

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A Kárpát-medencében található vaddisznó (*Sus scrofa*) állományok populációdinamikai vizsgálata, különös tekintettel azok eredetére, genetikai diverzitására és földrajzi elkülönülésére

Mihalik Bendegúz

Témavezető: Dr. Kusza Szilvia
egyetemi tanár, az MTA doktora

Társ-témavezető: Dr. Stéger Viktor
tudományos főmunkatárs



DEBRECENI EGYETEM
Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

1. Bevezetés

A vaddisznó (*Sus scrofa*) a világ és Európa legelterjedtebb nagyvadfajai közé tartozik. Nagytestű, generalista mindenevő vad, ami hazánk nagyvadjai közül a leginkább mondható R stratégistának, vagyis rövid ivarérési idővel sok utódot ellik. Állománya az 1960-as évektől kezdve afrikai sertéspestis vírus (ASP) fertőzés előtti időszakban töretlenül növekedett. Magyarországon és Európa-szerte átlagosan 10-20 évente megduplázza létszámát, az afrikai sertéspestis (ASP) 2018-ban történt megjelenése előtt állományát közel 120 000-re becsülték hazánkban. Mérete és mobilitása egyaránt nagy, mozgáskörzete a néhány 100 hektártól akár 15 000 hektárig terjedhet. Ezen tulajdonságai miatt élőhelyére komoly hatást gyakorol, ökológiai és ökonómiai szempontból egyaránt. Bolygatásával a biodiverzitást csökkentő és növelő hatásokat egyaránt kimutattak hazánkban, valamint jelentős természetvédelmi, vadgazdálkodási és mezőgazdasági kárt is okoz, például a földön fészkelő madarak tojásainak elfogyasztásával, vagy a kukoricavetés kitúrásával. Ezen kívül jelentős számú vadbaleset résztvevői, a közutakon a 2019-ben 627 vaddisznót ütöttek el Magyarországon, aminek anyagi vonzatán kívül emberi életek is komoly veszélybe kerültek. Kiváló alkalmazkodóképességét jól példázza, hogy a Természetvédelmi Szövetség (IUCN, International Union for Conservation of Nature) a világ 100 leginvazívabb faja között tartja számon.

Más fajokon végzett hazai felmérések eredményei szerint a Kárpát-medence állománya két haplotípusra oszlik, ezért érdekesnek bizonyulhat a hazai vaddisznóállomány ilyen jellegű felmérése reprezentatív mintaszettel. Ugyanis ezidáig Magyarországon a modern, genetikai módszerekre támaszkodó vizsgálatok száma alacsony, és azokban az esetekben is rendkívül kis elemszámú, mindössze néhány tucat egyed magában foglaló kutatások születtek, amelyekből hazánk és a Kárpát-medence vaddisznóállományának genetikai háttere, változatossága, valamint földrajzi felosztottságára vonatkozó információkat nem tudtak leszűrni. Dolgozatomban ezt a hiányt szeretném pótolni, modern genetikai módszerekkel és szoftverekkel levizsgálni és analizálni a kárpát-medencei egyedeket, hogy válaszokat kapjunk ezekre a kérdésekre, ami alapján a jövőben a fajjal való gazdálkodás még tudományosabb alapokra helyeződhet.

A genetikai alapkutatás az adott faj pontos megismerésének fontos mérföldköve, hiszen a diverzitás befolyásolja az adaptációt, vagyis a külső hatásokra adott válaszra való képességet és annak mértékét. Egy nagy létszámú, változatos egyedekből álló populáció

túlélési esélye jóval nagyobb az esetlegesen bekövetkező klimatikus, emberi, vagy egyéb negatív hatások esetében. Ezen kívül egy tágas genetikai háttérrel rendelkező állatcsoport tenyésztése, vagy az azzal való gazdálkodás során nagyobb eséllyel találhatunk számunkra kedvező változatokat, amelyeket szeretnénk az adott csoportban elterjeszteni. A tenyésztésben több olyan módszer is ismert (például fajtaátalakító-, vagy cseppvér keresztezés) ahol bizonyos minőségi, vagy mennyiségi tulajdonságot javítanak idegen fajta bevonásával. Mivel a vaddisznó extenzív életmódja miatt ellenállóbb a házi sertéseknél, így egy jó genetikai hátterű állomány ilyen jellegű tulajdonságait akár egyes házi sertésfajták tenyésztési programjában is fel lehet használni, illetve a vaddisznó „élő génbankként” is funkcionál, ami önmagán túl is értéket hordoz a keresztezési lehetőségek miatt. Ezen kívül, bár a vaddisznó alapvetően vadfaj, de farmi és kerti körülmények közt is tartják és tudatosan tenyésztik, tehát betegségekkel szembeni ellenállást, húsminőséget, vagy akár szaporodási és felnevelési sikert, alomszámot, takarmányhasznosítást és még számos, háziállatok esetében előnyösnek ítélt tulajdonságot lehet rögzíteni és tovább javítani bennük a genetikára alapozott, szelektált tenyésztés során. Végezetül megfelelő kontroll alatt és a készterméken az eredetet feltüntetve a hibrid egyedek tenyésztése és tartása az előbb leírt okok miatt bizonyos esetekben előnyös is lehet, például a zsírosabb késztermékek (kolbász) előállításához.

Mivel a vaddisznó a házi sertés őse és genetikailag egy fajba tartoznak, ezért a hibridizáció rendkívül könnyen végbemegy közöttük. A jelenségre rásegít továbbá az extenzív állattartás gyakorlata, miáltal az elmúlt 50 évet kivéve a két állatcsoport egyedei könnyen találkozhattak és hibrid utódokat hozhattak létre a természetben. Habár a hibridizáció a biodiverzitás növekedését okozza és így bizonyos szempontból kívánatosnak is tartható, de egy vadfaj és egy háziállat kereszteződése esetében mégis kerülendő. Először is egy háziállat nem természetes úton, a környezeti tényezők általi nyomás során szelektálódott és alakult jelenlegi formájára, tehát így a természetben való túlélőképessége gyengébb vad társaiénál. Jó példa erre a vaddisznó vastag és erős serteszőrzete, szemben a legtöbb házi sertésfajta szinte csupasz bőrével, vagy a házi disznók vastag zsírrétege, ami sok esetben már a mozgásukban is gátolja őket és a szívüket is erős terhelésnek teszi ki. Egyes házi sertésfajták stressztűrő képessége is rendkívül alacsony, ami természetes közegben, számukra idegen területen szintén komoly hátrányt jelent számukra. Másodsorban a házi sertés gének megjelenése a vaddisznópulációkban a vaddisznó génállomány csökkenéséhez vezet, várhatóan

egy-egy allélek el is tűnnek, ami így, bár bizonyos szempontból növeli a diverzitást, de mégis a vaddisznó génkészlet csökkenését okozza. Ez hazánkban is jellemző probléma, ahol a házi sertések külterjes tartása miatt a génkészletek évtizedeken keresztül keveredtek, de egyes országokban (USA, Ausztrália) a félig házi- félig vad „feral pig” milliós létszámban van jelen, hatalmas károkat okozva a mezőgazdaságban. Végezetül a vadászok számára sem vonzó a morfológiájában házi sertés jegyeket mutató egyedek elejtése, amivel így gazdasági kár is keletkezik a helyi vadgazdálkodó számára.

Végül, de nem utolsó sorban a genetikai háttér pontos ismerete nyithat utat olyan hosszú távú jövőbeli tervekhez, mint az adott faj teljes diverzitásának megőrzése génbankokban egy esetleges katasztrófahelyzet esetére, vagy ASP és egyéb kórokozó-toleráns egyedek kitenyésztése.

2. Célkitűzés

Munkánk fő kutatási céljai a következők voltak:

- A kárpát-medencei, különös tekintettel a magyarországi vaddisznó állományok populációgenetikai profiljának alapkutatása, az allélszámok, genetikai diverzitás mértéke, heterozigotitás-értékek és Hardy-Weinberg egyensúlyi értékek kiszámítása.
- A populációk/alpopulációk méretének és elhelyezkedésének megállapítása, az azokat elkülönítő tényezők feltárása, valamint a köztük levő genetikai elkülönülés mértékének vizsgálata.
- Az egyedazonosításra is alkalmas markerszett tesztelése nagy mintaszámon, regionális szinten.
- Hazánk vaddisznóállományát érintő múltbeli hatások feltárása populációdinamikai vizsgálatok által.
- Egy eredetvizsgálatra kifejlesztett vaddisznóspecifikus markerszett tesztelése természetes állományokon. A markereink paramétereinek (megbízhatóság, pontosság) összehasonlítása korábbi irodalmi adatokkal. Amennyiben a korábban említett paraméterek megfelelnek a tudományág követelményeinek, a kárpát-medencei vaddisznók hibridizáltsági szintjének megállapítása.

3. Anyag és módszer

Mintavétel

Vaddisznó minták

Kutatásunkhoz Magyarország teljes területéről (n=470), valamint a környező országokból (Románia n=5, Horvátország n=4, Szlovákia n=4) gyűjtöttünk vaddisznó izomszövet- (n=423) és szőrmintákat (n=63). Mivel a vaddisznó hazánkban egész évben legálisan vadászható, ezért hivatásos- és sportvadászoktól kértünk elejtés után mintát, valamint más intézmények kutatóitól is érkezett szőr és izolált DNS. Ezen kívül vadfeldolgozó cégekhez (Öreglaki Vadfeldolgozó Kft., Villányi-Vad Kft., és Sárrét-Vad Kft.) látogattam el, ahol egyszerre nagy mennyiségben, az ország jelentős részét lefedő mintaszettet tudtam begyűjteni. A mintákat egyedi azonosítóval ellátott, 1ml ethanol tartalmú 2ml-es eppendorf csövekben (izomszövet), illetve nylon zacskókban (szőr) tároltam. Az azonosítóhoz rendeltük papíron az elejtés pontos globális helymeghatározó rendszer-béli (GPS) koordinátáit, vagy ennek hiányában az elejtés területén illetékes vadgazdálkodási egység (VGE) kódszámát, az adatsort pedig a lehető leghamarabb digitalizáltam egy Microsoft Excel fájlba, illetve Google térképen ábrázoltam. A begyűjtött 486 darab mintát feldolgozásig -20°C-on fagyasztva tároltuk.

Házi sertés minták

A kutatáshoz felhasznált pietrain, hampshire, magyar nagy fehér, H39 x magyar nagy fehér, landrace, duroc, duroc x mangalica, szőke mangalica, fecskehasú mangalica, vörös mangalica (minden n=12) minták begyűjtése már a vizsgálataink elkezdése előtt, egy másik kutatáshoz megtörtént és így rendelkezésünkre álltak (Szemethy et al, 2020). A házi sertések közül a több generáción át tenyésztési programba vont pedigrés egyedekből vettünk szőrmintát. A mintákat ezután a korábban leírt módon tároltuk és kezeltük.

A begyűjtött minták háttéradatainak felvétele

Az egyedek földrajzi elhelyezkedését egy Microsoft Excel munkalapra vezettük fel. Amennyiben rendelkezésünkre állt pontos GPS koordináta, úgy azt adtam meg, ez azonban a legtöbb egyednél nem volt elérhető számomra. Így a többi esetben az OVA által szerkesztett, Magyarország 1445 vadgazdálkodási egységét és azok középpontjait tartalmazó térképet vettük alapul és a VGE-k középpontjainak koordinátáit írtam be az egyedek elejtési helyeként.

Genomiális DNS izolálás

A feldolgozás első lépéseként a begyűjtött, különböző típusú mintákból genomiális DNS-t izoláltunk. Izomszövetminta esetében a Geneaid Genomic Tissue Kitet (Geneaid, Taiwan), míg szőrtüsző esetén a QIAamp DNA Investigator Kitet (QIAGEN, Németország) használtuk, a hivatalos gyártói protokollban megadott lépéseket követve.

Az izolált DNS mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) spektrofotométeren ellenőriztük le. A polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatokhoz szükséges DNS koncentrációját desztillált víz hozzáadásával egységesen 15 ng/μl-re hígítottuk és úgy tároltuk -20°C-on a későbbi laboratóriumi felhasználásig.

A vizsgált régiók amplifikálása

Az STR régiók amplifikálása populációgenetikai vizsgálatokhoz

A populációgenetikai vizsgálatok alapját képező STR markerszett a Lin et al. (2014) által fejlesztett, 13 darab, fluoreszcens jelöléssel ellátott tetranukleotid markerszett volt, melyet a MATE (Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem) GBI (Genetika és Biotechnológiai Intézet) Alkalmazott Vad-és Haszonállat Genomikai Csoportjának munkatársaival a helyi viszonyokra optimalizáltunk.

A multiplex markerszettet 20 μl-es mennyiségre optimalizáltuk, a szükséges DNS mennyiség 45 ng, amihez a homogenizált mintákból 3 μl-t adtunk. Az összemérés során a QIAGEN Multiplex PCR Mixből 10 μl-t, az egyes primer mixekből 0,28-0,65 μl mennyiséget adtunk hozzá, majd az egészet 20 μl végtérfogatra egészítettük ki 1,23 μl desztillált vízzel. Az előbbieken részletezett módon összemért mixet ezután egy LifeECO (Hangzhou Bioer Technology, Hangzhou, Kína) típusú PCR gépbe helyeztük a DNS amplifikálása céljából. A PCR reakció körülményei a következők voltak: kezdeti denaturációs szakasz 95°C-on 15 perc, 35 cikluson keresztül denaturációs szakasz 94°C-on 30 másodperc, feltapadási szakasz 61°C-on 30 másodperc és meghosszabbítási szakasz 72°C-on 1 perc, végül a végső meghosszabbítási szakasz 72°C-on 90 perc.

Az InDel régiók amplifikálása hibridizációs vizsgálatokhoz

A hibridizációs vizsgálatokhoz egy, a MATE GBK Alkalmazott Vad-és Haszonállat Genomikai Csoport által fejlesztett (Szemethy et al., 2020), 3 markert tartalmazó InDel markerszettet használtunk, így optimalizálásra nem volt szükség.

A multiplex markerszett összemérése 25 µl-ben történt, DNS-ből pedig 45 ng-ra volt szükség. Az egységnyi PCR-hez QIAGEN Multiplex PCR Mixből 12,5 µl-t, a reagens mixekből pedig 0,7-2,05 µl-t mértünk be, majd 5,35 µl desztillált vízzel egészítettük ki. Az előbbieken részletezett módon összemért mixet ezután egy LifeECO (Hangzhou Bioer Technology, Hangzhou, Kína) típusú PCR gépbe helyeztük a DNS amplifikálása céljából. A PCR reakció körülményei a következők voltak: kezdeti denaturációs szakasz 95°C-on 15 perc, 40 cikluson keresztül denaturációs szakasz 94°C-on 40 másodperc, felpadási szakasz 60°C-on 40 másodperc és meghosszabbítási szakasz 72°C-on 30 másodperc, végül a végső meghosszabbítási szakasz 72°C-on 5 perc.

Minták genotipizálása

Az amplifikációk után a képződő termékeket 1,5%-os agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük 100A áramerősséggel, 30 percig. Az eredmény alapján a mintákat 10-100-szoros hígításban készítettük elő a fragment-analízishez. A termékekből 2 µl-t 10 µl HIDI formamiddal (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) és 0,3 µl LIZ500 Size Standarddal (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) kevertünk össze. A genotipizálást a BIOMI Kft. laboratóriuma ABI 3100 (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) genetikai analizátoron végezte el.

Statisztikai értékelés

A BIOMI Kft.-től kapott nyersadatokat elemzéséhez PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) programot használtunk. Az eredmények Microsoft Excel táblázatban kerültek felvezetésre.

A kárpát-medencei vaddisznó állományok populációgenetikai profiljának meghatározása

A teljes mintaszett genetikai vizsgálatához GenAlEx v.6.5. szoftvert (Peakall & Smouse, 2012) használtunk. A program segítségével megállapítottuk a markerenkénti allélszámok, effektív allélszámok, a várt és kapott heterozigotizációs értékek és a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés mértékét.

A populációk/alpopulációk méretének és elhelyezkedésének megállapítása, az azokat elkülönítő tényezők feltárása, valamint a köztük levő genetikai differenciálódás mértékének vizsgálata

Az egyedek csoportosítását és a köztük levő genetikai különbség mértékének kiszámítását (F_{st}) a Geneland v.3.4.2. (Guillot et al., 2012) program segítségével végeztük el. Input fájlként az egyedek genetikai profilját és a minták koordinátáit tápláltuk be. A futtatás paramétereit irodalmi adatok alapján a következőkre állítottuk:

- lehetséges populációk száma: 1-10
- ismétlések száma: 100 000
- ritkítás: 100
- allélfrekvencia modell: nem korrelált
- térbeli modell: igaz
- null allél modell: hamis
- többszörös egyedi futás: nem

Az alpopulációk genetikailag egymáshoz viszonyított helyzetét főkomponens analízis módszerrel a Past v.2 program használatával vizualizáltuk (Hammer et al., 2001). A kapott eredmények vizuális megjelenítését a Google által biztosított térképre helyeztük az ArcGis nevű program segítségével. A kész térképet elemezve először szabad szemmel próbáltuk a lehetséges elválasztó tényezőket (barriereket) megtalálni, majd a Barrier v.2.2. (Manni et al., 2004) programot használva. Végül a csoportokat külön-külön is levizsgáltuk a GenAlEx v.6.5. szoftverrel (Peakall & Smouse, 2012), az előző alfejezetben már említett módon.

Az egyedazonosításra is alkalmas markerszett tesztelése

Az általunk használt STR markerszett az irodalmi adatok szerint alkalmas egyedszintű azonosításra is. Érdekességképpen ezt az állítást is leteszteltük az általunk vizsgált mintaszetben. A vizsgálatot a Colony v2.0.6.6-os programban (Jones & Wang, 2010) végeztük el. Az eredmények vizualizálása a következőképp zajlott: az egyes egyedek genetikai profiljait egymás alá írtuk úgy, hogy minden oszlopba csak egyetlen számjegy kerüljön, a teljes táblázatot a számjegyek alapján növekvő sorba rendeztük, majd a jobb átláthatóság érdekében minden számjegyet különböző színű háttérrel láttunk el. Az általunk talált allélszámok alapján a markerszett az 1. ábrán látható számú egyedet tud elkülöníteni.

$$\left(n_1 + \frac{(n_1 - 1) \times n_1}{2}\right) \times \left(n_2 + \frac{(n_2 - 1) \times n_2}{2}\right) \times \dots \times \left(n_N + \frac{(n_N - 1) \times n_N}{2}\right)$$

1. *ábra*: **Az azonosítható egyedi genetikai profil kiszámításához használt képlet**
(Fegyverneki, 2011)

Jelmagyarázat: n=az adott markeren talált allélszám, N=a használt markerek száma

A kárpát-medencei vaddisznó állományok populációdinamikai vizsgálatai

Az állomány korábbi genetikai beszűkülésére utaló palacknyak-hatás vizsgálata

A palacknyak-hatás vizsgálatához Bottleneck v.1.2.02. programot használtunk (Cornuet & Luikart, 1996), amivel a 13 mikroszatellita marker eredményeit futtattuk le 486 vaddisznó mintán. A szoftver beállításai a következők voltak:

- Mutációs modell:
 - o Végtelen allél modell (Infinite allele model, IAM): nincs
 - o Lépésenkénti mutációs modell (Stepwise mutation model, SMM): van
 - o Kétlépéses mutációs modell (Two-phase mutation model, TPM): van
- a TPM varianciája: 30%
- az SMM aránya a TPM-ben: 70%
- ismétlések száma: 1000
- Statisztikai tesztek:
 - o sign teszt: igen
 - o standardizált különbség teszt: igen

- Wilcoxon-féle rangösszegteszt: igen
- módváltás (Mode-shift): igen

A levizsgált vaddisznó mintaszett rokonsági analízise

A rokonsági kapcsolatok vizsgálatát Colony v2.0.6.6-os programmal (Jones & Wang, 2010) végeztük el. A szoftver programozóinak vizsgálata szerint a családi kötelék erőssége és a rokonság foka függvényében már 4-10 mikroszatellita marker esetében is 90% fölötti pontossággal képes megállapítani az egyedek közötti kapcsolatokat, így vizsgálatainkhoz a program megbízhatóan használható.

A szoftver futási paraméterei a következők voltak:

- Analízis típusa: empirikus analízis
- Szaporodási rendszer:
 - hím poligámia: van
 - nőstény poligámia: van
 - beltenyésztettség: van
 - klónok: nincsenek
- Faj:
 - ivariság: kétivarú
 - ploidia: diploid
- Futás hossza: hosszú
- Analízis típusa: teljes valószínűség (full-likelihood)
- Valószínűségi precizitás: magas
- Futás specifikációi:
 - Allélfrekvencia frissítése: igen
 - testvériség skálázása: igen
 - futások száma: 1
 - random number seed: 1234
- Testvériség előzetes felosztása:
 - gyenge felosztás
 - apai testvériség mérete: 1
 - anyai testvériség mérete: 1
- Markerek jellemzői:

- marker típusa: kodomináns
- allél lemorzsolódási arány: 0
- hibahatár: 0,0001
- allélfrekvencia: ismeretlen
- Szülők jellemzői:
 - apa valószínűsége a mintaszettben: 0,5
 - anya valószínűsége a mintaszettben: 0,5
 - ismert apai utódok száma: 0
 - ismert anyai utódok száma: 0
 - kizárt apaság: 0
 - kizárt anyaság: 0
 - kizárt apai testvériség: 0
 - kizárt anyai testvériség: 0

Az eredmények értékelésénél csak a 90%-os valószínűség fölötti rokoni kapcsolatokat fogadtuk el irodalmi adatok és a visszaellenőrzés alapján. Utolsó lépésben az egyedpárok egymástól való földrajzi távolságát Google Térkép alkalmazásban mértük le. Mivel a legtöbb egyed pontos elejtési helye csak vadgazdálkodási egység szinten ismert, ezért a távolságot 10km-es pontosságra kerekítettük.

Vaddisznó hústermék-nyomonkövetésre kifejlesztett markerszett tesztelése természetes állományokon, hibridizációs vizsgálatok

A kifejlesztett markerszett pontosságának vizsgálata bioinformatikai úton

Az eredetileg hústermék-nyomonkövetésre kifejlesztett markerszeten egy kettős célú elővizsgálatot végeztünk el: bioinformatikai úton megállapítottuk a pontosságát, valamint azt összevetettük más, a hibridizáció megállapítására legtöbbször használt markerek (MC1R és NR6A1) pontosságával. Utóbbiak a szőrzet színét meghatározó gének SNP polimorfizmusain alapulnak, többek közt Lorenzini és munkatársai (2020) is ezt a módszert alkalmazták vizsgálatukban. Az összehasonlítást a következőképp végeztük el: az NCBI (National Center for Biotechnology Information, Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ) adatbázisából letöltött 11 házi sertés és 12 (holland) vaddisznó teljes genomra (SSC11.1) illesztettük IGV 2.3.97 (Robinson et al., 2011) program

segítségével a használt primereket, majd leellenőriztük, hogy az adott primer az egyednek megfelelő allélvariációt adja-e (vaddisznók esetében világoskék, házi sertéseknél szürke). Amennyiben a fajtának megfelelő színnel ellátott allélt jelezte a program, úgy 100%-os eredményt jegyeztünk fel, heterozigóta jelzés (sötétkék) esetében 50%-ost, a genomtól eltérő eredmény esetében pedig 0%-ot. Végül a 23 genom által adott eredményeket átlagoltuk, így megkaptuk a markerek pontosságát.

A hazai vaddisznóállomány hibridizáltsági fokának vizsgálata

Az egyedek hibridizáltsági fokának kimutatásához a Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) programot használtuk. A vizsgálatot elvégeztük csak a 3 InDel marker eredményeivel, valamint kiegészítve a 13 STR marker eredményeivel is. Az InDel markerszett szükségességét az adja, hogy önmagában az egyedazonosításra kifejlesztett STR markerszett nem képes a mangalicákat megbízhatóan elkülöníteni a vaddisznóktól. Mivel a mangalica fajta létrehozásakor vaddisznó egyedeket is használtak, így a két csoport a markerszett eredményei alapján genetikailag közelebb áll egymáshoz, mint a mangalicák a többi vizsgált fajtához (Szemethy et al., 2020).

A szoftvert a következő beállításokkal használtuk:

- A csoportok számát (K) mindkét esetben kettőre állítottuk, mivel ebben az esetben csak a vaddisznók és házi sertések elkülönítése volt a cél.
- Paraméterek:
 - o Égetési periódus hossza: 750 000
 - o Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ismétlések száma égetés után: 250 000
- Ismétlések száma: 5

Irodalmi adatok alapján azokat az egyedeket vettük hibridnek, amikben mindkét csoporthoz való tartozás valószínűsége elérte legalább a 25%-ot, ez alatt vagy tiszta vaddisznó, vagy tiszta házi sertésként soroltam be az adott egyedet. A markerek hatékonyságát szimulált F1-F2-es vaddisznó-házi sertés hibridekkel is teszteltük, majd az eredményeket statisztikai módszerekkel vetettük össze. A mesterséges hibridek létrehozásához a Hybridlab v1.0-ás szoftvert használtuk (Nielsen et al., 2006), ami meglévő egyedek genetikai profiljából képes szimulálni hibrid genotípusokat. Ehhez már korábban levizsgált, minél tisztább genotípusú vaddisznókat (n=12) használtunk fel, a

szimulációban külön 12 pietrainnel, illetve a három mangalicafajta 4-4 egyedével hoztunk létre F1-es hibrideket. Következő lépésben az F1-es hibrideket kereszteztük vissza vaddisznókkal, valamint a másik fajta szülő egyedével, így létrehozva 75%-ban, illetve 25%-ban vaddisznó utódokat. Végezetül a két F1-es csoport egyedeire is lefuttattunk egy keresztezést.

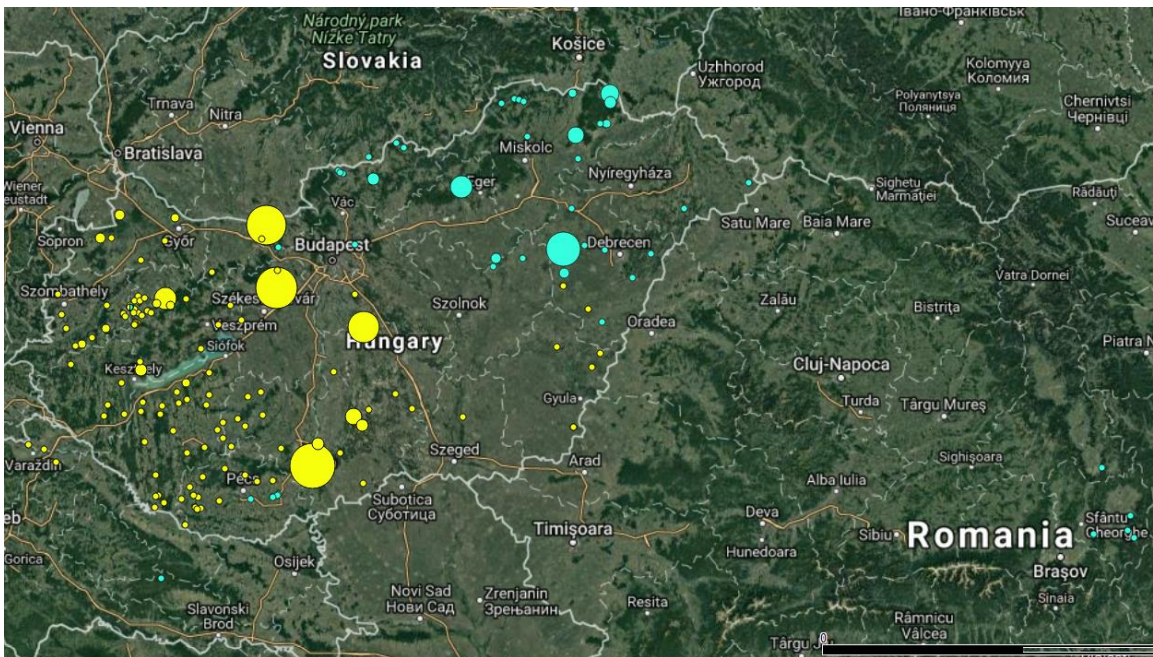
4. Eredmények

A kárpát-medencei vaddisznó állományok populációgenetikai profiljának alapkutatása

A vizsgálatok első lépéseként a populációgenetikai vizsgálatok általános felosztását követve az egyedek és a mintaszett alapvető genetikai jellemzőit állapítottuk meg. Ez az adatsor már önmagában is jelentős információval rendelkezik az egyedek diverzitásáról és az azokat fenyegető esetleges veszélyekről, például adaptációs nehézségek, vagy allélvesztés lehetősége. A populációt jellemző értékeket GenAlEx program segítségével állapítottuk meg. A markerenkénti allélszám 4 (PIGSTR14A) és 14 (PIGSTR11B és PIGSTR15A) között változott, 7,62-es átlagos értékkel. Egy korábbi, Costa és mtsai (2012) által közölt cikk eredményei szerint 14, az általunk használtaktól eltérő markerekkel 3 és 14 közötti allélszámot találtak, 6,21-es átlaggal. Vernesi és mtsai (2003) pedig egy harmadik, 9 markert tartalmazó szettet használva 6-12 közötti allélt találtak, 8,8-as átlagos allélszámmal. Más európai országokban végzett vizsgálatokkal összehasonlítva a magyarországi állomány genetikai változatossága a középső tartományba esik. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a markerszett jó hatékonysággal alkalmazható a hazai vaddisznóállomány genetikai vizsgálatára. Az is látható, hogy a magyarországi vaddisznóállomány diverzitása a többi európai állományhoz képest közepesnek mondható, ennek oka azonban lehet az egymástól eltérő markerszettek használata is. A várt heterozigotizációs érték a PigSTR4B és a PigSTR17A marker kivételével minden esetben magasabb volt az észlelnél, ami beltenyésztettséget jelez. 9 marker esetében kaptunk szignifikáns eltérést a Hardy-Weinberg egyensúlytól, a szignifikancia szintje 1 esetben (PigSTR14B) $p < 0,05$ és 8 esetben (PigSTR7B, PigSTR4C, PigSTR11B, PigSTR1B, PigSTR15A, PigSTR5C, PigSTR13E, PigSTR1A) $p < 0,001$. Ezek az eredmények egybevágóak a korábbi európai vizsgálatok eredményeivel, azonban a magyar kutatásokétól eltérnek. Bulgáriában és Németországban 9, illetve 8 marker esetében volt az észlelt érték szignifikánsan alacsonyabb a vártnál (Nikolov et al., 2009). Ezzel ellentétben Magyarországon a korábban vizsgált esetekben 9 markerből mindössze egy tér el szignifikánsan a Hardy-Weinberg egyensúlytól, egy másik kutatásban pedig a 14 markerből 8 esetben az észlelt heterozigotizációs érték meghaladta a vártat (Vernesi et al., 2003; Costa et al., 2012).

A populációk/alpopulációk méretének és elhelyezkedésének megállapítása, az azokat elkülönítő tényezők feltárása, valamint a köztük levő genetikai elkülönülés mértékének vizsgálata

Az állomány genetikai mutatóinak kiszámítása után a csoportba rendezésüket végeztük el a Geneland szoftver segítségével. A program szerint a legvalószínűbb eloszlás 2 populáció, aminek a valószínűsége közel 80%. A csoportosítás eredménye szerint az egyik csoport a mintázott terület nyugati részén található, ami Magyarországot foglalja magában, az északkeleti régió kivételével, a másik csoport pedig a többi részt foglalja el, ami Magyarország északkeleti részét, valamint a külföldi mintákat tartalmazza. A két csoportot meglehetősen erős határvonal választja el egymástól, amibe kevés minta esik bele, továbbá délen látható egy „betüremkedés”, ahol az északi csoportra jellemző egyedek találhatóak. Az ábra könnyebb értelmezhetősége érdekében a mintákat ArcGis szoftver használatával egy, a Google által biztosított térképre vezettem fel (2. ábra).



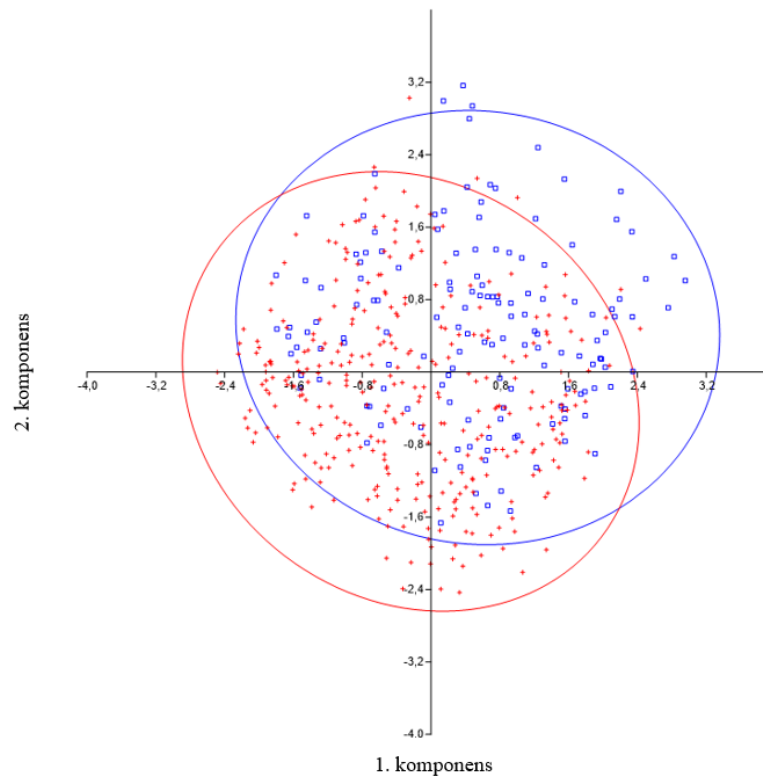
2. ábra: A minták alpopulációkba sorolva ArcGis-ben ábrázolva

Jelmagyarázat: kék kör: első csoport (n=147), sárga kör: második csoport (n=339). A körök mérete az adott VGE-ben gyűjtött minták számát mutatja

A két alpopuláció közötti határvonal Komárom-Esztergom, Pest, Jász-Nagykun-Szolnok és Hajdú-Bihar megyékben található. Egyértelműen csoportidegen egyedből mindössze egy darab található, Veszprém megyében. A külföldről kapott minták eredményeink

alapján a két alpopulációba beleilleszkednek. Ez az eredmény a horvát és szlovák minták esetében egyáltalán nem meglepő, hiszen a politikai határok a természeti határokkal nem, vagy csak kis részben esnek egybe (például a magyar-szlovák határ nyugati felében a Duna, vagy a magyar-horvát határon a Dráva), azonban ezek a természetes barrierek nem képeznek átjárhatatlan akadályt a vaddisznó számára. Magyarország déli határára a mintagyűjtési időszakban épült meg a magyar-horvát határon, azonban ennek hatása még nem volt kimutatható. A román minták esetében a nagy földrajzi távolság okozhatott volna elkülönülést, mivel a hozzájuk legközelebbi Magyarországon mintázott egyedek is több, mint 500 km-re lettek begyűjtve. Az elkülönülés hiányának oka vélhetően az a tény, hogy a két mintázott csoport között is élnek vaddisznók, ahonnan nem sikerült DNS-t gyűjteni.

A vizsgált minták csoportosítása után szükséges volt megállapítani, hogy azok milyen kapcsolatban állnak egymással, mennyire különböznek egymástól. A csoportok egymáshoz való viszonyát az F_{st} érték mutatja meg, így a következő lépésben ezt a mutatót számoltam ki, szintén a Geneland szoftvert használva. Esetünkben ez az érték 0,03, ami nem éri el a közepes elkülönülés szintjét ($F_{st} > 0,05$), tehát a program egy adott populáció két alpopulációjaként azonosította a csoportokat. Az alpopulációk egymáshoz viszonyított genetikai helyzetét főkomponens analízis módszerrel ábrázolva az alábbi ábra mutatja (3. ábra):



3. ábra: A két alpopuláció egymáshoz viszonyított genetikai elhelyezkedése főkomponens analízis módszerrel ábrázolva.

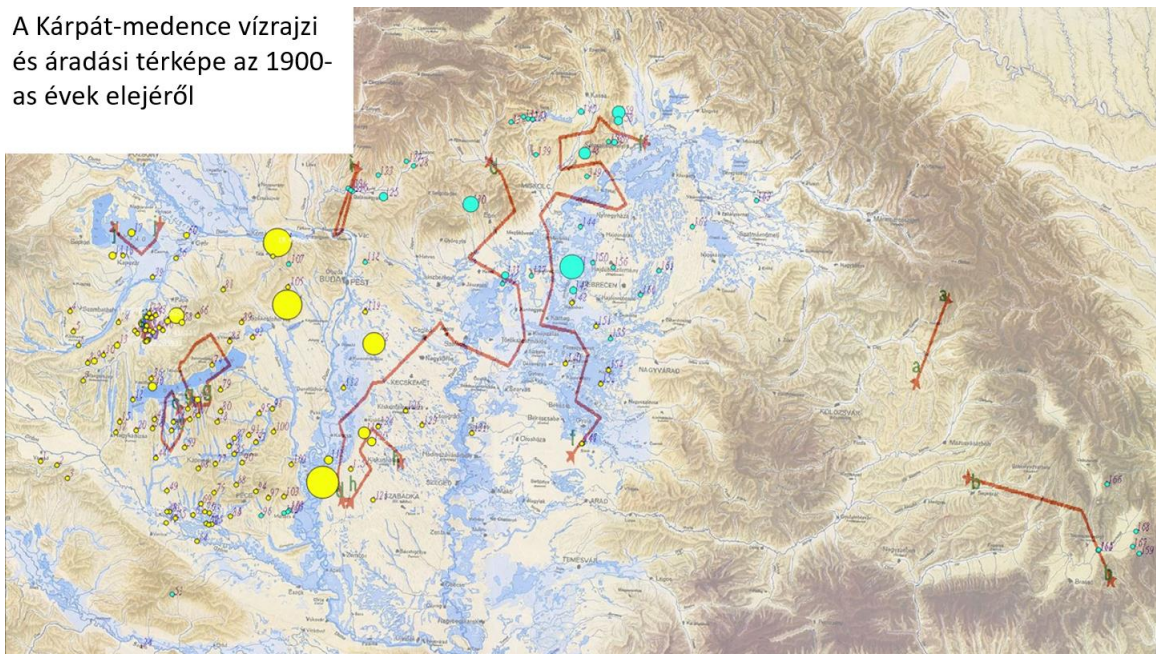
Jelmagyarázat: kék négyzetek: az első csoport egyedei (n=147), piros pluszjelek: a második csoport egyedei (n=339), a színes körök a csoportok köré húzott 95%-os valószínűségi halmazok

Az ábrán jól látható, hogy a két csoport nem különül el egymástól nagymértékben, az egyedek túlnyomó többsége a két valószínűségi halmaz metszetében található. A halmazok mérete nem tér el jelentősen egymástól, tehát a genetikai változatosság közel megegyező. Ez az eredmény megerősíti a Geneland és GenAlEx által kapott eredményeket, miszerint nem beszélhetünk különálló populációkról, azonban jól látható különbségek vannak a két csoport közt, ami alpopulációkat jelent.

A csoportok közötti elkülönülésre adható legegyszerűbb magyarázat a földrajzi barrierekből keresendő. Első lépésként tehát a már korábban bemutatott térképen kerestük az alpopulációk közötti területen különböző akadályokat, úgymint autópályák, tavak, folyók. Mivel egyértelmű földrajzi barriert nem találtunk, ezért a Barrier program segítségével kerestük az elkülönülési vonalakat. A Barrier általi eredmények nem követik sem az általunk kapott genetikai elkülönülés vonalát, sem a valós földrajzi viszonyokat,

ezért további lehetséges okokat kerestünk. Mivel a Kárpát-medencébe való visszatelepülés az utolsó jégkorszak után más fajoknál leírtan is több területről zajlott le, ezért múltbeli hatások nyomát kerestük. Végül egy 1900-as évek eleji vízrajzi térkép és az eredményeink összevetése adott lehetséges magyarázatot az eloszlásra. Az alábbi ábrán (4.) látható, hogy az északkeleti ártéri rész, a Mátrával határolva nagyjából egybeesik a kézzel jelölt alpopuláció elhelyezkedésével és a Barrier program által kijelölt „f” kódú barrierrel. Az elkülönülés pontos okainak kiderítése azonban amiatt is nehézségekbe ütközik, mivel országszerte több, mint 100 vadaskert található, amelyekbe engedélyeztetés után máshonnan származó egyedek telepíthetők. Így egy-egy korábbi telepítés nyomai akár lényegesen befolyásolhatják az eredményeket.

A Kárpát-medence vízrajzi és áradási térképe az 1900-as évek elejéről



4. ábra: Az alpopulációk és a Barrier program eredményei egy 1900-as évek eleji ártéri térképen ábrázolva

Az egyedazonosításra is alkalmas markerszett tesztelése nagy mintaszámon, regionális szinten

A statisztikai képlet eredményei szerint az általunk használt markerszett a kapott allélszámok esetében összesen $9,65 \cdot 10^{18}$ (megközelítőleg 10 trillió) egyedet tud elkülöníteni, azonban az általunk vizsgált 486 egyedből kettő genetikai profilja teljesen megegyezett, azaz a levizsgált 13 markeren minden egyes allél eredménye egyforma volt. Az egyezés okára három lehetséges magyarázatot találtunk: a két egyedben két marker

(PigSTR11B és PIGSTR1B) többszöri ismétlés után sem adott eredményt, tehát nem zárható ki, hogy azokon a részekben található a különbség. Ezen kívül mindkét egyed elejtési helye Borota, így előfordulhat, hogy egypetűjű ikrekről van szó, ami vaddisznók esetében is előfordulhat (Náhlík et al., 2013). Ebben az esetben az egyedek valóban megegyező genetikai profillal rendelkeznek. Végezetül habár a kiértékelést is leellenőriztük, de lehetséges, hogy értékelési hiba miatt egyezik a két egyed.

A kárpát-medencei vaddisznóállományok populációdinamikai vizsgálata

Az állomány korábbi beszűkülésére utaló palacknyak-hatás vizsgálata

A palacknyak-hatás vizsgálatához használt mikroszatellita markerszett adatait a mikroszatellita markerekre általánosan használt két módszerrel, az egy-és kétlépéses mutációs modellekkel (SMM és TPM) vizsgáltuk le. Mindkét statisztikai módszer eredményei szerint mind a 13 marker mutációs-drift egyensúlyban van, és a mode-shift teszt is normális (L-alakú) eloszlást mutat, tehát a közelmúltból genetikai beszűkülést nem sikerült kimutatni. Azonban az utóvizsgálatok kimutatták, hogy eltérések mutatkoznak a HWE-től, az SMM 13, a TPM 11 lokuszon talált az elvárt értéknél kevesebb heterozigóta egyedet, amit a Wilcoxon-féle rangösszegteszt is megerősített (TPM=0,00201, SMM=0,00006). Ennek alapján megállapítható, hogy a távolabbi múltban a hazai vaddisznóállományt genetikai beszűkülést okozó hatás érte.

A levizsgált mintaszett rokonsági analízise

Az általunk levizsgált mintaszett rokonsági mutatóit a következő mutatókra vizsgáltuk: testvérek, féltestvérek, illetve apasági és anyasági kapcsolatok. Az elemzéseket elvégeztük a mikroszatellita markerszettel (n=486), illetve előbbit kiegészítve az InDel markerszettel (n=422). A testvéri vizsgálat sorban 23, illetve 22 testvérpár meglétét tárta fel több, mint 90%-os valószínűséggel. A két eredmény sor között 7 testvérpár fedt át ezen a valószínűségi szinten. A kombinált markerszett eredményei szerint ráadásul két darab, egyenként 3 egyedből álló testvéri csoport is megmintázásra került. Ezután leellenőriztük az egymástól való földrajzi távolságot, ami meglepő eredményt adott: bár elméletileg a testvérek egymás mellett, maximum néhány 10 kilométerre élnek egymástól, de a mi eredményeink mást mutatnak. Ebben az összehasonlításban megbízhatóbbnak tűnnek a kombinált markerszett eredményei, mivel az átlagos távolság csak 61,3 km szemben az

STR 110 kilométeres eredményével. A szórás mindkét esetben meghaladja az átlagot, amit néhány egymástól nagyon távoli testvérpár okoz. Ezeket a kiugró távolsági adatokat okozhatja a vaddisznók áttelepítése, ami főleg kertek között gyakori tevékenység, illetve a magas valószínűségi mutató ellenére nem zárható ki genotipizálási hiba miatti hamis eredmény sem.

A féltestvéri vizsgálat 18, illetve 29 féltestvérpár meglétét tárta fel több, mint 90%-os valószínűséggel. A két eredmény sor között 6 féltestvérpár fed át ezen a valószínűségi szinten. A mikroszatellita markerszett eredményei szerint három darab kettőnél több egyedből álló féltestvéri csoport került megmintázásra, a kombinált markerszett pedig 5 ilyen csoportot adott ki, amiből a legnagyobb 5 egyedet foglal magában. A földrajzi távolság ellenőrzése során a korábbiaktól eltérő eredmény született, vagyis ebben az esetben a mikroszatellita szett átlagos távolsága kisebb, 133 km-el, szemben a kombinált markerszett 192 km-es eredményével. A minták térképen való visszaellenőrzésekor azonban egyértelműen kirajzolódik, hogy az egymástól nagyon távoli egyedek 3 magterületről származnak, amik egymástól nagyjából 120, 240, illetve 320 kilométerre találhatóak. A három magterületről kettő ráadásul nagy kiterjedésű, vaddisznóskerteket is magában foglaló vadgazdálkodási egység, így ebben az esetben a féltestvérek közötti nagy földrajzi távolságra az áttelepítések magyarázatot adnak.

A szülői vizsgálat csak a kombinált markerszett esetében, anya-utód kapcsolatokat mutatott ki 2 anyával, amelyeknek 5, illetve 4 utóda szerepel a mintaszettben. Az utódok megegyeznek a féltestvéri vizsgálat két nagy csoportjával, tehát ezen csoportok közös szülője a koca volt. Az egymástól való nagy távolságok magyarázata tehát ebben az esetben is vélhetően az áttelepítésre vezethető vissza.

Vaddisznó hústermék-nyomonkövetésre kifejlesztett markerszett tesztelése természetes állományokon, hibridizációs vizsgálatok

A kifejlesztett markerszett pontosságának vizsgálata bioinformatikai úton

A markerfejlesztés sikerét jól példázza a következő összevetés, melyben az elérhető legújabb és egyik legrészletesebb kutatással, Lorenzini és munkatársai (2020) vizsgálatával hasonlítottuk össze a saját markerszettünk eredményeit. A W3 marker értékelése kétféleképp történt, mivel a marker az SSC10.2-es referencia genomra lett tervezve, de jelenleg már az újabb, SSC11.1-es genom is elérhető, ahol a használt régió megváltozott, így a marker eredménye a programban fragmentálódott képet mutat. Egyik értékelésben a legtöbbet kapott fragmentszint vettük eredményül, a másikban pedig a színek átlagos értékét (1. táblázat).

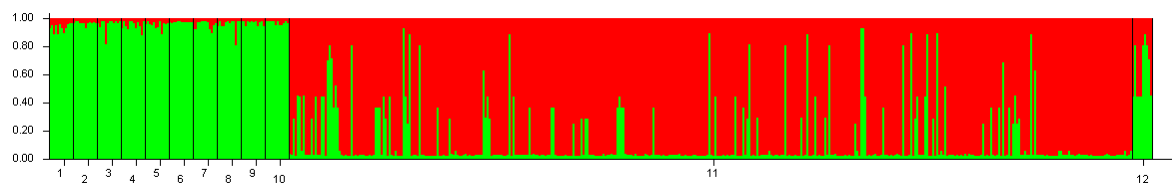
Különböző hibridizációra kifejlesztett markerek pontosságának összehasonlítása

fajta	W1	W2	W3 (legtöbb)	W3 (átlag)	MC1R2/3	MC1R1	NR6A1
angler schatterswein	100	-	-	-	-	-	100
angler schatterswein	100	100	100	50	100	100	100
bunte bentheimer	100	-	-	0	-	-	100
berkshire	100	0	50	50	100	0	50
berkshire	100	100	50	50	100	0	100
british saddleback	100	100	50	50	50	100	100
british saddleback	100	100	0	50	50	100	-
vaddisznó	50	0	100	50	0	0	100
vaddisznó	100	100	100	50	0	0	100
vaddisznó	100	100	100	50	-	-	-
vaddisznó	100	0	100	50	0	-	100
vaddisznó	50	50	100	50	0	0	100
vaddisznó	100	0	0	50	0	0	100
vaddisznó	100	0	100	50	0	-	-
vaddisznó	100	100	100	50	0	-	-
vaddisznó	100	100	100	50	0	0	0
vaddisznó	100	50	100	50	0	0	100
vaddisznó	100	-	100	50	0	-	0
vaddisznó	100	100	100	50	0	0	50
berkshire	100	100	50	50	100	0	-
berkshire	100	100	100	50	100	-	100
berkshire	0	100	100	50	-	-	100
berkshire	50	100	50	50	100	0	50
összesítve	2050	1400	1650	1050	700	300	1450
mennyiség	23	20	21	22	19	14	18
pontosság (%)	89,13	70	78,57	47,73	36,84	21,43	80,56

Az eredményekből látható, hogy az MC1R polimorfizmusok pontossága rendkívül gyenge, mindössze 21,43% és 36,85%. Ezt követi a W3 és W2 InDel markerek pontossága, a két legjobb eredményt pedig az NR6A1 és a W1 markerek adták.

A vaddisznó hibridizációs vizsgálatok eredményei

A hibridizáltsági vizsgálatokat 422 vaddisznó mintán végeztük el, egy 120 házi sertést tartalmazó referencia-adatbázis segítségével (1: pietrain, 2: hampshire, 3: nagy fehér, 4: H39 x nagy fehér, 5: landrace, 6: duroc, 7: duroc x mangalica, 8: szőke mangalica, 9: fecskehasú mangalica, 10: vörös mangalica, minden esetben n=12), valamint 10 ismert vaddisznó-házi sertés hibridet is a vizsgálatba vontunk. Az általunk korábban fejlesztett 3 InDel markert tartalmazó multiplex Structure program által adott Bayesi klasztereredménye az alábbi ábrán (5. ábra) látható:



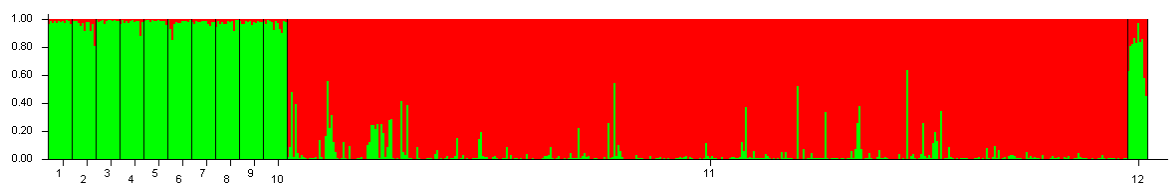
5. ábra: Hibridizáltsági jellemzők 3 InDel marker alapján

Jelmagyarázat: 1-10-es csoportok: házi sertésfajták, 11-es csoport: vaddisznók, 12-es csoport: ismert vaddisznó hibridek. Minden egyes függőleges vonal egy egyedet jelöl

Színmagyarázat: zöld: házi sertés, piros: vaddisznó

Az eredményeken jól látható, hogy a program az első 10 csoport (házi sertések) mind a 120 egyedét tiszta házi sertésként azonosította, a vaddisznó minták közül 336 minta lett vaddisznó, 71 hibrid, 18 pedig házi sertés, az ismert hibridek közül pedig 6-ot sorolt a hibridek és 4 házi sertések közé

Következő lépésben az InDel markerszettet kiegészítettük a validáló STR markerszett által kapott genotípusokkal, majd ezt az adatsort klasztereztük szintén a Structure programban (6. ábra):



6. ábra: Hibridizáltsági jellemzők az InDel markerszett és a validáló STR markerszett alapján

Jelmagyarázat: 1-10-es csoportok: házi sertésfajták, 11-es csoport: vaddisznók, 12-es csoport: ismert vaddisznó hibridek. Minden egyes függőleges vonal egy egyedet jelöl

Színmagyarázat: zöld: házi sertés, piros: vaddisznó

A kombinált módszerek eredménye alapján az első 10 csoportban változás nem tapasztalható a korábbiakhoz képest, a vaddisznók esetében a hibridizáltsági arányt jelentősen csökkentette a mikroszatellita markerszett hozzáadása, valamint a hibridek hibridizáltsági jellemzőit is némiképp változtatta, azonban ebben az esetben mindkét irányú változás látható. A kombinált eredmények (STR és InDel szett) alapján a 120 házi sertés mindegyike házi sertésként lett azonosítva, a vaddisznók közül 20 valójában hibrid, a hibridek közül pedig 3 lett a hibridek, 7 pedig a házi sertések közé besorolva. Az eredmények összevetése után megállapítható, hogy az általunk készített markerszett „szigorúbb” a validáló (STR) szettnél, mivel a vaddisznók közül is sorolt egyedeket a hibrid és házi sertések közé, valamint az ismert hibridek egy részét is házi sertésnek jelzi. Házi sertéseket egy esetben sem sorolt a vaddisznók közé, három esetben hibridnek sorolta. Ezek alapján a hibridizációs markerszett a valóssal megegyező eredményt adott 472 esetben, ami a teljes mintaszett 85,5%-a. „Túl szigorú”, a validáló markerszett által kijavítható hibát 13,41%-ban vétett, „túl megengedő”, tehát nem kijavítható hibát pedig mindössze 1,09%-ban. Összességében megállapítható, hogy a markerszett kb. 14 százalékban téves pozitív eredményt ad, ami azonban kiküszöbölhető, amennyiben a kérdéses egyedeket az STR markerszettel is levizsgáljuk. Téves negatív eredményt mindössze 1%-ban kaptunk, ami kifejezetten jó eredménynek mondható. Mivel az InDel markerszettet eredetileg egy gyors és olcsó előszűrésre alkalmas módszernek fejlesztettük ki, így az eredmények alapján a markerfejlesztést sikeresnek nyilvánítottuk.

A hibridizációs markerszett eredményeinek tesztelése szimulált genotípusok hozzáadásával

A hibridizációs vizsgálatok utolsó lépéseként az eredmények során legtisztább genotípusúként azonosított vaddisznókat és házi sertéseket kereszteztük 2 generáción át a Hybridlab utódgenerátor szoftver segítségével. A virtuális egyedekkel kibővített mintasor Bayesi klaszterezését szintén kétféleképpen, az InDel, illetve a kombinált markerszettel is elvégeztük.

Az InDel eredmények szerint a program házi sertések összes egyedét továbbra is tiszta házi sertésként azonosította. A vaddisznó minták közül a korábbinál 3-al több, összesen 339 minta lett vaddisznó, ugyanennyivel kevesebb, vagyis 68 hibrid, 18 pedig házi sertés, az ismert hibridek közül pedig egy korábba házi sertésként besorolt egyed a hibridek

közé sorolt, így a hibridek száma 7, a házi sertéseké pedig 3. A kombinált eredmények alapján a házi sertések ebben az eseten is minden egyed esetében a saját klaszterükbe (házi sertések közé) lettek besorolva. A vaddisznók közül 27 állatot jelzett hibridnek, ami 7-el több, mint a szimulált egyedek nélküli vizsgálatban, a vaddisznók száma pedig ugyanennyivel kevesebb. Házi sertésként egy vaddisznót sem azonosított a program. Az ismert hibrid egyedek eredményei változatlanok, 7 esetben lettek a házi sertések és 3 esetben a hibridek közé sorolva.

A virtuális genotípusok összesített eredményei a következő, 2. táblázatban láthatóak:

2. táblázat:

A vizsgált minták besorolása a hibridizációs (W) markerszett és a validáló markerszett által

Jelmagyarázat: HS: házi sertés, VD: vaddisznó

Színmagyarázat: zöld: megegyező genotípus, sárga: javítható hiba, piros: nem javítható hiba

		Fajta W (InDel) szerint		
		HS	Hibrid	VD
Fajta validálva (STR)	HS	124	3	0
	Hibrid	9	12	3
	VD	9	56	336

Az eredményekben jól látszik, hogy a várható eloszláshoz képest minden esetben a házi sertések irányába van eltolódva az adott csoportba sorolt egyedek száma. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a százalékos arány, aminél az egyedeket hibridnek soroljuk be esetünkben túl szigorú, mivel már kevés házi sertésekkel megegyező allélt is túl nagy hangsúllyal vesz figyelembe a program.

Összefoglalásként elmondható, hogy eredményeink alapján a hazai vaddisznó populáció 2,84%-a hibridizálódott. Korábbi eredményekkel összehasonlítva ez a szám átlagosnak mondható az egyéb STR markerekkel végzett vizsgálatokhoz képest. Két korábbi kutatásban sem sikerült STR markerekkel hibrid egyedeket kimutatni (Nikolov et al., 2017; Sprem et al., 2014). Egy olasz vaddisznókat célzó vizsgálatban 20 STR markert 164 vaddisznón használva mindössze 2,44%-os hibridizáltsági arányt találtak (Lorenzini et al., 2020). Frantz és munkatársai (2013) egy több országot is lefedő kutatásban 697

disznót vizsgáltak le egy 14 markert tartalmazó szettel, eredményeik szerint a vaddisznók 6,32%-a mutatta hibridizáltság jeleit. A színezetet befolyásoló génmutációk (MC1R és NR6A1) alapján végzett kutatások jóval nagyobb mértékű hibridizációt mutattak ki, azonban ezekben a vizsgálatokban sokkal kevesebb DNS szakaszt néznek, mivel ezekben a szekvenciákban kevés (1-3) SNP található. Így az eredmények is kevésbé pontosak, mint a jóval nagyobb mennyiségű, több polimorfizmust is tartalmazó STR markerszettek esetében.

5. Új tudományos eredmények

1. Elsőként végeztünk hazánkban ilyen mértékű vaddisznógenetikai vizsgálatokat STR markerek felhasználásával. Megállapítottuk a magyarországi vaddisznópopuláció genetikai változatosságának (7,62 allél/marker) és hibridizáltságának (2,84%) mértékét. Az egyéb európai vizsgálatokkal összehasonlítva mindkét érték a korábban megállapított tartományon belül helyezkedik el.
2. Megállapítottuk, hogy Magyarország vaddisznópopulációja két alpopulációra tagolódik (északkeleti (n=147) és az ország többi részére kiterjedő (n=339)), a határvonal feltételezhetően az utolsó jégkorszak és a vízrendezések maradványa, mivel a két alpopuláció keveredését gátló barrier nem található közöttük.
3. Bebizonyítottuk, hogy hazánkban is az általunk használt STR markerszett segítségével egyedi azonosítás végezhető vaddisznókon legalább 99,79%-os pontossággal.
4. Genetikai vizsgálatokkal kimutattuk a hazai állományt érő múltbeli palacknyakhatás jelenlétét, (SMM módszerrel 13/13, TPM módszerrel 13/11 markeren mutatkozik szignifikáns heterozigóta hiány, melyet a Wilcoxon-féle rangösszegteszt is megerősített, SMM=0,00006; TPM=0,00201), illetve a jelenlegi genetikai beszűkülést okozó események hiányát.
5. Vad populációban is leellenőriztük és bebizonyítottuk az általunk korábban kifejlesztett InDel hibridizációs markerszett megbízhatóságát és szükségességét a széles körben alkalmazott módszerek (MC1R és NR6A1) mellett. A 85,5%-os pontosság a mindössze 1%-nyi téves negatív eredménnyel együtt egy olyan módszert ad a vadgazdálkodók kezébe, amivel a korábbinál lényegesen gyorsabban és kisebb költséggel lehet nagy megbízhatóságú genetikai vizsgálatokat végezni a vaddisznókon.

6. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

1. A magyarországi vaddisznók közti átfogó mintavételezéssel, valamint genetikai diverzitásának és szerkezetének megállapításával olyan adatbázist hoztuk létre, ami a jövőbeli kutatások számára is hasznosítható alapot, vagy összehasonlítási lehetőséget biztosít populációgenetikai-, diverzitás-, vagy hibridizációs vizsgálatok számára.
2. Az alpopulációk méretének és elhelyezkedésének tudatában átfogó, nagyléptékű vadgazdálkodási tervek elkészítésére nyílt lehetőség mind a hasznosítás, mind az ASP elleni védekezés témakörében.
3. Az egyedazonosító STR markerszett használata megoldást nyújt különböző peres ügyek, mint orvvadászat, vagy trófeahamisítás elbírálására modern genetikai módszerek alkalmazásával.
4. Az InDel (és szükség esetén STR) markerszett alkalmazásával lehetőség van a kerti, vadasparki, vagy farmi vaddisznóállományok vizsgálatára és az eredmények alapján a hibrid egyedek kiszűrésére. Ezáltal az állományok valóban kizárólag genetikailag tiszta vaddisznókból állnak, ami a fenotípusra, húsminőségre is hatással lehet. A vadasparkokba, vadfarmokra bekerülő vaddisznókból minden esetben javasoljuk a mintavételezést, amit eladáskor le lehet vizsgálni, ezzel az eladott egyed genetikai háttere, minősége bizonyíthatóvá válik.

7. Irodalomjegyzék

- CORNUET, J.M. & LUIKART, G. 1996: Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014. pp.
- COSTA, V., PÉREZ-GONZÁLEZ, J., SANTOS, P., FERNÁNDEZ-LLARIO, P., CARRANZA, J., ZSOLNAI A., ANTON I., BUZGÓ J., VARGA GY., MONTEIRO, N., BEJA-PEREIRA, A. 2012: Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *BMC Research Notes* 5(479): 6 pp.
- FEGYVERNEKI S. 2011: Valószínűség-számítás és matematikai statisztika. Miskolc, 150 pp.
- GUILLOT, G., RENAUD, S., LEDEVIN, R., MICHAUX, J., CLAUDE, J. 2012: A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic and geographic data. *Systematic Biology* 61(5): 897-911. pp.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. 2001: PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologica Electronica* 4(1). 9 pp.
- JONES, O. & WANG, J. 2010: COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10: 551-555. pp.
- LIN, Y-C., HSIEH, H-M., LEE, J-C-I., HSIAO, C-T., LIN, D-Y., LINACRE, A., TSAI, L-C. 2014: Establishing a DNA identification system for pigs (*Sus scrofa*) using a multiplex STR amplification. *Forensic Science International: Genetics* 9, 12-19. pp.
- LORENZINI, R., FANELLI, R., TANCREDI, F., SICLARI, A., GAROFALO, L. 2020: Matching STR and SNP Matching STR and SNP genotyping to discriminate between wild boar, domestic pig, and their recent hybrids for forensic purposes. *Scientific Reports*, Vol 10(3188).
- MANNI, F., GUÉRARD, E., HEYER, E. 2004: Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by „Monmonier’s algorithm”. *Human Biology*, 76(2), 173-190. pp.

- NÁHLIK A., SÁNDOR GY., TARI T. 2013: A vaddisznó (*Sus scrofa*) szaporulatának alakulása egy szabadterületi populációban. *Erdészettudományi Közlemények* 3(1): 261-269. pp.
- NIELSEN, E.E.G., BACH, L., KOTLICKI, P. 2006: Hybridlab (version 1.0): a program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes* 6, 971-973. pp.
- NIKOLOV, I.S., STOECKLE, B.C., MARKOV, G., KUEHN, R. 2017: Substantial hybridization between wild boars (*Sus scrofa scrofa*) and East Balkan pigs (*Sus scrofa f. domestica*) in natural environment as a result of semi-wild rearing in Bulgaria. *Czech Journal of Animal Science*, Vol 62(1), 1-8. pp.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 2012: GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28(19), 3 pp.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959. pp.
- ROBINSON, J.T., THORVALDSDOTTIR, H., WINCKLER, W., GUTTMAN, M., LANDER, E.S., GETZ, G., MESIROV, J.P. 2011: Integrative Genomic Viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24-26.
- SPREM, N., SALAJPAL, K., SAFNER, T., DIKIC, D., JURIC, J., CURIK, I. DIKIC, M., CUBRIC-CURIK, V. 2014: Genetic analysis of hybridization between domesticated endangered pig breeds and wild boar. *Livestock Science*, Vol 162, 1-4. pp.
- SZEMETHY D., MIHALIK B., FRANK K., NAGY T., ÚJVÁRY D., KUSZA SZ., SZEMETHY L., BARTA E., STÉGER V. 2020: Development of wild boar species-specific DNA markers for a potential quality control and traceability method in meat products. *Food Analytical Methods* 2020/14, 18-27. pp.
- VERNESI, C., CRESTANELLO, B., PECCHIOLI, E., TARTARI, D., CARAMELLI, D., HAUFFE, H., BERTORELLE, G. 2003: The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): A microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12, 11 pp