



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2024. május 24.

**KÉT MAGYARORSZÁGON INVAZÍV EMLŐS RAGADOZÓ
FAJ (MOSÓMEDVE, NYESTKUTYA) MIKROSZATELLIT
ALAPÚ POPULÁCIÓGENETIKAI ÉS ROKONSÁGI
VIZSGÁLATA**

**Microsatellite-based population genetics and kinship study of two
Hungarian invasive carnivore species (raccoon and raccoon dog)**

Készítette: Scsepkó Nikolett
F6QF41
Mezőgazdasági biotechnológus mesterképzés
nappali tagozat
Szent István Campus

Témavezetők: **Dr. Fehér Péter Árpád**, tudományos
munkatárs, MATE, Szent István Campus, Genetika és
Biotechnológia Intézet, Genetika és Genomika Tanszék

Dr. Stéger Viktor, tudományos főmunkatárs,
MATE, Szent István Campus, Genetika és Biotechnológia
Intézet, Genetika és Genomika Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: „Agrárszekció”

**Gödöllő
2024.**

Tartalom

1. Jelölések és rövidítések jegyzéke	2
2. Bevezetés és célkitűzések.....	3
3. Szakirodalmi áttekintés.....	4
3.1. Mosómedve (<i>Procyon lotor</i>) jellemzése	5
3.1.1. Európai elterjedés.....	5
3.1.2. Hazai elterjedése	6
3.2. Nyestkutya (<i>Nyctereutes procyonoides</i>) jellemzése.....	7
3.2.1. Európai elterjedés.....	7
3.2.2. Hazai elterjedés.....	9
3.3. Populációgenetikai vizsgálatok alapjai.....	10
3.3.1. Mosómedve genetikai vizsgálatok	12
3.3.2. Nyestkutya genetikai vizsgálatok	13
4. Anyag és módszer	15
4.1. Mosómedve és nyestkutya mintavétel.....	15
4.2. DNS izolálás.....	17
4.3. PCR vizsgálatok.....	18
4.3.1. Mosómedve és nyestkutya STR markerszett	18
4.4. Populációgenetikai vizsgálatok.....	21
5. Eredmények és értékelésük.....	22
5.1 DNS izolálás és PCR vizsgálatok.....	22
5.2. Markerek optimalizálása multiplex körülmények között.....	22
5.3. Populációgenetikai vizsgálatok.....	25
5.3.1. Mosómedve.....	25
5.3.2. Nyestkutya.....	28
6. Következtetések és javaslatok.....	30
7. Összefoglalás	32
8. Köszönetnyilvánítás.....	34
9. Irodalomjegyzék	35

1. Jelölések és rövidítések jegyzéke

μl	microliter - mikroliter
bp	base pair - bázispár
db	darab
DNS	deoxyribonucleic acid - Dezoxiribonukleinsav
GenAlEx	Genetic Analysis in Excel
He	Expected Heterozygosity- Várt heterozigotitás
Ho	Observed Heterozygosity- Megfigyelt heterozigotitás
K	Cluster- Klaszter
mtDNS	mitochondrial DNA- mitokondriális DNS
n	Number- Egyedszám
Na	Number of alleles- Allélszám
Ne	Number of effective alleles- Effektív allélek száma
PCA	Principal Component Analysis - Főkomponens analízis
PCoA	Principal Coordinate Analysis - Főkoordináta analízis
PCR	Polimerase Chain Reaction - Polimeráz láncreakció
pId	példány
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA -
rRNS	ribosomal RNA- riboszomális RNS
SNP	Single Nukleotide Polymorphism- Egy pontos nukleotid-polimorfizmus
STR	Short Tandem Repeat- Rövid tandem ismétlődés

2. Bevezetés és célkitűzések

A mosómedve (*Procyon lotor*) és a nyestkutya (*Nyctereutes procyonoides*) hazánkban inváziós fajok, egész évben vadászható ragadozófajoknak számítanak. Mindkét faj esetében Európába betelepítették őket, így hazánkban a 1980-as évektől vannak jelen, amely annak köszönhető, hogy a tenyészetekből kiszabadultak vagy kiengedték őket (Báldi et al., 2017).

Az elmúlt években a mosómedve és a nyestkutya hazai állománya alacsony, viszont évről-évre folyamatos növekedést mutat, teríték adatokat tekintve pedig már éves szinten stabilan tíz példány fölötti a számuk (Csányi et al., 2023).

Ezek az invazív fajok nagy befolyással lehetnek a környezetre és a mindennapi életünkre is, mert ezek a fajok tehetnek akár egyes őshonos fajok kihalásáért, akár az általuk terjesztett betegségekért vagy akár mezőgazdasági károkért (Schaffner et al., 2013). Ennek függvényében fontos ezeknek az invazív fajoknak a kutatása az őshonos fajokkal szembeni versengés, illetve a különböző betegségek terjesztése szempontjából.

Kutatásom célja a Magyarországon előforduló mosómedve és nyestkutya genetikai alapú vizsgálata. Ezek a fajok kevésbé kutatottak Magyarországon ez teszi vizsgálatukat fontossá.

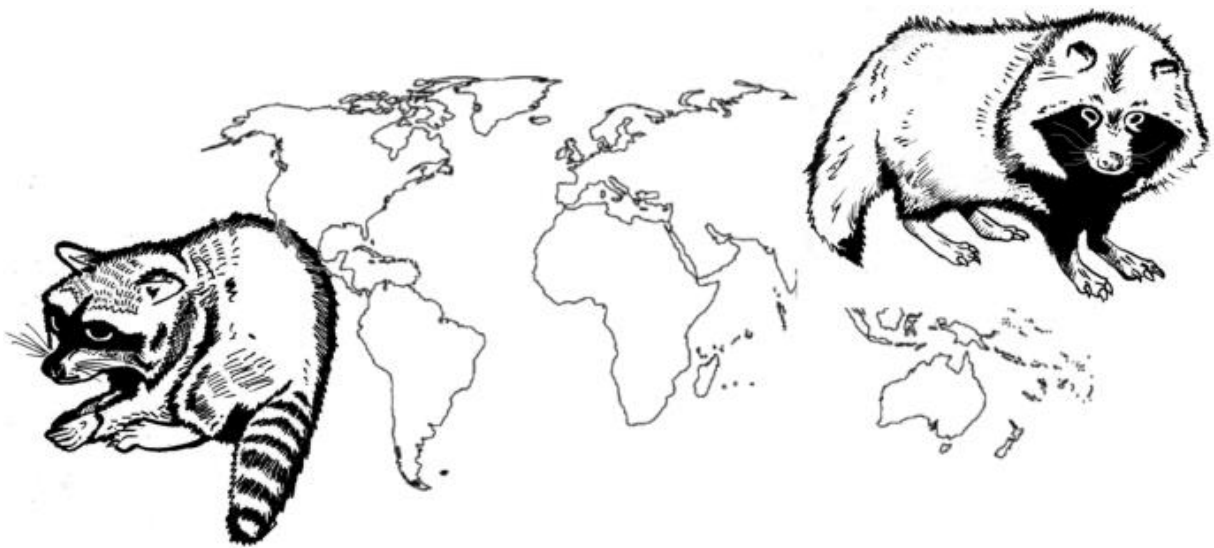
A TDK dolgozatomban során, ezeket az alapvető célokat tűztük ki:

1. Külföldi szakirodalmakból mosómedve és nyestkutya fajokon használt mikroszatellit markerek adaptálása,
2. Az adaptált markerek optimalizálása multiplex körülmények között fajonként,
3. Magyarországon gyűjtött mosómedve és nyestkutya mintákon a hazai állomány genetikai diverzitásának és struktúrájának felmérése, esetleges rokoni kapcsolatok feltárása

3. Szakirodalmi áttekintés

Az inváziós fajok elterjedését elősegítette a kereskedelem bővülése és az ezzel járó globalizáció. Ezeknek a fajoknak a jelenléte súlyos környezeti, gazdasági és egészségügyi hatásokat okozhat. A két általam vizsgált faj, a mosómedve és a nyestkutya is inváziós fajnak számít Európában, mivel ezek a fajok mosómedve esetében Amerikában, míg nyestkutya Ázsiában őshonosak (1.ábra). Ezek a vadfajok az új területeket gyorsan tudták benépesíteni és viselkedésbeli alkalmazkodásuk lehetővé tette, hogy az egyik legsikeresebb invazív fajként tartsák számon őket. A folyamatosan növekvő és terjeszkedő populációkból eredő egyik legnagyobb veszélyt a vadon élő állatok, a háziállatok és az emberek között a különböző vektorok által terjesztett kórokozók fenntartásában és terjesztésében betöltött szerepük jelenti (Keller et al., 2011). Magyarországon sikeresen elterjedt e két faj. Nálunk is veszélyt jelent a megjelenésük, mert kiszoríthatnak más őshonos fajokat, továbbá betegségeket terjeszthetnek, hazánkban ezért is vadászható mindkét faj egész évben.

1. ábra: Mosómedve és nyestkutya származása (Myśliwy et. al., 2022)



3.1. Mosómedve (*Procyon lotor*) jellemzése

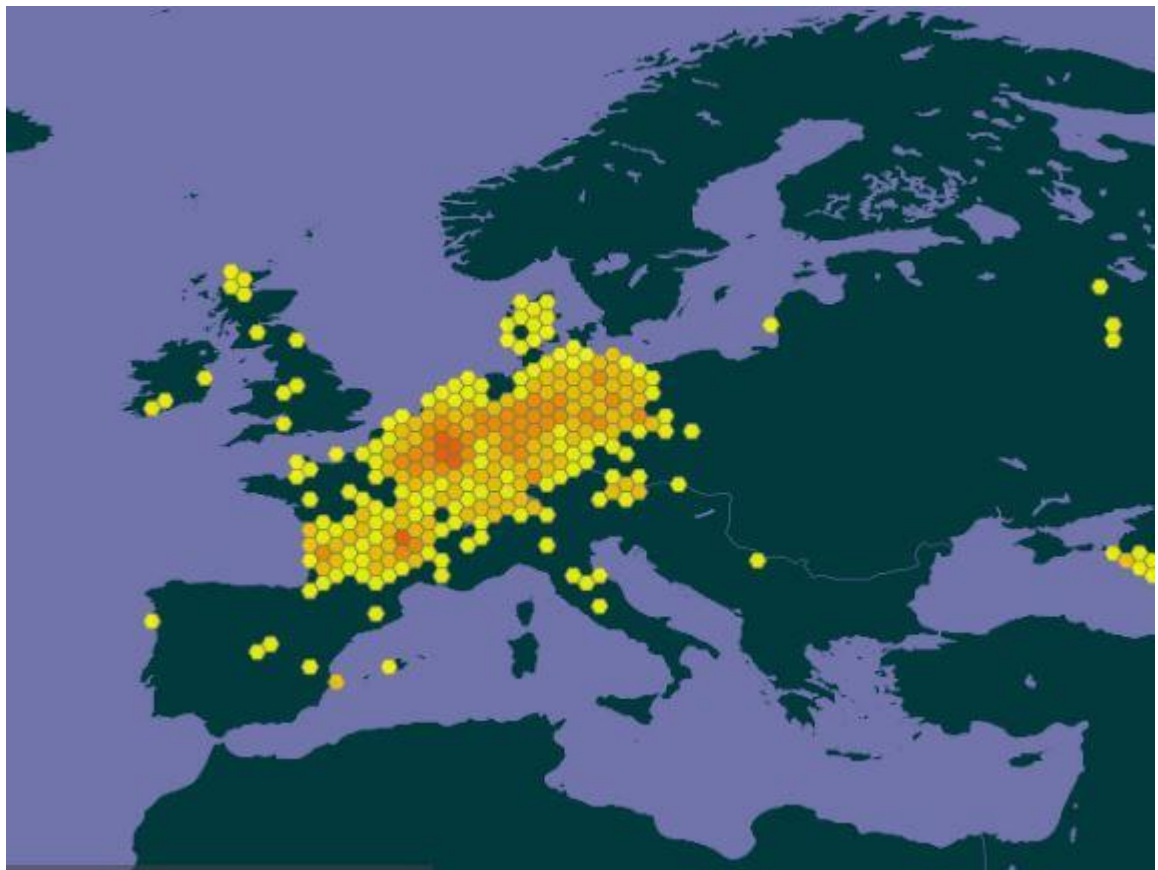
3.1.1. Európai elterjedés

A mosómedvét Japánba és Európába is betelepítették. Japánba a mosómedvéket házi állatnak szánva hozták be az országba. A gazdák, ha már felnőttek az állatok elengedték őket (Ikeda et al., 2004). Európában is azok az egyedek terjedtek el, amelyeket háziállatként tartottak és szöktek el. A prémesfarmokból való kiengedések és szökések, valamint a vadászat céljára szándékos betelepítések következtében a mosómedve szinte az egész kontinensen elterjedt. A mosómedve Észak-Amerikában honos faj, ami először 1934-ben került Európába, amikor a németországi Hessen tartományban engedtek szabadon két párt. Az első összegző publikációk természetesen a faj európai elterjedési területének központjából, Németországból származnak (Lutz, 1984). A II. világháború idején Közép-Európa számos pontján prémtelpeken tartott egyedek szabadultak ki. A korábbi Szovjetunió területeire is betelepítették ennek következtében több helyen is meg tudott telepedni, mint például Fehéroroszországban, Azerbajdzsánban, Dagesztánban, Üzbegisztánban és Krasznodar térségében is. Európában Németországon kívül megfigyelték már a Benelux-államokban, Csehországban, Szlovákiában, Dániában és hazánkban is (Heltai et al., 2010). Ötven évvel az első hatékony bevezetés után elterjedési tartománya Németországon túl, Franciaországra, Svájcra, Ausztriára és Lengyelországra is kiterjed (Lutz, 1984; Biedrzycka et al., 2014). Németországon kívül más európai országban is tenyésztették a mosómedvét fogságban, főként magántulajdon, kisállatkereskedelem és vadgyűjtemények céljából. Az ilyen kedvtelésből tartott mosómedvék megszöktek vagy szabadon engedtek őket, és találkoztak egymással az elszigetelt helyeken, és ott helyi populációkat hoztak létre (García et al., 2012; Biedrzycka et al., 2014). Ezeknek a betelepítéseknek eredményeképpen életképes populációkat is létre tudott hozni, amelyek 1975 óta növekednek az elterjedési területükön, és szétszóródtak Közép-Európában. A legújabb adatok is megerősítik a mosómedve Olaszországban (2003) és Spanyolországban (2004) való jelenlétét. Spanyolországban az elmúlt évtizedben megnövekedett a mosómedve észlelések száma, elsősorban a nagyvárosokban vagy azok közelében láttál őket. Feltételezések szerint Spanyolországban a legnagyobb mosómedve populáció, Madrid környékén fordul elő, bár a fajt már legalább 28 helyen jelentették már országszerte (García et al., 2012). Az első észlelés 2003-ban volt a Parque Regional del Sureste területén (Alda et al., 2013). A fajt Olaszországba is betelepítették, ahol 2004 óta az Adda folyó mentén, Lombardiában figyelték meg az egyetlen ismert szaporodó populációt (Mori et al., 2015).

Más országok, például Svédország, Norvégia, Dánia és Anglia arról számoltak be, hogy alkalmanként észlelték a jelenlétüket, viszont valószínűleg állattartóktól vagy állatparkokból szökhettek meg ezek az egyedek (Beltrán-Beck et al., 2012).

A vadászat azonban nem akadályozta meg más országokba való terjeszkedését. Főleg vizes élőhelyekhez kötődik, búvóhelyként kedveli az öreg, odvas fákat. Megtelepszik külvárosi övezetekben, parkokban, kertekben is. Állománya egész európai elterjedési területén növekszik (Mitchell-Jones et al., 1999; 2.ábra).

2. ábra: Mosómedve elterjedés Európában. A hatszögek jelölik az adott területen az egyedszám nagyságát, világos sárgával az alacsony egyedszám és piros színnel a magas egyedszám van jelölve (forrás: <http1>)



3.1.2. Hazai elterjedése

Az első hazai észlelést először Mórton figyelték meg. Aztán ezt követően máshol Nyugat-Magyarország területén figyelték meg, Győr-Moson-Sopron vármegyében (Faragó, 2012). Később a szlovák határ mellett található szigetközi térségből jelezték a fajnak a jelenlétét (Faragó, 2012). 1989-ben 9 egyed elejtését jelentették (Csányi, 1999). Majd rá egy évre végül elkészült az első szabadtéri fényképfelvétel a Pilis területén (Gábor, 1999).

Későbbiekben folytattak kérdőíves felmérést is, amelyet 1997 és 2006 között végeztek. A felmérés során 10-15 vadgazdálkodási egység számolt be mosómedve megjelenésről. A faj előfordulásáról az ország minden nagyobb tájegységéből érkezett megerősítés. A megfigyelések bizonytalanságát mutatja az is, hogy nagyon kevés azon vadászterületek száma, ahonnan több alkalommal is megerősítették a megfigyelést. Ugyanakkor 2002-ben és 2003-ban a válaszadók már a kérdőívekben is jelezték mosómedve tetemek megtalálását. Előbb 4 hím, 1 nőstény és egy fiatal egyed megtalálását jelezték Baranya, Pest, Nógrád és Hajdú-Bihar vármegyékből. A 2003-as évben összesen négy kifejlett hím példányt találtak Heves, Hajdú és Szabolcs vármegyék területén (Heltai et al., 2010). Az első, de független forrás által még nem igazolt elejtésekről 1996-ban számoltak be Borsod-Abaúj-Zemplén vármegye területéről, azóta 1997-et kivéve, minden évben terítékre került egy-két egyed. 1998-ban egy Gödöllő melletti fácántelegen élve fogó csapdával fogtak el egy kifejlett nőstény mosómedvét. 2000-ben több alkalommal is megfigyeltek a Pilis hegység területén és környékén egy mosómedvét. 2005 őszén ismét volt egy elejtés Hajdú-Bihar vármegyében (Heltai et al., 2010).

A mosómedve (17 pld) elejtett mennyisége a 2022-es évhez képest csökkenést mutat (4.ábra). A magyarországi egyedek száma ugyan önmagában nem jelentős, de az Országos Vadgazdálkodási Adattár adatai alapján emelkedő trendet mutat, ami a tartós megtelepedésüket jelezheti (Csányi et al., 2023). Európai megjelenésük annak a következménye, hogy az ember szándékosan vagy véletlenszerűen betelepítette őket prémjeik miatt. Stabil magyarországi jelenlétük nem örömdetes és ezért támogatja a Vadászati Kamara a vadászokat abban, hogy egész évben engedélyezett vadászati szezont biztosítanak korlátozás nélkül.

3.2. Nyestkutya (*Nyctereutes procyonoides*) jellemzése

3.2.1. Európai elterjedés

A nyestkutya eredetileg Ázsiából származó, invazív, ragadozó állatfajunk. Az első európai telepítés Ukrajnában történt meg majd később az egész európai kontinensen elterjedt (Mitchell-Jones et al., 1999). Ezeknek a betelepítéseknek az volt a célja, hogy hasonló értékű prém, amely a rókáéhoz hasonló, elérhető legyen Európában is, ne csak Ázsiában (Gyenge, 1985). Mivel a nyestkutya terjeszkedése nem tekinthető természetesnek, és az sem valószínű, hogy egyetlen terjeszkedési forrással kell számolnunk, többféle alfaj keveredhet és hibridizálódhat Európa területén. Pontosan nem lehet tudni, hogy a prémtenyészetek

mindig ugyanazzal az alfajjal dolgoztak-e és hogy a mesterséges betelepítéseknel mely alfajok jöttek számításba (Heltai et al., 2010).

Az európai adatokat először 1988-ban foglalták össze. A faj megfigyelési adatai többek között Finnországból (1935), Svédországból (1974), Lengyelországból (1955), Ausztriából (1962) származtak, és ebben az összefoglaló munkában természetesen szerepelt az 1961-ből származó első magyarországi előfordulás is. A nyestkutya napjainkban számos országban megtalálható, így a már említett Finnországban és Svédországban, a Baltikumban, Lengyelországban, Németországban, Bulgáriában, Romániában, Moldovában, Szerbiában és Magyarországon is. Megfigyelték továbbá Franciaországban, Hollandiában, Dániában, Norvégiában, Ausztriában, Svájcban, Boszniában és Szlovéniában is (3.ábra). A legtöbb élőhelyhez kiválóan alkalmazkodik, de elsősorban a tó- és folyópartokat, illetve az egyéb vizes élőhelyeket kedveli. Az ötvenes években történt megtelepedés után gyors állománynövekedését tapasztaltak Finnországban, a Baltikumban és Lengyelországban is, ami a nyolcvanas évek közepén tetőzött, kismértékű csökkenést mutatott, majd stabilizálódott. További nyugati irányú terjedése valószínűsíthető (Mitchell-Jones et al. 1999). A 2007 óta tartó populáció csökkenése Európában nem a mosómedvével való fajok közötti versengésnek, hanem a nyestkutya szopornyicajárványnak volt köszönhető (Mulder, 2012, 2013).

A későbbi populációbiológiai vizsgálatok részben magyarázatot is adnak a nyestkutya gyors area- és állománynövekedésére. A faj terjedését és állománynövekedését szinte egyáltalán nem korlátozza a fajok közötti versengés, mert a nyestkutya csak abban a periódusban aktív, amikor a táplálékforrások gyakorlatilag nem korlátozottak (Kauhala - Auniola 2001).

3. ábra: Nyestkutya elterjedése Európában. A faj előfordulási területei lila színnel vannak jelölve. (forrás: <http2>)

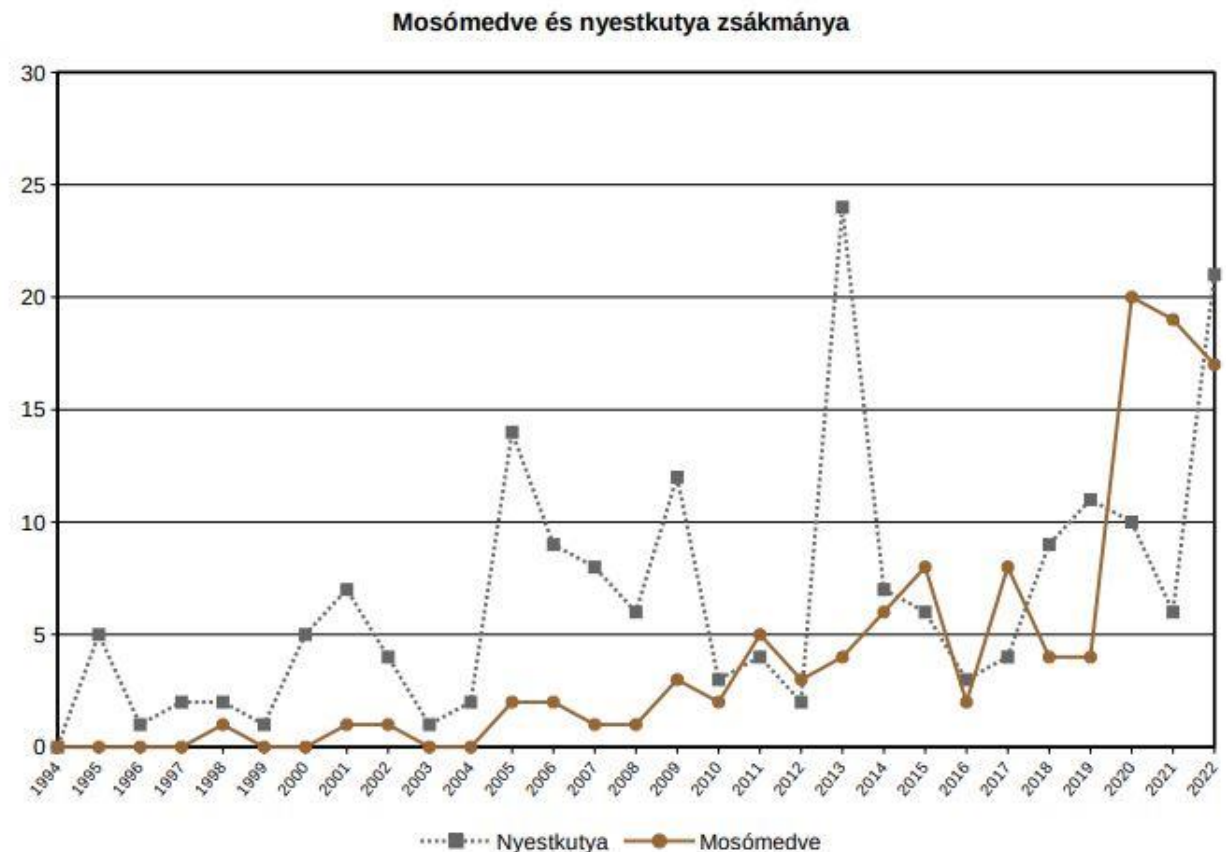


3.2.2. Hazai elterjedés

Magyarország területén az első példányt 1961-ben ejtették, aztán minden évben legalább egy lelövés történt, általában ezek a kilőtt egyedek a prém telepekről szökhettek meg (Heltai et al., 2000). Nyestkutya előfordulását 1997 és 2006 között nyomon követték kérdőíves felméréssel. Az Országos Vadgazdálkodási Adattárban 1995 óta állnak rendelkezésre terítékadatok. A kérdőívekre érkezett pozitív visszajelzések alapján Magyarországnak nincs olyan megyéje, ahonnan legalább egyszer ne jelezték volna a faj jelenlétét. Állandó jelenlétét csak nagyon kevés személy jelezte vissza, kb. 3-5. Ezek a területek egy Somogy és két Vas vármegyei eset kivételével, az ország keleti felében, a Duna-Tisza-közi, vagy Tiszántúli területeken találhatók. Találtak elhullott egyedeket is. A tetemeket többségét az ország keleti felében, a kölyköket Szolnok vármegye tiszántúli és Hajdú-Bihar vármegye területén lelték fel. Ugyanakkor a kérdőíves adatoknak ebben az esetben igen nagy a bizonytalansága (Heltai et al., 2010).

A nyestkutya (21 pld) elejtett mennyisége a 2022-es évhez képest növekedést mutat (4.ábra). Számuk ugyan önmagában nem jelentős, de nyestkutya esetében is emelkedő trendet mutat, ami a tartós megjelenésüket mutathatja (Csányi et al., 2023).

4. ábra: Mosómedve és nyestkutya elejtési adatok (Csányi et al., 2023)



3.3. Populációgenetikai vizsgálatok alapjai

Elsődlegesen a populációgenetikai vizsgálatokat, a természetes populációk genetikai diverzitásának vizsgálatára alkalmazták (Robert - Philipp 1997). A vizsgélati célok jelentősen bővültek, mert az utóbbi évtizedekben a rendelkezésre álló módszerek nagy fejlődésen mentek keresztül.

A RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) módszer volt a legkorábbi populációgenetikai vizsgálati módszer. Ebben a módszerben random, 9-12 nukleotidból álló primer alkalmazásával végezzük PCR-t, a kapott fragmentumok száma pedig attól függ, hogy a primerek hányszor találhatnak komplementer szakaszokat a DNS molekula két szálán 200-2000 bp távolságban, amely a hőstabil polimeráz hatótávolsága. A kapott DNS

fragmentek teszik lehetővé a genotípusok összehasonlítását. Az előnyei közé tartozik az, hogy nem igényli a templát DNS szekvenciájának ismeretét, nanogram nagyságrendű DNS mennyiség elég a vizsgálatokhoz és rendszerint nagyfokú polimorfizmust mutat. A módszer hátránya, hogy a kísérleti paraméterektől függ reprodukálhatósága, a DNS tisztaságára és minőségére érzékeny, általában domináns marker. Polimorf mintázat esetén a különbséget jelentő fragmentumok a gélből kivághatóak, a DNS molekula tisztítása után a fragmentum plazmidba ligálható és a plazmidra specifikus primerekkel szekvenálható. A szekvencia alapján a fragmentumra specifikus primerek tervezhetőek, ezek az ún. SCAR primerek jól reprodukálható eredményeket adnak, másrészt akár kodominánsak is lehetnek (Kiss, 2005). A mtDNS, azaz a mitokondriális DNS által is lehet vizsgálni az egyedek közötti rokonsági kapcsolatokat úgy, hogy a 16S rRNS szekvenciákat összehasonlítjuk, hiszen ennek eredménye képp nem szükséges a szervezetek DNS-ének a teljes szekvenciáját ismerni. Az a lényege, hogy az összehasonlított nukleotidok száma statisztikailag jelentős számúnak kell lennie, és hogy az összehasonlított szekvenciák megfelelően legyenek összeillesztve. A 16S rRNS különbözik a nukleotid-szekvenciájában, viszont olyan régiókat is tartalmaz, amelyek tökéletesen vannak konzerválódva. Olyan konzervált szekvenciák, amelyek néhány nem túl konzervált szekvenciával szomszédosak, alkalmazhatóak a filogenetikai kiértékelésekhez (Lane et al., 1985).

Az SNP-k (*Singe Nucleotide Polymorphism*), magyarul egy pontos nukleotid polimorfizmusok, ezek olyan szekvencia variációk a genomban, amelyek természetesen fordulnak elő. Egyetlen nukleotid megváltozását jelenti a DNS szekvenciájában. Az SNP-k a genomban bárhol előfordulhatnak, de a legtöbb SNP a genom nem kódoló szakaszain található, amennyiben ezek a bázis polimorfizmusok a DNS kódoló vagy szabályozó régiójában találhatók, akkor gyakran funkcióváltozást eredményeznek. Az SNP-k használata mellett szól, hogy nagyobb számban fordulnak elő a genomban, stabilabbak, illetve pontozásuk is jelentősen egyszerűbb, mint a mikroszatelliteké (Collins et al., 1998).

A munkámhoz fontos megemlíteni a mikrosatelliteket, amely egyedi genomhely (single lokusz) vizsgálatok közé tartozik. A mikrosatellitek kiváló eszközei a géntérképezésnek, valamint a használatukkal az egyedek pontosan és könnyen azonosíthatóak. A genomban elszórtan elhelyezkedő néhány bázispár ismétlődéséből álló 50-300 bp hosszúságú szekvencia részletek. Ezen ismétlődések típusa más-más azonosíthatóságot az őket határoló, genomban csak egy-egy helyen előforduló szekvenciák, primer kapcsolódási helyek teszik lehetővé (Heszky et al., 2005). A mikrosatellitek viszonylag közel állnak az ideális genetikai marker fogalmához. Nagyjából egyenletesen oszlanak el a genomban, a

kódoló és a nem kódoló régióban egyaránt előfordulnak. Egyszerű, néhány bázispár hosszú szekvencia-ismétlődésekből álló DNS-motívumok, amelyek az adott genom egyetlen pontjára jellemző szekvenciárészlet között helyezkednek el. A mikroszatellit alkalmazásának előnyei közé tartozik, az ismétlődések száma a néhánytól, a több tucatig terjedhet (0-40), míg a mikrosatellit teljes mérete 50 és 500 bp között változik. Polimorfizmusuk (allélváltozataik) az ismétlődések számának eltéréseiből adódik. Ez viszonylag gyakori másolási hibák, spontán mutációik következménye (Kurjákné, 2013). A polimeráz láncreakció, vagyis polymerase chain reaction: PCR arra alkalmas, hogy egy adott DNS szakaszt in vitro felamplifikáljunk. A reakció három egymást követő hőmérsékleti lépések vannak. Elsőnek a kétszálú DNS denaturációja (szétválása) 92-96 °C-on ezután a primereink feltapadása következik (annealing) a templát komplementer helyeire 30-70 °C-on. A harmadik lépésben a primerek növesztése a DNS polimeráz segítségével (elongation) 72 °C-on. A denaturáció, annealing és elongáció együttesen ciklusnak hívjuk, amelyek ismétlődnek és ez vezet végül a DNS felsokszorozásához (Heszky et al., 2005).

3.3.1. Mosómedve genetikai vizsgálatok

A genetikai vizsgálatok révén információkhoz tudunk jutni egy-egy populációról, továbbá nyomon követhetjük az adott populáció kialakulását. Így fő célja az volt egy spanyol tanulmánynak, hogy megértsük a mosómedve közelmúltbeli inváziós történetét Közép-Spanyolországban egy olyan genetikai megközelítés segítségével, amely kombinálja a mitokondriális és a sejtmag DNS-markerekből származó információkat. Felmérték a mosómedve betelepítés minimális számát Közép-Spanyolországban, a betelepítés után fennmaradó genetikai variációt és tényleges populációméretet egy észak-amerikai őshonos mosómedve populációhoz viszonyítva, és a relatív effektív alapító méretet (Alda et al., 2012). 2017-ben egy másik spanyolországi vizsgálat alapján populáción belüli diverzitás növekedésére számítottak, mivel a spanyol populációk genetikailag változatosabbak, mint a közép-európaiak. Azért változatosabbak, mert az elszigetelt populációk elterjedési területe kibővült. Mivel eredményeik bizonyítéknak szolgálnak az állatkerti egyedek és a szabadon élő egyedek közötti génáramlásának. A tanulmány azt mutatja, hogy a genetikai elemzések segíthetnek rekonstruálni az inváziós folyamatokat, ami fontos az invazív fajok jobb megértéséhez és hatékonyabb kezeléséhez (Fischer et al., 2017).

Frantz és munkatársai 2013-ban Németországbeli mosómedve populációkat vizsgálták meg. Mivel a mosómedvék sikeresen elszaporodtak Közép-Európában annak ellenére is, hogy a

populációt kevés egyed alapította. Az elterjedést azzal magyarázták meg, hogy ez a faj rendkívül alkalmazkodó képes. A német mosómedve populációnak azonban több alapítója lehet, és a feltételezettnél változatosabb genetikailag. Viszonylag gyakoriak az állatkertekből való kiszökések. Ebben a vizsgálatban a mitokondriális DNS alapján dolgoztak. Az eredmények alapján a populációt kevés nőtény alapította, és a német mosómedvek két külön kibocsátási periódusból származnak Közép- és Kelet-Németországból. Ez alapján Kelet-Németországban egy különálló populáció található. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy még több információhoz jussunk a mosómedve genetikai sokféleségéről és a populáció genetikai szerkezetéről (Frantz et al., 2013).

Franciaországban jelenleg három különálló, növekvő populációt hoztak létre a mosómedvek. Ezen populációk jelenlegi térbeli genetikai struktúrájának, elterjedési eseményeinek és filogenetikájának azonosítása szükséges a faj megértéséhez. Franciaországból és Belgiumból származnak a minták, amik vadon élő és fogságban élő egyedeket foglalják magukba. A francia mosómedve populációk genetikai sokféleségének és jelenlegi populációgenetikai szerkezetének jellemzésére, valamint a belga populációval való lehetséges genetikai kapcsolat azonosítására mitokondriális DNS-t és mikroszatelliteket használtak. Az eredmények alapján a francia egyedeknek legalább három független betelepítési periódusa volt. Bár mind a három populáció alacsony genetikai diverzitást mutat, viszont fennmaradó genetikai sokféleség elegendő ahhoz, hogy sikeresen alkalmazkodjanak új környezetükhöz és lehetővé tegyék a gyors elszaporodást. Az északkeleti francia populációra különös figyelmet kell fordítani, mert ezek az egyedek genetikailag keverednek a belga populációval (Larroque et al., 2023).

3.3.2. Nyestkutya genetikai vizsgálatok

A nyestkutya (*Nyctereutes procyonoides*) Délkelet-Szibériától Észak-Vietnamig elterjedt, beleértve Koreát és Japánt, valamint Európát is. Koreában a legtöbb versenytársa kihalt, ami a nyestkutya populáció gyors növekedését eredményezte. Ez a nagy populációnövekedés aggodalmakat váltott ki az ökoszisztémában betöltött szerepével kapcsolatban továbbá a különböző fertőző betegségek zoonózisos átvitelével kapcsolatban. Ezeknek a megakadályozásában hatékony módszerre volt szükség a nyestkutyák ellenőrzésére Koreában. A nyestkutyák genetikai diverzitásának és szerkezetének vizsgálatához 12 polimorf mikroszatellit lókuszt azonosítottak. Ezeket az új mikroszatellit markereket Dél-

Korea öt helyéről származó 104 nyestkutya minta alapvető populációgenetikai paramétereinek meghatározására alkalmazták. A mintákon belüli 12 lókuszt átlagos allélszáma 8,7 volt, a lókuszonkénti allélok száma pedig 2-13 között volt. Az átlagos várt és megfigyelt heterozigótaság 0,723 és 0,619 volt. A Bayes-alapú klaszteranalízis szerint, a koreai nyestkutyák négy különböző genetikai alpopulációból áll. Ezek a genetikai információk nagyon hasznosak lesznek a fertőző betegségek terjedésének megelőzésében (YoonJee et al., 2013).

A további vizsgálatnak az volt a célja, hogy a tenyésztett és vadon élő nyestkutyák közötti lehetséges különbségeket kimutassák. A 15 mikroszatellit szekvencia polimorfizmusának elemzése arra a következtetésre vezetett, hogy a lengyel farmokon nevelt nyestkutya és a Lengyelországban élő, vadon élő nyestkutyák két genetikailag különálló állatcsoport. A vadon élő lengyel nyestkutyák genetikailag jobban hasonlítanak a kalinyingrádi régióból származó vadon élő állatok populációjához, mint a haszonállatokhoz. A lókusztok elemzése egyértelmű genetikai különbségeket mutatott ki a tenyésztett és vadon élő nyestkutya populáció között, annak ellenére, hogy a két állatcsoport mindössze 50 éves elszigeteltségben van. A tenyésztett populációkat nagyobb genetikai variáció jellemezte, mint a vadon élő populációt. Az elemzések alapján három mikroszatellit lókuszt javasoltak a telepekről kikerült állatok eredetének meghatározására (Kasperek et al., 2015).

4. Anyag és módszer

4.1. Mosómedve és nyestkutya mintavétel

A felhasznált mintákat az egyetem Vadgazdálkodási és Természetvédelmi Intézetétől kaptuk, melyek legális vadászatokon kerültek elejtésre. Ezekből a példányokból boncoláskor izomszövet mintavételezés történt. A 31 db mosómedve és 15 db nyestkutya mintákat egyedi azonosítószámmal láttuk el, biobankunkban regisztráltuk, és rögzítettük a mintákhoz tartozó adatokat (1.táblázat, 2.táblázat, 5.ábra, 6.ábra).

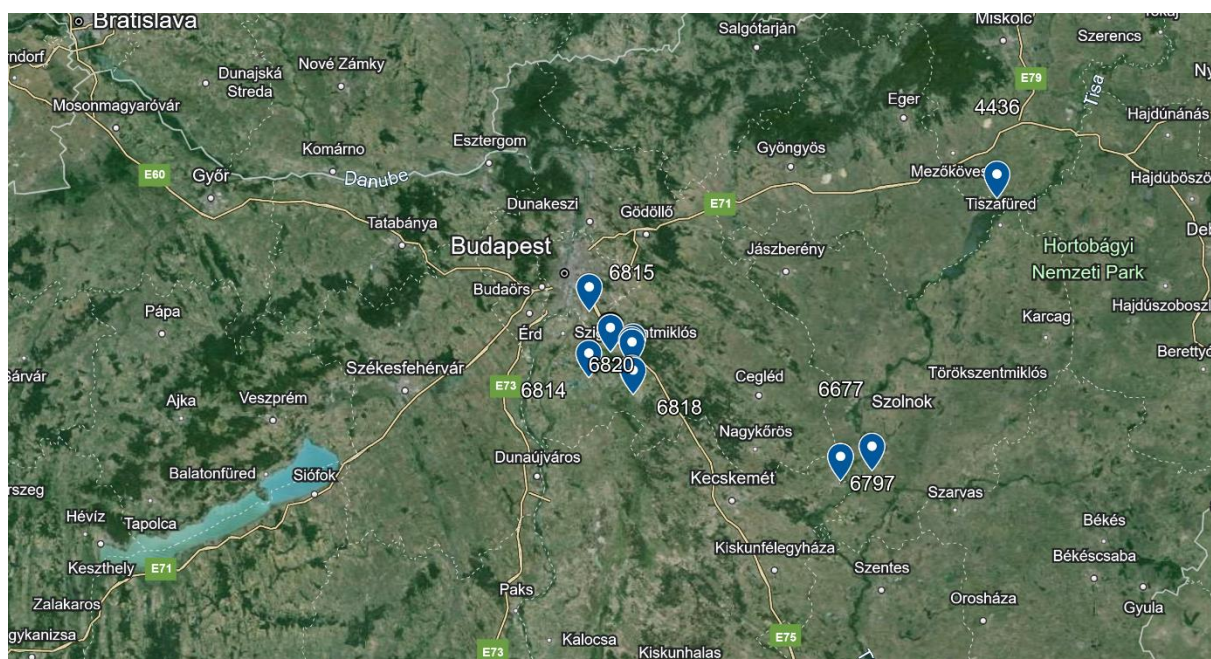
1. táblázat: Mosómedve minták adatai (forrás: saját munka)

Sorszám	Biobank azonosító	Elejtés helye	Elejtés éve	Egyed ivara
1	4431	Ócsa	nincs adat	hím
2	4432	nincs adat	nincs adat	nőstény
3	4433	Ócsa	nincs adat	nőstény
4	4434	Ócsa	nincs adat	hím
5	4435	Ócsa	nincs adat	hím
6	4436	Tiszavalk	2002	nőstény
7	4437	Ócsa	nincs adat	hím
8	4438	Ócsa	nincs adat	hím
9	4439	nincs adat	nincs adat	hím
10	4440	nincs adat	nincs adat	hím
11	6674	nincs adat	2017	hím
12	6675	Ócsa	2022	nőstény
13	6677	Tiszakécske	2022	hím
14	6693	Soroksár	2023	hím
15	6795	Ócsa	2021	hím
16	6796	Ócsa	2023	hím
17	6798	Tiszaöldvár	2023	hím
18	6797	Ócsa	2023	nőstény
19	6799	Ócsa	2023	nőstény
20	6800	Ócsa	2023	hím
21	6801	Ócsa	2023	nőstény
22	6813	Dabas	2023	hím
23	6814	Bugyi	nincs adat	hím
24	6815	Inárcs	2023	nőstény
25	6816	Inárcs	2023	nőstény
26	6817	Inárcs	2023	nőstény
27	6818	Dabas	2023	hím
28	6819	Ócsa	2022	hím
29	6820	Ócsa	2022	hím
30	6821	Ócsa	2023	nőstény
31	6822	Ócsa	2023	hím

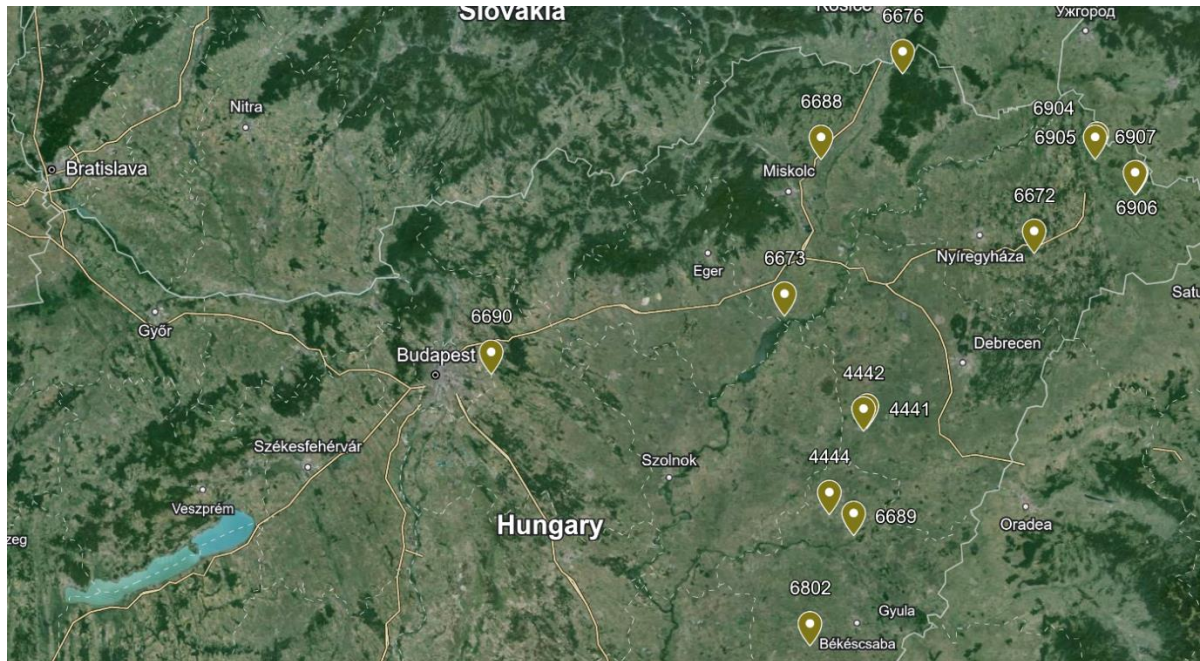
2. táblázat: Nyestkutya minták adatai (forrás: saját munka)

Sorszám	Biobank azonosító	Elejtés helye	Elejtés éve	Egyed ivara
1	4441	Püspökladány	2009	nőstény
2	4442	Püspökladány	2009	hím
3	4443	nincs adat	nincs adat	hím
4	4444	Déaványa	2006	hím
5	6672	Pócspetri	2023	hím
6	6673	Tiszavalk	2022	nőstény
7	6676	Hernádvölgye Vadásztársaság	2020	nőstény
8	6688	Szikszo	2023	nőstény
9	6689	Körösladányi Vadász Egyesület	2020	hím
10	6690	Budapest-Pécel	2020	hím
11	6802	Gerendás	2023	hím
12	6904	Tiszaszalka	2023	nőstény
13	6905	Tiszaszalka	2023	hím
14	6906	Tivadar	2023	hím
15	6907	Tivadar	2023	nőstény

5. ábra: Mosómedve minták elejtési helyei (forrás: saját munka)



6. ábra: Nyestkutya minták elejtési helyei (forrás: saját munka)



4.2. DNS izolálás

A kapott izomszövet mintákból MagCore HF16 Plus Automated Nucleic Acid Extractor (7. ábra) MagCore Genomic DNA Tissue Kit (RBC Bioscience Corp., Tajvan) segítségével DNS-t izoláltunk, a gyártó utasításai szerint. Az izolált DNS-ek mennyiségét és minőségét ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA) spektrofotométerrel ellenőriztük.

7. ábra: MagCore HF16 Plus DNS izoláló robot (forrás: saját munka)



4.3.PCR vizsgálatok

A szakirodalmi adatok alapján kiválasztott mosómedve (Fike et al. 2007, Cullingham et al. 2006) és nyestkutya (Drygala et al. 2016, Griciuvienė et al 2006) mikroszatellit primereket először jelöletlenül vásároltuk meg és reakciónként egy primert használva teszteltük azokat (8. ábra). Erre azért volt szükség, mert a későbbiekben multiplex körülmények között (egy reakcióterben több markert összemérve) szeretnénk volna azokat használni, lehetőség szerint azonos anellációs hőmérsékleten. Az azonos anellációs hőmérsékleten működő primer párokat használtuk a későbbiekben multiplex körülmények között fluoreszcens jelöléssel ellátva a primerek 5' végén. A multiplex reakciók tervezésénél a fő szempont az volt, hogy az allélméretek fluoreszcens jelölésük szerint eltérő mérettartományba essenek, így a kapott jelek nem interferálhatnak a genotipizálásnál. A primerek kiválasztásának fő szempontja volt, a szakirodalmi adatokból ismert lókuszonkénti allélszám, ugyanis ezek a primerek – az ismert adatok alapján – kellően informatívnak bizonyultak populációgenetikai vizsgálatok elvégzéséhez.

4.3.1. Mosómedve és nyestkutya STR markerszett

Mind a két faj esetében a már fluoreszcens jelöléssel ellátott primereket teszteltük, majd a szakirodalmakból ismert allélméretek alapján multiplexeket hoztunk létre, melyeket optimalizáltunk. (3., 4. táblázat). Az optimalizálást követően végeztük el a PCR vizsgálatokat a dolgozatban szereplő mintákon. A PCR reakciók sikerességét agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük.

3. táblázat: Mosómedve STR marker szett 1. oszlop=primer sorszáma, 2. oszlop=elnevezés, 3. oszlop=primer szekvencia (5'-3'), 4. oszlop= ismétlődő motívum, 5. oszlop= fragment hossz (bp) szakirodalomban, 6. oszlop= allélek száma szakirodalomban (Fike et al.2007, Cullingham et. al 2006)

Lókuszt sorszáma	Primer neve	Primer szekvenciák	Motívum	PCR termék hossz(bp)	Allélek száma (db)
1	PLOT-01_F	CAGACCAGATAAGATGATGATGC	(AG)16	162–172	5
	PLOT-01_R	CCTTTATCACTCCTAAATTATGTTCC			
2	PLOT-02_F	TCAATGTAGAACTGAGAAAAATTTGA	(GT)11	180–204	10
	PLOT-02_R	GGCTCAAAATCAGAGGTTAACAA			
3	PLOT-03_F	TGCATATTCTATGAACGGAGAAC	(GT)12	297–309	6
	PLOT-03_R	AGGACAGTGGAATCTGGTGAG			
4	PLOT-06_F	TAGCATGCAACTCCTCATCC	(TATC)10	161–173	4
	PLOT-06_R	TGGAGAGAAAATCCCACAGAC			
5	PLOT-07_F	TCTAGCTGAATCATATGAACAGAACC	(AC)10	209–221	7
	PLOT-07_R	AAGGCACGTTCCACATTC			
6	PLOT-08_F	TGTCTGTTAGACCACAGAAGTCC	(GATA)10	236–256	6
	PLOT-08_R	ATTAAATATAATAGGACAGGGTGTGC			
7	PLOT-10_F	ACTCTTGCCTGGACTCATCC	(GATA)9	146–178	9
	PLOT-10_R	ATGCCAATCAGGCTCATACC			
8	PLOT-11_F	CTAATCCACGTGCTTTATGTTCC	(GT)10	196–204	6
	PLOT-11_R	GGAGCCATCACTGACTCTGG			
9	PLO2-14_F	AAGAGCGTAATAAAAAGCTTAC	GAAA(21)	228–316	17
	PLO2-14_R	CAAATAACAAGTTTCAATTTGG			
10	PLO3-86_F	GATTGATAGATTAATTGGTCTTAACCTCC	CTTT(20)	301–460	23
	PLO3-86_R	CTGGATTATAAATCTGGCAAGAGCC			

4. táblázat: Nyestkutya STR marker szett 1. oszlop=primer sorszáma, 2. oszlop=elnevezés, 3. oszlop=primer szekvencia (5'-3'), 4. oszlop= ismétlődő motívum, 5. oszlop= fragment hossz (bp) szakirodalomban, 6. oszlop= allélek száma szakirodalomban (Dygala et al., 2016, Griciuvienė et al., 2016)

Lókuszsorszáma	Primer neve	Primer szekvenciák	Motívum	PCR termék hossz(bp)	Allélek száma (db)
1	FH2096_F	CCGTCTAAGAGCCTCCCAG	(GAAT)9	84-106	5
	FH2096_R	GACAAGGTTTCCTGGTTCCA			
2	FH2054_F	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	(GATA)16	134-164	13
	FH2054_R	ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC			
3	FH2010_F	AAATGGAACAGTTGAGCATGC	(ATGA)10	218-238	5
	FH2010_R	CCCCTTACAGCTTCATTTTCC			
4	PEZ17_F	CTAAGGGACTGAACTTCTCCATAC	(GAAA)n	186-218	10
	PEZ17_R	GTGGAACCTGCTTAAGATTCTCTT			
5	V402_F	GGGTAATTCATCCAGTGCCTT	(TG)n	73-90	6
	V402_R	TATGCAAACATGCAAACATGC			
6	V142_F	AAGCAGATCCTAGAGCAGCA	(TG)n	109-130	8
	V142_R	CCCCACAGTTTAGAAATATCTGC			
7	FH2226_F	GGACTACCCCATTCATTG	tetranukleotid	144-186	11
	FH2226_R	GAATCGAGTCCCATATCGGG			
8	V602_F	CAGCCTGGACTACAATTCTCTTT	(CT)13,14,18	128-154	9
	V602_R	CCCCAAGTCTTTTGTCCAGA			
9	FH2316_F	AAATGGCCTGACGAATATGC	tetranukleotid	280-350	19
	FH2316_R	GTGCCATGGCATATGGTAAA			
10	DGN14_F	TCACACAAAGTGGGTAAGATGG	tetranukleotid	248-314	23
	DGN14_R	GATTATGGTGCTATCCCTCTGG			

4.4. Populációgenetikai vizsgálatok

A mikroszatellitek fluoreszcensen jelölt primerekkel végzett multiplex reakciók eredményeként kapott PCR termékek allélméreteit kapilláris elektroforézissel határozták meg az Eurofins BIOMI Kft-nél, ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems Group, USA) készüléken. Az elektroferogrammok értékeléséhez Geneious Prime programot használtunk (Biomatters Ltd.). A kapott allélméreteket Microsoft Excel táblázatban rögzítettük. A vizsgált fajokhoz tartozó allélek összesítését (allélfrekvencia, heterozigotizáció) GenAlEx ver. 6.501 (Peakall és Smouse 2012) Microsoft Excel bővítmény segítségével határoztuk meg. A fajok genetikai struktúrájának meghatározásához főkoordináta analízist (PCoA) és bayesi féle klaszteranalízist használtunk a STRUCTURE program segítségével (Pritchard et al. 2000). A fajokon belüli rokoni kapcsolatok feltárásához a Colony2 programot használtuk (Jones és Wang 2010) a következő beállításokat alkalmazva: a hím és a nőstény egyedek is monogámok, illetve feltételezve, hogy a minták között találunk szülői kapcsolatokat is, ezért ennek valószínűségét 0.9-re állítottuk (0-1 közötti változó). Az eredmények közül a 85%- vagy a feletti valószínűségi értékkel rendelkezőket vettük figyelembe.

5. Eredmények és értékelésük

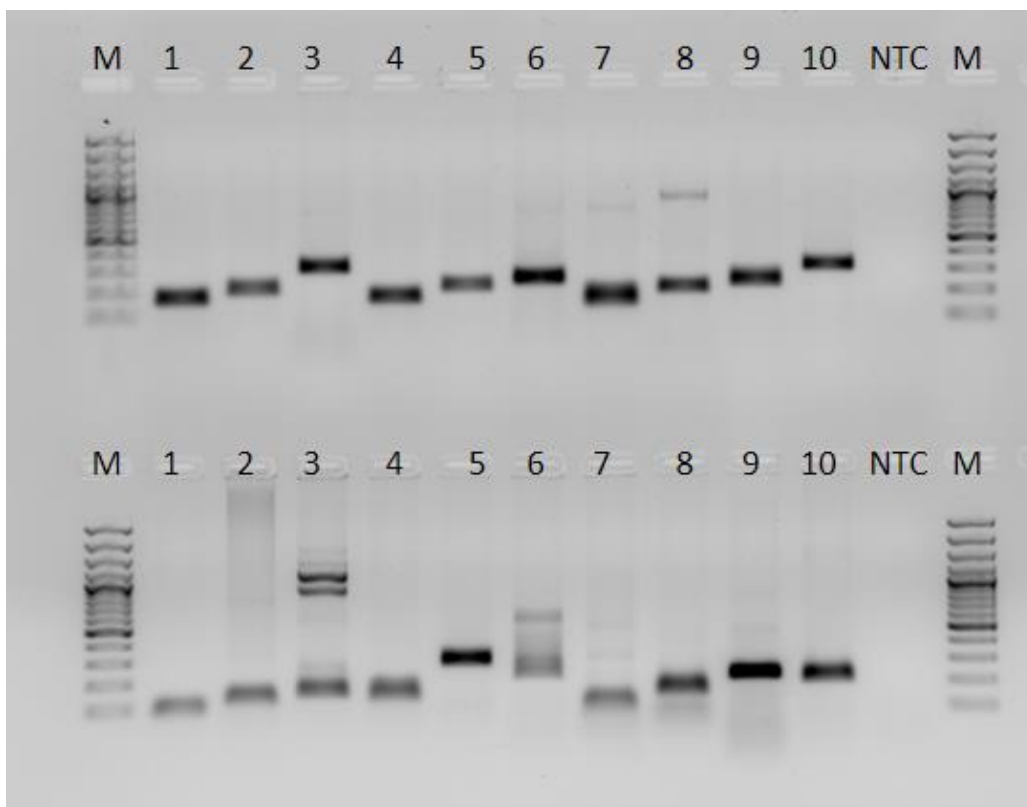
5.1 DNS izolálás és PCR vizsgálatok

Mindkét faj esetében az alkoholban tárolt szövetmintákból sikerült a PCR vizsgálatok elvégzéséhez szükséges mennyiségű és minőségű genomiális DNS-t izolálni.

5.2. Markerek optimalizálása multiplex körülmények között

A jelöletlen primerpárok mind a két faj esetében működtek azonos anellációs hőmérsékleten (8.ábra), így 10-10 primerpárból hoztuk létre a plexeket, már fluoreszcens jelöléssel ellátva a primerek forward szálát.

8. ábra: Mosómedve és nyestkutya jelöletlen primer párok gélképe (M= molekulásúly marker; NTC= negatív kontroll) Az „M” betű 100 bp plusz molekula tömeg markert jelent. A gél 1,5%-os volt. (forrás: saját munka)



A mosómedve esetében 10 primer párból a plex1 5 primer párt, illetve a plex2 szintén 5 primer párt tartalmazott. A nyestkutya esetében a 10 primer párból szintén kettő multiplexet állítottunk össze: a plex1 4 primer párt, a plex2 6 primer párt tartalmazott.

A multiplex reakciókat mindkét faj esetében 10 µl 2x Multiplex mixet, 3 µl DNS templátot és különböző mennyiségben bemért primereket tartalmazott 20 µl végtérfogatban (5. táblázat, 6. táblázat, 7. táblázat).

5. táblázat: Mosómedve multiplex receptek (forrás: saját munka)

Reagens	Konc.	1 reakcióra (ul)	Reagens	Konc.	1 reakcióra (ul)
Templát	15 ng/ul	3,00	Templát	15 ng/ul	3,00
Multiplex PCR Mix	2 ×	10,00	Multiplex PCR Mix	2 ×	10,00
PLOT-01FR	10 pM/ul	0,60	PLOT-07FR	10 pM/ul	1,10
PLOT-02FR	10 pM/ul	1,10	PLOT-10FR	10 pM/ul	0,55
PLOT-03FR	10 pM/ul	0,80	PLOT-11FR	10 pM/ul	0,70
PLOT-06FR	10 pM/ul	0,45	PLOT-14FR	10 pM/ul	1,00
PLOT-08FR	10 pM/ul	0,85	PLOT-86FR	10 pM/ul	0,90
Desztillált víz		3,20	Desztillált víz		2,75
Összesen		20,00	Összesen		20,00

6. táblázat: Nyestkutya multiplex receptek (forrás: saját munka)

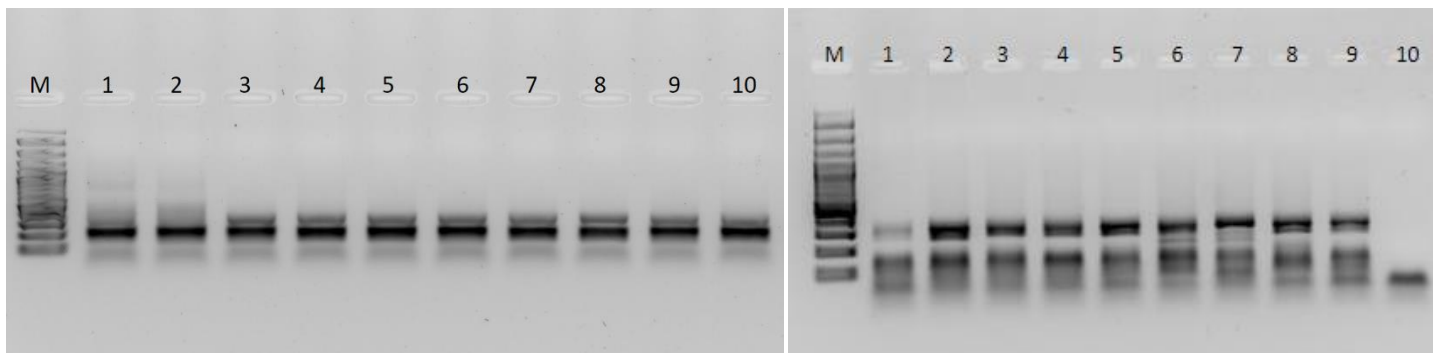
Reagens	Konc.	1 reakcióra (ul)	Reagens	Konc.	1 reakcióra (ul)
Templát	15 ng/ul	3,00	Templát	15 ng/ul	3,00
Multiplex PCR Mix	2 ×	10,00	Multiplex PCR Mix	2 ×	10,00
V402FR	10 pM/ul	0,80	FH2096FR	10 µM	0,40
V142FR	10 pM/ul	0,85	FH2054FR	10 µM	0,75
V602FR	10 pM/ul	1,15	FH2010FR	10 µM	0,30
FH2226FR	10 pM/ul	1,25	PEZ17FR	10 µM	0,65
DGN14FR	10 pM/ul	0,75	Desztillált víz		4,90
FH2316FR	10 pM/ul	0,85	Összesen		20,00
Desztillált víz		1,35			
Összesen		20,00			

7. táblázat: Mosómedve és nyestkutya multiplex PCR program (forrás: saját munka)

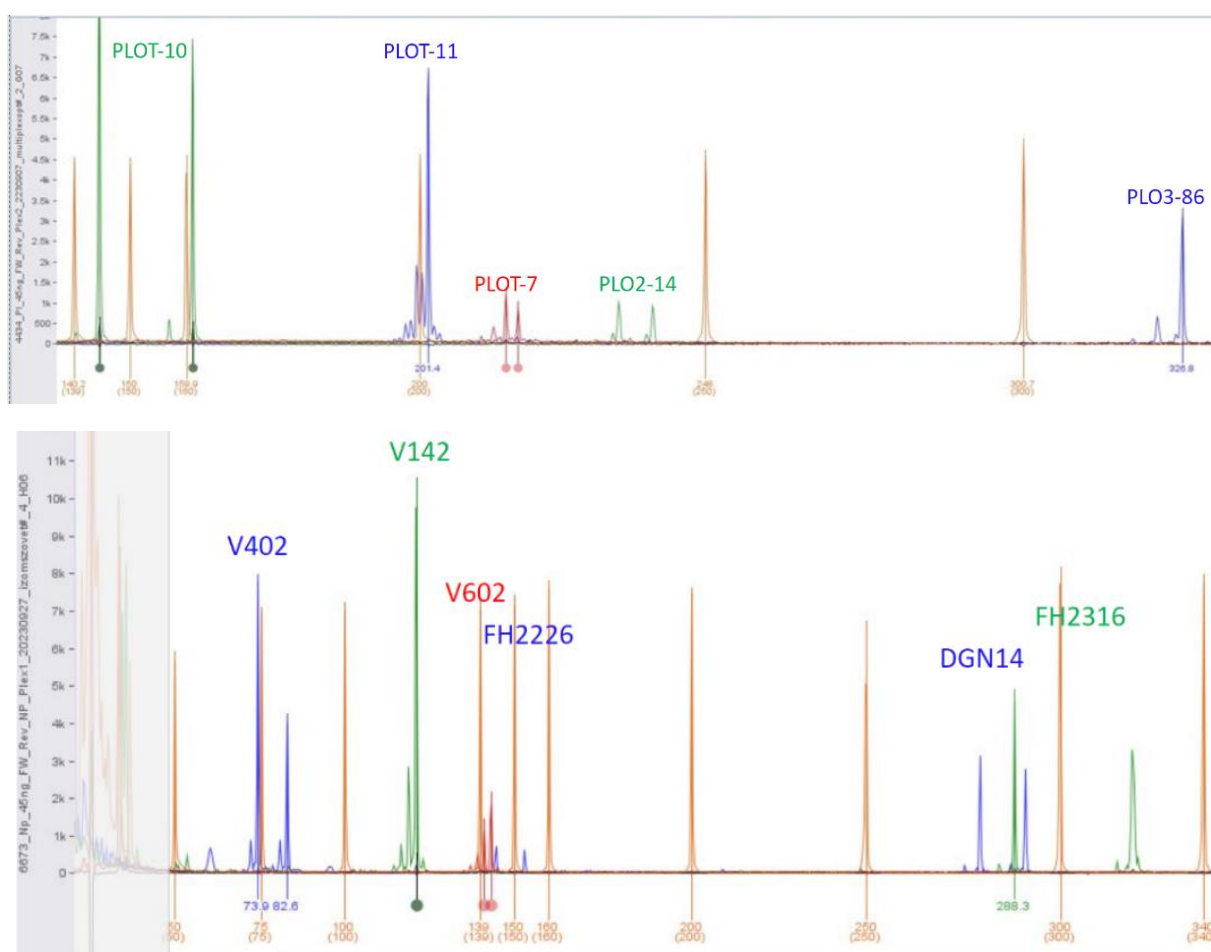
95 °C	15:00	1 ×
94 °C	0:30	35 ×
60 °C	0:40	
72 °C	1:00	
60 °C	30:00	1 ×

A PCR termékeken gélelektroforézis vizsgálatot végeztem azért, hogy megbizonyosodjak a PCR vizsgálat eredményességéről, amelynek gélképe a 9.ábrán látható. A 10. ábrán pedig a kromatogramjuk a Geneius Prime programban.

9. ábra: a, Mosómedve plex2 gélképe. Az „M” betű 100 bp plus molekula tömeg markert jelent. A gél 1,5%-os volt. Az egyes minták biobank azonosítójukkal. 1 = 4440; 2 = 6674; 3= 6675; 4= 6677; 5= 6693; 6= 6795; 7= 6796; 8= 6797; 9= 6798; 10= 6799. **b,** Nyestkutya plex1 gélképe. Az „M” betű 100 bp plus molekula tömeg markert jelent. Az egyes minták biobank azonosítójukkal. 1 = 4443; 2 = 4444; 3= 6672; 4= 6673; 5= 6676; 6= 6688; 7= 6689; 8= 6690; 9= 6802; 10= negatív kontroll. A gél 1,5%-os volt. (forrás: saját munka)



10. ábra: a, Mosómedve plex2 kromatogramja **b.,** Nyestkutya plex1 kromatogramja



5.3. Populációgenetikai vizsgálatok

5.3.1. Mosómedve

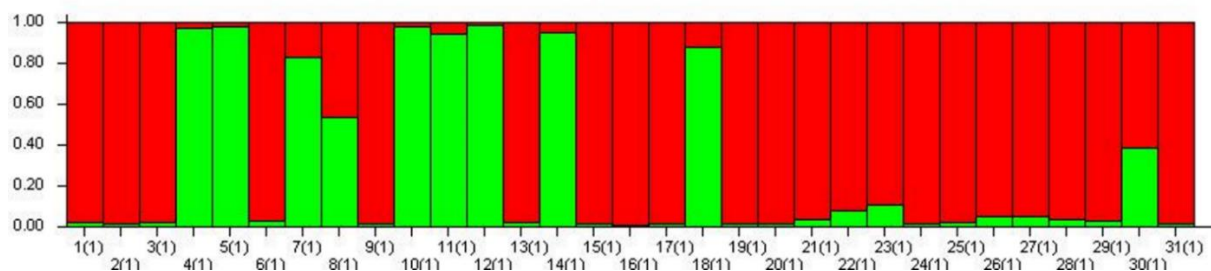
A vizsgált mosómedve állomány diverzitására vonatkozó eredmények a 8.táblázatban láthatók. A markereink polimorfnak bizonyultak. Az allélek száma 2-6, átlagosan 4,1; az effektív allélek száma 1,42-3,57, átlagosan 2,3; a megfigyelt heterozigotizás 0,32-0,71, átlagosan 0,54; az allél referenciák alapján várt heterozigotizás 0,29-0,72, átlagosan 0,54.

8. táblázat: Mosómedve állomány alapvető genetikai jellemzői (Na = talált allélek száma; Ne = effektív allélek száma Ho = megfigyelt heterozigotizás; He = az allélfrekvenciák alapján várt heterozigotizás) (forrás: saját munka)

Lókuszt	Magyarországi mosómedvék (n=31)			
	Na	Ne	Ho	He
PLOT-06	3	1,42	0,36	0,29
PLOT-01	2	1,98	0,65	0,49
PLOT-02	5	2,29	0,45	0,56
PLOT-08	5	3,42	0,71	0,71
PLOT-03	4	2,88	0,68	0,65
PLOT-10	5	2,58	0,61	0,61
PLOT-11	3	2,40	0,52	0,58
PLOT-07	3	2,02	0,68	0,51
PLO2-14	6	2,04	0,42	0,51
PLO3-86	5	1,63	0,32	0,38
Átlag	4,1	2,3	0,54	0,54

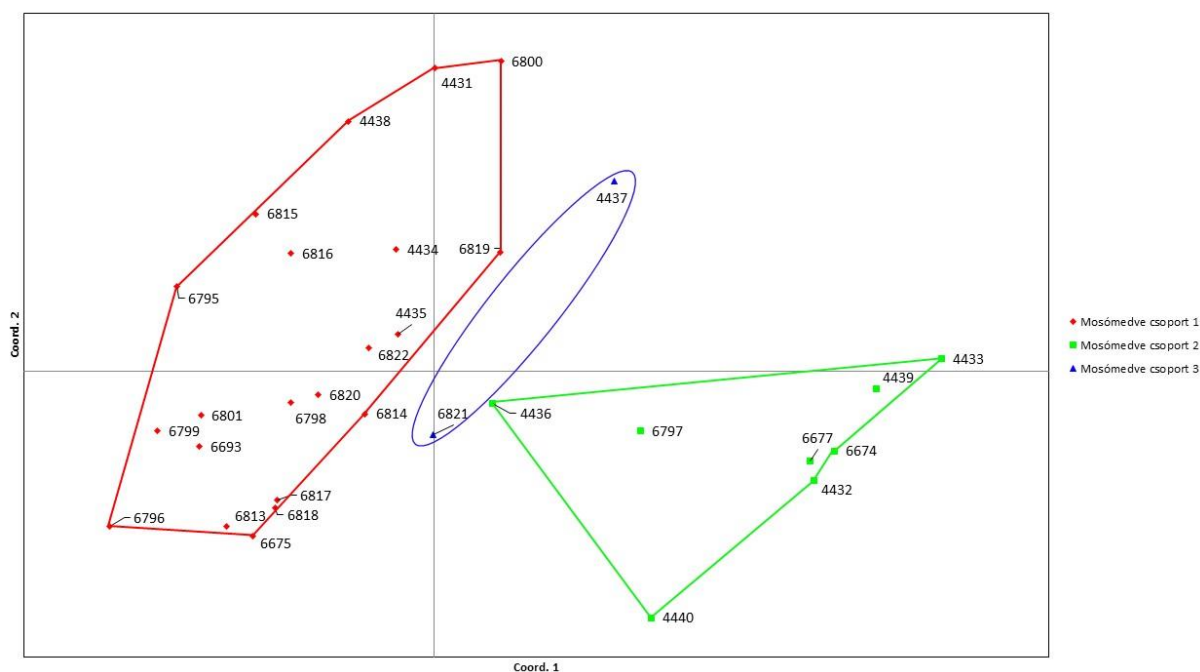
A Structure klaszterező program a mintákat két csoportra való bontását tulajdonította a legmagasabb általános valószínűségi értéknek (11.ábra). A piros színnel jelölt csoportban a minták többségében Ócsáról és környékéről származnak. A zöld színnel jelölt csoportban többségében ismeretlen helyről származó minták, illetve Ócsáról és a Tisza folyó mellől származó minták találhatók. A két csoport mintáin kívül két mintát a program nem tudott csoportba sorolni (8., 30. minták), ezek mind a két csoportra jellemző genotípussal rendelkeznek.

11. ábra: Genetikai profil alapján mosómedve csoportok. A Structure programban $K=2$ paraméterrel az egyes egyedek láthatóak oszloponként: a piros és a zöld szín az egyes csoportokhoz tartozó valószínűségek arányát mutatja be (forrás: saját munka)



A főkoordináta-analízist már a STRUCTURE program eredménye alapján végeztük el, aminek értelmében a mintákat két csoportra különítettük el, illetve külön kezeltük a két csoporthoz egyaránt hasonlító két mintát is. A főkoordináta-analízis eredménye alapján is elkülönülnek a csoportok egymástól, ez a 12. ábrán látható.

12. ábra: Főkoordináta-analízis mosómedve mintákra (forrás: saját munka)



Rokonsági kapcsolatok tekintetében a program több esetben is talált szülő-utód és édestestvéri kapcsolatokat is (9. és 10. táblázat). A szülő-utód rokoni kapcsolatok esetében ugyan ahhoz a szülőpárhoz (4435 és 6816 azonosító) hat utód tartozik 85%-os vagy annál

magasabb valószínűséggel, így ebben az esetben azonosítottunk egy nyolc tagú családot. A minták mindegyike Ócsáról és környékéről származik.

9. táblázat: Szülő-utód kapcsolatok a mosómedve minták között. Összesen hat utód tartozik 85%-os, vagy annál magasabb valószínűségi értékkel ugyan ahhoz a hím és nőstény egyedhez. (forrás: saját munka)

Utód (azonosító)	Valószínűsített apa (azonosító)	Valószínűsített anya (azonosító)	Valószínűség (%)
6799	4435	6816	87%
6815	4435	6816	87%
6795	4435	6816	87%
4434	4435	6816	86%
4438	4435	6816	85%
6693	4435	6816	85%

Az édestestvéri kapcsolatok tekintetében itt is többségében ócsai és környéki testvéri viszonyokat találtunk egy kivétellel (10. táblázat). A 6677 és 6797 azonosítószámmal ellátott feltételezett testvér egyedek a Tisza árteréből valók (6677-Tiszaakécske; 6797-Tiszaöldvár).

10. táblázat: Édestestvéri kapcsolatok a mosómedve minták között. (forrás: saját munka)

Édestestvérek					
4433	4439	97%	4438	6795	92%
6795	6815	97%	6817	6818	92%
4434	4438	97%	6693	6795	91%
6693	6799	96%	6799	6815	91%
4434	6815	95%	4434	6799	90%
4434	6795	95%	6693	6815	89%
6677	6797	94%	4438	6799	89%
6795	6799	93%	4434	6693	88%
4438	6815	93%	4438	6693	87%

5.3.2. Nyestkutya

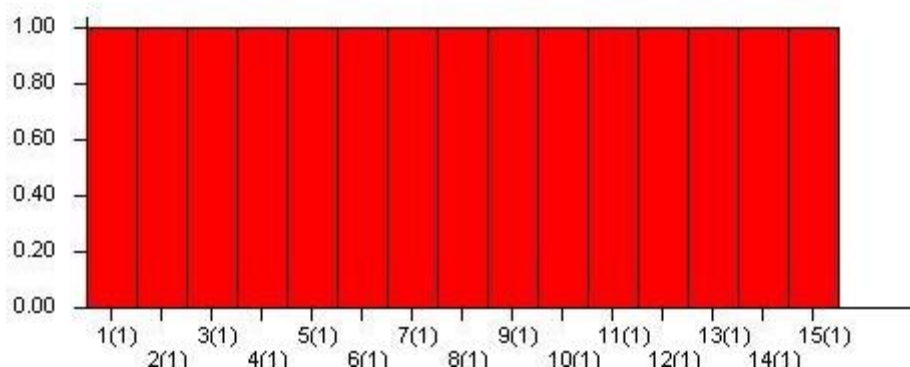
A vizsgált nyestkutya állomány genetikai jellemzői az 11.táblázatban találhatóak meg. A markereink polimorfnak bizonyultak. A detektált allélek száma 4-12 között változott, átlagosan 6,8 volt, az effektív allélek száma 2,66-7,63 között volt mérhető, átlagosan 4,57 volt, a megfigyelt heterozigotitás 0,4-0,93 átlagosan 0,7; az allél referenciák alapján várt heterozigotitás pedig 0,62-0,87 között változott, átlagosan 0,75 volt.

11. táblázat: Nyestkutya állomány alapvető genetikai jellemzői (Na = talált allélek száma; Ne = effektív allélek száma Ho = megfigyelt heterozigotitás; He = az allélfrekvenciák alapján várt heterozigotitás) (forrás: saját munka)

Lókusz	Magyarországi nyestkutyák (n=15)			
	Na	Ne	Ho	He
V402	4	3,33	0,53	0,70
V142	5	2,66	0,40	0,62
V602	8	4,13	0,80	0,76
FH2226	9	6,82	0,60	0,85
DGN14	9	6,16	0,73	0,84
FH2316	12	7,63	0,87	0,87
FH2096	5	3,54	0,93	0,72
FH2054	6	4,25	0,87	0,76
FH2010	4	2,76	0,47	0,64
PEZ17	6	4,46	0,80	0,78
Átlag	6,8	4,57	0,7	0,75

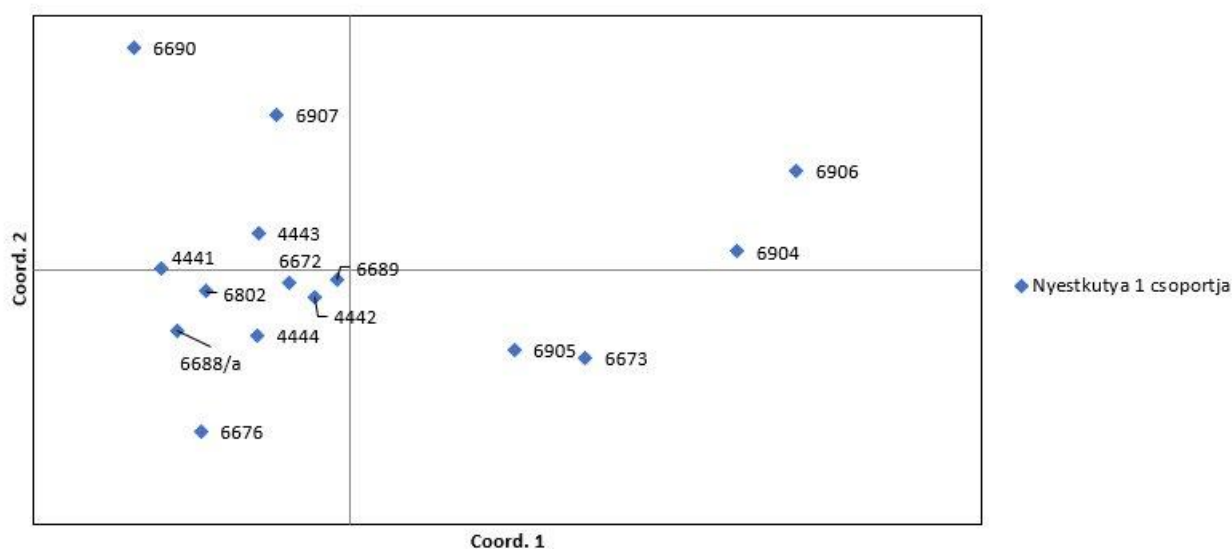
A Structure program segítségével az egyedek genetikai struktúrája alapján, különböző csoportokba sorolja őket. A klaszterező program a mintákat egy csoportra való bontását tulajdonította a legmagasabb általános valószínűségi értéknek, ennek értelmében a vizsgált minták között nem lehet csoportokat kialakítani, melyek valamilyen mértékben eltérnének egymástól (13.ábra).

13. ábra: Genetikai profil alapján nyestkutya csoportok. A Structure programban K=1 (forrás: saját munka)



A főkoordináta-analízis egy többváltozós statisztikai eljárás, amely eredménye az 14.ábrán látható nyestkutya esetében, amelyet szintén a STRUCTURE program eredménye alapján végeztünk el.

14. ábra: Főkoordináta-analízis nyestkutya mintákon (forrás: saját munka)



A nyestkutya minták között a Colony program egy édestestvéri kapcsolatot talált, ennek valószínűségi értéke 94% (12. táblázat). A két egyed Tizzaszalka (azonosító: 6904) és Tivadar (azonosító: 6906) településekről származik.

12. táblázat: Édestestvéri kapcsolat a nyestkutya minták között. (forrás: saját munka)

Édestestvérek		
6904	6906	94%

6. Következtetések és javaslatok

A vállalásainknak eleget téve sikerült a DNS minták genotipizálása, valamint a primerek optimalizálása is sikerült multiplex közegben, így ezeket a primereket a későbbiekben is használni lehet majd. A kísérletem alapjául a 2018-ban elkezdett vizsgálat adta, amelyben sikerült egy darab szőrtüszőt tartalmazó fedő- vagy pehelyszőrszálból mitokondriális DNS segítségével fajazonosítást végezni, ami alapján 4 haplotípust talált mosómedve és nyestkutya esetében is (Molnár 2018).

A vizsgálatok során azt az eredményt kaptuk a mosómedve állomány esetében, hogy az általunk használt markerek polimorfnak bizonyultak. Nekünk 31 egyeddel folyt a kutatás és az allélek száma a mi esetünkben 2-6, átlagosan 4,1. A talált allélek száma a legtöbb esetben alacsonyabb vagy legalább akkora, mint amit Fike et al. (2006) és által talált, viszont ők 29 egyeddel dolgoztak és 4-18 allélt találtak 14 lókuszra. Az átlagos allélszám az estükben 8,4 volt. Alda és munkatársai (2013) mikroszatellit markerekkel végzett kutatást Spanyolországban 58 egyeddel, amelyeknél az talált allélek száma átlagosan 2-6 közé volt tehető. Másik vizsgálatban, amelyet Larroque és munkatársai (2023) franciaországi mosómedve populáció genetikai struktúráját felmérni, 224 egyed számmal dolgoztak és összesen 180 allélt fedeztek fel.

A nyestkutya esetében diverzebb volt az állomány. Kevés mintaszámmal dolgoztunk, 15 egyeddel, a detektált alléljeink száma 4-12 között változott, átlagosan 6,8 volt, Drygala et al. (2016) által detektált allélek száma a legtöbb esetben magasabb vagy legalább akkora, mint a miénk. Finnországban 55 egyenél 7,4 volt az átlagosan talált allélek száma. Közép-Európában 252 egyeddel ez az érték 9,7 volt és Dániában 25 egyeddel 4,7.

Az pedig, hogy mi alacsonyabb értékeket találtunk az abból következhet, hogy kevesebb a mintaszámunk, továbbá a mosómedve esetében a minták túlnyomó része egy területről származik, ami arra enged következtetni, hogy kevés alapító egyed hozta létre az ócsai állományt, amiből adódóan alacsonyabbak lesznek ezek diverzitás értékek. és nincs vagy nagyon alacsony a bevándorlás, ezért előbb utóbb genetikailag beszűkülhet a magyarországi populáció. A nyestkutya esetében a magyarországi minták között ugyan magasabb diverzitás értékeket azonosítottunk, mint a mosómedvéknél, viszont a nemzetközi eredményeket figyelembe véve ennél a fajnál is alacsonyabb értékeket kaptunk.

Mind a két faj esetében találtunk olyan rokonsági kapcsolatokat, melyek tagjai különböző – egymástól nem túl távoli – településekről származnak. A nyestkutya esetében Saeki et al.

(2007) Japánban vizsgált egyedeken átlagosan 111ha-os otthonterületet mért, ami azonban egyedektől függően változott (23-228ha között). Prange et al. (2004) Észak-Amerikában Illinois államban vizsgálták a városi, külvárosi és vidéki környezetben élő mosómedvék mozgáskörzetét. Vizsgálatukban megállapították, hogy a vidéki, természetes környezetben élő egyedek mozgáskörzete minden esetben magasabb volt (71,2-182,4ha), mint a városi (25,2-52,8ha) és a külvárosi (21,4-37,2ha) egyedek esetében. Ezen kutatási eredmények megerősítik, az általunk kapott eredményeket.

A kutatásom során a hazánkban előforduló mosómedve és nyestkutya, amelyek nálunk kevésbé kutatott fajnak számítanak. A vizsgált egyedeken a mikroszatellit alapú genetikai vizsgálatok során sikerült felmérni az állomány diverzitását és struktúráját. A vizsgálat folytatása szempontjából érdemes lenne az ország más régióiból is mintát gyűjteni ezekből a fajokból, illetve célszerű lenne a mintaszám növelése is a nemzetközi eredményekkel való pontosabb összehasonlítás érdekében. Továbbá az ismeretlen ivarú egyedek ivarának azonosítására célszerű lenne a multiplexekbe ivarhatározó markerek bevonása, mely folyamatban van.

7. Összefoglalás

Dolgozatomnak az volt a célja, hogy felmérjem két Magyarországon invazív ragadozó faj (mosómedve, nyestkutya) genetikai diverzitását, valamint, megvizsgáltam az esetleges rokoni kapcsolatokat.

A kutatás során az alkoholban tárolt izom szövetmintákból DNS-t izoláltunk. Az izolált DNS-ek mennyiségét és minőségét ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük. Majd a hígított DNS-eket mosómedve esetében Fike és munkatársai. által (2006), illetve Cullingham és munkatársai (2006) által használt, nyestkutya esetében Drygala és munkatársai (2016), illetve Griciuvienė és munkatársai (2016) által publikált STR markerek segítségével genotipizáltuk. Az általunk kiválogatott és optimalizált 10-10 STR markerek segítségével történt minták genotipizálása, ami lehetőséget nyújtott többek között rokonsági vizsgálatokhoz, illetve populációk diverzitásának vizsgálatára is. Összesen 46 db mintával dolgoztam, mosómedve esetében 31 db és nyestkutyanál pedig 15 mintaszámmal dolgoztam.

A klaszterező analízisek eredménye alapján a mosómedve minták feltehetően két genetikailag különböző csoportba tartoznak, melyek közül az egyikbe többségében Ócsáról és környékéről gyűjtött minták tartoznak. A nyestkutya minták a klaszterező analízisek alapján egy csoportba tartoznak, nem lehet őket genetikailag külön csoportokra sorolni.

A rokonsági vizsgálatok során a mosómedvék esetében, a szülő-utód kapcsolatok esetében ugyan ahhoz a szülőpárhoz (4435 és 6816 azonosító) hat utód tartozik 85%-os vagy annál magasabb valószínűséggel, így ebben az esetben azonosítottunk egy nyolc tagú családot. A minták mindegyike Ócsáról és környékéről származik. A nyestkutya minták között a Colony program egy édestestvéri kapcsolatot talált, amelynek a valószínűségi értéke 94%. A két egyed Tiszaszalka (azonosító: 6904) és Tivadar (azonosító: 6906) településekről származik.

A talált alléljeink száma mosómedvéknél átlagosan 4,1 és nyestkutyanál pedig 6,8 volt, amelyek alacsonyabb értéket mutatnak, mint a szakcikkek, ahonnan adaptáltuk őket. Ez következhet abból, hogy sokkal kevesebb a mintaszámunk, ráadásul a mosómedve esetében a minták túlnyomó többsége egy területről származik, ami alapvetően az fogja sejtetni, hogy alacsonyabbak lesznek ezek az értékek, másrésről az lehet a konklúzió, hogy kevés alapító egyed hozhatta létre a magyarországi állományt és nincs vagy nagyon alacsony a bevándorlás, ezért előbb utóbb genetikailag beszűkülhet a magyarországi populáció mind a két faj esetében. A vizsgált egyedeken a mikroszatellit alapú genetikai vizsgálatok során sikerült felmérni az állomány diverzitását és struktúráját. A vizsgálat folytatása

szempontjából érdemes lenne az ország más régióiból is mintát gyűjteni ezekből a fajokból, illetve célszerű lenne a mintaszám növelése is a nemzetközi eredményekkel való pontosabb összehasonlítás érdekében. Továbbá az ismeretlen ivarú egyedek ivarának azonosítására célszerű lenne a multiplexekbe ivarhatározó markerek bevonása, mely folyamatban van.

8. Köszönetnyilvánítás

A TDK dolgozatom megírása során számos olyan szakember volt segítségemre, akik nélkül nem készülhetett volna el a dolgozat, ezért hálás köszönet illeti őket. Elsősorban köszönettel tartozom a témavezetőimnek Dr. Fehér Péter Árpádnak és Dr. Stéger Viktornak, akik szaktudásukkal, tanácsaikkal és türelmükkel támogattak a munkám során, továbbá laboratóriumi munka elsajátításában is a segítségemre voltak. Szeretném köszönetemet kifejezni nem utolsó sorban Dr. Varga László tanár úrnak, aki segítette témaválasztásomat.

Köszönettel tartozom továbbá azoknak a hivatásos vadászoknak és sportvadászoknak, akik az elejtett vagy elütött állatok tetemeit összegyűjtötték és különböző vizsgálatok céljából a MATE Vadgazdálkodási és Természetvédelmi Intézet rendelkezésére bocsátották.

Köszönettel tartozom még a MATE Vadgazdálkodási és Természetvédelmi Intézet munkatársainak, Dr. Biró Zsoltnak, Dr. Katona Krisztiánnak, Dr. Szabó Lászlónak és Bócsi Balázsnak, akik a tetemek boncolása során lehetőséget biztosítottak a minták genetikai mintavételére is.

A kutatás az Egészségbiztonsági Nemzeti Laboratórium (azonosítószám: RRF-2.3.1-21-2022-00006) keretén belül annak finanszírozásával valósult meg.

9. Irodalomjegyzék

- Alda F, Ruiz-López MJ, García FJ, Gompper ME, Eggert LS, García JT (2013) Genetic evidence for multiple introduction events of raccoons (*Procyon lotor*) in Spain. *Biol Invasions* 15:687–698
- Báldi, A., Csányi, B., Csorba, G., Erős, T., Hornung, E., Merkl, O., Orosz, A., Papp, L., Ronkay, L., Samu, F., Soltész, Z., Szép, T., Szinetár, Cs., Varga, A., Vas, Z., Véték, G., Vörös, J., Zöldi, V., Zsuga, K. (2017): Behurcolt és invazív állatok Magyarországon. *Magyar Tudomány*, 178 (4). pp. 399-437. ISSN 0025-0325
- Beltrán-Beck B, García FJ, Gortázar C (2012) Raccoons in Europe: disease hazards due to the establishment of an invasive species. *Eur Wildl Res* 58:5–15
- Biedrzycka A, Zalewski A, Bartoszewicz M, Okarma H, Jędrzejewska E (2014) The genetic structure of raccoon introduced in Central Europe reflects multiple invasion pathways. *Biol Invasions* 16:1611–1625
- Collins, F.S., Brooks, L.D., Chakravarti, A., 1998. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation: Table 1. *Genome Res.* 8, 1229–1231. <https://doi.org/10.1101/gr.8.12.1229>
- Cullingham C.I., Kyée C. J., White B. N. (2006): Isolation, characterization and multiplex genotyping of raccoon tetranucleotide loci, *Molecular Ecology Notes* (2006) 6, 1030–1032
- Csányi S., Márton M., Böti Sz. és Schally G. (2023): Vadgazdálkodási Adattár - 2022/2023. vadászati év. MATE VTI, Országos Vadgazdálkodási Adattár, Gödöllő, 70 pp.
- Csányi, S. (Ed.) 1999.: Hungarian Game Management Data Base 1994-1998, GATE, Vadbiológiai és Vadgazdálkodási Tanszék, Gödöllő.
- Drygala F, Korablev N, Ansorge H, Fickel J, Isomursu M, Elmeros M, et al. (2016) Homogenous Population Genetic Structure of the Non-Native Raccoon Dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Europe as a Result of Rapid Population Expansion. *PLoS ONE* 11(4): e0153098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153098>
- Faragó S. (2012): Vadászati állattan, Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Fike J. A., Drauch A. M., Beasley J. C., Dharmarajan G, Rhodes O. E. (2007): Development of 14 multiplexed microsatellite loci for raccoons (*Procyon lotor*), *Molecular Ecology Notes* (2007) 7, 525–527
- Fischer ML, Salgado I, Beninde J, Klein R, Frantz AC, Heddergott M, Cullingham CI, Kyle CJ, Hochkirch A (2017): Multiple founder effects are followed by range expansion and admixture during the invasion process of the raccoon (*Procyon lotor*) in Europe. *Divers Distrib* 23:409–420
- Frantz AC, Heddergott M, Lang J, Schulze C, Ansorge H, Runge M (2013): Limited mitochondrial DNA diversity is indicative of a small number of founders of the German raccoon (*Procyon lotor*) population. *Eur J Wildl Res* 59:665–674
- Gábor, J. (1999): Raccoon. *Vadászlap* 8/7. 16-17. [Photograph]
- García JT, García FJ, Alda F, González JL, Aramburu MJ, Cortés Y, Prieto B, Pliego B, Pérez M, Herrera J, García-Román L (2012): Recent invasion and reproduction of the Raccoon (*Procyon lotor*) in Spain. *Biol Invasions* 14:1305–1310

- Griciuvienė L., Paulauskas A., Radzijeuskaja J., Žukauskienė J., Pūraitė I. (2016): Impact of anthropogenic pressure on the formation of population structure and genetic diversity of raccoon
- Gyenge L. (1985): Nyestkutya – *Nyctereutes procyonoides*, Gray. Nimród 105. (5): 209.
- Heltai M. (2001): A vadgazdálkodás, vadászat szempontjából fontos emlős ragadozók és ragadozó madarak hosszútávú, országos kérdőíves adatgyűjtésén alapuló monitoringja. Kutatási részjelentés, Gödöllő, 36.
- Heltai M. (2010): Emlős ragadozók Magyarországon, Gödöllő 33-51
- Heltai M., Szemethy L., Bíró Zs. (2000): Új fajok a hazai faunában: az aranyakál, a nyestkutya és a mosómedve Magyarországon. Vadbiológia, 7. 63–71.
- Heszky L., Fesüs L., Hornok L. (2005): Mezőgazdasági biotechnológia, AGROINFORM Kiadó, Budapest
- Ikeda T, Asano M, Matoba Y, Go A (2004): Present status of invasive alien raccoon and its impact in Japan. Glob Environ Res 8:125–131
- Jones, O. R., Wang, J. (2010): Colony A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. Mol. Ecol. Resour, 10 551–555 (2010).
- Kasperek K., Horecka B., Jakubczak A., Ślaska B., Gryzińska M., Bugno-Poniewierska M., Piórkowska M., Jeżewska-Witkowska G. (2015): Analysis of genetic variability in farmed and wild populations of raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) using microsatellite sequences*, Ann. Anim. Sci., Vol. 15, No. 4 (2015) 889–901
- Kauhala, K., Auniola, M. (2001): Diet of raccoon dogs in summer in the Finish archipelago. Ecography, 24: 151-156.
- Keller, R.P., Geist, J., Jeschke, J.M.(2011): Invasive species in Europe: ecology, status, and policy. *Environ Sci Eur* 23, 23 <https://doi.org/10.1186/2190-4715-23-23>
- Kiss E. (2005): Molekuláris növény-nemesítés –In: Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (szerk). Mezőgazdasági biotechnológia.) Agroinform Kiadó és Nyomda Kft, Budapest, pp.194-209
- Kurjákné Korom Edit (2013): Mikroszatellitek adaptálása és izolálása pulyka és lúd állományok vizsgálatához, Doktori (PhD) értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R. (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequence for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 82, pp. 6955-6959, October 1985
- Larroque, J., Chevret, P., Berger, J. (2023): Microsatellites and mitochondrial evidence of multiple introductions of the invasive raccoon *Procyon lotor* in France. Biol Invasions 25, 1955–1972
- Lutz W (1984) Die Verbreitung des Waschbären im mitteleuropäischen Raum. Z Jagdwiss 30:218–228
- Mitchell-Jones A. J., Amori G., Bogdanowicz w., Kryntufek B., Reijnders P. J. H., Spitzenberger F., Stubbe M., Thissen J. B. M., Vohralik V., Zima J. (1999): The atlas of European mammals. T & A. D. Poyser Ltd. és Academic Press London, 484.
- Mori E, Mazza G, Menchetti M, Panzeri M, Gager Y, Bertolino S, Di Febbraro M (2015): The masked invader strikes again: the conquest of Italy by the Northern raccoon. Hystrix 26:47–51

- Mulder JL (2012): A review of the ecology of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Europe. *Lutra* 55:101–127
- Mulder JL (2013): The raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in the Netherlands—its present status and a risk assessment. *Lutra* 56:23–43
- Myśliwy, I., Perec-Matysiak, A., Hildebrand, J. Invasive raccoon (*Procyon lotor*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) as potential reservoirs of tick-borne pathogens: data review from native and introduced areas. *Parasites Vectors* 15, 126 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05245->
- Peakall, R., Smouse, P. E. (2012): GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: Anupdate. *Bioinformatics* 28, 2537–2539
- Prange S, Gehrt D. S, Wiggers P. E. Influences of Anthropogenic Resources on Raccoon (*Procyon lotor*) Movements and Spatial Distribution, *Journal of Mammalogy*, Volume 85, Issue 3, June 2004, Pages 483–490, <https://doi.org/10.1644/1383946>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000 Jun;155(2):945-59. doi: 10.1093/genetics/155.2.945. PMID: 10835412; PMCID: PMC1461096.
- Robert F. W., Philipp W. H. (1997): *Genetics*. Third edition, The McGraw-Hill Companies
- Saeki M, Johnson J. P, Macdonald W. D. Movements and Habitat Selection of Raccoon Dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in a Mosaic Landscape, *Journal of Mammalogy*, Volume 88, Issue 4, 20 August 2007, Pages 1098–1111, <https://doi.org/10.1644/06-MAMM-A-208R1.1>
- Schaffner, F., J. M. Medlock, W. Van Bortel. (2013): Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 8, 685–692
- YoonJee H., Kyung-Seok K., Hang L., Mi-Sook M. (2013): Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea using newly developed 12 microsatellite markers, *Genes Genet. Syst.* (2013) 88, p. 69–76

Internetes források:

http1: <https://www.gbif.org/species/5218786>

http2: <https://www.iucnredlist.org/species/14925/85658776#geographic-range>