

Válasz Prof. Dr. Orbán László 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 fogadja őszinte és hálás köszönetemet a disszertációm tárgyilagos és építő jellegű bírálatáért! Nagyon sokat jelent nekem, hogy Professzor úr vállalta az opponensi felkérést és elolvasta a munkámat. Válaszaiban igyekszem reagálni az összes felmerült kérdésére és megjegyzésére.

Professzor úr észrevételeire adott válaszaim a következők:

Professzor úr ábrák megnevezésének pozíciójára vonatkozó megjegyzését köszönöm. Egyúttal itt szeretnék reagálni Professzor úr bírálatában később megjelenő fotóra vonatkozó megjegyzésére, miszerint azt ábraként kellett volna kezelnem, illetve az internetes hivatkozások mikéntjére. Az értekezésre vonatkozóan általános formai követelmény nincsen, és a magyar tudományos közleményekben található példát a fent említett és általam használt formákra is, ezért használtam azokat. De még egyszer köszönöm a megjegyzést, a későbbiekben már ezt a szellemiséget fogom követni munkáimban. Idetartozónak érzem azt a megjegyzést is, miszerint az ábrákat, táblázatokat magyarázó bekezdések végén utaltam az illusztrációra, az első mondat vége helyett. Köszönöm a megjegyzést, a későbbiekben erre is jobban figyelek.

Sajnálom, hogy nem illusztráltam minden vizsgált fajt/fajtat és ezért hiányérzet maradt Bírálómban. Igyekszem ezt szóbeli előadásomban pótolni. Törekedtem arra, hogy minden később rövidítésként is használt módszer, mutatószám az első említéskor kifejtésre és magyarázatra kerüljön. Sajnos úgy tűnik, hogy ez minden igyekezetem ellenére sem sikerült mindenhol, amit sajnálok.

A Network analízisekhez használt génbanki szekvenciák azonosítószámai azért kerültek felsorolásra a szövegben önálló Melléklet helyett, mert utóbbi esetben az értekezés maximum 150 oldalnyi terjedelmi korlátján túlhaladtam volna. A dolgozat megírásakor ugyan így kezdtem el dolgozni, azonban a táblázatok tömege a kiegészítő információkkal már több mint 30 oldal terjedelmű lett volna. Ezért döntöttem inkább az azonosítók felsorolásszerű közlése mellett.

Köszönöm Bírálómnak a dolgozat stílusára, tagolására, szerkesztésére, illusztrációira vonatkozó pozitív megjegyzéseit, és sajnálom, hogy minden igyekezetem ellenére szóismétlések maradtak az Anyag és módszer fejezetekben, illetve, hogy a szöveg tördelése sem volt mindenhol kielégítő. A 28 oldalon keresztül felsorolt Irodalomjegyzékben sajnálattal vettem észre, hogy valóban maradtak hiányosságok, főképpen a konferencia anyagok esetén. Továbbá, hogy a 23. ábrán, a vaddisznó haplotípusok polimorf helyeinek bemutatásánál kisebb betűméretet használtam, és így rontottam a láthatóságon. Az említett 23. ábrán nem látható InDel pozíció egy elírás következménye, amit mélységesen sajnálok! Köszönöm Professzor úrnak, hogy az értekezés nagyon alapos és részletes vizsgálata során rávilágított ezekre a hiányosságokra, mert ezzel hozzásegít ahhoz, hogy a jövőben ilyen szempontokból is még nagyobb odafigyeléssel ellenőrizsem munkáimat.

Úgy gondolom, hogy ha a tézisekben megjelenő táblázatot használtam volna az Anyag és Módszer fejezetben, úgy nem lettem volna a szükséges mértékben részletes és pontos az egyes fejezetekben.

Köszönöm és tisztelettel elfogadom Professzor úr címre vonatkozó megjegyzését. Törekedtem a cím rövid, témát átfogó megfogalmazására, amire ugyancsak tökéletes példát

javasolt Bírálóm is. A rövidítések, táblázatok és ábrák jegyzéke szintén a terjedelmi korlátok miatt nem szerepelnek az értekezésben.

Örömmel tölt el, hogy a Bevezetés fejezetet elfogadja Professor úr. Az alkalmazott módszerek jellemzésére, indoklására nem is gondoltam ebben a fejezetben, de teljes mértékben elfogadom az észrevételt. Köszönöm az Irodalmi áttekintésre vonatkozó pozitív szavakat is. A román szürkemarha létszámára vonatkozó adatok a 28. oldalon megtalálhatóak. A vaddisznó haplotípusok elterjedését bemutató térképes ábrák több nemzetközi szacikkben megtalálhatóak. Sajnálom, hogy ezt kihagytam és hiányolja Bírálóm. Ugyanígy sajnálom, hogy az értekezésben az aranysakál faj neve néhány helyen pontatlanul szerepel. Hálásan köszönöm a pontosítást! Örömmel tölt el, hogy a dámszarvasra vonatkozó fejezetrész elnyerte Bírálóm tetszését. Az Anyag és módszer fejezeteknél a pontos leírásra törekedtem az ismételhetőség érdekében. A genomiális DNS izolálási módszereknél valóban nem minden esetben jeleztem a módszer típusát, és csak a referenciát adtam meg. Próbáltam nem elveszni a részletekben, de egyetérték Professor úrral abban, hogy ez segítette volna az olvasókat. A vaddisznó fajon végzett kutatás izomszövet minták felhasználásával történt. Az Eredmények és azok megvitatása fejezetben a közép-, kelet- és dél-európai juhajtásokra vonatkozó kutatásban a klaszteranalízis nem adott teljesen konzisztens eredményt, de a legvalószínűbb klaszterszámnak a $K=10$ mutatkozott. A referált 2007-ben megjelent szacikk –amely 57 európai és közel-keleti juhajtást vizsgált, köztük néhányat az általunk is vizsgáltakból– eltérő eredményének oka az eltérő mikroszatellit és elemszámmal, illetve a nem ugyanazon állományok mintázásával magyarázható. Ezek a fajták, ahogy értekezésemben is jelezni próbáltam, inkább fajtacsoportként kezelendők. A fajták közötti génáramlás, különösen a Balkán régióban, igen intenzív, sokáig nem volt jellemző a térségben a célzott tenyésztés, így nem csoda, ha a különböző vizsgálatok eredményei nagyobb szórást mutatnak, hiszen a különböző kutatócsoportoknak nagy valószínűséggel nem ugyanazon egyedek mintázásához van hozzáférésük. A két régióból származó török kivircik állományok, nem csak cigája juhokkal álltak közeli genetikai távolságra, hanem a török gokceada vagy szerb pramenka fajtával is. Erre alapoztam, kijelentésem. Sajnálom, hogy Professor úr nem tartja a célkitűzésekhez kapcsolódónak a hortobágyi racka fajtáról szóló esettanulmány végén a fajtával végzett jelenlegi kutatásainkat. Szerettem volna szemléltetni, hogy a kutatásaimat sohasem tekintem befejezettnek, és mindig igyekszem bővíteni az eredmények körét, új megközelítésekkel, új mintákkal és új módszerekkel, elemzésekkel. Az általunk vizsgált román szürkemarha mtDNS szekvenciákat összevetettük 605 különböző fajtába tartozó szarvasmarha szekvenciával, amely adatkészlet tartalmazta a magyar szürke (EU982211-EU982290, GQ129207), a bolgár szürke (KF373013- KF373019) és az ukrán szürke (GQ129208) fajtákat, azok releváns génbanki mtDNS szekvencia részleteit. A szekvenciák összeillesztése után 377 bp hosszú régióval dolgoztunk és összesen 260 haplotípust detektáltunk. Egyértelmű földrajzi, mai országhatároknak megfelelő elkülönüléseket nem találtunk, így nem közöltük az eredményt. A napjainkban megkülönböztetett ukrán, román és magyar szürkemarha egyedek is keverten tartoztak az egyes haplotípusokba. A bolgár szürkemarha volt az a fajta, aminek egyedei több külön haplotípust alkottak. Sajnálom, hogy Bírálóm szerint a vaddisznó esetében a SAMOVA analízis eredményét bemutató ábrát és az azt magyarázó szöveget nem részleteztem eléggé. Illetve a filogenetikai analízis értelmezésénél valóban hangsúlyosabban kellett volna kifejeznem, hogy miért nem tartom az előzetes várakozásoknak megfelelőnek az eredményeket. A genomi szekvenciák elemzésén alapuló irodalmi adatok alapján 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 terjedt ki. A saját mitokondriális adatok alapján, az effektív populáció méret változását bemutató Bayesian skyline plot (13. ábra) alátámasztja ezt a konklúziót. Azonban csak akkor látnám saját

adataink által is kellően bizonyítottak a jelenséget, ha a filogenetikai fán (12. ábra) is megjelent volna egy nagy közös haplotípus, ami a feltételezett refúgium területekhez kapcsolódik.

A fejezet végén szereplő két bekezdés a korábban már kifejtett szellemiség jegyében készült, melyben kitekintést szerettem volna adni a további vizsgálatok kontextusairól, távlatairól. Utólag belátom, hogy nem volt szerencsés ezeket itt szerepeltetni, talán egy önálló alfejezet cím alatt jobban megfértek volna, de a továbbiakban mellőzni fogom az ilyen tartalmakat.

Sajnálom, hogy a mezei nyúllal foglalkozó esettanulmányban a filogenetikai fák ábrázolásának módja nem kielégítő Bírálómnak, de nagy ábrákról van szó és a láthatóságot is meg kellett őriznem, ezért kerültek külön oldalakra.

Professzor úr kérdéseire adott válaszaim a következők:

K1) Van-e annak speciális oka, hogy a különböző fajokból, de azonos forrásból (pl. tépett szőr) származó minták esetén eltérő DNS izolálási eljárásokat használtak?

A többféle izolálási protokoll alkalmazását a gyakorlati munka természete vonta maga után. Ugyanis a genomiális DNS izolálások nem ugyanabban a laboratóriumban történtek minden kutatás esetén, és az egyes laborokban, de akár még azonos laboratóriumon belül is, más-más időben, más-más protokoll volt az alkalmazott módszer. Az izolálási módszerek folyamatosan fejlődnek. Ha lehetőségünk van egy-egy új kit, módszer kipróbálására, élünk a lehetőséggel, mert minél jobb hatásfokú módszert sikerül találni, annál nagyobb lehetőségek nyílnak a mintázásban, ami pedig az egész kutatásra pozitív hatással lehet. Előfordul sokszor az is, hogy ugyanaz a protokoll, kit nem működik minden fajnál és módosítani kell az egyes lépésein. Azonban egy vizsgálaton belül, azonos mintatípus esetében ugyanazon izolálási módszert használjuk az összes mintában.

K2) A vizsgált fajok és fajták esetében melyeknél látja szükségességét a további vizsgálatok kiterjesztését nagyléptékű genomi eljárásokra? Mely eljárásokat alkalmazná ezekben az esetekben és miért?

Mindegyik fajjal/fajtaival végzett kutatás folytatható, főleg, mivel sok faj/fajta esetén a mintagyűjtés időtartama hónapokban, években mérhető, így célunk minél több, a gyakorlati szakembereknek és tudományos életnek is hasznosnak ítélt kutatást elvégezni használatukkal. Ezt az egyes fejezetrészek végén jelezni is kívántam, leírva, hogy a kutatás milyen irányban folytatódik. Mindig anyagi forrástól, az aktuális pályázati kiírások témájától függ, hogy milyen irányba próbáljuk vizsgálatainkat kiterjeszteni, szem előtt tartva a gyakorlatnak is átadható eredmények felhasználhatóságát, illetve kutató lévén, a publikációs lehetőségeket is. A közelmúltban hatalmas lehetőségek nyíltak a kutatók számára a genomikai vizsgálatok egyre szélesebb körű elterjedésével. Az újgenerációs szekvenálás (NGS) –nagy mennyiségű nyersadatot eredményezve– és a különböző denzitású SNP-chipek –nagy számú SNP-re történő genotipizálás– használatával teljes genomra kiterjedő eredményeket kapunk, melyek lehetővé teszik a genom alapú szelekciót, segítve az állatnemesítők munkáját. Ezen vizsgálatok egyre elérhetőbbek kisebb anyagi forrással rendelkező laborok, kutatók számára is, hiszen egyre több szolgáltató cég veszi palettájára ezeket az új módszereket, így az infrastruktúra felállítása, nagy teljesítményű számítógépes háttérpark sem szükséges, sőt felesleges is, hogy minden laboratóriumban rendelkezésre álljon, a szakképzett személyzetről nem is beszélve. Ez a körülmény igen jó lehetőségeket nyújthat a forrásmegosztásokra és az együttműködések keretében történő kutatásokra az egyes munkacsoportok között.

Napjainkban az alkalmazott kutatások preferálása miatt a kutatók inkább a domesztikált állatfajokat vizsgálják, azok genetikai hátterének ismerete a potenciális gazdasági előnyök

miatt elsőbbséget élvez a vadon élő fajokéval szemben. Az általam vizsgált domesztikált fajok mindegyikére létezik kereskedelmi forgalomban elérhető, különböző denzitású SNP chip (néhány tízezer-százezer SNP), amelyekkel genotipizálás szükséges lenne az általam is vizsgált fajtákra, elsődlegesen diverzitás vizsgálatokhoz, mivel a genotípusok termelési tulajdonságokkal való összevetése ezeknél a fajtáknál nem igazán releváns, azonban a kapott eredményekkel az állattenyésztők, nemesítők munkáját nagyban segíthetjük. Egy-egy populáció genotipizálása egyébként is folyamatos felülvizsgálatot igényel, hiszen a chipeket folyamatosan frissítik. Jó példa erre az állatorvostudományi felhasználás, mert folyamatosan megjelenhetnek új mutációk betegségekkel összefüggésben, melyeket egy korábbi chip nem fog már kimutatni.

A vadon élő fajok vizsgálatakor sok esetben a hozzá legközelebbi rokon domesztikált fajra kidolgozott arrayt használják pl. kutya chip farkashoz, aranysakálhoz, sertés chip vaddisznóhoz vagy szarvasmarha chip európai vagy amerikai bölény vizsgálatához. A genotipizálási árak az utóbbi 10 évben drasztikusan csökkentek így egyre inkább elérhetőek a kisebb anyagi forrással rendelkező kutatócsoportok számára is. Pl. 2011-ben egy mintára Canid SNParray 170 000 SNP-re kb. 250 EUR-t fizettünk, addig napjainkban 500 000 SNP-re kb. 100 EUR az ár. Ugyanez az áresés jellemzi a domesztikált állatfajokra kidolgozott különböző denzitású chipekkel végzett genotipizálási költségeket is (jelenleg kb. 30-100 EUR között mozognak az árak a chip denzitásától, fajtól függően).

A vadon élő állatfajok esetén, ahogy fentebb már említettem, általában a közeli rokon háziállatfajra kifejlesztett chipet használják, azonban szakirodalmi adatok alapján elmondhatom, hogy ezek nem minden esetben olyan sikeres genotipizálások mint azon domesztikált faj esetén, amire a chipet kifejlesztették. Ezért a vadon élő fajokra inkább a teljes genom szekvenálási (WGS) módszereket javaslok. A súlyosan veszélyeztetett fajok, mint például a viza (*Huso huso*), túzok (*Otis tarda*), európai bölény (*Bison bonasus*) vagy az európai nyérc (*Mustela lutreola*) minél több, még fennmaradt egyedének bevonásával, referencia genom ismeretében alacsony lefedettségű referenciagenom hiányában restriktív helyhez kötött DNS szekvenálással (RADseq) végzett teljes genom szekvenálás is adhat annyi új eredményt, ami nagy lehetőséget rejt a fajmegőrzési- és az állatkertekben zajló tenyésztési munka számára. Ezek a fajok erőteljes drift hatásnak vannak kitéve, ami miatt súlyosan csökkenhetett alkalmazkodóképességük is. A teljes genom szekvenálásával kapott információ tömeg korábban nem látott részletességű elemzést tesz lehetővé, így felmérhetővé és menedzselhetővé válnak a kockázati faktorok az érintett fajok esetében, mely ismeretek alapvető fontosságúak lehetnek a sikeres megőrzési, visszatelepítési erőfeszítések kapcsán.

A WGS segítheti az általam is vizsgált vadon élő fajok esetén is fellépő hibridizáció (pl. házi sertés-vaddisznó, havasi nyúl-mezei nyúl, kutya-aranysakál stb.) jelenségének vizsgálatát, megbecsülhetjük akár az introgresszió mértékét is. Amennyiben rendelkezésre áll referenciagenom poolseq módszerrel, populáció szinten viszonylag kis mennyiségű DNS használatával elég nagy genomi lefedettségű (>70%) eredményt kaphatunk, és több millió SNP-t azonosíthatunk. Egy-egy faj evolúciós történetének, domesztikációjának (pl. kutya, házi sertés) megismeréséhez, referenciagenom ismeretében a teljes genom újraszekvenálással több száz akár ezer egyed is vizsgálható. Mivel egyre több teljes genom elérhető (az általam vizsgált fajok közül tudomásom szerint egyedül a dámszarvasé nem, így azon először de novo szekvenálást végeznék) online adatbázisokban, akár csak a mtDNS szekvenciáké, így összehasonlítható vizsgálatok végezhetőek kevés saját minta szekvenálásával is.

Az általam is vizsgált vadon élő fajok már több kutatócsoport új genomikai módszerekkel végzett vizsgálatának alanyai. Teljes genom vagy mitogenom szekvenálásból SNP-eket azonosítanak, illetve szekvenciákat elemezve határozzák meg a vizsgált fajok eredetét, filogenetikai fán helyezik el őket, más fajokkal történő hibridizációt és annak fokát becsülik,

előrejeleznek modellszámítások révén demográfiai változásokat, bizonyítanak múltbeli eseményeket.

Összefoglalva elmondhatom, hogy az általam vizsgált mindegyik faj/fajta esetén végezhető nagyléptékű genomi eljárás, a kutatás céljától függően megválasztott módszerrel.

K3) Amennyiben rendelkezésére állna az ehhez szükséges anyagi támogatás, az értekezésében vizsgált fajok közül melyiknek a genomját szekvenálná meg, és miért?

A kérdés kapcsolódik az előzőhöz, így annak folytatásaként is értelmezhető.

Ha korlátlan anyagi lehetőségeim lennének és választhatnék, nem fajt, hanem a dolgozatomban is vizsgált őshonos domesztikált fajták mindegyikén teljes genom szekvenálást végeznék/tetnék. Ezek a fajták a kis gazdasági értékük miatt kevésbé vizsgáltak a modern genomikai eszközökkel, pedig ezek a fajták azok, amelyek tökéletesen alkalmazkodtak a helyi klimatikus viszonyokhoz, így a napjainkban kurrens témának számító, éghajlatváltozáshoz való alkalmazkodás kulcsfontosságú változatait hordozhatják. Rendkívüli ellenállóképességük a különböző betegségezisztenciákkal kapcsolatos vizsgálatok ideális alányává is teszik őket. Ezen túlmenően a magyarországi állattenyésztés és élelmiszer-előállítás kitörési pontja elsősorban nem a mennyiségi paraméterek javításában, hanem a minőség fokozásában rejlik, és ezen a területen egyedülálló lehetőséget rejtenek őshonos fajtáink. Akár jelenlegi állapotukban, akár új genotípusok kialakítása által, de felhasználásukkal különleges minőségű termékek fejleszthetőek. Például a gasztronómiai érték és a pozitív élettani hatású beltartalmi tulajdonságok párhuzamos fejlesztése a zsírsavösszetétellel összefüggő genetikai háttér vizsgálata által. Ezt a munkát hatékonyan tudnánk támogatni a modern genomikai eszközök felhasználásával.

Bízom észrevételeire, kérdéseire adott válaszaim elfogadásában és köszönöm, hogy Professzor úr MTA Doktori értekezésemet alkalmasnak tartja nyilvános vitára.

Debrecen, 2020. június 03.

Kusza Szilvia

Dr. Kusza Szilvia