznosítani tud tevékenységei során.

A vizsgálat együttműködések keretében folytatódik mikroszatellit markerek felhasználásával.

3.3. Sakál

Irodalmi áttekintés

Az arany sakál (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) csoportban élő, közepes méretű ragadozó (**Macdonald**, 1983; **Moehlman**, 1987), melynek létszáma az utóbbi évtizedekben rohamosan megnőtt Európa középső és délkeleti részein (**Arnold és mtsai**, 2012; **Šálek és mtsai**, 2014; **Trouwborst és mtsai**, 2015; **Rutkowski és mtsai**, 2015; **Kowalczyk és mtsai**, 2015; **Ivanov és mtsai**, 2016). A sakál jó példa az olyan fajokra, amelyek újranevesítik Európát (**Deinet és mtsai**, 2013). Míg a 20. század közepére elterjedési területének nagy részéről kihalt (**Demeter és Spassov**, 1993; **Krofel és mtsai**, 2017), a 20. század végétől a Balkán-félszigetről kiindulva spontán módon elkezdte újranevesíteni korábbi élőhelyeit, és a kolonizált területeken létszáma nagyon gyors növekedésbe kezdett (**Krystufek és mtsai**, 1997; **Szabó és mtsai**, 2009; **Arnold és mtsai**, 2012; **Rutkowski és mtsai**, 2015). Ez a dinamika jellemző a magyar sakál populációkra is (**Szabó és mtsai**, 2007). Terjeszkedésüket több tényező is elősegítette (**Ranc és mtsai**, 2017), azonban a pontos okok kevésbé ismertek (**Trouwborst és mtsai**, 2015; **Krofel és mtsai**, 2017). Feltételezések szerint az okokat más vadfajokhoz hasonlóan a sakál esetében is a megváltozott éghajlat, a mezőgazdasági technológiák, a természetes predátor fajok számának csökkenése, illetve eltűnése, valamint a faj magas ökológiai toleranciája között kell keresnünk (**Arnold és mtsai**, 2012; **Banea és mtsai**, 2012; **Šálek és mtsai**, 2014; **Pyšková és mtsai**, 2016).

A populációgenetikai vizsgálatok a különböző molekuláris technikákkal lehetővé teszik, hogy bővítsük ismereteinket a vadbiológiáról és ökológiáról, populációk szétszóródásáról, valamint a múltban lezajlott demográfiai folyamatokról (**Hewitt**, 1999; **Schmitt**, 2007; **Broquet és Petit**, 2009; **Lowe és Allendorf**, 2010). A nagyragadozók filogeográfiai vizsgálatai azt mutatták, hogy a jelenkori populációkon belüli genetikai különbözőség a pleisztocén kori eljegesedés következménye. Nincsenek arra utaló nyomok, hogy a késő pleisztocéntól kezdve a sakál jelen lett volna Európában (**Sommer és Benecke**, 2005), ezért azt feltételezik, hogy a sakál egy új faj kontinensünkön. Anyai vonalon történő genetikai vizsgálatok alacsony szintű polimorfizmusról, monomorf jellegről tanúskodnak. A szerbiai sakálok mtDNS D-loop régiójának vizsgálatakor monomorfizmust találtak (**Zachos és mtsai**, 2009a). Egy Ausztriában kóborló sakál genetikailag nem volt elkülöníthető a szerbiai sakáloktól, sem mtDNS, sem mikroszatellit markerek használatával. Ez azért volt, meglepő, mert az olasz, szlovén és osztrák sakál populációkról azt feltételezték, hogy az Isztriai-félszigetről és Észak-Nyugat-Horvátországból származnak (**Krystufek és mtsai**, 1997). Anyai vonalon a törökországi sakál populáció diverzitása nagyobb, mint az észak-balkáni sakáloké, ahol genetikai egyöntetűség jellemző (**Fabbri és mtsai**, 2014; **Ibis és mtsai**, 2015). Annak ellenére, hogy a gerincesek mtDNS-nek D-loop régiója a legvariábilisabb (**Simon**, 1991), mégis monomorfnak találták más ragadozóban is, mint például a vidrában (*Lutra lutra*) (**Mucci és mtsai**, 2010). Emiatt ajánlatos más markereket is használni a mai arany sakál populációk diverzitásának és eredetének meghatározásához (**Aguilar és mtsai**, 2004; **Quignon és mtsai**, 2012). Az Olaszországot benépesítő arany sakáloknak dalmát és szlávón kevert őseik lehetnek (**Fabbri és mtsai**, 2014). Dél-Kelet-Európában (köztük Magyarország, n=10) és a Kaukázusban (n=14) alacsony szintű genetikai diverzitást találtak 15 mikroszatellit marker és 406 bp hosszú mtDNS D-loop szekvencia használatával (**Rutkowski és mtsai**, 2015). Továbbá génáramlást is kimutattak a két régió között, amit GPS telometriás adatokkal is alátámasztottak (**Zachos és mtsai**, 2009a; **Rutkowski és mtsai**, 2015; **Lanszki és mtsai**, 2018). Hibridizáció nyomait mutattak ki Bulgáriában szürke farkas (*Canis lupus*) és arany sakál, illetve Horvátországban elvadult kutya és arany sakál között (**Moura és mtsai**,

2014; Galov és mtsai, 2015), emiatt a gyorsan expandáló faj veszélyt jelenthet más fajokra és különösen fontos annak genetikai hátterének vizsgálata, ismerete.

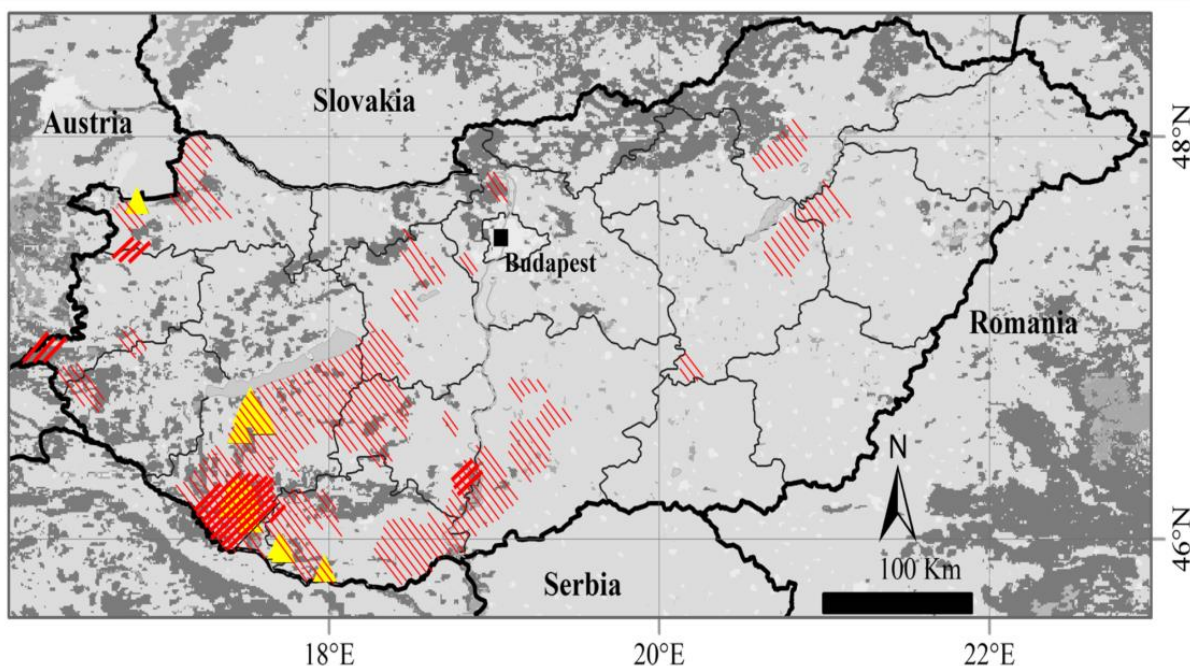
Kutatásunk célja az volt, hogy az aranyasakál Magyarországon legkorábban kolonizált területéről, más tanulmányokhoz képest nagy elemszámmal vizsgáljuk a faj genetikai diverzitását és szerkezetét.

Anyag és módszer

Mintavétel és genomális DNS izolálás

2010 és 2013 között 70 izomszövet (ebből három egyed fenotípusos jegyek alapján feltételezett hibrid) minta gyűjtöttünk hivatalos engedéllyel rendelkező vadászok által, illetve közutakon elgázolt egyedekből. A mintagyűjtés Magyarország nyugati, délnyugati térségében zajlott (**21. ábra**). Ez az a terület, ahol a fajt először megfigyelték az országban, és a teljes magyarországi létszám 70 %-ka itt van jelen, továbbá a legnagyobb egyedsűrűséggel is ez a terület rendelkezik (**Heltai és mtsai, 2004**). A minták tárolása a laboratóriumi vizsgálatokig 96%-os alkohollal töltött műanyag csövekben -20°C-on történt. A genomális DNS izolálása a DNeasy Blood and Tissue Kit használatával (QIAGEN, USA), a gyártó utasításait követve történt.

21. ábra: Az aranyasakál elterjedési területe 1997 (balról jobbra sávozás) és 2016 (jobbról balra sávozás) között, illetve a vizsgálatba vont egyedek mintázási helyei (sárga háromszög). A sávozások keresztezése nagy populációsűrűséget jelent.



Mikroszatellit vizsgálat

Az egyedek genotipizálása 10, kutyafélénél azonosított mikroszatellittel történt – PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 és FHC2079 –, egy multiplex reakcióban, StockMarks for Dogs Canine Genotyping Kit (Applied Biosystems, CA, USA) felhasználásával. A PCR és a genotipizálás során a gyártó által leírt protokollt követtük. A fragment analízishez ABI 3100 genetikai analízátort alkalmaztunk. Az allélok leolvasásához a GeneMapper v.4.0. szoftvert (Applied Biosystems, USA) használtuk.

Statisztikai elemzés

A statisztikai értékeléshez 69 egyed genotípus adatait használtuk fel. Illetve egy mikroszatellit (FHC2079) monomorfként azonosítottunk, így kizártuk az elemzésekből. A null allél jelenlétét a MICRO-CHECKER 2.2.3 programmal ellenőriztük (**Van Oosterhout és mtsai**, 2004). Az FSTAT 2.9.3. (**Goudet**, 1995) szoftverrel számoltuk ki az allél gazdagságot (AR) és a fixációs indexet (F_{IS}). Az egy lókuszra eső allélok száma, a várt (H_E) és megfigyelt (H_O) heterozigotizáció, és a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés vizsgálata (HWE) minden lókusz esetén az ARLEQUIN 3.1. segítségével került kiértékelésre (**Excoffier és mtsai**, 2005). A páronkénti linkage disequilibrium (LD) a GENEPOP 3.4-el került meghatározásra (**Raymond és Rousset**, 1995).

Az effektív populációméret meghatározása (N_e) a linkage disequilibrium (LDNe) módszerrel az NeESTIMATOR 2.01 szoftver használatával történt (**Do és mtsai**, 2014), különböző allél gyakoriságok kizárásával: <5%, <2% és <1.

A közelmúltban történt effektív populációméret csökkenést a BOTTLENECK 1.2.0.2. (**Cornuet és Luikart**, 1996) programmal ellenőriztük. A program a relatív heterozigóta többletet hasonlítja az allélok számához, ami hamarabb csökken palacknyak hatás során, mint az előbbi. Az Előjel próba, Standardizált különbség teszt és a Wilcoxon-féle előjeles rang próbák három modellel kerültek kiszámításra: IAM - infinite allele modell, SMM - stepwise-mutation modell, TPM - two-phased modell, 1 000 iterációval és 70 % stepwise mutation mellett.

A genetikai strukturáltságot Bayes-féle csoportosítási algoritmussal elemeztük. A STRUCTURE 2.3.4.szoftverrel (**Pritchard és mtsai**, 2000), meghatároztuk a legvalószínűbb K számot, K 1 és 10 között, 10 000 burn in periódussal, 100 000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) iterációval, admixture modellel és korrelált allélgyakoriságokkal. A STRUCTURE HARVESTER (**Earl és vonHoldt**, 2012) és CLUMPAK (**Kopelman és mtsai**, 2015) programokat a ΔK érték (**Evanno és mtsai**, 2005) és az eredmények grafikus megjelenítésére használtuk.

Az egyedek földrajzi távolságait is figyelembe véve tovább vizsgáltuk a genetikai strukturáltságot a GENELAND programmal (**Guillot és mtsai**, 2005; **Guillot**, 2008), 50-szer futtatva $K=1-10$, a következő paraméterek mellett: 20 000 MCMC iteráció, Poisson eljárás maximális aránya 100, a térbeli koordinátákhoz kapcsolódó bizonytalansági érték 0,2 és a maximális nukleusz szám a Poisson-Voronoi mozaikban (tesszellációban) 300.

Főkomponens analízissel (PCA) ellenőriztük a GENELAND által meghatározott 2 szubpopulációba tartozó egyedeket az adegenet (**Jombart és mtsai**, 2008) segítségével R 3.3.3-ban (**R Development Core Team**, 2017). Az elemzés eredményeit grafikusán is megjelenítettük az első és második tengely-menti sajátértékekkel.

Mitokondriális DNS vizsgálat

A PCR során **Zachos és mtsai** (2009a) által leírt protokollt követtük, majd a szekvenálást szolgáltatásként a MacroGen Inc (Hollandia) végezte el. Szekvenáló primerként a PCR reakció forward primerét használtuk.

Statisztikai értékelés

A szekvenciák ellenőrzése és illesztése a BIOEDIT 7.0 (**Hall**, 1999) és CLUSTALW (**Larkin és mtsai**, 2007) programokkal történt. A szekvenciák 385 bp hosszra történt vágása után a DnaSP 5.10. (**Librado és Rozas**, 2009) szoftverrel meghatároztuk a haplotípusok számát. Mivel egy haplotípust találtunk, nem történt további elemzés.

Eredmények és azok megvitatása

Mikroszatellit markerekkel végzett vizsgálatok

A vizsgált lókuszok között nincs linkage disequilibrium (kapcsoltsági egyensúlytalanság) és null allél sincs jelen. A genetikai variabilitás, allél gazdagság (AR), megfigyelt- (H_O) és várt heterozigotitás (H_E) mérsékelt volt minden lókuszon (**28. táblázat**). A 9 polimorf lókuszon az allélok száma 2 (PEZ1 és PEZ3) és 11 (PEZ12) között változott. Az átlagos megfigyelt allélszám $6,200 \pm 3,600$ volt. A megfigyelt és várt heterozigotitási értékek 0,014-től (PEZ3) 0,885-ig (PEZ12) és 0,014-től (PEZ3) 0,856-ig (PEZ12) változott. A 9 lókusz közül 5 eltért a HWE-től. Három lókusz (FHC2010, PEZ5, PEZ3) esetén volt a megfigyelt heterozigotitás nagyobb a vártnál. Eredményeinkhez hasonló genetikai variabilitási értékeket mutattak ki balkáni sakálokban (Bulgária, Szerbia és Horvátország), 2-14 allélszám lókuszonként, mérsékelt megfigyelt (0,47) és várt heterozigotitási értékek (0,51) (**Fabbri és mtsai**, 2014). Izraelben 88 aranyasakálban 14 mikroszatellit használatával magas genetikai variabilitást (0,643-0,718 régiótól függően) mutattak ki (**Magory Cohen és mtsai**, 2013). Vizsgálatunkban négy lókusz esetén az F_{IS} értékek szignifikánsan eltértek 0-tól, átlagos értéke 0,222 volt.

28. táblázat: Allél gazdagság (AR), megfigyelt allélszám (n_O), megfigyelt heterozigotitás (H_O), várt heterozigotitás (H_E) és fixációs index (F_{IS}) a vizsgált 9 polimorf lókuszon.

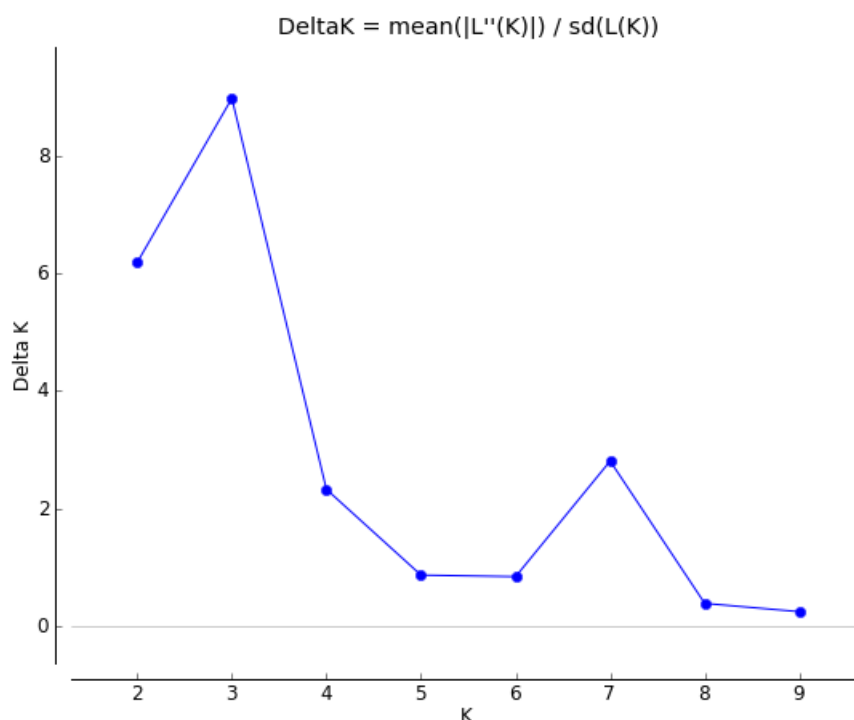
Lókusz	AR	n_O	H_O	H_E	F_{IS}
EZ1	2,000	2	0,203	0,343*	0,410*
FHC2054	9,000	9	0,507	0,594*	0,146
FHC2010	7,000	7	0,725	0,680	-0,067
PEZ5	3,000	3	0,145	0,136	-0,063
PEZ20	9,000	9	0,232	0,420**	0,450*
PEZ12	11,000	11	0,855	0,856*	0,001
PEZ3	1,986	2	0,142	0,014	0,000
PEZ6	10,000	10	0,275	0,803**	0,659*
PEZ8	8,000	8	0,522	0,620	0,160*
Átlag $\pm$ s.d.		$6,200\pm3,600$	$0,348\pm0,277$	$0,447\pm0,299$	0,222

* $p<0,05$; ** $p<0,001$

Az N_e 55,1 (CI 38,2 - 86,9) és 68,1 (40,0 - 149,5) között változott különböző allél gyakoriságok kizárásától függően. A várt heterozigóta többlettel rendelkező lókuszok száma 5,06, 5,14 és 5,11 volt az előjel próba IAM, TPM és SMM modelljei esetén. Az SMM modell esetén a nullhipotézist elvetettük, és palacknyak-hatást mutattunk ki. A standardizált különbségek teszt és a Wilcoxon-féle előjeles rang próba a TPM és SMM modellek esetén vetették el a null hipotézist. **Magory Cohen és mtsai** (2013) az izraeli aranyasakál populációban a palacknyak-hatás hiányát mutatták ki, annak ellenére, hogy a faj majdnem teljesen eltűnt a vizsgált térségből. Eredményeink megerősítették a korábbi ismereteinket az európai aranyasakál eredetéről, miszerint Európát egy kis egyedszámú alapító populáció kolonizálta, akik a délen élő aranyasakál populációk teljes genetikai variációjának korlátozott részét hordozzák (**Fabbri és mtsai**, 2013).

Korábbi vizsgálatok gyenge genetikai struktúrálttságot mutattak az európai aranyakál populációkban, kivéve a dalmát populációt, mely egyértelműen eltért a többi balkáni és közel-illetve távol-keleti állománytól (török, izraeli, indiai) (**Ibis és mtsai**, 2015; **Zachos és mtsai**, 2009a; **Fabbri és mtsai**, 2014). Az általunk vizsgált magyar populációban a $K=3$ bizonyult a legvalószínűbb klaszter számnak (posterior valószínűségi érték és a ΔK korrekció is alátámasztotta). Azonban az egyedek felosztási mintázata két szubpopulációra történő gyenge szétválást követett magas hozzákeveredéssel (admixture) (**22. ábra**).

22. ábra: A legvalószínűbb K csoport meghatározás (Evanno és mtsai, 2005)

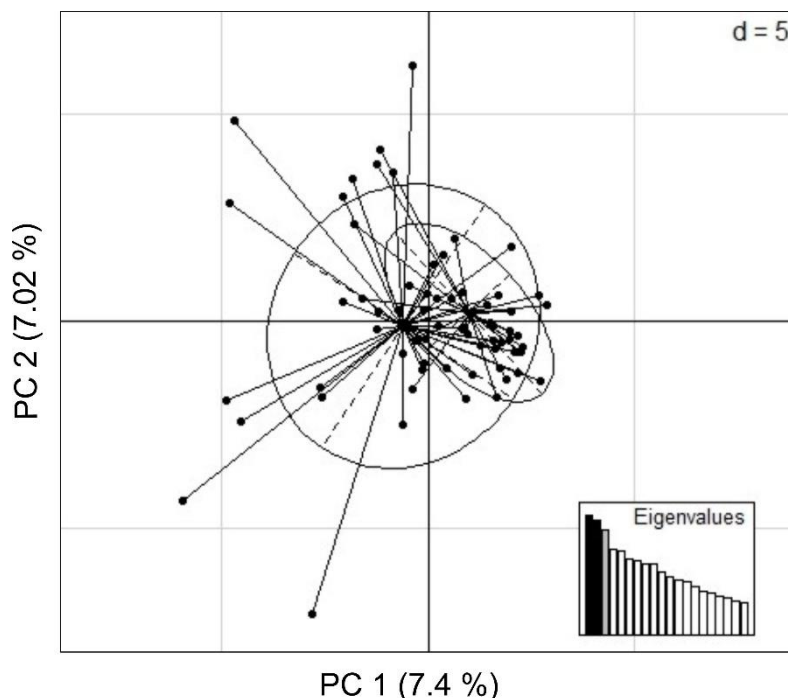


A GENELAND, mely figyelembe veszi a minták földrajzi helyeit is, 2 szubpopulációt különböztetett meg a mintázott területen belül, az északit és a délit. Ötven futásból 38 esetben kettőnél, míg 12 futásnál, háromnál adott értéket a K eloszlásra. A két klaszter következetesen helyezkedett el mind az 50 futtatásban, de a harmadik klaszterbe tartozott néhány egyed Dél-Magyarországról szétszórtan mintázva. A három feltételezett hibrid mintáknak volt a legmagasabb hozzákeveredési (admixture) szintje és az északi szubpopulációhoz tartoztak $<0,65$ membership koefficienssel.

A főkomponens analízis (PCA) nem mutatott erős szerkezeti elkülönülést a vizsgált mintákban (**23. ábra**). Az egyedek többsége (a vizsgált állomány 95%-a) a déli szubpopuláció mintáihoz közel csoportosult, a második PC tengely mentén magasabb differenciáltsági szintet mutatva.

A hibridizáció fontos esemény az evolúció szempontjából, különösen gyorsan változó környezeti feltételek mellett (**Pyšková és mtsai**, 2016; **Ashrafzadeh és mtsai**, 2019). A jelenség már bizonyított aranyakál és más kutyafélék között (**Moura és mtsai**, 2013; **Galov és mtsai**, 2015; **Pyšková és mtsai**, 2016), azonban a vizsgálatunkba vont három egyed, melyeket fenotípusos jegyei alapján hibrideknek véltünk, nem bizonyultak annak.

23. ábra: Magyar aranyakál minták főkomponens analízise (PCA). A fekete ovális 95 %-os inertia (tehetetlenségi) ellipszis. Az első és második tengely és hozzájuk tartozó sajátértékek.



mtDNS marker alapú vizsgálatok

A 70 magyar aranyakál szekvencia a mitokondrális DNS D-loop régiójának 385 bp hosszú szakasza teljesen megegyezett, egy haplotípust alkotott, ami megegyezett a **Rutkowski és mtsai** (2015) által leírt H1-gyel, és korábban már azonosították Bulgáriában, Északnyugat-Lengyelországban, Horvátországban, Magyarországon, Olaszországban, Szerbiában, Ukrajnában és a Kaukázusban (**Zachos és mtsai**, 2009a; **Fabbri és mtsai**, 2014; **Koepfli és mtsai**, 2015; **Yumnam és mtsai**, 2015). A török populációban ezzel szemben sok haplotípust mutattak ki (n=7, h= 4; **Ibis és mtsai**, 2015).

Új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága

Korábbi balkáni, közép- és kelet-európai, illetve olasz sakálokon végzett filogeográfiai vizsgálatok eredményeit támasztottam alá kilenc polimorf mikroszatellit és mtDNS D-loop régió használatával, az ismereteink szerint legnagyobb egyedszámot magába foglaló magyar aranyakál populációra alapozva. Bizonyítottam, hogy a gyors ütemben növekvő sakál létszám alacsony genetikai variabilitást és struktúrát mutat, szemben más kutyafélékkel, vagy az izraeli sakál populációval és az expanzió délről északra történik. Ezt azzal is alátámasztottam, hogy nem tudtam kimutatni biztosan elkülönülő szubpopulációt a mintázott területen belül, annak ellenére, hogy Magyarország földrajzilag Európa közepén helyezkedik el. A közeljövőben mindenképpen javaslok további genetikai és genomvizsgálatokat (RADseq, GBS), a hibridizáció és a genetikai szerkezet meghatározására, ökológiai vizsgálatokkal kiegészítve.

3.4. Dámszarvas

Irodalmi áttekintés

A dámszarvas (*Dama dama*) az egyik legjelentősebb vadfaj Európában, de széleskörűen elterjedt a világ számos más régiójában is. Az európai populáció nagy része az utolsó jégkorszak idején kihalt (**Chapman és Chapman**, 1975, 1980; **Masseti**, 1996; **Ueckermann és Hansen**, 2002; **Ludwig és mtsai**, 2012), azonban a dél-európai refúgiumok (Szicília, Balkán-félsziget déli része), valamint Dél-Anatólia és a Közel-Kelet védelmet jelentett a faj oda visszahúzódó egyedei számára (**Masseti**, 1996; **Arslangündogdu és mtsai**, 2010). Ellentétben számos más mérsékelt égövi fajjal, a dámszarvasról azt feltételezték, hogy az újranevesedés a faj jelenlegi, közép- és észak-európai elterjedési területére, nem természetes módon bekövetkezett, a jégkorszak utáni rekolonizációs folyamat volt (**Pemberton és Smith**, 1985). Alternatív megoldásként az európai dámszarvas jelenlegi eloszlását leginkább az ember általi betelepítések befolyásolhatták (**Chapman és Chapman**, 1980). **Randi és Apollonio** (1988) szerint az Európába való visszatelepítésük a rómaiak vagy görögök segítségével zajlott. Az archeológiai feljegyzések azt mutatták, hogy a dámszarvas terjeszkedése a korai Neolitikumban kezdődött Görögország szárazföldi részén, valamint Kréta és Rodosz szigetén (**Yannouli és Trantalidou**, 1999; **Masseti és mtsai**, 2008; **Harris**, 2015). A dámszarvast a Mediterrán térségbe is betelepítették, amit a középkori időkben az Alpoktól északra eső térség betelepítése követett (**Haltenorth**, 1959; **Ludwig és mtsai**, 2012). A források alapján a 3-4. században, Németországban szabadon engedtek belőlük példányokat (**Niethammer**, 1963; **Ludwig és mtsai**, 2012). Magyarországra történő betelepítése azonban nem teljesen ismert, feltételezik, hogy Anatóliából kiindulva történt, viszont szabadon élő dámokról a 17. század előtti időkből nincsen ismeretünk. Egyes szerzők azonban fosszilis leletekre alapozva kijelentik a dámszarvas Kárpát-medencében való őshonosságát (**Veress**, 1941; **Müller**, 2003). Az ezredforduló idejére a faj, a zárt erdős középhegységek kivételével Magyarország nagy részén stabil vagy növekvő állományt alkotott (**Buzgó**, 2006).

Az első írásos dokumentáció egy nagyobb dámszarvas populációról a 17. századból származik Gyulaj térségéből (Délnyugat-Magyarország) (http://gyulajhuntinghungary.com/fallow_buck_hunting). Gyulaj és a szomszédos Tamási erdei Magyarország legjobb dámszarvasos területének számítanak (**Faragó**, 2009). Ma a magyarországi dámszarvas-trófeák többnyire Gyulajról és Gúthról származnak, amelyek a C.I.C. (Conseil International de la Chasse et du Conservation du Gibier) világranglista első 50 helyezettjének 60%-át adják (http://gyulajhuntinghungary.com/fallow_buck_hunting). Három szörzet szín létezik a magyar populációkban. A vörös a legdominánsabb, de a sötét (fekete vagy barna) színezet, valamint ritkább esetben a fehér is előfordul (http://www.royalhunting.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=75&lang=en).

A szarvasfélékre több mtDNS alapú vizsgálatot végeztek az elmúlt években: perzsa dámszarvas (*Dama mesopotamica*; **Fernández-García**, 2012), gímszarvas (*Cervus elaphus*, **Hartl és mtsai**, 2003; **Zachos és mtsai**, 2003, 2009b; **Pérez-Espona és mtsai**, 2009; **Dellicour és mtsai**, 2011; **Niedzialkowska és mtsai**, 2012; **Marsalkova és mtsai**, 2014; **Schnitzler és mtsai**, 2018), szikaszarvas (*Cervus nippon*, **Thevenon és mtsai**, 2004; **Shen-Yin és mtsai**, 2014; **Pūraitė és Paulauskas**, 2016), őz (*Capreolus capreolus*, **Lorenzini és mtsai**, 1993; **Royo és mtsai**, 2007; **Olano-Marin és mtsai**, 2014; **Lee és mtsai**, 2015), jávorszarvas (*Alces alces*, **Schmidt és mtsai**, 2009; **Kangas és mtsai**, 2013, 2015; **Niedzialkowska**, 2017), sörényes szarvas (*Rusa timorensis*, **Webley és mtsai**, 2004). A dámszarvas európai, és az egész világot érintő genetikai diverzitásáról és szerkezetéről is több

tanulmány született különböző markerek felhasználásával. Korábban enzim polimorfizmus vizsgálatokat végeztek a genetikai variancia meghatározására (**McDougall és Lowe**, 1968; **Pemberton**, 1984; **Pemberton és Smith**, 1985; **Hartl és mtsai**, 1986; **Randi és Appolonio**, 1988; **Wehner és mtsai**, 1991; **Ludwig és mtsai**, 2012). Míg az utóbbi időkben más markereket alkalmazó tanulmányok (mtDNS, mikroszatellit) alacsony polimorfizmust találtak ez európai állományban (**Masetti és mtsai**, 1997; **Poetsch és mtsai**, 2001; **Say és mtsai**, 2003; **Webley és mtsai**, 2007; **Masetti és Mertzani**, 2008). Egy mtDNS D-loop alapú vizsgálatban, amely 365 mintát használt 22 németországi helyszínről, három regionális csoportot mutattak ki, és arra utaló jeleket is találtak, hogy a német populációknak török származásuk lehet (**Ludwig és mtsai**, 2012). **Masetti és mtsai** (2008) által közzétett eredmények különösen érdekesek, mivel viszonylag magas mtDNS variabilitást és állomány specifikus inszerciót találtak a rodoszi dámszarvasokban. Az eddigi legátfogóbb genetikai vizsgálatot **Baker és mtsai** (2017) végezték, 10 mikroszatellit és a mtDNS D-loop régió 683 bp hosszúságú szakasza alapján, 364 európai és kanadai egyedet bevonva. Jelentősen különböző populációkat azonosítottak, ami összhangban van a kis létszámú alapító egyedekből kialakuló populációkra ható genetikai drift elvárásaival, és megerősítették azt a korábbi feltételezést is, hogy ezek az alapítók északról származnak. Ezen kívül differenciálódást írtak le a dél-európai izolálódott régiók között is, ideértve az Ibériai-félszigetet. Szintén ebben a vizsgálatban a természetes folyamatok, azaz a jégkorszak utáni vándorlás erősebb hatását mutatták ki a jelen állományon, mint ami várható olyan fajok esetén, amelyeket ilyen erős és ismert antropogén beavatkozás ért. Hangsúlyozták a természetvédelmi erőfeszítések fontosságát, különösen Törökországban és Rodoszon.

A vadgazdálkodásban rendkívül fontos a fajok genetikai diverzitásának és szerkezetének pontos ismerete, mivel a genetikailag izolált populációknak a genetikai sokféleség elvesztése mellett a beltenyésztettség és csökkent szaporodási képességgel is szembe kell nézniük. Az alacsony genetikai diverzitás a populációt ért palacknyak hatás következményeként is létrejöhethet. A palacknyak hatásnak a genetikai diverzitásra gyakorolt hatása az átlagos allélszám és a heterozigotizációs értékek csökkenésében, a ritka allélok elvesztésében, vagy beltenyésztési leromlás (depresszió) fellépésében érhetőek tetten a nyomai (**Frankham**, 1995; **Luikart és mtsai**, 1998). A jelenséget már többen leírták más szarvas fajok esetén és a történelmi adatok egyeznek a molekuláris adatokkal (**Broders és mtsai**, 1999; **Lenny Williams és mtsai**, 2002; **Webley és mtsai**, 2004). Azonban a palacknyak hatás nem mindig okoz genetikai leromlást a populációban (**DeYoung és mtsai**, 2003; **Zenger és mtsai**, 2003; **Doerner és mtsai**, 2005).

A világon Magyarország rendelkezik az egyik legjobb minőségű dámszarvas állománnyal. Ezt igazolja az is, hogy a legutóbbi két világrekord trófeát Magyarország északkeleti részén, Gúthon ejtették el. Ennek ellenére e populáció genetikai diverzitását és szerkezetét tudomásunk szerint nem vizsgálták. Így kutatásunkkal ezt a hiányt szeretnénk volna pótolni és: i.) meghatározni a haplotípusok számát a mintázott térségben; ii.) meghatározni a genetikai diverzitás és haplotípusok eloszlását, illetve iii.) filogeográfiai vizsgálatot végezni a mintázott populációk haplotípusainak és a korábban Magyarországon és világszerte talált haplotípusok összevetésével.

Anyag és módszer

Mintavétel és genomiális DNS izolálás

2015-ben összesen 41, vegyes ivarú dámszarvas szőrmintát gyűjtöttünk a Szabolcs-Szatmár-Bereg megyei Vadász Kamara vadászainak segítségével Északkelet-Magyarországról, három

helyszínről: bockereki erdő n=13, gúthi erdő n=20, Tiszadob n=8 (**24. ábra**). A minták egyedenként kerültek papírzacskóba és azokat 4°C-on tároltuk a további vizsgálatokig. A genomiális DNS izolálást a **FAO/IAEA** (2004) protokollja szerint végeztük, a kivont DNS-k koncentrációját NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) készülékkel ellenőriztük.

24. ábra: Dámszarvas mintavételi helyeink. A telt körök a saját mintáink helyeit, az üres körök **Baker és mtsai** (2017) magyar mintáinak helyeit jelölik.



Mitokondriális DNS vizsgálat

A mitokondriális kontroll régió (D-loop) 450 bp hosszúságú szakaszát **Masseti és mtsai** (2008) leírása alapján amplifikáltuk. A szekvenálási reakciókat szolgáltatásként a MacroGen Inc (Hollandia) végezte el, a PCR során használt forward primerrel, DamaCtr1F-vel.

Statisztikai értékelés

A kapott szekvenciák ellenőrzését és illesztését a MEGA 6 (**Tamura és mtsai**, 2013) program segítségével végeztük el. A filogenetikai vizsgálatokhoz a saját haplotípusainkhoz további NCBI GenBank-ból 218 egyedből származó 39 haplotípust töltöttünk le (AF291895, **Randi és mtsai**, 2001; AM279272, **Fajardo és mtsai**, 2007; AM419027, **Fajardo és mtsai**, 2008; NC020700, JN632629, **Hassanin és mtsai**, 2012; KY564399-KY564432, **Baker és mtsai**, 2017). Külcsoportként (outgroup) a perzsa dámszarvast (*D. mesopotamica*) (AF291896: **Randi és mtsai**, 2001; NC024818, és JN632630: **Hassanin és mtsai**, 2012) és a gímszarvast (*Cervus elaphus*, GU457435, NC013840: **Zha és mtsai**, nem publikált, közvetlenül a GenBank-ba benyújtva és AB245427: **Wada és mtsai** nem publikált) használtuk.

A legmegfelelőbb nukleotid helyettesítő modell kiválasztása a korrigált Akaike-féle Információs Kritérium (AICc) használatával a maximum likelihood, míg a Bayes-féle Információ Kritérium (BIC) használatával a Bayes-féle következtetés (BI) a JModelTest 0.1.1 (**Posada**, 2008) programmal történt. Adatkészletünkre a legjobb modellnek a HKY+I+G bizonyult AICc és a HKY+G a BIC kritériumok esetén. A Bayes-féle következtetés (BI) fát a MrBayes 3.2 (**Ronquist és mtsai**, 2012) alkalmazásával (40 000 000 MCMC, mintavétel

minden 100. generációban), a maximum likelihood fát pedig az IQ-TREE 1.6. szoftverrel (**Nguyen és mtsai**, 2015) 10 000 bootstrap lépés alkalmazásával használtuk.

A haplotípusok közötti median-joining hálózatot a NETWORK 5.0.0.1. (**Bandelt és mtsai**, 1999) szoftverrel hoztuk létre.

A genetikai szerkezet vizsgálathoz a Bayes-féle populáció szerkezet analízist (Bayesian Analysis of Population Structure - BAPS) a BAPS v6 (**Corander és mtsai**, 2008) szoftverrel végeztük el, kapcsolódó lókuszok klaszterezése (clustering for linked loci) módszerrel, két független futtatásban, K=10 és K=20 ismétléssel.

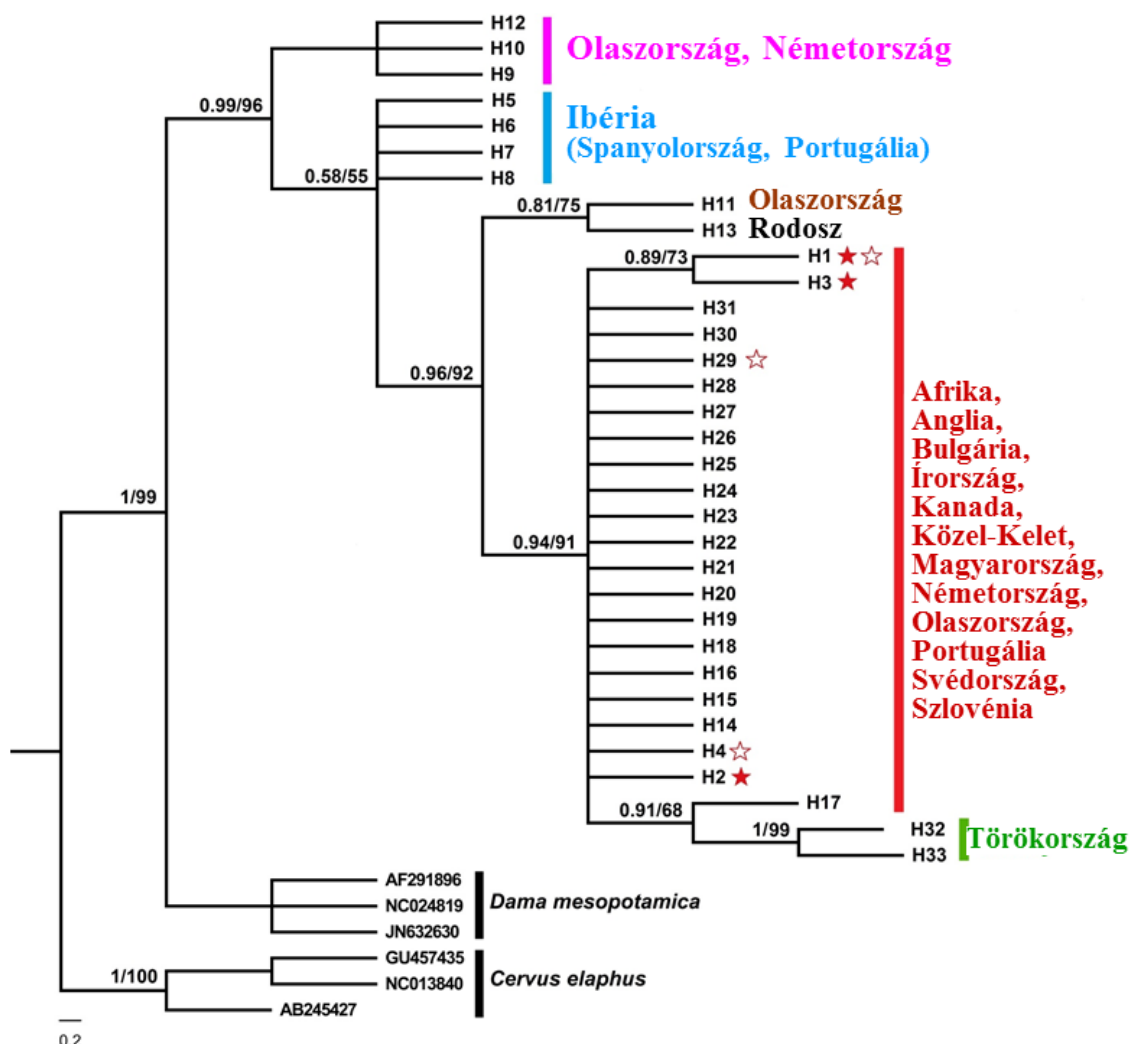
Az ARLEQUIN 3.5. (**Excoffier és Lischer**, 2010) programot használtuk a páronkénti Φ_{ST} , az AMOVA és a BAPS program által kialakított klaszterek közötti génáramlás (N_m) meghatározására. Az általános diverzitás mutatókat (polimorf helyek száma, haplotípus és nukleotid diverzitás, haplotípusok száma) a DnaSP 5.10 programmal számoltuk ki (**Librado és Rozas**, 2009). A populációk demográfiai történetének megismeréséhez a Fu féle F_s (**Fu**, 1997) és a Tajima-féle D értéket (**Tajima**, 1989a) az ARLEQUIN 3.5. (**Excoffier és Lischer**, 2010), míg a Ramos-Onsins és Rozas-féle R_2 értéket (**Ramos-Onsins és Rozas**, 2002) a DnaSP 5.10. (**Librado és Rozas**, 2009) használatával számoltuk ki.

Eredmények és azok megvitatása

A 41 egyedben összesen három haplotípust azonosítottunk a mtDNS kontroll régióban. Ebből kettő új volt (H2 és H3, GenBank azonosító szám: MG917678, MG917679), míg egy (H1), az NCBI Genbankba már KY564415 azonosítószámmal feltöltött szekvenciával egyezik meg és Magyarország déli részéről származik (**25. és 26. ábrák**). Az egyedek majdnem fele ($n=17$) hordozta ezt a **Baker és mtsai** (2017) által leírt, H1 haplotípust, míg 21 egyed az újonnan kimutatott H2 haplotípussal rendelkezett. Az általunk szintén újonnan azonosított H3 csak egy Gúthról származó egyedben volt megtalálható.

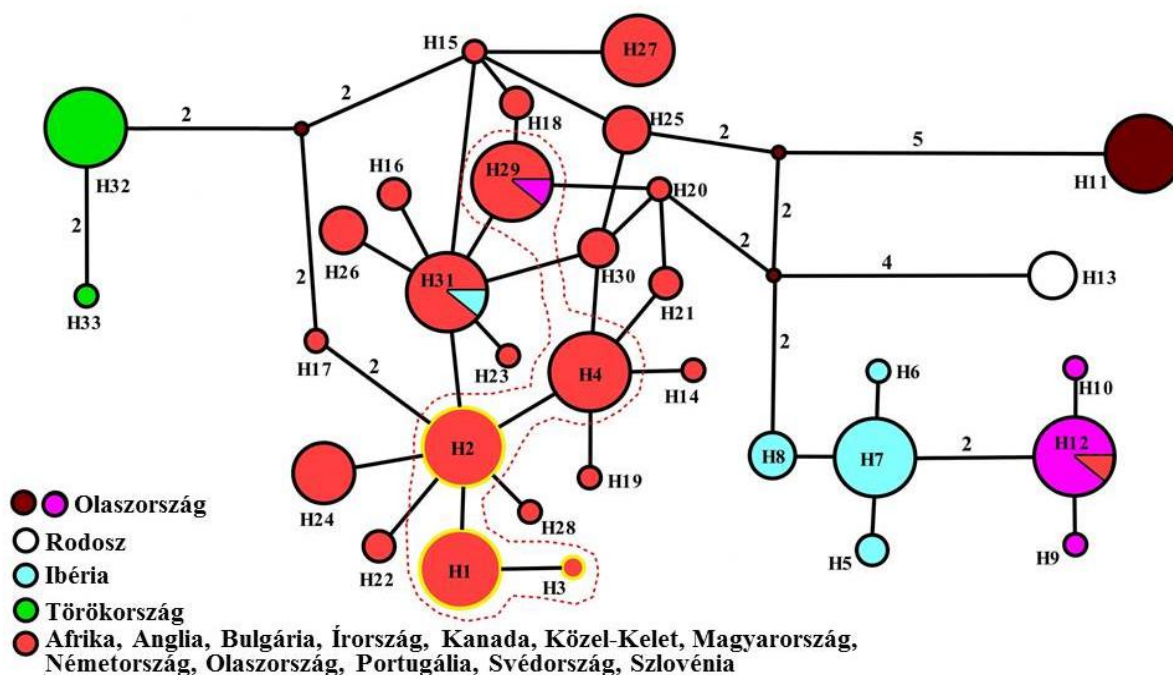
A filogenetikai vizsgálatot a 41 saját szekvencia és további, GenBank-ból letöltött 39 szekvencia felhasználásával végeztük el, és így összesen 33 haplotípust mutattunk ki. Ebből kilenc haplotípus az Ibériai-félszigeten ($n=34$; H5,6,7,8), Olaszországban ($n=27$; H9,10,11,12), Németországban ($n=1$; H12) és Rodoszon ($n=4$; H13) volt kimutatható, míg 22 egy igen széles földrajzi elterjedésű csoportban volt jelen (Kanada, Afrika, Közel-Kelet és Európa egésze, köztük Magyarország is). Két haplotípus ($n=20$; H32 és H33) csak a törökországi területre volt jellemző (**25. ábra**).

25. ábra: Filogenetikai kapcsolat a dámszarvas haplotípusok között 450 bp hosszú mtDNS D-loop szakasz alapján. Külső csoport (outgroup): *Dama mesopotamica* (AF291896, NC024818, JN632630) és *Cervus elaphus* (GU457435, NC013840). Az ágakon levő számok a Bayes-féle utólagos következtetés valószínűségét és a ML bootstrap százalékos értékeit jelölik. A telt csillagok a saját mintázott egyedeink haplotípusait, az üres csillagok **Baker és mtsai** (2017) által leírt magyarországi haplotípusokat jelölik.



A filogenetikai fával megegyező topológiai mintázatot adott a Median-Joining hálózat (26. ábra) is. Az olasz, ibériai, német és rodoszi 66 egyedben azonosított 9 haplotípus elkülönül a nagy földrajzi eloszlású csoporttól (173 egyed, 22 haplotípus) és a 20 török egyedben azonosított két haplotípustól. A néhány olasz és a rodoszi minta haplotípusának közeli kapcsolatára magyarázat lehet, hogy betelepítések történtek Rodoszon, a sziget olasz megszállása (1912-1947) idején (Chapman és Chapman, 1980). Dámszarvasok filogenetikai elemzése során hasonló mintázatot kapott Ludwig és mtsai (2012) és Baker és mtsai (2017) is.

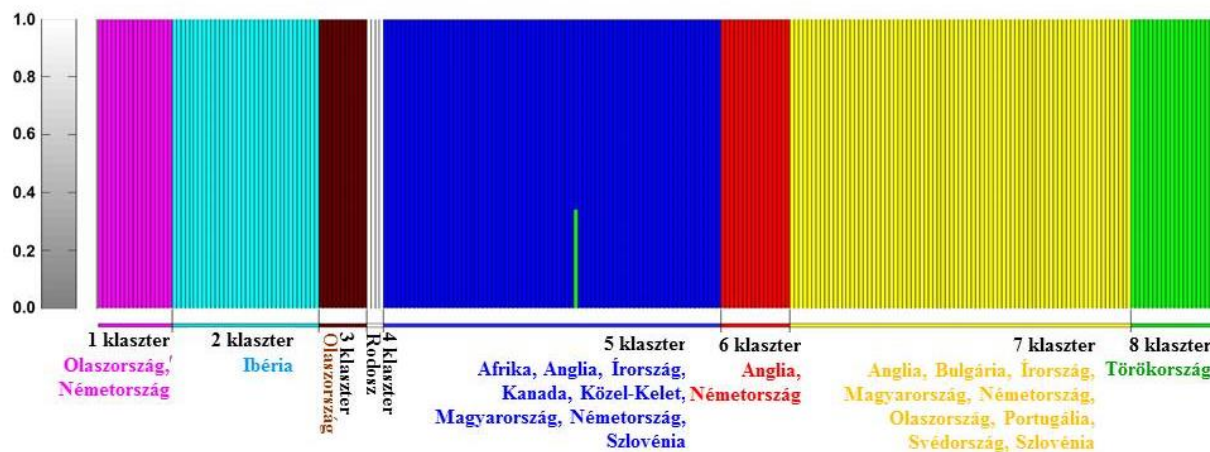
26. ábra: Median-Joining network dámszarvas haplotípusok között, 450 bp hosszú mtDNS D-loop szakasz alapján. A haplotípusokat összekötő vonalakon levő számok a mutációk számát jelentik >1 esetén.



A BAPS klaszteranalízis eredménye szerint a dámszarvas minták 8 klaszterbe sorolódnak (1. olasz és német minták; 2. ibériai minták; 3. olasz minták; 4. rodoszi minták; 5. magyar, szlovén, német, ír, angol, közel-keleti, afrikai és kanadai minták; 6. angol és német minták; 7. angol, ír, német, svéd, olasz, magyar, szlovén, bolgár és portugál minták; és 8. török minták klasztere) (27. ábra).

Keveredést csak az 5. klaszterben találtunk, ami **Ludwig és mtsai (2012)** eredményével volt egybehangzó, miszerint a német alapító dámszarvasok török eredetűek.

27. ábra: Bayes-féle klaszteranalízis dámszarvas mtDNS D-loop régió 450 bp hosszú szakaszának szekvenciái alapján, K=8 csoportosítás szerint.



A páronkénti Φ_{ST} értékek megerősítették az előzőekben bemutatott eredményeinket. A BAPS által meghatározott klaszterek között szignifikáns különbségeket mutattunk ki (0,567-1,000 közötti értékek). Az 5. és 7. klaszterek (a két legszélesebb földrajzi kiterjedésű csoport) között volt a legkisebb Φ_{ST} érték (0,567) 0,381 génáramlási értékkel; míg a legnagyobb távolság a 3. és 4. klaszterek (1,000) illetve a 3. és 8. klaszterek (0,989) között mutatkozott. Az N_m érték 0,000-tól (3. és 4. klaszter) 0,381-ig (5. és 7. klaszter) terjedt (**29. táblázat**).

29. táblázat: Páronkénti Φ_{ST} értékek (átló felett) és génáramlás (N_m , átló alatt) a 8 BAPS által meghatározott klaszterre

	1. klaszter	2. klaszter	3. klaszter	4. klaszter	5. klaszter	6. klaszter	7. klaszter	8. klaszter
1. klaszter	-	0,856*	0,985*	0,978*	0,899*	0,918*	0,923*	0,982*
2. klaszter	0,084	-	0,964*	0,950*	0,881*	0,900*	0,901*	0,969*
3. klaszter	0,007	0,019	-	1,000*	0,895*	0,919*	0,930*	0,989*
4. klaszter	0,011	0,026	0,000	-	0,875*	0,898*	0,904*	0,987*
5. klaszter	0,056	0,067	0,059	0,071	-	0,659*	0,567*	0,855*
6. klaszter	0,045	0,056	0,044	0,057	0,259	-	0,633*	0,875*
7. klaszter	0,042	0,055	0,038	0,053	0,381	0,290	-	0,887*
8. klaszter	0,009	0,016	0,005	0,007	0,085	0,071	0,064	-

* $p < 0,05$

Az AMOVA azt mutatta, hogy teljes genetikai variancia nagyobb része (87,47 %) a klaszterek közötti genetikai varianciának tulajdonítható, míg 12,53 %-a a klasztereken belülről ered (**30. táblázat**).

30. táblázat: Az AMOVA eredményei a BAPS által meghatározott 8 klaszter között

Variancia forrása	d.f.	Variancia (%)	p-érték
Klaszterek között	7	87,47	$p < 0,000$
Klasztereken belül	251	12,53	
Teljes	258		

A dámszarvas mintákra alacsony haplotípus szám és haplotípus diverzitás (0,100-0,691) volt jellemző, a német (0,962) és angol (0,898) minták kivételével. A magyar dámszarvasok mérsékelt, 0,678-as haplotípus diverzitás értéke hasonló volt az olasz (0,691) és portugál (0,647) mintákéhoz, viszont a nukleotid diverzitás értéke (0,003) azoknál kisebb. A polimorf helyek száma 2 (Törökország) és 16 (Németország) között változott. A F_u féle F_S , a Tajima-féle D és a Ramos-Onsins és Rozas-féle R_2 értékek, egyértelmű expanziót egyik ország mintáiban sem mutatott. A spanyol, ír, angol és német dámszarvasok esetén az F_S szignifikáns és negatív értéket vett fel, expanzióra utalva, azonban a másik két mutató ezt nem támasztotta alá. A magyar mintákban pedig mindhárom mutató elutasította az expanzió eseményét ($F_S = 0,355$ $p < 0,05$; $D = -1,504$ $p < 0,05$; $R_2 = 0,161$). Magyarországon a telepítések az 1970-es években zajlottak leginkább, melynek hatására nőtt a populációméret is. Azonban a faj biológiai tulajdonsága, hogy alacsony szintű a vándorlási hajlama, így a telepített egyedek elszigetelt, homogén populációt alkotnak (**Buzgó, 2006**). Ez is bizonyítja, hogy a jelenlegi genetikai szerkezet nagyrészt az emberi tevékenységeknek köszönhető.

A BAPS féle klasztereket vizsgálva ugyancsak mérsékelt haplotípus diverzitási értékeket kaptunk (0,000 és 0,787 között). Azonban itt az F_S , a D és az R_2 értékek ($F_S = -1,680$ $p > 0,05$;

D= 0,117 $p>0,05$; $R_2= 0,115$) mind nemrégiben bekövetkezett expenziót mutattak az 1. klaszterben (Olaszország és Németország egyes mintái) (31. táblázat).

31. táblázat: Főbb diverzitás mutatók értékei a dámszarvas mtDNS D-loop régió alapján, országonként és klaszterenként. n=elemszám; H=haplotípusok száma; h=haplotípus diverzitás, π =nukleotid diverzitás, S=polimorf helyek száma, F_S = Fu féle F_S érték, D= Tajima-féle D érték, Ramos-Onsins és Rozas féle R_2 érték

	n	H	h	π	S	F_S	D	R_2
<u>Mintavételi területek</u>								
Anglia	56	14	0,898	0,005	11	-4,440*	-0,097	0,102
Bulgária	11	1	-	-	-	-	-	-
Írország	17	5	0,507	0,002	4	-2,036*	-1,082	0,104*
Kanada	3	1	-	-	-	-	-	-
Közel-Kelet, Európa, Afrika	2	1	-	-	-	-	-	-
Magyarország	54	5	0,678	0,003	5	0,355	0,117	0,115
Németország	13	10	0,962	0,009	16	-3,896*	-1,159	0,111
Olaszország	31	5	0,691	0,013	15	6,847	1,648	0,187
Portugália	17	3	0,647	0,007	7	4,199	1,256	0,202
Rodosz	4	1	-	-	-	-	-	-
Spanyolország	21	3	0,267	0,002	2	-1,258*	-1,159	0,116
Svédország	7	1	-	-	-	-	-	-
Szlovénia	3	2	-	-	-	-	-	-
Törökország	20	2	0,100	0,000	2	-0,025	-1,513*	0,218
<u>BAPS klaszterek</u>								
1. klaszter	17	3	0,228	0,001	2	-1,680*	-1,504*	0,161
2. klaszter	34	4	0,362	0,001	3	-1,699	-1,075	0,078
3. klaszter	11	1	0,000	0,000	0	-	-	-
4. klaszter	4	1	0,000	0,000	0	-	-	-
5. klaszter	78	11	0,787	0,003	11	-4,338*	-1,202	0,056
6. klaszter	16	4	0,642	0,003	3	0,071	0,815	0,193
7. klaszter	79	7	0,632	0,002	5	-2,354	-0,525	0,078
8. klaszter	20	2	0,100	0,000	2	-0,025	-1,513*	0,218

* $p<0,05$

Új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága

Magyarország rendelkezik a világ egyik legjobb minőségű dámszarvas állományával. Ezt igazolja az is, hogy a legutóbbi két világrekord trófeát Magyarország északkeleti részén, Gúthon ejtették el. Az északkelet-magyarországi dámszarvas populációk anyai ágon végzett genetikai vizsgálatával kapott eredményeim a faj diverzitására és filogenetikai szerkezetére vonatkozóan megerősítették az eddig közép-európai populációban leírtakat, illetve a történelmi feljegyzéseken alapuló tényeket. A faj alacsony szintű diverzitással rendelkezik, ezen belül a magyar állomány is. Azonban ennek ellenére, a mintázott területen 2 új haplotípust írtam le, amiből az egyik csak Gúthon –ahonnan a legutóbbi 2 világrekord is származik–, és ott is csak egy egyedben fordult elő. Lehetséges, hogy további állomány/terület specifikus genetikai jellegzetességek azonosíthatóak nagyobb elemszámmal,

más markerekkel, illetve mindenképpen érdemes lenne a mintagyűjtési területet az egész Kárpát-medencére kiterjeszteni. Bizonyítottam, hogy még mindig létezhetnek új, eddig fel nem fedezett haplotípusok zárt populációkban, illetve az emberi áttelepítések meghatározó szerepét a faj jelenlegi genetikai struktúrájában.

A dámszarvason végzett vizsgálataim török együttműködéssel és finanszírozással folytatódnak 2019-től.

Irodalomjegyzék

Achilli A, Olivieri A, Pellecchia M, Ubaldi C, Colli L, Al-Zahery N. 2008. Mitochondrial Genomes of Extinct Aurochs Survive in Domestic Cattle. *Current Biology* 18 (2): 157-158.

Achmann R, Curik I, Dovc P, Kavar T, Bodó I, Habe F, Marti E, Sölkner J, Brem G. 2004. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics* 35 (4): 285-292.

Aguilar A, Roemer G, Debenham S, Binns M, Garcelon D, Wayne RK. 2004. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (10): 3490-3494.

Alexandri P, Triantafyllidis A, Papakostas S, Chatzinikos E, Platis P, Papageorgiou N, Larson G, Abatzopoulos TJ, Triantaphyllidis C. 2012. The Balkans and the colonization of Europe: the post-glacial range expansion of the wild boar, *Sus scrofa*. *Journal of Biogeography* 39 (4): 713-723.

Alvarez I, Royo LJ, Fernandez I, Gutierrez JP, Gomez E, Goyache F. 2004. Genetic relationship and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. *Journal of Animal Science* 82 (8): 2246-2252.

Alves A, Ovilo C, Rodriguez MC, Siliò L. 2003a. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and others domestic and wild pig populations. *Animal Genetics* 34 (5): 319-324.

Alves PC, Ferrand N, Suchentrunk F, Harris DJ. 2003b. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27 (1): 70-80.

Alves PC, Melo-Ferreira J, Branco M, Suchentrunk F, Ferrand N, Harris DJ. 2008. Evidence for genetic similarity of two allopatric European hares (*Lepus corsicanus* and *L. castroviejoi*) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46 (3): 1191-1197.

Alves PC, Pinheiro I, Godinho R, Vicente J, Gortazar C, Scandura M. 2010. Genetic diversity of wild boar populations and domestic pig breeds (*Sus scrofa*) in Southwestern Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 101 (4): 797-822.

Amills M, Megens HJ, Manunza A, Ramos-Onsins S, Groenen M. 2017. A Genomic Perspective on Wild Boar Demography and Evolution. In: Melletti M, Meijaard E, eds. *Ecology, Conservation and Management of Wild Pigs and Peccaries*. Cambridge University Press, pp. 376-387.

ANARZ. Annual report of National Agency for Animal Improving and Reproduction from Romanian. 2014. [Internet] Available from: <http://www.anarz.eu/AnarzAdministratorSite/public/Raport+de+activitate.aspx> (2014.11.02.)

Anderson S, de Bruijn MH, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology* 156 (4): 683-717.

Angermann R. 1983. The taxonomy of Old World *Lepus*. *Acta Zoologica Fennica* 174:17-21.

- Antoniou A, Magoulas A, Platis P, Kotoulas G. 2013. Assessing the genetic landscape of a contact zone: the case of European hare in northeastern Greece. *Genetica* 141 (1-3): 23-40.
- Apollonio M, Andersen R, Putman R. 2010. *European Ungulates and their Management in the 21st century*. In: Apollonio M, Andersen R, Putman R. eds. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1-618.
- Apollonio M, Scandura M, Sprem N. 2014. Reintroductions as a management tool for European Ungulates. In: Putman R, Apollonio M, eds. *Behaviour and management of European Ungulates*. Whittles Publishing, pp. 46-77.
- Arnold J, Humer A, Heltai M, Murariu D, Spassov N, Hackländer K. 2012. Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* in Europe. *Mammal Review* 42 (1):1-11.
- Arslangündoğdu Z, Kasperek M, Saribasak H, Kacar MS, Yontem O, Sahin MT. 2010. Development of the population of the European Fallow Deer, *Dama dama dama* (Linnaeus, 1758), in Turkey (Mammalia, Cervidae). *Zoology in the Middle East* 49 (1): 3-12.
- Ashrafzadeh MR, Rezaei HR, Khalilipour O, Kusza Sz. 2018. Genetic relationships of wild boars highlight the importance of Southern Iran in forming a comprehensive picture of the species' phylogeography. *Mammalian Biology* 92:21-29.
- Ashrafzadeh MR, Naghipour AA, Haidarian M, Khorozyan I. 2019. Modeling the response of an endangered flagship predator to climate change in Iran. *Mammal Research* 64 (1): 39-51.
- Azor P, Valera M, Gómez M, Goyache F, Molina A. 2007. Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 30 (1): 37-42.
- Bacila V, Vidu L. 2011. Characterisation of indigenous and improved breeds. In: Bodo I, ed. *Podolic cattle*. Debrecen University, pp. 118-131.
- Baker KH, Gray HWI, Ramovs V, Mertzaniadou D, Akın Pekşen C, Bilgin CC, Sykes N, Hoelzel AR. 2017. Strong population structure in a species manipulated by humans since the Neolithic: the European fallow deer (*Dama dama dama*). *Heredity* 119 (1): 16-26.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37-48.
- Banea OC, Krofel M, Červinka J, Gargarea P, Szabó L. 2012. New records, first estimates of densities and questions of applied ecology for jackals in Danube Delta Biosphere Reserve and hunting terrains from Romania. *Acta Zoologica Bulgarica* 64 (4): 353-366.
- Bartosiewicz L. 2006. Phenotype and age in protohistoric horses: a comparison between Avar and Early Hungarian crania. In: Ruscillo D, eds. *Recent advances in ageing and sexing animal bones*. Oxbow Books, pp. 204-215.
- Bedő S, Sáfár L, Póti P. 2003. Hortobágyi racka. In: Tőzsér J, Bedő S, eds. *Történelmi állatfajtáink enciklopédiája*. Mezőgazda Kiadó, pp.144-147.
- Beja-Pereira A, Caramelli D, Lalueza Fox C, Vernesi C, Ferrand N, Casoli A, Goyache F, Royo LJ, Conti S, Lari M, Martini A, Ouragh L, Magid A, Atash A, Zsolnai A, Boscato P,

Triantaphylidis C, Ploumi K, Sineo L, Mallegni F, Taberlet P, Erhardt G, Sampietro L, Bertranpetit J, Barbujani G, Luikart G, Bertorelle G. 2006. The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy Sciences* 103 (21): 8113-8118.

Ben Slimen H, Suchentrunk F, Memmi A, Sert H, Kryger U, Alves PC, Ben Ammar Elgaaied A. (2006). Evolutionary relationships among hares from North Africa (*Lepus sp.* or *Lepus spp.*), cape hares (*L. capensis*) from South Africa, and brown hares (*L. europaeus*), as inferred from mtDNA PCR-RFLP and allozyme data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44 (1): 88-99.

Ben Slimen H, Suchentrunk F, Stamatis C, Mamuris Z, Sert H, Alves PC, Kryger U, Shahin AB, Elgaaied ABA. 2008. Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): A test of Petter's hypothesis of conspecificity. *Biochemical Systematics and Ecology* 36 (1): 22-39.

Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SLF, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo J, Beattie CW. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136 (2): 619-639.

Bodó I. 2000. Eleven örökség - Régi magyar háziállatok. In: Bodó I. ed. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, pp.1-126.

Bodó I. 2003. A hucul ló. In: Tözsér J, Bedő S, eds. *Történelmi állatfajtáink enciklopédiája*. Mezőgazda Kiadó, pp.52-54.

Bosch J, Rodríguez A, Iglesias I, Muñoz MJ, Jurado, C, Sánchez-Vizcaíno JM, De la Torre A. 2017. Update on the risk of introduction of African Swine Fever by wild boar into disease-free European Union Countries. *Transboundary and Emerging Diseases* 64 (5): 1424-1432.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in human using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32 (3): 314-331.

Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* 10 (4): e1003537.

Brezinsky L, Kemp SJ, Teale AJ. 1993. Polymorphic bovine microsatellites (ILSTS010-014). *Animal Genetics* 5 (24): 75-76.

Broders HG, Mahoney SP, Montevecchi WA, Davidson WS. 1999. Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of moose, *Alces alces*, in Canada. *Molecular Ecology* 8 (8): 1309-1315.

Broquet T, Petit EJ. 2009. Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40(1): 193-216.

Brzustowski J. 2002. Doh Assignment Test Calculator. [Internet] [cited 2002.márc.12., 2014.aug.17.]; Available from: <http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/Doh.php>.

Buchanan FC, Swarbrick PA, Crawford AM. 1992. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF 65 locus. *Animal Genetics* 23 (1): 85-85.

Buzgó J. 2006. Szarvasfélék túlszaporodásából eredő problémák áttekintő vizsgálata és a megoldás lehetőségei. Doktori (PhD) értekezés. Nyugat-Magyarországi Egyetem, Sopron

Cai D, Tang Z, Han L, Speller CF, Yang DY, Ma X, Cao J, Zhu H, Zhou H. 2009. Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse. *Journal of Archaeological Science* 36 (3): 835-842.

Canon J, Garcia D, Garcia Atance MA, Obexer Ruff G, Lenstra JA, Ajmone Marsan P, Dunner S, ECONOGENE Consortium. 2006. Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East. *Animal Genetics* 37 (4): 327-334.

Canu A, Scandura M, Luchetti S, Cossu A, Iacolina L, Bazzanti M, Apollonio M. 2013. Influence of management regime and population history on genetic diversity and population structure of brown hares (*Lepus europaeus*) in an Italian province. *European Journal of Wildlife Research* 59(6): 783–793.

Casas-Marce M, Marmesat E, Soriano L, Martínez-Cruz B, Lucena-Perez M, Nocete F, Rodríguez-Hidalgo A, Canals A, Nadal J, Bernáldez-Sánchez CDE, Fernández-Rodríguez C, Pérez-Ripoll M, Stiller M, Hofreiter M, Rodríguez A, Revilla E, Delibes M, Godoy JA. 2017. Spatio-temporal dynamics of genetic variation in the Iberian Lynx along its path to extinction reconstructed with ancient DNA. *Molecular Biology and Evolution* 34 (11): 2893-2907.

Chapman DI, Chapman NG. 1975. Fallow deer. Their history, distribution and biology. In: Chapman DI, Chapman NG. ed. Terence Dalton Publisher, Lavenham pp. 1-272.

Chapman JA, Flux JEC. 1990. Rabbits, hares and pikas. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland, p.9.

Chapman NG, Chapman DI. 1980. The distribution of fallow deer, a worldwide review. *Mammal Review* 10 (2-3): 61-138.

Chauhan M, Gupta AK, Dhillon S. 2004. Genetic characterization of Indian Spiti horses. *Journal of Genetics* 83 (3): 291-295.

Chelmu SS, Maciuc V, Creanga S. 2013. Reproduction indexes of Grey Steppe cattle breed from Romania been in genetic bio preservation. *Romanian Biotechnological Letters* 18 (5): 8715-8722.

Cieslak M, Pruvost M, Benecke N, Hofreiter M, Morales A, Reissmann M, Ludwig A. 2010. Origin and History of Mitochondrial DNA Lineages in Domestic Horses. *PLoS ONE* 5 (12): e15311.

Ćinkulov M, Krajcinovic M, Pihler I. 2003. Phenotypic differences between two types of Tsigai breed of sheep. In: Bura M, Acatincai S, Caprita R, Grozea A, Csiszter LT, Michescu M, Trandafir G, Muscalu Nagy R, Bochs F, eds. *Scientific papers of Animal Science and Biotechnologies*. AgroPrint, pp. 213-219.

Cinkulov M, Popovski Z, Porcu K, Tanaskovska B, Hodzić A, Bytyqi H, Mehmeti H, Margeta V, Djedović R, Hoda A, Trailović R, Brka M, Marković B, Vazić B, Vegara M, Olsaker I, Kantanen J. 2008. Genetic diversity and structure of the West Balkan Pramenka sheep types as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 125 (6): 417-426.

- Corander J, Marttinen P. 2006. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular ecology* 15 (10): 2833-2843.
- Corander J, Waldmann P, Marttinen P, Sillanpää MJ. 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20 (15): 2363-2369.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* 9 (1): 539.
- Corbet GB. 1986. Relationships and origins of the European lagomorphs. *Mammal Review* 16 (3-4): 105-110.
- Cornuet JM, Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144 (4): 2001-2014.
- Crawford AM, Swarbrick PA, Buchanan FC. 1992. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF70 locus. *Animal Genetics* 23 (2): 185-185.
- Crawford AM, Dodds KG, Ede AJ, Pierson CA, Montgomery GW, Garmonsway HG, Beattie AE, Davies K, Maddox JF, Kappes SW, Stone RT, Nguyen TC, Penty JM, Lord EA, Broom JE, Buitkamp J, Schwaiger W, Epplen JT, Matthew P, Matthews ME, Hulme DJ, Beh KJ, McGraw RA, Beattie CW. 1995. An autosomal genetic Linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140 (2):703-724.
- Creanga S, Maciuc V. 2010. *The Grey Steppe breed in Romania*. Alfa Iasi, Romanian.
- Creanga S, Maciuc V, Balteanu VA. 2011. Preservation and utility of the genetic found of the Romanian Grey Steppe breed. *Animal Science Series* 56 3-7.
- Csizmár N, Mihók S, Jávör A, Kusza Sz. 2018. Genetic analysis of the Hungarian draft horse population using partial mitochondrial DNA D-loop sequencing. *PeerJ* 6:e4198
- D'Andrea M, Pariset L, Matassino D, Valentini A, Lenstra JA, Maiorano G, Pilla F. 2011. Genetic characterization and structure of the Italian Podolian cattle breed and its relationship with some major European breeds. *Italian Journal Animal Science* 10 (4): 237-243.
- Dalvit C, Sacca E, Cassandro M, Gervaso M, Pastore E, Piasentier E. 2008a. Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. *Small Ruminant Research* 80 (1-3): 45-51.
- Dalvit C, De Marchi M, Dal Zotto R, Gervaso M, Meuwissen T, Cassandro M. 2008b. Breed assignment test in four Italian beef cattle breeds. *Meat Science* 80 (2): 389-395.
- Danilkin AA. 2001. The wild boar: An unprecedented spread or restoration of the species range? *Doklady Biological Sciences* 380 (1-6): 457-460.
- Dawson MR. 1981. Evolution of modern leporids. In: Proceedings of the World Lagomorph Conference. Myers K, MacInnes CD., eds. University of Guelph Press, Ontario. pp.1-8.
- Deinet S, Ieronymidou C, McRae L, Burfield IJ, Foppen RP, Collen B, Böhm M. 2013. *Wildlife comeback in Europe: The recovery of selected mammal and bird species. Final report to Rewilding Europe by ZSL*. In: Deinet S, Ieronymidou C, McRae L, Burfield IJ, Foppen RP, Collen B, Böhm M. eds. BirdLife International and the European Bird Census Council, London pp.1-312.

- Dellicour S, Frantz AC, Colyn M, Bertouille S, Chaumont F, Flamand MC. 2011. Population structure and genetic diversity of red deer (*Cervus elaphus*) in forest fragments in north-western France. *Conservation Genetics* 12 (5): 1287-1297.
- Demeter A, Spassov N. 1993. *Canis aureus* Linnaeus, 1758. In: Niethammer J, Krapp F, eds. *Handbuch der Säugetiere Europas*. Aula-Verlag, pp.107-138.
- DeYoung RW, Demarais S, Honeycutt RL, Rooney AP, Gonzales RA, Gee KL. 2003. Genetic consequences of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) restoration in Mississippi. *Molecular Ecology* 12 (12): 3237-3252.
- Di Lorenzo P, Lancioni H, Ceccobelli S, Colli L, Cardinali I, Karsli T, Capodiferro MR, Sahin E, Ferretti L, Marsan PA, Sarti FM, Lasagna E, Panella F, Achilli A. 2018. Mitochondrial DNA variants of Podolian cattle breeds testify for a dual maternal origin. *PLoS ONE* 13 (2): e0192567.
- Djan M, Obreht D, Vapa L. 2006. Polymorphism of mtDNA regions in brown hare (*Lepus europaeus*) populations from Vojvodina (Serbia and Montenegro). *European Journal of Wildlife Research* 52 (4): 288-291.
- Djan M, Veličković N, Stefanović M, Marković V, Vidaković DO, Vapa L. 2015. Genetic variation within and among brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) populations in Serbia as inferred from microsatellites. *Balkan Journal of Wildlife Research* 2 (1): 18-26.
- Djan M, Stefanović M, Veličković N, Lavadinović V, Alves PC, Suchentrunk F. 2017. Brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from the Balkans: a refined phylogeographic model. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 28 (2): 1-8.
- Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth GM, Tillet BJ, Ovenden JR. 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular ecology resources* 14 (1): 209-214.
- Doerner KC, Braden W, Cork J, Cunningham T, Rice A, Furman BJ, McElroy D. 2005. Population genetics of resurgence: whitetailed deer in Kentucky. *Journal of Wildlife Management* 69 (1): 345-355.
- Draganescu C. 2003. *Romanian strategy for a sustainable management of farm animal genetic resources*. In: Draganescu C. ed. Institute of Biology and Animal Nutrition, Balotesti, Ministry of Agriculture, Forestry, Waters and Environment, Bucuresti.
- Dragasescu C. 2005. Animal genetic resources in the Romanian sheep industry. In: Kukovics S, Kume K. (eds.) *Possible way of conservation the multipurpose Tsigai and other indigenous sheep breeds in Central, Eastern European and Balkan countries*. Printing House, Budapest pp. 51-57.
- Draganescu C, Grosu H. 2010. *Valachian (Zackel) heritage philetic sheep group – A taxonomic problem*. In: Draganescu C, Grosu H. (ed.) *Romanian Academy*. pp.1-7.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.". *BMC evolutionary biology* 7 (1): 214.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11 (12): 2571-2581.

Dunka B. 2002. Magyar juh (*Ovis aries strepsiceros hungaricus*) In: Jávora A, Mihók S. (eds) *Génmegőrzés: Kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről*. Debreceni Egyetem, Debrecen, pp. 167–187.

Earl DA, vonHoldt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources* 4 (2): 359-361.

Edwards CJ, Bollongino R, Scheu A, Chamberlain A, Tresset A, Vigne JD, Baird JF, Larson G, Simon YW Ho, Heupink TH, Shapiro B. 2007. Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274 (1616): 1377-1385.

Elmaci C, Oner Y, Balcioglu S. 2006. Genetic polymorphism of β -lactoglobulin gene in Native Turkish sheep breeds. *Biochemical Genetics* 44 (7-8): 379-384.

Epstein H, Mason IL. 1984. Evolution of Domesticated Animals. In: Mason IL, eds. *Cattle*. Longman, pp. 6-27.

Erbajeva MA. 1981. Late cenozoic Lagomorpha of Transbaikalia. In: Myers K, MacInnes CD, eds. *Proceedings of the World Lagomorph Conference Held in Guelph*. Guelph University Press, pp. 53-55.

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

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 23 (1): 47-50.

Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10 (3): 564-567.

Fabbri E, Caniglia R, Galov A, Arbanasić H, Lapini L, Bošković I, Florijančić T, Vlasseva A, Ahmed A, Mirchev RL, Randi E. 2014. Genetic structure and expansion of golden jackals (*Canis aureus*) in the north-western distribution range (Croatia and eastern Italian Alps). *Conservation genetics* 15 (1): 187-199.

Fadeev EV. 1969. Rezultaty iskusstvennogo rasseleniya nekotorykh vidov dikikh kopytnykh zhivotnykh v okhotnichikh khozyaistvakh Rossii (The results of a resettlement of some wild ungulate animals in the hunting ranges of Russia). *Byulleten Moskovskogo Obshchestva Ispytatelei Prirody, Otdel Biologii* 74: 37-46.

Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Rojas M, García T, Hernández PE, Martín R. 2007. PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Science* 76 (4): 644-652.

Fajardo V, González I, Martín I, Hernández PE, García T, Martín R. 2008. Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. *Meat Science* 78 (3): 314-322.

- Fang M, Andersson L. 2006. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273 (1595): 1803-1810.
- Fang M, Berg F, Ducos A, Andersson L. 2006. Mitochondrial haplotypes of European wild boars with 2n=36 are closely related to those of European domestic pigs with 2n=38. *Animal genetics* 37 (5): 459-464.
- FAO. 2014. Statistical yearbook. [Internet] [cited 2018 Feb 14]; Available from: <http://kids.fao.org/glipha/>.
- FAO. 2015. List of Domestic Animal Diversity. [Internet] Available from: <http://dad.fao.org>.
- FAO/IAEA. 2004. Agriculture Biotechnology Laboratory, Handbook of Laboratory Exercises. IAEA Laboratories. Seibersdorf. Austria.
- Faragó S. 2009. Természeti- Vadászati Örökségünk (Our Natural Hunting Heritage). *Nimród*. p.96.
- Faragó S, Náhlik A. 1997. *A vadállomány szabályozása (Regulation of games)*. In: Faragó S, Náhlik A. (ed.) Mezőgazda Press, Budapest. pp 1-315.
- Fauvelot C, Bernardi G, Planes S. 2003. Reductions in the mitochondrial DNA diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from Holocene sea-level change. *Evolution* 57 (7): 1571-1583.
- Feichtner B. 1998. Causes of fluctuations in the hunting kill of wild boar in the Saarland. *Zeitschrift Fur Jagdwissenschaft* 44 (3): 140-150.
- Felius M, Koolmees PA, Theunissen B, Lenstra JA, European Cattle Genetic Diversity Consortium. 2011. On the breeds of cattle - historic and current classifications. *Diversity* 3(4): 660-692.
- Fernández-García JL, Carranza J, Martínez JG, Randi E. 2014. Mitochondrial D-loop phylogeny signals two native Iberian red deer (*Cervus elaphus*) lineages genetically different to Western and Eastern European red deer and infers human-mediated translocations. *Biodiversity and Conservation* 23 (3): 537-554.
- Fickel J, Schmidt A, Putze M, Spittler H, Ludwig A, Streich WJ, Pitra C. 2005. Genetic structure of populations of European brown hare: implications for management. *Journal of Wildlife Management* 69 (2): 760-770.
- Fickel J, Hauffe HC, Pecchioli E, Soriguer R, Vapa L, Pitra C. 2008. Cladogenesis of the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *European Journal of Wildlife Research*, 54 (3): 495-510.
- Flux JEC, Angermann R. 1990. The hares and jackrabbits. Rabbits, hares and pikas. Status survey and conservation action plan. In: Chapman JA, Flux JEC, eds. *IUCN/SSC Lagomorph Specialist Group*. IUCN, pp. 61-94.
- Fontanesi L, Di Palma F, Flicek P, Smith AT, Thulin CG, Alves PC, Lagomorph Genomics Consortium. 2016. LaGomiCs—Lagomorph genomics consortium: an international

collaborative effort for sequencing the genomes of an entire mammalian order. *Journal of Heredity* 107 (4): 295-308.

François O, Durand E. 2010. Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics. *Molecular Ecology Resources* 10 (5): 773-784.

Frankham R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29 (1): 305-327.

Frantz LA, Schraiber JG, Madsen O, Megens HJ, Cagan A, Bosse M, Paudel Y, Crooijmans RPMA, Larson G, Groenen MAM. 2015. Evidence of long-term gene flow and selection during domestication from analyses of Eurasian wild and domestic pig genomes. *Nature Genetics* 47 (10): 1141.

Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147 (2): 915-925.

Galov A, Fabbri E, Caniglia R, Arbanasić H, Lapalombella S, Florijančić T, Bošković I, Galaverni M, Randi E. 2015. First evidence of hybridization between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers. *Royal Society Open Science* 2 (12): 150450.

Gavojdian D, Padeanu I, Sauer M, Dragomir N, Ilisiu E, Kusza Sz, Rahmann G. 2016. Effects of using indigenous heritage sheep breeds in organic and low-input production systems on production efficiency and animal welfare in Romania. *Journal of Applied Agriculture and Forestry Research - Landbauforschung Volkenrode* 66 (4): 290-297.

Geisser H, Reyer, HU. 2004. Efficacy of hunting, feeding, and fencing to reduce crop damage by wild boars. *Journal of Wildlife Management* 68 (4): 939-946.

Geisser H, Reyer HU. 2005. The influence of food and temperature on population density of wild boar *Sus scrofa* in the Thurgau (Switzerland). *Journal of Zoology* 267 (1): 89-96.

Georgescu SE, Costache M. 2012. Genetic characterization of Romanian local breeds using microsatellite markers. In: Caliskan M, eds. *Analysis of Genetic Variation in Animals*. INTECH, pp. 27-44.

Georgescu SE, Manea MA, Costache M. 2008. The genetic structure of indigenous Romanian Hucul horse breed inferred from microsatellite data. *Roumanian Biotechnological Letters* 13 (6): 4030-4036.

Georgescu SE, Manea MA, Zaulet M, Costache M. 2009. Genetic diversity among Romanian cattle breeds with a special focus on the Romanian Grey Steppe breed. *Romanian Biotechnological Letters* 14 (1): 4194-4200.

Giacomoni EH, Fernández Stolz GP, Freitas TRO. 2008. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. *Genetics and Molecular Research* 7 (1): 261-270.

Giannoulis T, Stamatis C, Tsipourlianos A, Mamuris Z. 2018. Mitogenomic analysis in European brown hare (*Lepus europaeus*) proposes genetic and functional differentiation between the distinct lineages. *Mitochondrial DNA Part A* 29 (3): 353-360.

Ginja C, Penedo MC, Melucci L, Quiroz J, Martínez López OR, Revidatti MA, Martínez-Martínez A, Delgado JV, Gama LT. 2010. Origins and genetic diversity of New World Creole

cattle: Inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Animal Genetics* 41 (2): 128-141.

Gissi C, Gullberg A, Arnason U. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Genomics* 50 (2): 161-169.

Giuffra EJM, Kijas JM, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon JT, Andersson L. 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154 (4): 1785-1791.

Goedbloed DJ, van Hooft P, Megens H-J, Langenbeck K, Lutz W, Crooijmans RPMA, van Wieren SE, Ydenberg RC, Prins HHT. 2013. Reintroductions and genetic introgression from domestic pigs have shaped the genetic population structure of Northwest European wild boar. *BMC Genetics* 14 (1): 43.

Gongora J, Peltoniemi OAT, Tammen I, Raadsma H, Moran C. 2003. Analyses of possible domestic Pig Contribution in two populations of Finnish farmed Wild Boar. *Acta agriculturae scandinavica. Section A, Animal Science* 53 (4): 161-165.

Gongora J, Fleming P, Spencer PB, Mason R, Garkavenko O, Meyer J-E, Droegemueller C, Lee JH, Moran C. 2004. Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand feral pigs assessed by mitochondrial control region sequence and nuclear GPII genotype. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33 (2): 339-348.

Gongora J, Cuddahee RE, Nascimento FF, Palgrave CJ, Lowden S, Ho SYW, Simond D, Damayanti CS, White DJ, Tay WT, Randi E, Klingel H, Rodrigues-Zarate CJ, Allen K, Moran C, Larson G. 2011 Rethinking the evolution of extant sub-Saharan African suids (Suidae, Artiodactyla). *Zoologica Scripta* 40 (4): 327-335.

Gortázar C, Ferroglio E, Hofle U, Frolich K, Vicente J. 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research* 53 (4): 241-256.

Goudet J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86 (6): 485-486.

Goudet J. 2002. FSTAT 2.9.3.2. [Internet] Available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

Groenen MAM, Archibald AL, Uenishi H, Tuggle CK, Takeuchi Y et al. Rothschild MF, Rogel-Gaillard C, Park C, Milan D, Megens H-J, Li S, Larkin DM, Kim H, Frantz LAF, Caccamo M, Ahn H, Aken BL, Anselmo A, Anthon C, Auvil L, Badaoui B, Beattie CW, Bendixen C, Berman D, Blecha F, Blomberg J, Bolund L, Bosse M, Botti S, Zhan Bujie NV, Bystrom M, Capitanu B, Carvalho-Silva D, Chardon P, Chen C, Cheng R, Choi S-H, Chow W, Clark RC, Clee C, Crooijmans RPMA, Dawson HD, Dehais P, De Sapio F, Dibbits B, Drou N, Du Z-Q, Eversole K, Fadista J, Fairley S, Faraut T, Faulkner G, Fowler KE, Fredholm M, Fritz E, Gilbert JGR, Giuffra E, Gorodkin J, Griffin DK, Harrow JL, Hayward A, Howe K, Hu Z-L, Humphray SJ, Hunt T, Hornshøj H, Jeon J-T, Jern P, Jones M, Jurka J, Kanamori H, Kapetanovic R, Kim J, Kim J-H, Kim K-W, Kim T-H, Larson G, Lee K, Lee K-T, Leggett R, Lewin HA, Li Y, Liu W, Loveland JE, Lu Y, Lunney JK, Ma J, Madsen O, Mann K, Matthews L, McLaren S, Morozumi T, Murtaugh MP, Narayan J, Dinh Truong Nguyen NV, Ni P, Oh S-J, Osteru S, Panitz F, Park E-W, Park H-S, Pascal G, Paudel Y, Perez-Enciso M, Ramirez-Gonzalez R, Reecy JM, Rodriguez-Zas S, Rohrer GA, Rund L,

Sang Y, Schachtschneider K, Schraiber JG, Schwartz J, Scobie L, Scott C, Searle S, Servin B, Southey BR, Sperber G, Stadler P, Sweedler JV, Tafer H, Thomsen B, Wali R, Wang J, Wang J, White S, Xu X, Yerle M, Zhang G, Zhang J, Zhang J, Zhao S, Rogers J, Churcher C, Schook LB. 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 491 (7424): 393-398.

Groenen MA. 2016. A decade of pig genome sequencing: a window on pig domestication and evolution. *Genetics Selection and Evolution* 48 (1): 23.

Groeneveld LF, Lenstra JA, Eding H, Toro MA, Scherf B, Pilling D, Negrini R, Finlay EK, Jianlin H, Groeneveld E, Weigend S, Globaldiv Consortium. 2010. Genetic diversity in farm animals - a review. *Animal genetics* 41 (1): 6-31.

Guberti V, de Marco MA, Riga F, Cavazza A, Trocchi V, Capucci L. 2000. Virolog and species conservation: the case of EBHSV and the Italian hare (*Lepus corsicanus* De Winton, 1898). In: *Proceedings of V Int. Congress of European Society for Veterinary Virology, Brescia*, pp. 27-30.

Guillot G. 2008. Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation - the correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics* 24 (19): 2222-2228.

Guillot G, Mortier F, Estoup A. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5 (3): 712-715.

Guo S, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48 (2): 361-372.

Hajji GM, Zachos FE. 2011. Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal pronounced genetic structuring in Tunisian wild boar *Sus scrofa*. *European Journal of Wildlife Research* 57 (3): 449-456.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41 (41): 95-98.

Haltenorth T. 1959. Beitrag zur Kenntnis des Mesopotamischen Damhirsches - *Cervus (Dama) mesopotamicus* Brooke, 1875 - und zur Stammes- und Verbreitungsgeschichte der Damhirsche allgemein. *Sagetierkund Mitteil* 8: 1-89.

Hankó B. 1954. A magyar háziállatok története ősidőktől máig. Budapest, pp.130.

Harris K. 2015. Cervid exploitation and symbolic significance in prehistoric and early historic periods hunting, performance and incorporation: human-deer encounter in late bronze age Crete. In: Baker K, Carden R, Madgwick R, eds. *Deer and People: Past Present and Future*. Oxbow, pp. 48-58.

Hartl GB, Schlegler A, Slowak M. 1986. Genetic variability in fallow deer, *Dama dama* L.. *Animal Genetics* 17 (2): 335-341.

Hartl GB, Suchentrunk F, Nadlinger K, Willing R. 1993. Studies on the European hare. 47. An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europaeus* based on morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. *Acta Theriologica*, 38 (2): 33-57.

Hartl GB, Zachos F, Nadlinger K. 2003. Genetic diversity in European red deer (*Cervus elaphus* L.): anthropogenic influences on natural populations. *Comptes Rendus Biologies* 326: S37-S42.

Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Jansen van Vuuren B, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A. 2012. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies* 335 (1): 32-50.

Heltai M, Szűcs E, Lanszki J, Szabó L. 2004. Az aranyakál (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) új előfordulásai Magyarországon. (Latest data on the distribution of jackal in Hungary). *Allattani közlemények* 89 (2): 43-52.

Hewitt G. 1999. Post-glacial re-colonisation of European biota. *Biological journal of the Linnean Society* 68 (1-2): 87-112.

Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405 (6789): 907-913.

Hewitt GM. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359 (1442): 183-195.

Hiemstra SJ, de Haas Y, Maki Tanila A, Gandini G. 2012. *Development of policies and strategies for self - sustaining breeds Local cattle breeds in Europe*. In: Hiemstra SJ, de Haas Y, Maki Tanila A, Gandini G. (ed.) Wageningen Academic Publisher, Wageningen. pp. 1-151.

Hill EW, Bradley DG, Al Barody M, Ertugul O, Splan RK, Zakharov I, Cunningham EP. 2002. History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Animal Genetics* 33 (4): 287-294.

Hoffmann RS. 1993. Order Lagomorpha. In: Hoffmann RS. (ed.) *Mammal species of the world*. Institution Press, pp. 807-827.

Hristov P, Teofanova D, Neov B, Radoslavov G. 2014. Haplotype diversity in autochthonous Balkan cattle breeds. *Animal Genetics* 46 (5): 92-94.

Hulme DJ, Silk JP, Redwin JM, Barendse W, Beh KJ. 1994. Ten polymorphic ovine microsatellites. *Animal Genetics* 25 (6): 434-435.

Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23 (2): 254-267.

Iacolina L, Scandura M, Goedbloed DJ, Alexandri P, Crooijmans RPMA, Larson G, Archibald A, Apollonio M, Schook LB, Groenen MAM, Megens H-J. 2016. Genomic diversity and differentiation of a managed island wild boar population. *Heredity* 116 (1): 60-67.

Iacolina L, Pertoldi C, Amills M, Kusza Sz, Megens HJ, Balteanu VA, Bakan J, Cubrik-Curic V, Oja R, Saarma U, Scandura M, Spren N, Stronen AV. 2018. Hotspots of recent hybridization between pigs and wild boars in Europe. *Scientific reports* 8, Article number: 17372

Ibis O, Aksöyek E, Özcan S, Tez C. 2015. A preliminary phylogenetic analysis of golden jackals (*Canis aureus*) (Canidae: Carnivora: Mammalia) from Turkey based on mitochondrial D-loop sequences. *Vertebrate Zoology* 65 (3): 391-397.

Ilie DE, Kusza S, Sauer M, Gavojdian D. 2018. Genetic characterization of indigenous goat breeds in Romania and Hungary with a special focus on genetic resistance to mastitis and gastrointestinal parasitism based on 40 SNPs. *PLoS ONE* 13(5): e0197051.

Ivankovic A, Dovc P, Kavar T, Caput P, Mioc B, Pavic V, Stuhec V, Leto J. 2005. Genetic characterization of the Pag island sheep breed based on microsatellite and mtDNA data. *Small Ruminant Research* 57 (2-3): 167-174.

Ivanković A, Ramljak J, Konjačić M, Kelava N, Dovč P, Mijić P. 2009. Mitochondrial D-loop sequence variation among autochthonous horse breeds in Croatia. *Czech Journal of Animal Science* 54 (3): 101-111.

Ivankovic A, Paprika S, Ramljak J, Dovc P, Konjacic M. 2014. Mitochondrial DNA-based genetic evaluation of autochthonous cattle breeds in Croatia. *Czech Journal of Animal Science* 59 (11): 519-528.

Ivanov G, Karamanlidis AA, Stojanov A, Melovski D, Avukatov V. 2016. The re-establishment of the golden jackal (*Canis aureus*) in FYR Macedonia: implications for conservation. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde* 81(3): 326-330.

Jansen T, Forster P, Levine MA, Oelke H, Hurler M, Renfrew C, Weber J, Olek K. 2002. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10905-10910.

Jávora A, Kukovics S, Nábrádi A, Molnár Gy, Molnár B, Molnár A, Ábrahám M. 1998. Present state of Hungarian sheep breeding. Sheep and Goat Production in Central and Eastern European Countries Workshop. *Proceedings RUE technical Series* 50: 107-119.

Jędrzejewska B, Jędrzejewski W, Bunevich AN, Miłkowski L, Krasinski ZA. 1997. Factors shaping population densities and increase rates of ungulates in Białowieża Primeval Forest (Poland and Belarus) in the 19th and 20th centuries. *Acta Theriologica* 42 (4): 399-451.

Jombart T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24 (11): 1403-1405.

Jombart T, Devillard S, Dufour AB, Pontier D. 2008. Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity* 101 (1): 92-103.

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2017. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16(5): 1099-1106.

Kangas V-M, Kvist L, Laaksonen S, Nygrén T, Aspi J. 2013. Present genetic structure revealed by microsatellites reflects recent history of the Finnish moose (*Alces alces*). *European Journal of Wildlife Research* 59 (5): 613-627.

Kangas V-M, Kvist L, Kholodova M, Nygrén T, Danilov P, Panchenko D, Fraimout A, Aspi J. 2015. Evidence of post-glacial secondary contact and subsequent anthropogenic influence upon the genetic composition of Fennoscandian moose (*Alces alces*). *Journal of Biogeography* 42 (11): 2197-2208.

- Kantanen J, Edwards CJ, Bradley DG, Viinalass H, Thessler S, Ivanova Z, Kiselyova T, Cinkulov M, Popov R, Stojanovic S, Ammosov I, Vilkkilä J. 2009. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity* 103 (5): 404-415.
- Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G. 2005. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34 (1): 55-66.
- Kawecka A, Krupinski J. 2014. Sheep in the Polish Carpathians: Genetic resources conservation of the Podhale Zackel and Coloured Mountain sheep. *Geomatics, Landmanagement and Landscape* 1 (2): 35-45.
- Keros T, Jemersic L, Prpic J, Benic M, Roic B, Brnic D. 2013. Genetic variability of microsatellites in autochthonous Podolian cattle breeds in Croatia. *Acta Veterinaria Brno* 82 (2): 135-140.
- Keros T, Jemersic L, Prpic J, Brnic D. 2015. Molecular characterization of autochthonous Slavonian Syrmian Podolian cattle. *Acta Veterinaria Beograd* 65 (1): 89-98.
- Kim BW, Cho IC, Park MS, Zhong T, Lim HT, Lee S-S, Park H-B, Ko M-S, Lee J-H, Jeon J-T. 2011. Characterization of the European type of maternal lineage evident in extant Jeju native pigs. *Genes Genomics* 33 (2): 111-117.
- Kim KI, Yang YH, Lee SS, Park C, Ma R, Bouzat JL, Lewin HA. 1999. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horses breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics* 30 (2): 102-108.
- Kimura M, Crow JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49 (2755): 725-738.
- Koepfli KP, Pollinger J, Godinho R, Robinson J, Lea A, Hendricks S, Schweizer RM, Thalmann O, Silva P, Fan Z, Yurchenko AA, Dobrynin P, Makunin A, Cahill JA, Shapiro B, Álvares F, Brito JC, Geffen E, Leonard JA, Helgen KM, Johnson WE, O'Brien SJ, Van Valkenburgh B, Wayne RK. 2015. Genome-wide evidence reveals that African and Eurasian golden jackals are distinct species. *Current Biology* 25 (16): 2158-2165.
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* 15 (5): 1179-1191.
- Kovac P. 2006. Huculsky kon vcera a dnes. *Slovensky chov* 9 (4): 30-32.
- Kowalczyk R, Kołodziej-Sobocińska M, Ruczyńska I, Wójcik JM. 2015. Range expansion of the golden jackal (*Canis aureus*) into Poland: first records. *Mammal Research* 60 (4): 411-414.
- Krofel M, Giannatos G, Čirovič D, Stoyanov S, Newsome TM. 2017. Golden jackal expansion in Europe: a case of mesopredator release triggered by continent-wide wolf persecution? *Hystrix* 28 (1): 1-7.
- Krystufek B, Murariu D, Kurtonur C. 1997. Present distribution of the Golden Jackal *Canis aureus* in the Balkans and adjacent regions. *Mammal Review* 27 (2): 109-114.

Kukovics S, Jávor A. 2001. Prospects for small ruminant production and consumption in Eastern Europe. In: Kukovics S, Jávor A, eds. *Proceedings of 52th Annual Meeting of European Association for Animal Production. Book of Proceedings No.7.* pp. 26-29.

Kukovics S, Jávor A. 2002. A cigája juh és jövője (The Tsigai breed and its future). In: Jávor A, Mihók S, eds. *Génmegőrzés; kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről (Gene preservation; Research results about the values of old domestic animals).* Licium Art, pp.103-147.

Kukovics S, Kume K. 2005. Cooperation in the preservation of sheep breeds. In: Kukovics S, Kume K, eds. *Possible way of conservation the multipurpose Tsigai and other indigenous sheep breeds in Central, Eastern European and Balkan countries.* Printing House, pp. 117-122.

Kukovics S, Molnár A, Jávor A, Gáspárdi A, Dani Z. 2003. A hazai cigája juhállományok változatai és termelési különbségei. *Magyar Juhászat, Magyar Mezőgazdaság melléklet* 6: 2-6.

Kukovics S, Molnár A, Jávor A, Gáspárdi A, Dani Z. 2004. A hazai cigája juhállományok változatai és termelési különbségei. 1. Közlemény. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 53: 515-528.

Kume K, Pape L. 2006. The autochthonous sheep breeds of Albania. In: Kukovics S, Kume K, eds. *Possible way of conservation the multipurpose Tsigai and other indigenous sheep breeds in Central, Eastern European and Balkan countries.* Printing House, pp. 125-135.

Kusza Sz. 2006. A genetikai távolság becslése cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállományok között, valamint három nem klasszikus immungén kifejeződés és polimorfizmus vizsgálata sertésben. *Doktori disszertáció.* Debreceni Egyetem.

Kusza Sz., Veress Gy, Kukovics S, Jávor A, Sanchez A, Angiolillo A, Bősze Zs. 2007. Genetic polymorphism of α s1- and α s2-caseins in Hungarian Milking Goats. *Small Ruminant Research* 68: 329-332.

Kusza Sz., Nagy I, Sasvári Zs, Stágel A, Németh T, Molnár A, Kume K, Bősze Zs, Jávor A, Kukovics S. 2008. Genetic diversity and population structure of Tsigai and Zackel type of sheep breeds in the Central-, Eastern- and Southern-European regions. *Small Ruminant Research* 78 (1-3): 13-23.

Kusza Sz., Zakar E, Budai Cs, Cziszter LT, Padeanu I, Gavojdian D. 2015. Mitochondrial DNA variability in Gyimesi Racka and Turcana Sheep Breeds. *Acta Biochimica Polonica* 62 (2): 273-280.

Kusza Sz., Ilie DE, Sauer M, Nagy K, Patras I, Gavojdian D. 2016. Genetic polymorphism of β -casein gene in Banat White and Carpatina goats. *Acta Biochimica Polonica* 63 (3): 577–580.

Kusza Sz., Ilie DE, Sauer M, Sauer IW, Gavojdian D. 2017. Preliminary report on β -casein gene Met183QVal183 polymorphism in Romanian indigenous Zackel sheep breeds. *Acta Biochimica Polonica* 64(2): 339-341.

Kusza Sz., Cziszter LT, Ilie DE, Sauer M, Padeanu I, Gavojdian D. 2018a. Kompetitive Allele Specific PCR (KASPTM) genotyping of 48 polymorphisms at different caprine loci in the

Saanen and French Alpine goat breeds and their association with milk composition. *PeerJ* 6:e4416

Kusza Sz, Ilie DE, Sauer M, Nagy K, Atanasiu TS, Gavojdian D. 2018b. Study of LGB gene polymorphisms of small ruminants reared in Eastern Europe. *Czech Journal of Animal Science* 63 (4): 152-159

Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B. 2016. Partition Finder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34 (3): 772-773.

Lanszki J, Schally G, Heltai M, Ranc N. 2018. Golden jackal expansion in Europe: first telemetry evidence of a natal dispersal. *Mammalian Biology* 88: 81-84.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948.

Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307 (5715): 1618-1621.

Larson G, Albarella U, Dobney K, Rowley-Conwy P, Schibler J, Tressetg A, Vigneg J-D, Edwardsh CJ, Schlumbaumf A, Dinui A, Balaşescu A, Dolmank G, Tagliacozzo A, Manaseryanm N, Miraclen P, Van Wijngaarden-Bakker L, Massetip M, Bradleyh DG, Cooper A. 2007. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (39): 15276-15281.

Laval G, Iannuccelli N, Legault C, Milan D, Groenen MAM, Giuffra E, Andersson L, Nissen PH, Jorgensen CB, Beeckmann P, Geldermann H, Foulley JL, Chevalet C, Ollivier L. 2000. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetics Selection and Evolution* 32 (2): 187-203.

Lee YS, Markov N, Voloshina I, Argunov A, Bayarlkhagva D, Oh JG, Park YS, Min MS, Lee H, Kim KS. 2015. Genetic diversity and genetic structure of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) populations from Asia. *BMC Genetics* 16 (1): 100.

Lenney Williams C, Serfass TL, Cogan R, Rhodes OE. 2002. Microsatellite variation in the reintroduced Pennsylvania elk herd. *Molecular Ecology* 11 (8): 1299-1310.

Levene H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematical Statistics* 20 (1): 91-94.

Lewontin RC. 1972. The apportionment of human diversity. In: *Evolutionary Biology*. Springer, pp. 381-398.

Li MH, Kantanen J, Michelson A, Saarma U. 2011. Genetic components of grey cattle in Estonia as revealed by microsatellite analysis using two Bayesian clustering methods. *BMC Research Notes* 4 (1): 37.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (11): 1451-1452.

- Linck EB, Hanna ZR, Sellas A, Dumbacher JP. 2017. Evaluating hybridization capture with RAD probes as a tool for museum genomics with historical bird specimens. *Ecology and Evolution* 7 (13): 4755-4767.
- Lorenzini R, Patalano M, Apollonio M, Mazzarone V. 1993. Genetic variability of roe deer *Capreolus capreolus* in Italy: electrophoretic survey on populations of different origin. *Acta Theriologica* 38 (2): 141-151.
- Lowe WH, Allendorf FW. 2010. What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology* 19 (15): 3038-3051.
- Lucchini V, Meijaard E, Diong CH, Groves CP, Randi E. 2005. New phylogenetic perspectives among species of South-east Asian wild pig (*Sus* sp.) based on mtDNA sequences and morphometric data. *Journal of Zoology* 266 (1): 25-35.
- Ludwig AW, Vernesi C, Lieckfeldt D, Lattenkamp EZ, Wiethölter A, Lutz W. 2012. Origin and patterns of genetic diversity of German fallow deer as inferred from mitochondrial DNA. *European Journal of Wildlife Research* 58 (2): 495-501.
- Luikart G, Cornuet JM, Allendorf FW, Sherwin WB. 1998a. Distortions of allele frequency distributions provide a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89 (3): 238-247.
- Luikart G, Sherwin WB, Steele BM, Allendorf FW. 1998b. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* 7 (8): 963-974.
- Macdonald DW. 1983. The ecology of carnivore social behavior. *Nature* 301 (5899): 379-384.
- Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, Hulme DJ, Vaiman D, Cribiu EP, Freking BA, Beh KJ, Cockett NE, Kang N, Riffkin CD, Drinkwater R, Moore SS, Dodds KG, Lumsden JM, van Stijn TC, Phua SH, Adelson DL, Burkin HR, Broom JE, Buitkamp J, Cambridge L, Cushwa WT, Gerard E, Galloway SM, Harrison B, Hawken RJ, Hiendleder S, Henry HM, Medrano JF, Paterson KA, Schibler L, Stone RT, van Hest B. 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Research* 11 (7): 1275-89.
- Magee DA, MacHugh DE, Edwards CJ. 2014. Interrogation of modern and ancient genomes reveals the complex domestic history of cattle. *Animal Frontiers* 4 (3): 7-22.
- Magory Cohen T, King R., Dolev A., Boldo A, Lichter-Peled A, Bar-Gal GK. 2013. Genetic characterization of populations of the golden jackal and the red fox in Israel. *Conservation Genetics* 14 (1): 55-63.
- Mamuris Z, Moutou KA, Stamatis C, Sarafidou T, Suchentrunk F. 2010. Y DNA and mitochondrial lineages in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 75 (3): 233-242.
- Manatrion S, Fischerleitner F, Baumung R. 2008. Genetic characterization among some Austrian and Hungarian cattle breeds. *Archiv für Tierzucht* 51 (5): 426-437.
- Manunza, A. Amills M, Noce A, Cabrera B, Zidi A, Eghbalsaid S, Carrillo de Albornoz E, Portell E, Mercadé A, Sánchez A, Balteanu V. 2016. Romanian wild boars and Mangalitza

pigs have a European ancestry and their genomes harbour genetic signatures compatible with past population bottlenecks. *Scientific Reports* 6: 29913.

Markova AK, Simakova AN, Puzachenko AY. 2009. Ecosystems of Eastern Europe at the time of maximum cooling of the Valdai glaciation (24-18 kyr BP) inferred from data on plant communities and mammal assemblages. *Quaternary International* 201 (1-2): 53-59.

Marletta D, Tupac Yupanqui I, Bordonaro S, Garcia D, Guastella AM, Crisione A, Canon J, Dunner S. 2006. Analysis of genetic diversity and determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123 (5): 315-325.

Maršáľková L, Židek R, Pokoradi J, Golian J, Belej L. 2014. Genetic diversity and relatedness among seven red deer (*Cervus elaphus*) populations. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* 8 (1): 15-19.

Martel C, Viard F, Bourguet D, Garcia-Meunier P. 2004. Invasion by the marine gastropod *Ocenebrellus inornatus* in France. II. Expansion along the Atlantic coast. *Marine Ecology Progress Series* 273: 163-172.

Mason IL. 1967. *The Sheep Breeds of the Mediterranean*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK.

Massei G, Genov P. 2004. The environmental impact of wild boar. *Galemys* 16 (1): 135-145.

Masetti M. 1996. The postglacial diffusion of the genus *Dama* Frisch, 1775, in the Mediterranean region. *Supplement Ric Biology Selvaggina* 25: 7-29.

Masetti M, Mertzaniidou D. 2008. *Dama dama*. *The IUCN Red List of Threatened Species* e.T42188A10656554.

Masetti M, Pecchioli E, Romei A, Tilotta G, Vernesi C, Chiarelli B. 1997. RAPID (Random amplified polymorphic DNA) fingerprinting analysis of some Italian populations of fallow deer *Dama dama*. *Italian Journal of Zoology* 64 (3): 235-238.

Masetti M, Pecchioli E, Vernesi C. 2008. Phylogeography of the last surviving populations of Rhodian and Anatolian fallow deer (*Dama dama dama* L., 1758). *Biological Journal of Linnean Society* 93 (4): 835-844.

Matolcsi J, 1975. A háziállatok eredete. Mezőgazdasági Könyvkiadó Vállalat, pp. 149-160.

McDougall EI, Lowe VPW. 1968. Transferrin polymorphism and serum proteins of some British deer. *Journal of Zoology* 155 (1): 131-40.

McGahern A, Bower MA, Edwards CJ, Brophy PO, Sulimova G, Zakharov I, Vizuite Forster M, Levine M, Li S, MacHugh DE, Hill EW. 2006. Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations. *Animal Genetics* 37 (5): 494-497.

Melo-Ferreira J, Boursot P, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC. 2005. Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology* 14 (8): 2459-2464.

Melo-Ferreira J, Boursot P, Randi E, Kryukov A, Suchentrunk F, Ferrand N, Alves PC. 2007. The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene glaciations:

- expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 16 (3): 605-618.
- Melo-Ferreira J, Alves PC, Freitas H, Ferrand N, Boursot P. 2009. The genomic legacy from the extinct *Lepus timidus* to the three hare species of Iberia: contrast between mtDNA, sex chromosomes and autosomes. *Molecular Ecology* 18 (12): 2643-2658.
- Melo-Ferreira J, Boursot P, Carneiro M, Esteves PJ, Farelo L, Alves PC. 2012. Recurrent introgression of mitochondrial DNA among hares (*Lepus* spp.) revealed by species-tree inference and coalescent simulations. *Systematic Biology* 61 (3): 367-381.
- Mihók S. 2004. *The Hucul horse (Monography and Central European history of the breed)*. In: Mihók S. (ed.) Póni és Kislótenyésztők Országos Egyesülete, Debrecen. pp. 1-251. (in Hungarian)
- Mihók S. 2006. The Hucul horse. In: Aranyossy Á, eds. *Poni and Small horse*. Mezőgazda Kiadó, pp. 72-75.
- Moehlman PD. 1987. Social organization in jackals. *American Scientist* 75 (4): 366-375.
- Moioli B, Napolitano F, Catillo G. 2004. Genetic diversity between Piedmontese, Maremmana, and Podolica cattle breeds. *Journal of Heredity* 95 (3): 250-256.
- Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncalés P, López-Pérez MJ, A. Pérez-Martos A. 2000. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (7): 2829-2832.
- Moore SS, Byrne K, Berger, KT, Barendse, W, McCarthy, F, Womack, JE, Hetzel, DJS. 1994. Characterization of 65 microsatellites. *Mammalian Genome* 5 (2): 84-90.
- Mucci N, Arrendal J, Ansorge H, Bailey M, Bodner M, Delibes M, Ferrando A, Fournier P, Fournier C, Godoy JA, Hajkova P, Hauer S, Heggberger TM, Heidecke D, Kirjavainen H, Krueger HH, Kvaloy K, Lafontaine L, Lanszki J, Lemarchand C, Liukko UM, Loeschcke V, Ludwig G, Madsen AB, Mercier L, Ozolins J, Paunovic M, Pertoldi C, Piriz A, Prigioni C, Santos-Reis M, Luis TS, Stjernberg T, Schmid H, Suchentrunk F, Teubner J, Tornberg R, Zinke O, Randi E. 2010. Genetic diversity and landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe. *Conservation Genetics* 11 (2): 583-599.
- Müller P. 2003. Anpassungsfähiger Weltbürger (Damwild - eine Erfolgsgeschichte). *Jäger*. 10: 46-49.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. In: Nei M. ed. Columbia University Press, pp. 1-512.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19 (2): 153-170.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32 (1): 268-274.
- Niedziałkowska M. 2017. Phylogeography of European moose (*Alces alces*) based on contemporary mtDNA data and archaeological records. *Mammalian Biology* 84: 35-43.

- Niedziałkowska M, Jędrzejewska B, Wójcik JM, Goodman SJ. 2012. Genetic structure of red deer population in Northeastern Poland in relation to the history of human interventions. *Journal of Wildlife Management* 76 (6): 1264-1276.
- Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E, Watanobe T, Ishiguro N, Yasue H, Mitsunashi T. 2001. Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in Wild Boars and several breeds of domesticated pigs. *Animal Genetics* 32 (3): 139-147.
- Olano-Marin J, Plis K, Sönnichsen L, Borowik T, Niedziałkowska M, Jędrzejewska B. 2014. Weak population structure in European roe deer (*Capreolus capreolus*) and evidence of introgressive hybridization with Siberian roe deer (*C. pygargus*) in northeastern Poland. *PLoS ONE* 9 (10): e109147.
- Ottoni C, Girdland Flink L, Evin A, Georg C, De Cupere B, Van Neer W, Bartosiewicz L, Linderholm A, Barnett R, Peters J, Decorte R, Waelkens M, Vanderheyden N, Ricaut F-X, Çakırlar C, Çevik Ö, Hoelzel AR, Mashkour M, Karimlu AFM, Seno SS, Daujat J, Brock F, Pinhasi R, Hongo H, Perez-Enciso M, Rasmussen M, Frantz L, Megens H-J, Crooijmans R, Groenen M, Arbuckle B, Benecke N, Vidarsdottir US, Burger J, Cucchi T, Dobney K, Larson G. 2013. Pig domestication and human-mediated dispersal in Western Eurasia revealed through ancient DNA and geometric morphometrics. *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 824-832.
- Outram AK, Stear NA, Bendrey R, Olsen S, Kasparov A, Zaibert V, Thorpe N, Evershed RP. 2009. The Earliest Horse Harnessing and Milking. *Science* 323 (5919): 1332-1335.
- Ozsensoy Y, Kurar E. 2014. Genetic diversity of native Turkish cattle breeds: Mantel, AMOVA and bottleneck analysis. *Journal of Advanced Veterinary Animal Research* 1 (3): 86-93.
- Padeanu I. 2010. *Productia de carne la ovine*. In: Padeanu I. ed. Mirton, Timisoara. pp. 1-189
- Paetkau D, Calvert W, Sterling I, Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4 (3): 347-354.
- Palacios F, Estonba A, Perez-Suarez G, Alonso-Campos G, Sanz A, Galan L. 2004. Report on the restoration program of the Cantabrian population of brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in the Basque Country, Spain. *Second World Lagomorph Conference*. Research Center in Biodiversity and Genetic Resources, pp.
- Pariset L, Mariotti M, Nardone A, Soysal MI, Ozkan E, Williams JL, Dunner S, Leveziel H, Maroti Agots A, Bodò I. 2010. Relationships between Podolic cattle breeds assessed by single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 127 (6): 481-488.
- Pellecchia M, Negrini R, Colli L, Patrini M, Milanesi E, Achilli A, Giorgio Bertorelle, Cavalli-Sforza LL, Piazza A, Torrioni A, Ajmone-Marsan P. 2007. The mystery of Etruscan origins: novel clues from *Bos taurus* mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Social Biological Sciences* 274 (1614): 1175-1179.
- Pemberton JM. 1984. A genetic study of British fallow deer using gel electrophoresis. In: Tóth S, eds. *The Fallow Deer (Dama dama L.)*. Proceedings of a Symposium held in Budapest, pp. 85-88.

- Pemberton JM, Smith RH. 1985. Lack of biochemical polymorphism in British fallow deer. *Heredity* 55 (2): 199-207.
- Penty JM, Henry HM, Ede AJ, Crawford AM. 1993. Ovine microsatellites at the OarAE16, OarAE54, OarAE57, OarAE119 and OarAE129 loci. *Animal Genetics* 24 (3): 219-219.
- Pereira HM, Navaro LM. 2015. Rewilding European landscapes. In: Pereira HM, Navaro LM. (ed.) Springer, New York. pp. 1-227.
- Pérez-Espona S, Pérez-Barbería FJ, Goodall-Copestake WP, Jiggins CD, Gordon IJ, Pemberton JM. 2009. Genetic diversity and population structure of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*) populations: a mitochondrial survey. *Heredity* 102 (2): 199-210.
- Pesole G, Gissi C, Chirico AD, Saccone C. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 48 (4): 427-434.
- Peter C, Bruford M, Perez T, Dalamitra S, Hewitt G, Erhardt G, ECONOGENE consortium. 2007. Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* 38 (1): 37-44.
- Pieragostini E, Scalon A, Rullo R, Di Luccia A. 2000. Identical marker alleles in Podolian cattle (*Bos taurus*) and Indian zebu (*Bos indicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 127 (1): 1-9.
- Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V, Randi E. 1999. Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology* 8 (11): 1805-1817.
- Pietri C. 2007. Caccia e protezione delle popolazioni di lepre (*Lepus sp.*) in Corsica. In: De Filippo G, De Riso L, Riga F, Trocchi V, Troisi SR, eds. *Conservazione di Lepus corsicanus De Winton, 1898 e stato delle conoscenze*. IGF Publication, pp. 52-62.
- Pietri C, Alves PC, Melo-Ferreira J. 2011. Hares in Corsica: high prevalence of *Lepus corsicanus* and hybridization with introduced *L. europaeus* and *L. granatensis*. *European Journal of Wildlife Research* 57 (2): 313-321.
- Poetsch M, Seefeldt S, Maschke M, Lignitz E. 2001. Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer-possible employment in forensic applications. *Forensic Science International* 116 (1): 1-8.
- Porter V, Alderson L, Hall SJG, Sponenberg DP. 2016. *Mason's World Encyclopedia of Livestock Breeds and Breeding, 2 Volume Pack*. In: Cabi: Porter V. (ed.) CABI, Oxfordshire. pp. 1-1200.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1253-1256.
- Priskin K, Szabó K, Tömöry G, Bogácsi Szabó E, Csányi B, Eördögh R, Downes CS, Raskó I. 2010. Mitochondrial sequence variation in ancient horses from the Carpathian Basin and possible modern relatives. *Genetics* 138 (2): 211-218.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945-959.

Irma P, Paulauskas A. 2016. Genetic diversity of the Sika deer *Cervus nippon* in Lithuania. *Balkan Journal of Wildlife Research* 3 (1): 19-25.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics* 81 (3): 559-575.

Pyšková K, Storch D, Horáček I, Kauzál O, Pyšek P. 2016. Golden jackal (*Canis aureus*) in the Czech Republic: the first record of a live animal and its long-term persistence in the colonized habitat. *ZooKeys* 641: 151-163.

Quignon P, Rimbault M, Robin S, Galibert F. 2012. Genetics of canine olfaction and receptor diversity. *Mammalian genome* 23 (1-2): 132-143.

R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. [Internet]; Available from: <http://www.R-project.org/>.

Rambaut A, Drummond AJ. 2007. Tracer v1.4. [Internet]; Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Ramos-Onsins SE, Rozas J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19 (12): 2092-2100.

Ranc N, Alvares F, Banea OC, Berce T, Cagnacci F, Červinka J, Ćirovic D, Cosic N, Giannatos G, Hatlauf J, Heltai M, Ivanov G, Lanszki J, Lapini L, Maiorano L, Melovski D, Migli D, Mladenovic J, Pankov IA, Penezic A, Petrova A, Šálek M, Selanec I, Selimovic A, Stojanov A, Szabó L, Trbojevic I, Trbojevic T, Krofel M. 2017. *The golden jackal (Canis aureus) in Europe: predicting habitat suitability of a rapidly establishing carnivore*. 33rd IUGB Congress, Montpellier, pp. 320-322.

Randi E, Apollonio M. 1988. Low biochemical variability in European fallow deer (*Dama dama* L) - Natural bottlenecks and the effects of domestication. *Heredity* 61 (3): 405-410.

Randi E, Mucci N, Claro-Hergueta F, Bonnet A, Douzery EJP. 2001. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the *Cervinae*: speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Animal Conservation* 4 (1): 1-11.

Raymond M, Rousset F. 1995. Genepop (version 3.1): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61 (3): 539-42.

Rosenberg AN. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4 (1): 137-138.

Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementations of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8 (1): 103-106.

Royo LJ, Pajares G, Álvarez I, Fernández I, Goyache F. 2007. Genetic variability and differentiation in Spanish roe deer (*Capreolus capreolus*): A phylogeographic reassessment within the European framework. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42 (1): 47-61.

- Rozas J, Sanchez DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19 (18): 2496-2497.
- Russakov OS, Timofeeva EK. 1984. *Kaban. Ekologiya, resursy, khozyaistvennoe znachenie na Severo-Zapade SSSR (Wild boar. Ecology, population numbers, and economic importance in the north-west USSR)*. In: Russakov OS, Timofeeva EK. (ed.) Izdatelstvo Leningradskokho Universiteta, Leningrad. pp. 1-206.
- Rutkowski R, Krofel M, Giannatos G, Ćirović D, Männil P, Volokh AM, Lanszki J, Heltai M, Szabó L, Banea OC, Yavruyan E, Hayrapetyan V, Kopaliani N, Miliou A, Tryfonopoulos GA, Lymberakis P, Penezić A, Pakeltytė G, Suchecka E, Bogdanowicz W. 2015 A European concern? Genetic structure and expansion of golden jackals (*Canis aureus*) in Europe and the Caucasus. *PLoS ONE* 10 (11): e0141236.
- Saez-Royuela C, Telleria JL. 1986. The increased population of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Europe. *Mammal Review* 16 (2): 97-101.
- Šálek M, Červinka J, Banea OC, Krofel M, Ćirović D, Selanec I, Penezić A GS, Riegert J. 2014. Population densities and habitat use of the golden jackal (*Canis aureus*) in farmlands across the Balkan Peninsula. *European Journal of Wildlife Research* 60 (2): 193-200.
- Satoiu N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406-425.
- Savic M, Trailovic R, Petrujkic B, Beckei Z, Dimitrijevic B, Dimitrijevic V. 2013. Determining the value of Vlashko-Vitoroga Zackel sheep for the conservation process. *Acta veterinaria* 63 (5-6): 621-629.
- Say L, Naulty F, Hayden TJ. 2003. Genetic and behavioural estimates of reproductive skew in male fallow deer. *Molecular Ecology* 12 (10): 2793-2800.
- Scandura M, Iacolina L, Crestanello B, Pecchioli E, Di Benedetto MF, Russo V, Davoli R, Apollonio M, Bertorelle G. 2008. Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable? *Molecular Ecology* 17 (7): 1745-1762.
- Scandura M, Iacolina L, Apollonio M. 2011. Genetic diversity in the European wild boar *Sus scrofa*: phylogeography, population structure, and wild x domestic hybridization. *Mammal Review* 41 (2): 125-137.
- Schandl J. 1959. Gyapjú-, tej- és hústermelés a juhászatban. Mezőgazdasági Kiadó, pp. 19-21.
- Schmidt JI, Hundertmark KJ, Bowyer RT, McCracken KG. 2009. Population structure and genetic diversity of moose in Alaska. *Journal of Heredity* 100 (2): 170-80.
- Schmitt T. 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4 (1): 11-11.
- Schmitt T, Habel JC, Zimmermann M, Mueller P. 2006. Genetic differentiation of the marbled white butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology* 15 (7): 1889-1901.
- Schnitzler A, Granado J, Putelat O, Arbogast R-M, Drucker D, Eberhard A, Schmutz A, Klaefiger Y, Lang G, Salzburger W, Schibler J, Schlumbaum A, Bocherenset H. 2018. Genetic diversity, genetic structure and diet of ancient and contemporary red deer (*Cervus elaphus* L.) from north-eastern France. *PLoS ONE* 13 (1): e0189278.

- Seroussiand E, Yakobson E. 2010. Bovine mtDNA D-loop haplotypes exceed mutations in number despite reduced recombination: an effective alternative for identity control. *Animal* 4 (11): 1818-1822.
- Sert H, Suchentrunk F, Erdoğan A. 2005. Genetic diversity within Anatolian brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) and differentiation among Anatolian and European populations. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde* 70 (3): 171-186.
- Sert H, Ben Slimen H, Erdoğan A, Suchentrunk F. 2009. Mitochondrial HVI sequence variation in Anatolian hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde* 74 (4): 286-297.
- Shen-Jin L, Yan Y, Xue-Bina W. 2014. Genetic diversity analysis by microsatellite markers in four captive populations of the sika deer (*Cervus nippon*). *Biochemical Systematics and Ecology* 57: 95-101.
- Simon C. 1991. Molecular Systematics at the Species Boundary: Exploiting Conserved and Variable Regions of the Mitochondrial Genome of Animals via Direct Sequencing from Amplified DNA. In: Hewitt GM, Johnston AW, Young JPW, eds. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer, pp. 33-71.
- Slatkin M, Barton NH. 1989. A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43 (7): 1349-1368.
- Slatkin M, Hudson RR. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129 (2): 555-562.
- Smith AT. 2008. Conservation of endangered lagomorphs. In: Alves PC, Ferrand N, Hacklander K. eds. *Lagomorph biology: evolution, ecology and conservation*. Springer, pp. 297-315).
- Soliva R. 2007. Agricultural decline, landscape change, and outmigration: Debating the sustainability of three scenarios for a Swiss mountain region. *Mountain Research Development* 27 (2): 124-129.
- Sommer R, Benecke N. 2005. Late-Pleistocene and early Holocene history of the canid fauna of Europe (*Canidae*). *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde* 70 (4): 227-241.
- Sommer RS, Nadachowski A. 2006. Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review* 36 (4): 251-265.
- Soysal I, Kobab E, Özkan E, Altonuk V, Bulut Z, Nizamhoglu M, Togan I. 2005. Evolutionary relationship among three native and two crossbred sheep breeds of Turkey: preliminary results *Revue de Médecine Vétérinaire* 156 (5): 289-293.
- Soysal I. 2005. Sheep breeding in Turkey. In: Kukovics S, Kume K. eds. *Possible way of conservation the multipurpose Tsigai and other indigenous sheep breeds in Central, Eastern European and Balkan countries*. Printing House, pp. 297-309.
- Soysal M, Kök S. 2008. The last survivors of Grey cattle resisting extinction. A case study of characteristics and sustainability of traditional systems of native Grey cattle breeds. *Options Méditerranéennes* 78: 55-63.
- Sönmez R. 1977. Comparison of milk yield and prolificacy between native sheep and Ostfriz crossbreeds in Turkey. 28. Jahrestagung der EVT, Brüssel

- Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou KA, Giacometti M, Haerer G, Djan M, Vapa L, Vukovic M, Tvrtković N, Sert H, Alves PC, Mamuris Z. 2009. Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of southeastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography* 36 (3): 515-528.
- Stanciu G. 1999. *Tehnologia cresterii bovinelor (Cattle breeding technology)*. In: Stanciu G. (ed.) Brumar, Timisoara. pp. 166-170.
- Steinborn R, Muller M, Brem G. 1998. Genetic variation in functionally important domains of the bovine mtDNA control region. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1397 (3): 295-304.
- Stevanovic J, Stanimirovic Z, Dimitrijevic V, Maletic M. 2010. Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). *Czech Journal of Animal Science* 55 (6): 221-226.
- Suchan T, Pitteloud C, Gerasimova NS, Kostikova A, Schmid S, Arrigo N, Pajkovic M, Ronikier M, Alvarez N. 2016. Hybridization Capture Using RAD Probes (hyRAD), a New Tool for Performing Genomic Analyses on Collection Specimens. *PLoS ONE* 11 (3): e0151651.
- Suchentrunk F, Ben Slimen HB, Stamatis C, Sert H, Scandura M, Apollonio M, Mamuris Z. 2006. Molecular approaches revealing prehistoric, historic, or recent translocations and introductions of hares (Genus *Lepus*) by humans. *Human Evolution* 21 (2): 151-165.
- Swarbrick, PA Buchanan, FC Crawford, AM. 1991. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF35 locus. *Animal Genetics* 22 (11): 369-370.
- Szabó L, Heltai M, Lanszki J, Szűcs E. 2007. An indigenous predator, the Golden jackal (*Canis aureus* L. 1758) spreading like an invasive species in Hungary. *Bulletin USAMV-CN* 64 (1-2): 230-235.
- Szabó L, Heltai M, Szűcs E, Lanszki J, Lehoczki R. 2009. Expansion range of the golden jackal in Hungary between 1997 and 2006. *Mammalia* 73 (4): 307-311.
- Sziszkosz N, Mihók S, Jávör A, Kusza Sz. 2016. Genetic diversity of the Hungarian Gidran horse in two mitochondrial DNA markers. *PeerJ* 4: e1894.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7 (4): 453-464.
- Tajima F. 1989a. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 (3): 585-595.
- Tajima F. 1989b. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123 (3): 597-601.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24 (8): 1596-1599.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725-2729.

- Tapio M, Tapio I, Grislis Z, Holm LE, Jeppson S, Kantanen J, Miceikiene I, Olsaker I, Viinalass H, Eythorsdottir E. 2005a. Unfolding of population structure in Baltic sheep breeds using microsatellite analysis. *Heredity* 94 (4): 448-457.
- Tapio M, Tapio I, Grislis Z, Holm LE, Jeppson S, Kantanen J, Miceikiene I, Olsaker I, Viinalass H, Eythorsdottir E. 2005b. Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. *Molecular Ecology* 14 (13): 3951-3963.
- Teneva A, Todorovska E, Tyufekchiev N, Kozelov L, Atanasov A, Foteva S, Ralcheva S, Zlatarev S. 2005. Molecular characterisation of Bulgarian livestock genetic resources: I. Genetic diversity in Bulgarian cattle as revealed by microsatellite markers. *Biotechnology Animal Husbandry* 21 (5-6): 35-41.
- Thévenon S, Thuy LT, Ly LV, Maudet F, Bonnet A, Jarne P, Maillard JC. 2004. Microsatellite analysis of genetic diversity of the Vietnamese Sika deer (*Cervus nippon pseudaxis*). *Journal of Heredity* 95 (1): 11-18.
- Thulin CG, Isaksson M, Tegelström H. 1997. The origin of Scandinavian mountain hares. *Gibier Faune Sauvage, Game Wildlife* 14 (3): 463-475.
- Thulin CG, Fang M, Averianov AO. 2006. Introgression from *Lepus europaeus* to *L. timidus* in Russia revealed by mitochondrial single nucleotide polymorphisms and nuclear microsatellites. *Hereditas* 143: 68-76.
- Trandzik J, Zidek R, Jakabova D, Buleca J, Massányi P, Hasko M, Kozlik P. 2007. Genetic diversity of Hucul horse, based on microsatellite data in Slovak Republic. Available at: <http://www.raumberg-gumpenstein.at>
- Trouwborst A, Krofel M, Linnell JDC. 2015. Legal implications of range expansions in a terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (*Canis aureus*) in Europe. *Biodiversity and Conservation* 24 (10): 2593-2610.
- Troy CS, MacHugh DE, Bailey JF, Magee DA, Loftus RT, Chamberlain AT, Sykes BC, Bradley DG. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 410 (6832): 1088-1091.
- Ueckermann E, Hansen P. 2002. *Das Damwild-Biologie*. In: Ueckermann E, Hansen P. ed. Hege und Jagd, Stuttgart.
- Vaiman D, Mercier D, Moazami Goudarzi K, Eggen A, Ciampolini R, Lepingue A, Velmala R, Kaukinen J, Varvio SL, Martin P, Levéziel H, Guérin G. 1994. A set of 99 cattle microsatellite: characterization, syntenic mapping and polymorphism. *Mammalian Genome* 5 (5): 288-297.
- Van Asch B, Pereira F, Santos SL, Carneiro J, Santos N, Amorim A. 2012. Mitochondrial lineages reveal intense gene flow between Iberian wild boars and South Iberian pig breeds. *Animal Genetics* 43 (1): 35-41.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: a software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535-538.
- Vapa L, Obreht D, Vapa M, Selmic V. 2002. Genetic variability in brown hare (*Lepus europaeus*) populations in Yugoslavia. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 48 (1): 261-266.

Vapa L, Djan M, Obreht D, Hammer S, Suchentrunk F. 2007. Allozyme variability of brown hares (*Lepus europaeus*) from the Vojvodina (Serbia), compared to central and south eastern European populations. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 53 (1): 75-87.

Velickovic N, Djan M, Ferreira E, Stergar M, Obreht D, Maleti V, Fonseca C. 2015. From north to south and back: the role of the Balkans and other southern peninsulas in the recolonization of Europe by wild boar. *Journal of Biogeography* 42 (4): 716-728.

Velickovic N, Ferreira E, Djan M, Ernst M, Vidakovic DO, Monaco A, Fonseca C. 2016. Demographic history, current expansion and future management challenges of wild boar populations in the Balkans and Europe. *Heredity* 117 (5): 348-357.

Veress G. 1941. A dámszarvas. *Nimród Vadászlap*. 1941.július 10. p.315.

Veress L, Jankowski ST, Schwark HJ. 1982. *Juhtenyésztők kézikönyve*. In: Veress L, Jankowski ST, Schwark HJ eds. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. pp. 1-400.

Veress L, Bedő S, Lovas L, Mucsi I, Lengyel A, Zomborszky Z. 1995. *Juhtenyésztés. Állattenyésztés 1. Szarvasmarha, juh, ló*. In: Horn Péter ed. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Veress L, Dunka B, Oláh J. 2002. Ősi magyar juhaink megmentése. In: Jávorski A, Mihók S eds. *Génmegőrzés: Kutatási eredmények régi háziállatfajták értékeiről*. Debreceni Egyetem, pp. 161-165.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10 (4): 506-513.

Webley LS, Zenger KR, English AW, Cooper DW. 2004. Low levels of genetic variation within introduced Javan rusa (*Cervus timorensis russa*) in Australia. *European Journal of Wildlife Research* 50: 137-140.

Webley LS, Zenger KR, Hall GP, Cooper DW. 2007. Genetic structure of introduced European fallow deer (*Dama dama dama*) in Tasmania, Australia. *European Journal of Wildlife Research* 53 (1): 40-46.

Wehner J, Müller HP, Orthwein L. 1991. Untersuchungen zur genetischen Situation des Damwildes in Nordrhein-Westfalen. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 37 (2): 69-77.

Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 (6): 1358-1370.

Wright S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. In: Wright S. (ed.) University of Chicago Press, Chicago. pp. 1-590.

Wu GS, Yao YG, Qu KX, Ding ZL, Li H, Palanichamy MG, Duan Z-Y, Li N, Chen Y-S, Zhang Y-P. 2007. Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia. *Genome Biology* 8 (11): R245.

Xu X, Arnason U. 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Genetics* 148 (2): 357-362.

Xuan TP, Georgescu SE, Manea MA, Hermenean AO, Costache M. 2010. Phylogenetic relationships of Romanian cattle to other cattle populations determined by using mitochondrial DNA D-Loop sequence variation. *Romanian Biotechnological Letters* 15 (3): 5287-5292.

- Yannouli E, Trantalidou K. 1999. The fallow deer (*Dama dama* Linnaeus, 1758): archaeological presence and representation in Greece. *The Holocene history of the European vertebrate fauna* 247-282.
- Yeh FC, Yong R. 1999. POPGENE version 1.31: Microsoft-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- Yu L, Li YW, Ryder O, Zhang YP. 2007. Analysis of complete mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of bears (Ursidae), a mammalian family that experienced rapid speciation. *BMC Evolutionary Biology* 7 (1): 198.
- Yumnam B, Negi T, Maldonado JE, Fleischer RC, Jhala YV. 2015. Phylogeography of the Golden Jackal (*Canis aureus*) in India. *PLoS ONE* 10 (9): e0138497.
- Zachos F, Hartl GB, Apollonio M, Reutershan T. 2003. On the phylogeographic origin of the Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*): evidence from microsatellites and mitochondrial DNA. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde* 68 (5): 284-298.
- Zachos FE, Cirovic D, Kirschning J, Otto M, Hartl GB, Petersen B, Honnen AC. 2009a. Genetic variability, differentiation, and founder effect in golden jackals (*Canis aureus*) from Serbia as revealed by mitochondrial DNA and nuclear microsatellite loci. *Biochemical Genetics* 47 (3-4): 241-250.
- Zachos FE, Hajji GM, Hmwe SS, Hartl GB, Lorenzini R, Mattioli S. 2009b. Population viability analysis and genetic diversity of the endangered red deer *Cervus elaphus* population from Mesola, Italy. *Wildlife Biology* 15 (2): 175-186.
- Zenger KR, Richardson BJ, Vachot-Griffin AM. 2003. A rapid population expansion retains genetic diversity within European rabbits in Australia. *Molecular Ecology* 12 (3): 789-794.
- Zhou T, Shen X, Irwin DM, Shen Y, Zhang Y. 2014. Mitogenomic analyses propose positive selection in mitochondrial genes for high-altitude adaptation in galliform birds. *Mitochondrion* 18: 70-75.
- Zuccaro A, Bordonaro S, Longeri M, Cozzi MC, Guastella AM, Croscione A, D'Urso G, Marletta D. 2009. Mitochondrial DNA control region variation in Sanfratellano horse and two other Sicilian autochthonous breeds. *Italian Journal of Animal Science* 8 (2): 180-182.
- Zsolnai A, Orbán, L. 1999. Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis* 20 (7): 1462-1468.
- Zsolnai A, Anton I, Rátky J, Bruford M, Egerszegi I. 2014a. Fekete és fehér racka genetikai különbségének felmérése DNS-analízissel. *Magyar Állatorvosok Lapja* 136: 27-31.
- Zsolnai A, Kovács A, Anton I, Rátky J, Brüssow KP, Józsa Cs, Bán B., Gyurmán A. 2014b. Comparison on different Hungarian Grey herds as based on microsatellite analysis. *Animal Science and Reports* 32 (2): 121-130.
- http://gyulajhuntinghungary.com/fallow_buck_hunting accessed 20 January 2018.
- <http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>
- http://www.ddnp.hu/index_v.php?pg=menu_1152
- http://www.royalhunting.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=75&lang=en accessed 20 January 2018.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet fejezem ki **prof. dr. Jávor András** rektori főtanácsadó úrnak (DE), aki PhD tanulmányaim alatt témavezetőm volt és utána laboratóriumvezetőként is önzetlenül támogatta kutatási tevékenységeimet, minden irányú szakmai ötletemet. Ugyanilyen hálás köszönettel tartozom **prof. dr. Bősze Zsuzsanna** tudományos tanácsadó asszonynak (NAIK-MBK) aki PhD témavezetésem után is hasznos és iránymutató tanácsokkal látott el a tudományos életben, további lépésekre biztatott a kutatói pályán.

Köszönettel tartozom **prof. dr. Kovács András** professor emeritus úrnak (DE) akinek hatalmas tudása, szakmai ötletei és a vele folytatott beszélgetések mindig inspirálóan hatottak rám.

Prof. dr. Kukovics Sándor (NAIK-ATHK) és **prof. dr. Mihók Sándor** (DE) urakat is köszönet illeti, hogy kutatásaik, pályázataik során nyitottak voltak együttműködésekre, és ezáltal segítették szakmai fejlődésemet.

Hálával tartozom külföldi munkáim során professzoraimnak, külön kiemelve **dr. Claire Rogel-Gaillard** (INRA) és **dr. Bogumila Jędrzejewska** (MRI-PAS) professzor asszonyokat, és a különböző egyetemek, illetve kutatóintézetek vezetőinek, amiért fogadtak intézményükben, segítségemre voltak szakmai fejlődésemben és azóta is mindennemű együttműködésre nyitottak velem.

A teljesség igénye nélkül a következő külföldi munkatársaimnak szeretnék mindenképp köszönetet mondani, amiért az elmúlt években együtt dolgozhattam/tok velük, számítanak szakmai véleményemre, meglátásaimra: **dr. Daniela Elena Ilie**, **dr. Dinu Gavojdian**, **dr. Frank E. Zachos**, **dr. Astrid Vik Stronen**, **dr. Laura Iacolina**, **dr. Magdalena Niedzialkowska**, **dr. Ludovic Toma Ciszter**, **dr. Bouabid Badaoui**, **dr. Ali Esmailzadeh**, **dr. Eva Pasic-Juhas**, **dr. Mohammad Ashrafzadeh**, **dr. Ante Ivankovic**, **dr. Massimo Scandura**, **dr. Donata Marletta**, **dr. Andrzej Oleksa**. Bízom benne, hogy sikeres együttműködéseink folytatódnak a jövőben is!

Köszönetemet fejezem ki **dr. Győri Zoltán**, **dr. Holb Imre** és **dr. Balogh Péter** professzor uraknak (DE), akikkel ugyan nem egy szakterületen dolgozunk és nem állunk közvetlen szakmai kapcsolatban, mégis kutatói pályafutásom kezdete óta támogattak és nyíltan fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel.

Köszönet illeti volt PhD hallgatóimat, **dr. Péntek-Zakar Erikát**, **Baginé dr. Hunyadi Ágnes** és **dr. Bagi Zoltánt**, amiért saját kutatási témájukon túl, más általam vezetett témákban is részt vettek, segítettek a napi teendőim és türelmet tanulhattam tőlük. Ugyancsak köszönöm jelenlegi PhD hallgatóim (**Farkas Péter** és **Mihalik Bendegúz**) munkáját, segítségét az időigényes mintagyűjtésekben és laboratóriumi vizsgálatokban. **Bacsóné Nagy Krisztina** több éves munkájáért is hálás vagyok és bízom benne, hogy hamarosan elkészül PhD disszertációjával.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni **Véghné Tóth Bianka**, titkárságvezető asszonynak (DE AKIT), aki már egyetemi szakdolgozómként is rendkívüli teherbírásáról és pontosságáról tett tanúbizonyságot, majd egyetemi éveim után is rendelkezésemre állt a laboratóriumi és adminisztratív terheim csökkentésében.

A Debreceni Egyetem Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet munkatársainak, külön vezetőjének, **prof. dr. Komlósi Istvánnak**, ezúton köszönöm a támogatást és a segítőkészséget, amelyet irányomba nyújtottak.

Köszönettel tartozom más intézményekben dolgozó kollegáimnak, **dr. Stéger Viktornak** (NAIK-MBK), **dr. Monori Istvánnak** (DE AKIT), **dr. Barta Endrének** (NAIK-MBK), **dr. Jurkovich Viktornak** (Állatorvostudományi Egyetem), **dr. Bajcsy Csabának** (Hannoveri Egyetem), akikkel együtt dolgozhattam és dolgozhatom, ezáltal lehetőségem van egyre jobban szélesíteni kutatási területeim körét, és tőlük tanulva más-más megközelítésben (biológusi, állatorvosi, informatikusi) vizsgálni az egyes kérdéseket.

Megköszönöm minden hazai és külföldi szerzőtársamnak, valamint a közleményeim köszönetnyilvánításaiban szereplők munkáját, vizsgálataimhoz nyújtott segítségét. Munkájuk nélkül nem tudtam volna kutatásaimat elvégezni!

Külföldi ösztöndíjaimat a Marie Curie program a Tempus Közalapítvány, míg hazai kutatásaimat a Debreceni Egyetem, illetve az általa elnyert pályázatok és a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíj Kuratóriuma támogatta.

És végül, de nem utolsó sorban, hatalmas hálával és köszönettel tartozom **Családomnak** és **Barátaimnak**, akik folyamatosan támogattak, mellettem álltak és legfőképpen bíztak bennem.