

Válasz Prof. Dr. Nagy István opponensi véleményére

„Genetikai diverzitás és filogenetikai kutatások Közép- és Dél-Európában élő domesztikált és vadon élő állatfajokban” című MTA doktori értekezésemről

Tisztelt Professzor Úr!

Először is hálásan köszönöm, hogy elfoglaltságai ellenére vállalta a felkérést és elvégezte dolgozatom tárgyilagos és építő jellegű bírálatát. Válaszaimban igyekszem reagálni az összes kritikai észrevételre és felvetett kérdésre.

Professzor úr észrevételeire adott válaszaim a következők:

Köszönöm pozitív vélekedését, inspiráló észrevételeit, meglátásait az értekezés szakmai tartalmával kapcsolatban. Örömmel tölt el, hogy a dolgozat témaválasztását indokoltnak tartja. Egyetértek azon megjegyzésével, miszerint a jövőben a tenyésztéértébecslést és a molekuláris genetikai vizsgálatokat integráltan kellene elvégezni. Megjegyzem, hogy már évekkorábban dr. Posta János kollégámmal terveztük hucul lovak ilyen jellegű összehasonlító vizsgálatát.

Professzor úr jelzi, hogy az értekezést szerencsésebb lett volna csak a domesztikált fajokra/fajtákra korlátozni és így a címet is aszerint megfogalmazni. Dolgozatom összetett témaválasztását széleskörű tudományos tevékenységem indokolta. Törekedtem benne a Közép- és Dél-Európa állatvilágával kapcsolatos genetikai diverzitás- és filogenetikai vizsgálataim bemutatására, mert ez az a földrajzi régió, amely leginkább kihatással van mindennapi életünkre, és úgy gondolom felelős magyar kutatóként elsődleges feladatomban az itt élő közösség életminőségének javítása a tudomány eszközeivel. Ebben a felfogásban pedig egyforma súllyal rendelkeznek a domesztikált és vadon élő állatfajok, hiszen mindkét csoport nélkülözhetetlen eleme ökoszisztémánknak. Ráadásul annak ellenére, hogy a klímaváltozás a vadon élő állatokra is egyre erőteljesebben hat, ma Magyarországon nagyon kevés kutatócsoport foglalkozik kutatásukkal, miközben külföldön egész kutatóintézetek munkája irányul vizsgálatukra. Értekezésemben arra is törekedtem, hogy olyan vizsgálatokat mutassak be, amelyek nem PhD-hallgatóim munkáiból származnak, illetve szem előtt kellett tartanom, az MTA doktori követelmény rendszer terjedelmi szempontjait is („A dolgozat terjedelme 80–150 oldal lehet”, így lett a doktori mű 115 szimpla sortávval megírt oldal). Ezek az okai a dolgozat sajátos felépítésének, a rövidnek tartott – 3 oldalas – Bevezetés fejezetének, az egyes esettanulmányok 1-2 oldalas irodalmi áttekintésének. A Professzor úr által javasolt módszer szerinti struktúrát is számításba vettem az értekezés szerkezetének kialakítása során, azonban az egyes esettanulmányok önálló logikai egységeket képeznek, melyek módszertanának esetében előfordulnak azonosságok, viszont minden esetben vannak olyan specifikumok, mint például az elemszámok, laboratóriumi módszerek, statisztikai elemzések paraméterei stb., melyeket mindenképpen egyedileg is közölni kellett volna. Így az összevont módszertani fejezet szükségtelen párhuzamosságokat hozott volna létre, s ezzel talán a teljes munka elvesztette volna olvashatósságát, követhetőségét. A doktori műhöz tartozó tézisek összeállításában táblázatban összegeztem az esettanulmányokhoz tartozó módszereket, így rövidebbé, érthetőbbé téve azokat.

Tisztelt Bíráló jelezte, hogy az értekezés legkevésbé erős pontja az egyes esettanulmányok végén megadott új tudományos eredményeket és azok hasznosíthatóságát taglaló alfejezetek. A genetikai diverzitás vizsgálatok mind vadon élő állatfajok, mind domesztikált fajok/fajták esetében a természetvédelem tárgykörébe is tartoznak, mely tudományterület egyik alapvető elve a holisztikus megközelítés. Ez az élő szervezetek és életközösségek összetettségéből adódik, tehát a problémakör vizsgálata is minden elemében széles spektrumú megközelítést igényel. Ebből fakad, hogy az egyes esettanulmányok új tudományos eredményekre és azok

hasznosíthatóságára vonatkozó alfejezetekben esetenként az eredményekből csak közvetve levezethető, vagy éppen az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó tevékenységekre való utalások is megjelennek. Ezek a kitekintések az eredmények gyakorlati alkalmazhatósága szempontjából bírnak jelentőséggel. Egyetértek Bírálóm azon megállapításával, mely szerint a további vizsgálatok elvégzését szorgalmazó javaslatok nem tekinthetők következtetéseknek. Mindazonáltal a tudományterület módszertanának rendkívüli sebességű fejlődése indokolja, és a korábbi évek gyakorlati tapasztalata is azt mutatja, hogy egy-egy esettanulmány eredményeinek értékelésével nem feltétlenül zárható le véglegesen az adott kutatási téma. Az alkalmazott módszerek és a hozzá kapcsolódó adatelemzési módszertan felbontásának gyors fejlődése nagyságrendekkel növelheti az eredmények megalapozottságát, ezért indokolt és bevett gyakorlat is az adott téma ismételt/bővített feldolgozása az új lehetőségek igénybevétele által, ami megerősítheti vagy új megvilágításba is helyezheti a korábbi eredményeket. A további vizsgálatok elvégzésére tett javaslatok ezért véleményem szerint iránymutatóak és megtarthatóak.

Professzor úr kérdéseire adott válaszaim a következők:

A közép-, kelet- és dél-európai juhajtókra vonatkozó kutatásban a STRUCTURE program nem adott teljesen konzisztens eredményt, de a legvalószínűbb klaszterszámnak a $K=10$ mutatkozott.

Mason (1967) állítását a fejezetben a 4. táblázat F_{ST} értékek és 6. táblázat Nei-féle genetikai távolság értékek alapján vontam le, de talán nem volt szerencsés az eredeztethető kifejezés, mivel az időbeli elválást valóban nem vizsgáltam a fajták között.

Professzor úr új tudományos eredmények és azok hasznosíthatósága alfejezetekre tett észrevételeire megadott válaszom tudnám megismételni. Ezek a kitekintések az eredmények gyakorlati alkalmazhatósága szempontjából bírnak nagy jelentőséggel. Végző soron minden kutatásnak a gyakorlati problémák megoldását kell szolgálja. Ezért tartom nélkülözhetetlennek minden esetben az eredményeknek és következtetéseknek a gyakorlati alkalmazás irányába történő perspektivikus kibontását.

A magyar racka juhok genetikai szerkezetének vizsgálatára az AMOVA (Analysis of Molecular Variance) tesztet használtuk. A varianciát meghatároztuk az állományok földrajzi helye és szín szerinti csoportosításában. Mindkét esetben azt kaptuk, hogy a fajtában jelenlévő genetikai variancia az egyedek szintjén van jelen (földrajzi elhelyezkedés esetén 98,02%, szín szerinti csoportosítás 96,70%).

Negatív variancia elemek előfordulhatnak az AMOVA teszt eredményeként, genetikai struktúra hiányára utalva.

A magyar racka juh fehér és fekete színek fajtán belüli változatként való kezelésén azt értem, hogy nem külön fajtaként kell őket számon tartanunk, csupán színváltozatnak tekinteni. A genetikai differenciálódás kimutatható a két színváltozat között, azonban a genetikai távolságot jellemző indexek mindegyikének biztos elkülönülést mutatónak kellene lennie (nem pedig, az éppen elhanyagolható távolság felső határa) és más tulajdonságok (szaporodásbiológia, eredet, termelési tulajdonságok stb.) eltérő volta indokolná a külön fajtaként való megnevezést. Ez azonban nem áll fenn, ellentétben azzal, hogy a két színváltozat egyedei ne legyenek fajtán belül külön tenyésztve, ahogy ez más juhajtóknál is jelen van (pl. bergshaf, szomáliai stb.).

A STRUCTURE analízis igazolta a két színváltozat differenciáltságát de ahogy az előző válaszomban is leírtam, további paramétereket, tulajdonságokat, illetve magasabb elem és

marker számmal kellene bizonyítani a külön fajtaként történő megnevezést.

A cigája és racka állományok beltenyésztettségére vonatkozó értékelését kérte Professzor úr. Professzor úrnak igaza van abban, hogy nem történtek értékmérő tulajdonságokra vonatkozó mérések. Kijelentésemet a populáción belüli beltenyésztési együttható (F_{IS}) pozitív értékére - mely heterozigóta hiányt (beltenyésztés) jelez -, illetve a fekete színváltozat történeti múltjára alapoztam. A fekete változat génmegőrzésére már 1937-ben felhívta Hankó a figyelmet (Állattenyésztők Lapja. 21. 263–265), amikor a becsült állomány kb. 300 egyedből állt. Próbáltam árnyaltan fogalmazni, így a beltenyésztéses leromlásra utaló jelek kifejezést pont amiatt használtam mert nem indokolt a beltenyésztés kifejezés, de ezek szerint megfogalmazásom nem fejezte ki pontosan szándékomat.

A közép-, kelet- és dél-európai juhajták esetén sem álltak rendelkezésemre értékmérő tulajdonságokra vonatkozó mérési adatok. Bírálómnak igaza van, hogy nem hangsúlyoztam ezen állományok esetén a beltenyésztésre utaló jelek erősebb voltát. A beltenyésztéses leromlás leginkább a szerb svrjig pramenka állományt érinti, míg legkevésbé a horvát cigáját. Országokénti csoportosításban a szerb, míg fajtacsoport szerinti felosztásban a pramenka juhok esetén kell tartani a beltenyésztéstől.

Ahogy korábban is jeleztem, törekedtem a tágabb kitekintésre az eredmények értékelése szempontjából. Egy-egy vizsgálat, szűk tudományterület eredményei önmagukban nem jelenthetnek alapot egy olyan bonyolult és összetett feladat tervezése során, mint az őshonos állatfajták géntartalék-védelme. Minden esetben szükség van az eredmények kontextusba helyezésére és annak vizsgálatára, hogy a javasolt intézkedések hogyan illeszkednek a fajta hosszú távú jövőjébe, és a biológián túl milyen társadalmi, gazdasági hatásai lehetnek. Hiszen a háziállat fajták esetében ezek a körülmények épp oly jelentős hatással bírnak, mint a természeti környezet. A génmegőrzés gyakorlati feladatait sok esetben populációgenetikai ismeretekkel kevésbé felvértezett szakemberek végzik. Eredményeink irányukba való kommunikálását nagyban segítik ezek a kitekintések. A tisztelt Bíráló által kifogásolt részek ezeket a célokat szolgálják.

Köszönöm Professzor úr 14., 15. és 16. táblázatra vonatkozó megjegyzését! Az általa leírtakkal egyetértek. A hivatkozott vizsgálatokban valóban nem volt részemről pontos az eredmények megfogalmazása, az indexek jellemzése. A jövőben törekszem a sokkal egyértelműbb fogalmazásokra, indexek értelmezésére.

A hucul lovakra vonatkozó válaszaim: Valójában a vizsgálat megkezdésekor célunk a hucul lovak genetikai diverzitásának meghatározása, illetve az egyedek kancacsaládokba való besorolásának ellenőrzése volt. Azonban az a ritka lehetőség adódott, hogy mintázhassunk przewalski és konik lovakat is, így kiterjesztettük a vizsgálat célkitűzéseit a három fajta genetikai kapcsolatának meghatározására is.

A kérdés izgalmasnak ígérkezett, mert az evolúció folyamatos, mi emberek pedig szeretünk kategorizálni, így néha nehéz az élővilágot a saját fogalmaink szerint értelmezni. Linné szerint azok az egyedek összessége tekinthető egy fajnak, amelyek önként párosodnak és utódaik mindkét ivarban termékenyek. Korábban külön fajnak írták le a przewalski és házilovat, de újabban az *Equus ferus* alfajainak tartják őket: a tarpán az *E. f. ferus*, a przewalski az *E. f. przewalskii* és a háziló az *E. f. caballus*. Valószínűleg Kazahsztán területén a przewalskit háziásították előbb, és csak később, a nyugatabbra élt tarpánt. A tarpán teljesen kipusztult, a Moszkvai Állatkertben 101 éve elpusztult példány a fotó alapján lógó sörényű üstökös háziló és nem vadló volt. Az orosz-lengyel konyik szó lovacskát jelent, ezeket és a hucult is a tarpántól származtatják. Érdekes a kromoszóma-számok eltérése is, ami minden przewalski esetében $2n=66$, míg a házilóval minden fajtájában $2n=64$, csak néhány iráni kaszpi póniban találtak 65-öt, ami egyezett a háziló x przewalski F1 hibridekével. Tehát

előzetesen a przewalski lovak és a házilovak között nem volt nagy hasonlóság várható, míg a konik és a hucul között vártunk némi genetikai kapcsolatot.

Örömmel tölt el, hogy Professzor úr hasznosnak ítéli a származási adatok molekuláris genomikai alapú korrigálására irányuló vizsgálatainkat, melyet a hucul fajtán kívül gidrán, furioso-north star és magyar hidegvérű lovakkal is elvégeztünk. Véleményem szerint is ez egy olyan kutatási terület, aminek eredményei nem csak nagyon hamar alkalmazhatóak a gyakorlatban, de igen nagy hatást is fejtenek ki a tenyésztésre. Professzor úr támogató véleménye tovább erősít ebben, ezért a jövőben törekedni fogok ilyen jellegű kutatásaim kibővítésére.

Az 57. és 76. oldalakon hivatkozott részek esetében egyetértek Oponensem megállapításaival, azonban szeretnék visszautalni egy korábbi válaszomra, miszerint minden esetben szükség van az eredmények szélesebb kontextusba helyezésére, a gyakorlati alkalmazásokra/hatásokra való kitekintésre, ami elősegítheti az eredmények társadalmi hasznosulását.

Oponensem összes esettanulmányra vonatkozó kérdéseire adott válaszaiban megpróbálok rövid lenni és tömören fogalmazni.

A diverzitás vizsgálatokhoz markerenkénti szükséges elemszámra vonatkozó kérdésére a válaszom a következő. A genetikai diverzitás vizsgálatokhoz szükséges minimum elemszám több tényezőtől függ, de leginkább az alkalmazott markertől, a vizsgálandó faj/fajta létszámától, elérhetőségétől illetve a rendelkezésre álló anyagi forrástól. Az általam vezetett kutatások során, a vizsgálatok megtervezésekor törekedtem a lehető legtöbb minta begyűjtésére, mivel számolni kell a laboratóriumi mintavesztésekkel (sikertelen DNS izolálás, amplifikálási problémák, ismétlések stb.) illetve statisztikai értékelések során kizárható adatokkal. Az anyagi források biztosításának problematikája pedig javítható együttműködések keretében végzett kutatásokkal.

Az egyik leggyakrabban használt marker az egyes fajok/fajták genetikai diverzitásának jellemzésére a *mikroszatellit*. A FAO ajánlása szerint domesztikált állatok esetén legalább 25 állat/fajta vizsgálata szükséges, amihez legalább 40 egyedből ajánlatos mintát venni az esetleges mintavesztések miatt (FAO 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome). Fontos kritérium a rokonegyedek mintázásának elkerülése és a vizsgálat céljától függően az ivar ismerete is. Egyes fajok genotipizáláshoz már akár 4-8 mikroszatellit marker is elegendő lehet (házi méh, halak, ritka fajok), azonban általánosan 10 fölötti markert alkalmaznak egyre több állatfaj esetén, melyekkel közel 100%-os valószínűséggel lehet dolgozni. A FAO ajánlása, szerint 30 mikroszatellit marker szükséges a legtöbb domesztikált állatfaj esetében, sőt konkrét markerszettet is ajánl több fajra, így egymással összevethető adathalmazt kaphatunk. Kereskedelmi forgalomban található kitek is rendelkezésre állnak egyre több faj esetén a laboratóriumi munka gyorsabb, pontosabb elvégzését segítve.

A mikroszatellitokkal végzett genotipizálás mellett egyre inkább használatos a kétallélos *SNP* alapú módszer. Ezek sokkal gyorsabban és nagy elemszám vagy markerszám esetén alacsonyabb fajlagos költséggel járnak. Ha néhány száz SNP-re kívánjuk genotipizálni mintáinkat kereskedelmi forgalomban elérhető KASP és TaqMan próbákat használhatunk, míg magasabb SNP szám esetén az alacsony denzitású (néhány száztól néhány ezer SNP) és magas denzitású (több százezer SNP) chipek vagy RADSeq/GBS, módszerek használata lehetséges. Azonban figyelembe kell vennünk a nagy denzitású chipeken kapott adatok feldolgozása, kiértékelése már speciális informatikai háttérrel és szakképzett informatikusok tudását igényli. Diverzitás vizsgálatok során leggyakrabban az alacsony denzitású chipek használata elterjedt, illetve ha nem chippel dolgozunk a 30-90 SNP szám már kielégítő

eredményt adhat. A mikroszatellitokkal szemben hátránya, hogy több SNP vizsgálatára van szükség, egyesek szerint 3-5-ször többre ahhoz, hogy megbízható eredményt kapjunk, különösen helyi, őshonos fajták vizsgálatakor. Mivel sokszor megtörténik, hogy a modern fajtákban polimorf SNP, a helyiekben monomorf, torz eredményt ad. Az elemszám meghatározásánál ajánlott figyelembe venni, hogy általában a kereskedelmi forgalomban kapható chippek, gyártótól függően (mezőgazdaságban legelterjedtebb az Illumina és Affymetrix) 24-48-96 minta egyidejű genotipizálására alkalmasak. Úgy vélem, hogy anyagi forrásaink (sokszor az árak sávós beosztásúak az SNP-k számától függően) maximális kihasználása érdekében ajánlott kiválasztani az elem és SNP számot. A gazdasági haszonállatok esetén populációnként 10-15 egyed bevonása elterjedt mind a magas, mind az alacsony denzitású chippek használatakor.

A *mitokondriális DNS* D-loop, citokróm-b, COI, COII régiók teljes vagy részleges szekvenálása is gyakori populáció genetikai vizsgálatoknál, mivel ehhez nem kapcsolódnak hisztonok, vagy más fehérjék, amelyek megvédenék a DNS-t a mutagén hatások ellen. Leggyakrabban, a legtöbb emlős legpolimorfabb, nem kódoló D-loop régiójának 300-800 bp hosszú szakaszát, vagy a teljes D-loop régiót szekvenálják és vizsgálják. Napjainkban egyre több kutatócsoport mitogénom vizsgálatot végez a pontosabb eredmény érdekében. A mitokondriális genom vizsgálatának legnagyobb hátránya, hogy eddigi tudásunk szerint nem tükrözi a sejtmagi genom változásait, ezért ajánlott a mtDNS és egy nukleáris marker közös használata. Mivel a mtDNS anyai eredetű, azért itt különösen figyelni kell a közeli rokon egyedek mintázásának elkerülésére. Vadon élő állatfajok esetén egy mintavételi helyről egy-két minta elég, sokszor nincs is lehetőség többre, és a vizsgált faj élőhely igényét is mindig szem előtt kell tartani. Ha anyagi forrásaink lehetővé teszik, teljes mtDNS-, illetve teljes genomszekvenálás is lehetséges. Az ilyen vizsgálatokhoz kisebb elemszám is elegendő, általában 3-5 egyed teljes genomszekvenálása szokott történni. Mára az árak is csökkentek, azonban az adatok kiértékeléséhez bioinformatikus munkája, illetve nagy kapacitású informatikai háttér szükséges. Napjainkban egyre több teljes genom elérhető online adatbázisokban, akárcsak az mtDNS szekvenciák.

Professzor úr különböző genetikai távolsáértékekre vonatkozó kérdéseire a válaszaim a következők. A különböző programcsomagok általában (de nem mind) azonos vagy hasonló modellekre, teóriákra alapozva, más genetikai távolsáértékeket számolnak (pl. Nei- Popgene, F_{ST} - Arlequin) és a szoftver alapbeállításának változtatásával tapasztalataim szerint finomításokat tudunk végezni, más végeredményt azonban nem kapunk.

A paraméterek megválasztásánál, változtatásánál szem előtt kell tartanunk a használt marker öröklődését, mutációs rátáját és a vizsgált fajt. Y kromoszóma vizsgálatok során Reynolds (R_{ST}) féle genetikai távolság érték ajánlott, míg STR markerek esetén a Nei féle és F_{ST} a leggyakrabban használt. Azonban napjainkban a Nei féle távolság nem a „legmodernebb” érték, mivel viszonylag egyszerűen „működik”, feltételezi, hogy a mutáció egyformán valószínű minden lókuszon és nem ajánlott, amikor a populációk eltávolodása csakis a genetikai sodródásnak köszönhető. Kevésbé használt, még az egyre gyakoribb genomszintű vizsgálatokban is. Több összefoglaló tanulmány jelent meg az utóbbi évtizedben a leggyakoribb genetikai távolság értékeket összehasonlítva. Összegezve megállapították, hogy az alacsony mutációs rátájú markerek könnyebben értelmezhetőek, illetve populációk közötti genetikai diverzitás vizsgálatok során továbbra is az F_{ST} ad megbízható eredményt. A genomvizsgálatok során egyre nagyobb mennyiségű adatok nyerésével pedig folyamatosan új megközelítéseket tesztelnek, mutatókat értékelnek a statisztikusok, matematikusok, bioinformatikusok a vizsgált populációk közti különbségek, illetve hasonlóságok megállapítására.

Mivel minden vizsgálat egyedi, ezért javaslom, hogy minden esetben a szakirodalom alapos

ismerete alapján, kritikusan alkalmazzuk a legelterjedtebb távolság értékeket, és ha adathalmazunk megkívánja, akkor módosítsunk a gyakorlaton, alkalmazkodjunk a körülményekhez.

Professzor úr kérdését, miszerint mely markerek, módszerek használatát, - gazdasági megfontolások figyelembe vételével – mikor és miért javaslom, részben megválasoltam a különböző módszerek esetén szükséges elemszámokra vonatkozó kérdésnél. Ennek alapján ismételtén azt tudom mondani, hogy a marker kiválasztása minden esetben egyedi mérlegelést igényel, és nagyban befolyásolják a vizsgálat céljai, körülményei és annak tárgya. Az egyes fajok/fajták genetikai diverzitásának jellemzésére az egyik legelterjedtebb markerek a *mikroszatellitek*. Más módszerekkel összehasonlítva, ennek kisebb és olcsóbb a laborigénye és a nyersadatok elemzése sem igényel bioinformatikust, illetve speciális számítógépeket. Hátrányuk viszont, hogy eloszlásuk nem olyan egyenletes, mint az SNP-ké, így vannak még nem lefedett genomterületek. Ugyanakkor szem előtt kell tartani, hogy az eredmények megbízhatósága érdekében javasolt markerszám és elemszám lehetőségekhez mért maximalizálása a költségek arányos növekedését is magával vonja. Ezért a vizsgálat megkezdése előtt mérlegelni kell az anyagi források figyelembe vételével, hogy mely marker alkalmazása adhat leginkább kielégítő választ a kitűzött cél megválaszolására. Azonban napjainkban is a többallélos mikroszatellit markereket a genetikai diverzitás vizsgálatok mellett, leggyakrabban termékeredet azonosításra (pl. melyik farmról, melyik állattól származik az adott hús); géntérképezésekhez, különböző természetes (pl. folyók, hegyek, völgyek) és mesterséges (pl. utak, hidak) akadályok genetikai struktúrát befolyásoló hatásának vizsgálatára ajánlják és széleskörben használják. Ugyanígy kiválóan alkalmasak származásellenőrzés meghatározására (különösen nagy értékű egyedek, tenyészállatok származás igazolása - versenylovak, tenyész bikák, hobbiállatok). Az *SNP* markerek mutációs rátája alacsony, így kiváló markerek egyes vizsgálati célok megválaszolására, vizsgálatuk gyors, könnyen ismételtető és nagy elemszám vagy markerszám esetén alacsonyabb fajlagos költséggel járnak. További előnye, hogy a labormunka könnyen automatizálható, szemben a korábban gyakran használt *izoenzimek*, *RAPD*, *RFLP* vagy *AFLP* markerekkel szemben, és kis mennyiségű DNS (10-20ng) is elég a vizsgálatához. A mikroszatellittekkel szemben azonban hátránya, hogy komolyabb labor- és informatikai infrastruktúra igénye van, ami jelentős költségnövelő tényező lehet. Ez utóbbi vizsgálatnál hatalmas előnyt jelent az STR-k poliallelikus volta. Az SNP-k egyre több populációgenetikai és filogenetikai kutatásban használt markerek. Az SNP HD és LD chipek pedig egyre több adaptáció és populációstruktúra vizsgálat eszközei. Eddigi tapasztalataim alapján az SNP-k és mikroszatellitek hasonló eredményt adtak a genetikai szerkezet vizsgálatok során. A *mitokondriális DNS* alkalmazása a kisebb anyagi ráfordítás igényű módszerek körébe tartozik, ugyanakkor különösen alkalmas marker fajazonosításra, hibridizáció igazolására, ősök, kolonizációs utak meghatározására vagy palacknyak-effektus meghatározására. A jövőben az egy régiót érintő vizsgálatok helyett egyre inkább elterjed a *mitogenom* vizsgálat. Még megemlítem a nemi kromoszómákon lokalizálódó STR rendszereket, melyek kiválóan alkalmasak az anyai -illetve az *Y kromoszómán* elhelyezkedőek az apai ágon- lévő ősök, valamint leszármazási vonalak meghatározásához. Így az eredet meghatározható akkor is, ha már nem él vagy nem pontosan ismert az apa, de az előző generációk hím tagjai még elérhetőek. Az elmúlt évtizedekben számtalan eljárást dolgoztak ki a DNS nukleotid sorrendjének megismeréséhez, ennek ellenére jelenleg is fejlesztenek ki új technológiákat, az egyre pontosabb, gyorsabb és olcsóbb leolvasás érdekében. Az új generációs szekvenálási technológiák (*NGS*) segítségével gyorsan kinyerhető (néhány óra alatt több százmillió bázis leolvasható), pontos genomikus adatok érhetőek el. Először minden read szűrése, majd az egyes darabok referenciagenomhoz hasonlítása (alignment), és az összeszerelés (assembly) következik. Ezután a szekvencia ismeretében következhet a részletes kiértékelés, amely

nagyon széleskörű vizsgálatok eredményeit adhatja, mint a génexpresszió mérése, SNP-k, új gének azonosítása; új fajok genomjának meghatározása stb. Napjainkban diverzitás vizsgálatok során egyre több szekvenálási technológiát alkalmaznak. Gyakori a szekvencián alapuló genotipizálás (GBS-Genotyping by Sequencing), amely során az SNP-k azonosítása és a genotipizálás egyidőben zajlik. A szekvenálás során sok rövid szekvencia leolvasása történik nagyobb lókuszonkénti lefedettséget eredményezve.

Úgy gondolom, hogy a közeljövőben az NGS technológiák használata még jobban elterjed és a hagyományos Sanger szekvenálás csupán az ellenőrzést fogja szolgálni. Sőt már napjainkban is a színvonalas nemzetközi szakfolyóiratokban közölni kívánt kéziratokban, nemzetközi kutatási pályázatokban ezek az elvárt módszerek a diverzitás és filogenetikai kutatások során is. Azonban ahogy ezt korábban is említettem, az NGS-k használata során kritikus tényező az adatok kiértékelése. Ahhoz, hogy megkapjuk a szekvenciát a hatalmas adathalmazból, nagy teljesítményű számítógépek, szakképzett bioinformatikusok szükségesek, akiknek folyamatosan képezniük kell magukat, mert sok esetben egy év alatt teljesen elavulnak a kiértékelő programok. Bioinformatikusból pedig hiány van világ szinten is.

Végezetül újból szeretnék köszönetet mondani Professzor úrnak értékes megjegyzéseiért, jóindulatú, de megalapozott kritikai észrevételeiért. Köszönöm, hogy eddigi kutatási eredményeim alapján Professzor úr megalapozottnak tartja pályázatomat az MTA doktora címre.

Debrecen, 2020. május 1.


.....
Dr. Kusza Szilvia