

Válasz Prof. Dr. Patócs Attila opponensi véleményére

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

Tisztelt Professor Úr!

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani, amiért elvállalta értekezésem bírálatát, időt szánt annak aprólékos tanulmányozására. Köszönöm segítő szándékú kritikáit, észrevételeit, megjegyzéseit.

Professzor úr észrevételeire adott válaszaim a következők:

Egyetértek a Bírálóval abban, hogy értekezésem szerkezeti felépítése nem a klasszikus formát követi, azonban ismereteim szerint nem létezik egzakt formai követelmény, amit követhettem volna. Megítélésem szerint ez hasznos dolog, mert teret biztosít az egymástól nagyon különböző tudományos munkák mind teljesebb körű összefoglalására és bemutatására is. Esetemben a vizsgált fajok/fajták, a szűkebb vizsgálati területek, a konkrét vizsgálati célkitűzések és részben a vizsgálati módszerek sokfélesége indokolta a klasszikusnak tekintett formától való eltérést, mivel az érthetőséget, a követhetőséget mindenekelőtt szem előtt kívántam tartani. Szándékom szerint az önálló esettanulmányokat egységes keretbe foglalja a klímaváltozás jelentette kihívás megkerülhetetlen problémaköre, ugyanis minden bemutatott vizsgálat alapkérdései ebből eredeztethetőek. Szintén a kohéziót erősíti, hogy az összes bemutatott vizsgálat a Kárpát-medence természetföldrajzi régiójában élő állatpopulációkban történt, így egy sok aspektusból megvilágított képet kaphatunk az említett földrajzi régió állatvilágának genetikai sokféleségéről. Véleményem szerint csak ez a holisztikus megközelítés segít hozzá minket ahhoz, hogy megértsük a közvetlen környezetünket jelentő élővilág működését a klímaváltozás által okozott dinamikus változások közepette, és hogy ezáltal nekünk is esélyünk nyíljon a hatékony alkalmazkodásra. Tisztelt Professor úr bírálatát olvasva belátom, hogy a fenti gondolatokat talán szerencsésebb lett volna még inkább kihangsúlyozni a bevezető részben.

Egyetértek Bírálóm azon megállapításával, hogy az alkalmazott módszerekben sok a hasonlóság, és párhuzamosságok vannak, azonban meg kell jegyezzem azt is, hogy legalább ennyi eltérés is előfordul az egyes vizsgálatok között. Egyedileg eltérnek a vizsgálatokban felhasznált anyagok, elemszámok, vegyszerek, az elemző szoftverek beállított paraméterei, de akár maguk az elvégzett analízisek is. Az érthetőség és az értékelhetőség érdekében ezeket mindenképpen szükséges volt megadni az értekezésben. Ha egy összevont anyagok és módszerek fejezetet alakítok ki, akkor vagy csak egy nagyon általános összefoglalást adhattam volna ezekről a körülményekről, és később az esettanulmányokban ismételve, specifikusan kellett volna megadnom ezeket, vagy egy akkurátus leíró részben mindent bemutatok egymás mellett, de abban az esetben véleményem szerint könnyű lett volna elveszni a részletekben, a könnyű tévesztés lehetősége állt volna fenn, és álláspontom szerint egy rosszul követhető, roncsolt struktúra jött volna létre az értekezésben. A tézisekben már nem volt sem tér, sem szükség ilyen szintű részletezésre, így ott már a javasolt összevont, táblázatos formában tüntettem fel a nevezett részeket. Értve és elfogadva Bírálóm álláspontját, a tervezett ppt előadásomban szintén ezt a közlési módot fogom választani.

Professzor úr kérdéseire adott válaszaim a következők:

- 1. mint orvosgenetikus érdekel, hogy a vizsgált fajtákban mennyire lehet nyomkövetni olyan rendellenességeket, betegségeket, amelyek genetikai okokra vezethetők vissza? A tenyésztett fajták között nem alakult ki olyan betegség/rendellenesség, ami az adott fajta eltűnéséhez vezetett?*

A gazdaságos termelés érdekében valamint a tenyésztési eredmények hatékony és gyors fejlesztéséhez egyre nagyobb szükség van a gazdaságilag fontos értékmérő tulajdonságok nemcsak élettani, de genetikai hátterének megismerésére is. E tulajdonságokat (tej-, hús-, tojástermelés, tej összetétel, húsminőség, betegségekkel szembeni rezisztencia, hőstressz) meghatározó gének feltérképezése és az ezekre végzett közvetlen szelekció olyan eszköz a kezünkben, mellyel egységnyi idő alatt nagyobb genetikai előrehaladást érünk el, mint a hagyományos szelekcióval. A markerek, gének segített szelekció (MAS, GAS) lehetőséget ad például olyan tulajdonságok vizsgálatára, melyek az élet késői vagy épp nagyon korai szakaszában nyilvánulnak meg (pl. hasznos élettartam, tejtermelés), vagy ha a tulajdonság csak az egyik ivarban fejeződik ki (tejtermelés), vagy ha mérése az állat pusztulásával jár. Napjainkban a klasszikus állattenyésztői módszerek (szelekció) egyre több esetben kiegészülnek vagy lecserélődnek a genetikai eszközök/markerek használatával. A gazdasági haszonállatfajokban a termelési tulajdonságokon túl mind több azonosított genetikai rendellenességre, betegségre is elérhető DNS teszt.

Disszertációmban őshonos fajtákat vizsgáltam, amelyek általános tulajdonsága a betegségekkel szembeni rendkívüli ellenállóképesség, így nem jellemzőek rájuk az intenzív fajták megbetegedései. Azonban, a vizsgált fajokban leggyakrabban előforduló örökletes megbetegedéseket, melyekre vannak DNS tesztek napjainkban, röviden bemutatom.

Ma Magyarországon kötelezően elvégzendő a juhok surlókorra való fogékonyság vizsgálata. Ez egy abnormális prionfehérje okozta betegség. Azok a juhok és kecskék, melyek fogékonyak a betegségre általában fiatal korban fertőződnek meg, a méhlepényen keresztül, vagy másik, fertőzött anyák ellési váladékán keresztül. Nincs ellene kezelés, vakcina. A kosok is megfertőződhetnek, de nem terjesztik, csak örökíthetik a betegséggel szembeni fogékonyságra való hajlamot. A normál prion fehérjét kódoló gén (PrP) adott kodonjainál (136- alanin (A)/valin (V), 154- arginin (R)/hisztidin (H), 171-arginin (A)/glutamin (Q)/hisztidin (H) fellépő variációk befolyásolják a surlókorral szembeni fogékonyságot, illetve rezisztenciát. Ez alapján öt rizikócsoportot határoztak meg. R1 (ARR/ARR) esetben nagyon kicsi a megfertőződés valószínűsége, míg R5 esetben a legnagyobb a betegség kockázata (ARH/VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ). Két tenyészetből származó 64 őshonos cigája vizsgálatával az ismert 15 prion genotípusból hatot azonosítottak. Az egyedek legnagyobb százaléka, az R3 (45,31%) és R4 (43,75%) csoportba tartozott, míg a legnagyobb rizikófaktorú R5 csoportba 1,56%-uk. A fajtát így a surlókorral szemben közepes ellenálló képességűnek minősítették. Négy tenyészetből, összesen 140 hortobágyi rackát vizsgálva, a legnagyobb surlókór fogékonysággal jellemzett VRQ/VRQ genotípus hiányzott. A legtöbb vizsgált egyed itt is az R3 (48,57%) és R4 (32,14%) csoportokba tartozott, az R5-be 3,57%-uk, míg az R1-be 5%-uk. A vizsgálat eredménye szerint, a hortobágyi racka fajta is a surlókór fertőzéssel szemben közepesen ellenálló fajtának tekinthető (Fésüs et al. 2004. A juhok surlókórja: 2. A priongenotípusok gyakorisága hazai őshonos juhállományokban. Magyar Allatorvosok Lapja 11:670-675.).

Nagy gazdasági kárt okozhatnak a lótenyésztőknek, tartóknak, különösen versenylovak esetén, a következő genetikai betegségek, melyekre tesztek elérhetőek: glikogén összekapcsoló enzim hiány (GBED), lovak örökletes regionális bőrgyengesége (HERDA), hyperkalaemiás periodikus paralízis (HYPP), malignus hyperthermia (MH), poliszacharid tárolási miopátia (PSSM) és letális fehércsikó-szindróma (LWOF). A glikogén összekapcsoló enzim hiány nevű betegség okozója egy autoszomális, recesszíven öröklődő mutáció a GBE1 génben. Ennek hatására a glikogén összekapcsoló fehérje hiánya lép fel, képtelenné téve a glikogén raktározását és mobilizálását. A lovak örökletes regionális bőrgyengeségét egy autoszomális recesszíven öröklődő betegség, melyet olyan génmutáció okoz, ami a prokollagén kollagén szintézisében vesz részt. A bőr elvékonyodik, gyenge, könnyen szakadó lesz, így igen sérülékennyé válik. A hyperkalaemiás periodikus paralízis ugyancsak

autoszomális, recesszíven öröklődő betegség, melyet egy-, a vázizomzat egyik transzmembrán fehérjéjét kódoló génben, a SCN4A génben bekövetkező mutáció okoz. A malignus hyperthermia egy ritka örökletes rendellenesség, a vázizmok anyagcserezavarát és károsodását okozhatja. A ryanodin receptor 1 (RYR1) gén eddig 31 mutációjáról bizonyított, hogy malignus hypothermiát okoznak. A poliszacharid tárolási miopátiának két típusát különböztetik meg: PSSM 1, melynek genetikai faktorok állnak a háttérben és a PSSM 2, amely tüneteinek kialakulásának háttere még nem tisztázott. A PSSM1 esetén a vázizom glikogén szintáz (GYS1) génjében következik be pontmutáció. PSSM 1 nagyobb gyakorisággal fordul elő hidegvérű illetve azokkal keresztezett lovakban. A letális fehércsikó szindróma autoszomális recesszív öröklődésű betegség, amelyet az endotelin-B receptorgénben bekövetkező TC→AG csere okoz. Mind a hucul mind a gidrán lófajta betegségekkel szemben rendkívül ellenállóak. A fentebb leírt ló fajtában leggyakrabban előforduló genetikai betegségek nem jellemzőek rájuk de tudomásom szerint nem is végeztek még ilyen jellegű genetikai tesztek ezeken a fajtákon.

A *szarvasmarha* fajtában genetikai tesztek elsősorban a világon leginkább elterjedt, intenzív tejtermelő holstein-fríz fajtában kimutatott örökletes betegségekre léteznek. A leukocita adhéziós deficiencia (BLAD) a CD18 gén 383.pozíciójában bekövetkező adenin→guanin csere következménye, mely az immunrendszer elégtelen működését eredményezi. Nem fertőző, örökletes, homozigóta formában letális terheltég. Magyarországon a holstein-fríz tehének 9,8%-a, bikák 11,1%-a volt hordozó (Zsolnai és Fésüs 1996. Anim. Genet. 27: 207-209.) Az uridin monofoszfát szintetáz deficiencia (DUMPS) ugyancsak holstein-fríz fajtát veszélyeztető betegség, mely a hiányos pirimidin szintézis és így nukleinsav szintézis eredménye. A legtöbb hordozó egy közös amerikai bikától származik, így jól szemlélteti egy bika túlzott használatának felelősségét. Magyarországon ritka megbetegedés (1000 egyedből 2 heterozigóta). Ugyancsak elérhető genetikai teszt a ritkán előforduló a CVM (Complex Vertebral Malformation), illetve a citrullinémia betegségekre is. A fent említett betegségekre tudomásom szerint nem végeztek tesztek a román szürkemarkarhában, de nincs is nagy esély magas százalékban való előfordulásukra.

2. *Megfigyelhető-e a populáció méretének dinamikus változása (akár expanzió, akár kihalás irányába) a vadon élő fajok esetében és ha igen, ez visszavezethető-e a genetikai diverzitásra? Tervezi-e esetleg az ilyen jellegű adatok bevonását a további tudományos munkájába?*

Professzor Úr egy nagyon izgalmas, egyben összetett témát érint kérdésében, amire az alábbiakban igyekszem választ adni.

A vadgazdálkodásban rendkívül fontos a fajok genetikai diverzitásának és szerkezetének pontos ismerete, mivel a genetikailag izolált populációknak a genetikai sokféleség elvesztése mellett a beltenyészettel és csökkent szaporodási képességgel is szembe kell nézniük, amik által csökken a természetes vagy akár az antropogén eredetű környezeti változásokhoz való alkalmazkodás képességük. Ezek a jelenségek végső soron az állományok kipusztulását is eredményezhetik. Általánosságban elmondható, hogy a hazai *nagyvadállomány* folyamatos, erős növekedést mutat. Ennek oka vélhetőleg a mezőgazdasági technológiák és módszerek megváltozása és a nagyvadnak kedvező élőhelyek bővülése (erdősítés, monokultúrák), valamint a vadgazdálkodás fejlődése. A gímszarvas (*Cervus elaphus*) és vaddisznó (*Sus scrofa*) állomány világszerte növekszik. Genetikai vizsgálatok azt mutatják, hogy mindkét faj magas diverzitással rendelkezik. A dámszarvas (*Dama dama*) és muflon (*Ovis aries orientalis*) Magyarországra betelepített faj, állományuk 60 év alatt megtízszereződött. A magyar *apróvadállomány* a 60-as évektől kezdve szinte folyamatosan csökken, némelyik fajt már vadászni sem lehet, vagy csak különleges keretek közt (kibocsátott állomány 1/10-e).

Ennek okának a nagyüzemi mezőgazdaságot tartják, ahol több száz hektáron monokultúrát termesztnek, sok a gépi zavarás és jelentős a kemikália felhasználás, ami a táplálékbázis csökkenését eredményezi. A predátorok létszámának emelkedése sem kedvez ezen fajoknak. Így a néhány 10 hektáron élő apróvadaink sem bűvó, sem megfelelő táplálkozóhelyet nem találnak, a fácán- és fogolycsibéknek fontos rovarok is eltűnnek a területről (kultúrsivatag). Drasztikus csökkenés jellemzi a fácán (*Phasianus colchicus*) és fogoly (*Perdix perdix*) létszámot is. A fogolyállomány a másfél millióról 10-11 ezer példányra csökkent. A fácánállomány a hetvenes évek második felében, a kibocsátások után elérte a 2,2 milliót, ma 500 ezret tartunk nyilván. Anyai vonalon magyar és szerb fácánok vizsgálatokor alacsony szintű diverzitást mutattunk ki. A monokultúrás, gépesített növénytermesztés töredékére csökkentette a mezei nyúl (*Lepus europaeus*) élőhelyének kiterjedését is, jelentősen csökkentve így annak létszámát is, ami 1,2–1,3 millióról redukálódott 400 ezerre. Ennek ellenére a Kárpát-medencén belül Magyarország területén él a legnagyobb egyedszámú és egyedsűrűségű mezei nyúl populáció. Jász-Nagykun-Szolnok, Csongrád és Békés megyékben a denzitás 15-30 egyed/100 hektár.

A balkáni gerlét (*Streptopelia decaocto*) tartják a világ egyik legsikeresebben terjeszkedő gerinces fajának. Természetes expanziójának sikerét vizsgálva felmerült a lehetséges okok között a genetikai háttér is. A faj genetikai sokféleségére vonatkozó eddigi eredmények azonban nem okoztak meglepetést abban az értelemben, hogy a genetikai diverzitás mutatók és a genetikai szerkezet tekintetében hasonlóan mutatkoztak más, robbanásszerű terjeszkedést megvalósító fajok eredményeihez. A kutatók a balkáni gerle rendkívüli elterjedésének okait így a faj tág alkalmazkodóképességével és a környezet számára kedvező megváltozásával magyarázzák. Volt PhD hallgatóm is vizsgálta a fajt, mely vizsgálat alapján a fajon belüli genetikai variancia nincs összefüggésben a földrajzi elterjedéssel. Sikerrel mutattuk ki a fajt ért alapító hatás genetikai nyomait, mely a gyors expanzió és hirtelen populáció növekedés eredménye. Bizonyítottuk továbbá, hogy populációk között kismértékű genetikai távolságok vannak. Ezáltal molekuláris genetikai módszerekkel is alátámasztottuk a faj terjedésével kapcsolatos eddigi elméleteket és megfigyeléseket.

Néhány megfigyelés, vizsgálat igazolta, hogy az egyes fajok hogyan védekeznek a genetikai beszűkülés ellen. Például a fogoly egy fészekaljon (családon) belül nem választ magának párt. Mivel a fogoly családoknak nem nagy az otthonterületük, kellő populáció sűrűség kell ahhoz, hogy a családok találkozzanak, és így keveredve tavasszal párba állás történhessen. Ha a populáció denzitása 2 egyed/100 ha alá csökken (kritikus állománysűrűség), a területen a fogolyállomány hamarosan összeomlik. A vaddisznók, a tavasszal megszületett kan malacokat, akik októberre kansüldökké válnak, a kondán belül kiközösítik, mivel hamarosan ivaréretté válnak (ez kondíciótól is függ). Így kerül el, hogy az ivarérett kansüldők bebúgják novemberben-decemberben a nőivarú testvéreiket.

A fajok közötti introgresszív hibridizáció is gyakori jelenség a természetben, ami több kutató véleménye szerint is a genetikai információ frissítésének egyik eszköze. A természetes biodiverzitás szempontjából viszont veszélyeztető faktor lehet a veszélyeztetett faj genetikai állományának felhígulása/kiszorulása által. A különböző védett/őshonos és a betelepített vagy invazív fajok populációi közötti génáramlás rosszul tervezett beavatkozásokkal és élőhely degradációval párosulva csökkentheti ezen populációik túlélési esélyeit természetes élőhelyükön. Leggyakrabban hibridizálódó fajtárok a házi és vadmacskák, a szürke farkas és a kutya, a mezei nyúl és a havasi nyúl, az aranyakál és a szürkefarkas, illetve a vaddisznó és a házi sertés. Ez utóbbiakat több kutatócsoport vizsgálja, igazolva a jelenséget genetikai/genomikai módszerekkel. Bár a hibridek esetleges szelekciós előnyét már többen felvetették, a széleskörűen elfogadott álláspont szerint a hibridizáció genetikai homogenizálódáshoz vezet, ami csökkentheti a genetikai adaptációs képességet, ami pedig egyéb veszélyeztető körülmények fennállása esetén a ritka fajok kihalásához vezethet.

Ugyan ez nem természetes folyamat, hanem bevett vadgazdálkodási gyakorlat, de hosszú ideje egy részleges állománycserét (50-100 egyed) végeznek a szakemberek, egymástól 30-50 km-re élő mezei nyúl populációk között, a genetikai változatosság fenntartásának érdekében. A bemutatott példák alapján az tűnik valószínűnek, hogy a genetikai diverzitás változása inkább tekinthető a populációdinamikai változások kísérő jelenségének, mintsem annak kiváltó okának, bár ez utóbbit sem zárhatjuk ki teljesen. Általánosságban logikusnak tűnik az a megközelítés, hogy a nagyobb genetikai diverzitás nagyobb genetikai adaptációs potenciált hordoz magában, így kulcsszerepe lehet a populációdinamikai változások befolyásolásában is, azonban egy-egy expanziós vagy kihalási esemény mindig több tényező változásának együttes eredménye, így a kizárólagos hatást jelenlegi ismereteink alapján nem tartom valószínűnek.

A tisztelt Bírálóm által feltett kérdés mindeztidáig nem szerepelt kutatási tevékenységem homlokterében, de köszönöm, hogy Professzor Úr felhívta erre figyelmemet.

3. Milyen betegségek jellemzőek a román szarvasmarhában, ami esetleg utalhat genetikai háttérre, lehet-e örökletes génhibákat beazonosítani, ami a tenyésztést korlátozná?

A román szürkemarha a többi podóliai típusú marhához illetve őshonos fajtához hasonlóan igen jól alkalmazkodott a helyi, szélsőséges időjárású és extenzív tartási körülményekhez, igen magas a vitalitása és a betegségekkel szembeni ellenállóképessége. Nem jellemző rá szarvasmarha tuberkolózis illetve a csülökbetegségek, főleg a sántaság, mint az intenzív tartásra szelektált fajták esetén. Ezeknek azért van igen nagy jelentősége, mert a fájdalom érzete, a mozgásszegény elhelyezés stresszhelyzetet teremt az állat szervezetében, kevesebb lesz a takarmányfelvétele, romlik az egészségi állapota, szaporodás biológiai zavarok léphetnek fel (rendellenes ivarzás, csökkent fogamzóképeség, két ellés közötti idő meghosszabbodása), romlik az állat kondíciója, csökken a termelése. Illetve az állatorvosi költségek, selejtezési kiesések anyagi terhet rónak a gazdákra. Ezzel szemben, a román szürke igen jól bírja az extrém, zord hőmérsékleti viszonyokat, az év nagy részében vagy egész évben legelőn vannak, ott hozzák világra borjaikat is. Amennyiben a telet nem a legelőn töltik, abban az esetben sem kapnak speciális takarmányt, koncentrátumokat, nincs állategészségügyi ellátás. A fajtára a természetes szelekció hat, a legéletképesebb borjak maradnak meg, nőnek fel, így lehet, hogy a tehének fertilitása magas, 15 éves kor után is termékenyülnek. Mindezek ellenére húsuk kiváló minőségű.

Nem igazán képezi genetikai vizsgálatok alapját a román szürke marha. 2007-ben megjelent egy citogenetikai tanulmány, amiben azt találták, hogy a vizsgálatba vont 10 egyedben viszonylag magas volt a kromoszóma illetve kromatida törések aránya. Azokat az egyedeket ahol ezt kimutatták azonnal selejtezték, nem vonták be további tenyésztésbe (Ioana és Sofronie, Bulletin USAMV-CN, pp.63-64/2007). Néhány román tanulmányban tejfehérje gén polimorfizmusokat is vizsgáltak (Creanga és Maciuc, Rasa Sură de stepă din România, pp.279-284/2010). A fajtatizta állomány létszáma továbbra is nagyon alacsony (<80), így elsődlegesen megőrzésére korlátozódnak a tenyésztési munkák.

4. Az archaikus mintákból kinyert DNS minősége korlátozza az új, nagy áteresztőképességű genetikai vizsgálatokat. A vaddisznóbőrök vizsgálatával a Jelölt is tapasztalta a markerek furcsaságát, és nagyon helyesen ebből nem vont le messzemenő következtetést. Miért 60k SNP arrayt használt ehhez a vizsgálatához, a mitokondrium DNS vizsgálatának elvégzése talán megbízhatóbb információkat adott volna?

Ahogy Professor úr is jelezte, az archaikus mintákból nem könnyű a különböző vizsgálatokhoz elégséges mennyiségű és minőségű DNS izolálása. A szennyeződés veszélyén túl, a degradálódott mintákban sokszor a DNS töredezettsége a fő akadály a további laborvizsgálatoknak. Egyetértek Bírálóm megjegyzésével is, hogy megbízhatóbb eredményt kaptunk volna mtDNS vizsgálattal, mivel DNS a sejtmagban, illetve a nagyszámú mitokondriumban is található. Így utóbbiban nagyobb eséllyel található kevésbé degradálódott maradvány. Azonban kíváncsiak voltunk, hogy nem jelenkori mintákkal milyen hatékonysággal alkalmazható az SNP chip, amelyet a dán laboratóriumban, ahol a vizsgálat folyt, rendelkezésre állt és rutinszerűen használnak jelenkori mintákkal. Tehát a vizsgálat ezen részének elsősorban metodikai szempontból volt jelentősége, mivel, ha sikerül kellő hatásokra optimalizálni az eljárást, az archaikus minták vizsgálatában is új távlatokat nyithat. Ugyanis a diverzitás vizsgálatokhoz jelenleg leginkább recens mintákat használnak. Ebből következik, hogy a populációk jelen helyzetét tudjuk pontosan felmérni, és különböző statisztikai megoldásokkal próbálunk következtetni a régmúlt állapotaira. Ezek a becslések sokszor kielégítő eredményeket adnak, azonban a közeli- vagy régmúltból származó minták vizsgálatával új kontextusba helyezhetnénk a jelen eredményeit is. A részleges sikerek és a már említett távlatok miatt tervben van a vizsgálat folytatása, pontosítása további minták és konzorciumi partnerek bevonásával.

Bízom válaszaik elfogadásában és köszönöm, hogy Professor úr MTA Doktori értekezésem alkalmasnak tartja nyilvános vitára.

Debrecen, 2020. május 17.



Dr. Kusza Szilvia