

DIPLOMAMUNKA

Pető Dorina

2020

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
ÁLLATTENYÉSZTÉSI, TAKARMÁNYOZÁSTANI ÉS LABORÁLLAT-
TUDOMÁNYI TANSZÉK

**Fehér gólyák egyedi azonosítása - bűnügyi eset tisztázása genetikai vizsgálatok
segítségével**

TDK dolgozat

Készítette: Petó Dorina

IV. évfolyam, állatorvostan hallgató

Témavezető: Dr. Zenke Petra

tudományos munkatárs

2017.

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	3
1 Bevezetés, Irodalmi áttekintés.....	4
1.1 Európai fehér gólya populáció	4
1.2 Magyarországi fehér gólya populáció	4
1.3 Molekuláris genetika és vizsgáló módszerei	5
1.4 Mikroszatelliták.....	6
1.5 Mitokondriális DNS	6
1.6 Populációgenetika	7
1.7 Genetikai vizsgálatok gólyákban.....	8
1.8 Igazságügyi vadvilág genetika	9
2 Célkitűzések	10
3 Anyag és Módszer.....	11
3.1 Mintavétel	11
3.2 DNS-kivonás és agaróz gélelektroforézis	12
3.3 A mitokondriális kontroll régió (mtCR) vizsgálata.....	13
3.3.1 PCR amplifikáció	13
3.3.2 PCR termékek tisztítása és szekvenálása	14
3.3.3 Statisztikai számítások a mitokondriális genomszakasz alapján.....	14
3.4 Mikroszatellita vizsgálat	14
3.4.1 PCR amplifikáció és fragmens analízis.....	15
3.4.2 A repetíciós struktúrák elnevezése	15
3.4.3 Genotipizálás.....	16
3.4.4 Statisztikai számítások a Cc4 mikroszatellita allélgyakorisági értéke alapján.....	16
3.5 Esettanulmány–összehasonlító genetikai vizsgálat állatbántalmazás ügyében	17
4 Eredmények.....	18
4.1 DNS kinyerése	18
4.2 Mitokondriális DNS vizsgálata	18
4.3 Mikroszatelliták vizsgálata.....	20
4.3.1 A Cc4 lokusz polimorfizmusának vizsgálata	20
4.3.2 A Cc4 lokusz jellemzése	20
4.4 Genotipizálás.....	22
4.5 Populációstatisztikai elemzések	23
4.5.1 Allélgyakoriság	23

4.5.2	Populációgenetikai alapértékek	24
4.5.3	Beltenyésztettség felmérése	24
4.6	Eseti alkalmazás – esettanulmány	24
5	Megbeszélés/Következtetések	26
5.1	Módszertani jellemzők	26
5.2	Mitokondriális kontroll régió	26
5.3	A Cc4 mikroszatellita jellemzése	26
5.4	Populációgenetikai felmérés STR markerek alapján.....	27
5.4.1	Beltenyésztettség.....	27
5.5	Esettanulmány	28
5.5.1	Faji besorolás lehetősége.....	28
5.5.2	Egyedi szintű azonosítás	28
5.6	A kutatás értékelése, további lehetőségei.....	28
6	Összefoglalás.....	29
7	Summary	31
	Irodalomjegyzék.....	32
	Köszönetnyilvánítás	34

Rövidítések

μl	mikroliter
BFK	brómfenolkék
DNS	dezoxiribonukleinsav
DTT	dithiothreitol
H_(exp)	Expected Heterosigosity, várt heterozigotitás
H_(obs)	Observed Heterosigosity, megfigyelt heterozigotitás
mA	milliamper
MME	Magyar Madártani Egyesület
mp	másodperc
mtDNS	mitokondriális dezoxiribonukleinsav
ng	nanogramm
PCR	Polimerase Chain Reaction, polimeráz-lánreakció
PD	Power of Discrimination, megkülönböztetési valószínűség
PIC	Polymorphism Information Content, polimorfizmus információ tartalom
RNS	ribonukleinsav
STR	Short Tandem Repeats, rövid tandem szerű ismétlés/mikroszatellita
Taq	Thermus aquaticus
UV	ultraibolya-sugárzás
V	volt

Nukleotidok rövidítései:

A	adenozin
G	guanin
C	citozin
T	timin

1 Bevezetés, Irodalmi áttekintés

1.1 Európai fehér gólya populáció

A fehér gólya szaporodási területének eloszlása Ibériától kelet felé, Oroszországig helyezhető. Északon Finnország, délen Görögország határolja (Hagemeijer és Blair, 1997). A két európai populáció közötti választóvonalat a németországi Elba-folyónál húzhatjuk meg. Az inntől nyugatra fészkelő egyedek a Gibraltári-szoroson átkelve az afrikai Száhel-övezetben telelnek, míg a keleti csapat Isztambulon átkelve Afrika déli részén tölti a hideg évszakot (Shephard és mtsai, 2009). Az 1930-as években történt demográfiai változások miatt jelentős átalakulásnak indult a populációk genetikai szerkezete. A nyugati részen több országból is eltűnt ez a madárfaj az 1940-es évek közepére. Ekkor elindítottak egy betelepítési programot Franciaországban, Németországban, Belgiumban, Hollandiában és Svédországban (Barlein, 1991). Ez a folyamat nagy hatással volt az európai fehér gólyák genetikai struktúrájára.

1. ábra: A Margitszigeti Vadasparkban fészkelő sérült fehér gólya fiókáival (saját kép)



1.2 Magyarországi fehér gólya populáció

Magyarországon 1941-ben tartottak először gólya fészekfelmérést, majd ezután 1958-tól kezdődően ötévenkénti rendszerességgel tették meg ezt. A második világháború után a hetvenes évekig jelentős egyedszökkenés volt megfigyelhető, ami 1974-ben érte el a mélypontot. Ennek fő oka a táplálkozó- és fészkelőhelyek zsugorodása és feldarabolódása volt, a mezőgazdasági és ipari területek javára. Ezután újra lassú növekedésnek indult a számuk, feltehetőleg azért, mert felfedezték a villanyoszlopokat, mint fészekrakásra alkalmas helyeket (Lovászi, 1998).

Ma körülbelül 5000-5500 rendszeresen itt fészkelő párra tehető a számuk (www.mme.hu). A természetes élőhelyek csökkenése mellett gondot jelent még a középvezetőségű szabad légvezeték hálózat is, mely sok madárnak okoz áramütést. Szerencsére Magyarországon a fehér gólya 1901 óta törvényes oltalom alatt áll, 1993-tól pedig a fokozottan védett fajok közé tartozik (**1. ábra**). A13/2001. (V.9.) Környezetvédelmi Minisztériumrendelet 2. melléklete alapján a faj természetvédelmi értéke 100.000 Ft.

1.3 Molekuláris genetika és vizsgáló módszerei

A molekuláris genetika, mint az a nevéből is látszik, az öröklődés genetikai alapjait vizsgálja molekuláris szinten. Kutatja a DNS és az RNS szerkezetét, a DNS replikációt, reparációt, a génexpressziót, az örökítőanyagban jelentkező mutációk kialakulását és következményeit.

Vizsgálati módszerei között találjuk többek között a makromolekulák kimutatására alkalmas blotolási technikákat, a polimeráz láncreakciót és a DNS szekvenálást.

A Southern blot lényege, hogy többféle DNS szekvenciát tartalmazó mintából kimutassuk a számunkra fontos DNS szekvenciát. A DNS mintát kisebb fragmentekre bontjuk szét, majd gélelektroforézissel szétválasztjuk őket. A szétválasztott fragmenteket átvisszük egy membránra (ez tulajdonképpen a blotolás) és a vizsgálni kívánt DNS szakasszal komplementer, radioaktívan jelölt DNS szekvenciát adunk a rendszerhez. A hibridizáció megtörténte után az adott szakaszt autoradiográfiás módszerrel tesszük láthatóvá. A Northern blot hasonlóan zajlik, de ebben az esetben a RNS oldatban lévő speciális RNS molekulák kimutatása zajlik. A Western blottal a mintából specifikus fehérjéket mutatunk ki, míg az Eastern blot technika a fehérjékhez kapcsolódó szénhidrát molekulák kimutatásában nyújt segítséget.

Kary Banks Mullis 1983-ban jelentősen fellendítette a genetika tudományágában folyó kutatásokat, amikor feltalálta a polimeráz-láncreakciót (Polimerase Chain Reaction, PCR). A módszer azért nagyon jelentős, mert szinte minimális mintából fel tudja sokszorosítani és ki tudja mutatni a vizsgálni kívánt génszakaszt. Ehhez szükség van a DNS templátra, két ún. primerre (18-25 bp hosszú oligonukleotid, melyek a vizsgálandó szakasz két végét jelölik ki), a DNS másolásáért felelős enzimre, valamint az új DNS építőköveiként szolgáló nukleotidokra. Ezenkívül, hogy a reakció specifikus módon játszódhasson le, megfelelő puffer közeget kell biztosítani. A folyamatban a hőmérséklet

kulcsfontosságú szereppel bír. Az általában 20-40-szer ismétlődő, más-más hőmérsékletű lépésekben először a DNS templát két szárra válik szét (denaturáció), majd a primerek kötődése (annelláció) után a DNS polimeráz enzim lemásolja a kijelölt génszakaszt. Ez elindítja a láncreakciót, aminek során az újonnan készült DNS is templát szerepet vesz fel.

A DNS-szekvenálás alapelve hasonló a PCR technikához, mindkettő a hőmérséklet ciklikus változtatásán alapul. Ez esetben is DNS polimerizáció történik, eközben véletlenszerűen fluoreszcens festékkel jelölt didezoxinukleotidok épülnek be a komplementer szárra épülő DNS láncba, melyek terminálják a reakciót. A szekvenátor készülék az ezen nukleotidok lézeres gerjesztés hatására kibocsátott fény hullámhosszúságát detektálja és a számítógépes feldolgozás után leolvashatjuk a DNS szekvenciát.

A populációgenetikai kutatások szubmolekuláris szinten a DNS-lánc ún. polimorf szakaszait vizsgálják mind a sejtmagi, mind pedig mitokondriális genomban.

1.4 Mikroszatelliták

A mikroszatelliták (STR-ek) olyan inaktív DNS szakaszok, amelyeket 2-7 bázispárból álló, változó számban jelen lévő, tandem-szerűen ismétlődő egységek alkotnak. Nagyszámban, elszórtan fordulnak elő az egész nukleáris genom területén. Öröklődésük a mendeli szabályok szerint történik. A mikroszatellita lokuszok polimorfizmusa a hossz-polimorfizmusok közé tartozik, mivel az allélok hosszukban térnek el egymástól. Adott egyedben a mikroszatellita egy vagy két allélja fordulhat elő. Ebből kifolyólag az egyed homo- vagy heterozigóta az adott allélra nézve. Új STR markerek felfedezésére általában DNS szekvencia adatbázisokban történő kereséssel (Weber-May, 1989) vagy molekuláris biológiai izolációs módszerekkel van lehetőség (Edwards és mtsai, 1991).

1.5 Mitokondriális DNS

A mitokondrium önálló örökítő anyaggal rendelkezik, ez a mitokondriális DNS. A genetikai kutatásokban nagy jelentőséggel bír, mivel a nukleáris DNS-hez képest eltérő, vizsgálati szempontból sokszor előnyösebb tulajdonságokkal rendelkezik. Egyetlen szomatikus sejtben körülbelül ezer darab mtDNS található, a petesejtben a példányszám akár százezer is lehet – ezzel szemben a diploid sejtekben csak két darab nukleáris DNS lelhető fel. A mitokondriális DNS kompakt, cirkuláris struktúrájára az exonukleázok

kiseb hatással vannak, mint a lineáris DNS-re, így a sejt elhalása után is jobban megőrzi eredeti jellegét. A fenti jellegzetességekből kifolyólag a mtDNS sokkal érzékenyebb vizsgálati szempontból, mint a nukleáris DNS, emiatt használható erősen sérült, bomlott biológiai minták vizsgálatára. Csak anyai ágon öröklődik (Giles és mtsai, 1980) és nem rekombinálódik (Howell, 1997). Ezek alapján – a mutációk által létrehozott változásoktól eltekintve – az egy anyai ágról származó egyedek mindegyike megegyező mtDNS haplotípust hordoz, melynek következményeként a mitokondriális DNS kevésbé alkalmas egyedi azonosításra, hisz a haplotípus megegyezik az anyai ágon rokon egyedek körében. Mutációs rátája viszont jóval magasabb, mert a magi DNS állomány javító mechanizmusaihoz képest a mtDNS-ben ezek a folyamatok kb. tízszer kisebb hatékonysággal rendelkeznek.

1.6 Populációgenetika

Azon élőlénycsoportokat, melyek közös génállománnyal rendelkező szaporodási közösséget alkotnak, populációnak nevezzük. A populációgenetika ezt a fogalmat úgy határozza meg, hogy a populáció ugyanazon faj egyedeinek közössége, amelyben a különböző ivarú egyedek között a párosodási rendszerek szabályai szerint zajlik a párosodás. A nagyobb területen élő populációkat izolációs határok választják el.

A populációgenetika a populáció szintjén vizsgálja a tulajdonságok öröklődését, az allélgyakoriságok változását, a genotípus és fenotípus megoszlását és a környezeti tényezők hatását. A kvalitatív populációgenetika egy vagy néhány gén által meghatározott tulajdonságokkal foglalkozik, melyek megjelenését a környezeti tényezők nem befolyásolják. A kvantitatív populációgenetika pedig olyan tulajdonságokat vizsgál, melyeket sok, viszonylag kis hatású gén kódol.

A populáció közös génállományát az egyes egyedek génállományának összessége adja. Az összes egyed az utódai által segíti az adott populáció genetikai változatosságának növelését.

1.7 Genetikai vizsgálatok gólyákban

A gólyák genetikai anyagának vizsgálatával számos kutatás foglalkozik, mivel a természetvédelmi, populációgenetikai felmérések mellett a faj modellállatként szolgál a madarak migrációjának és viselkedésének tanulmányozása során is. Erre alkalmassá teszi hosszú életideje, feltételezhetően monogám életvitele, az emberi települések közelében való előfordulása és hogy általában visszatér az előző évi fészkelő helyére, ezért könnyen fellelhető és beazonosítható.

Japán kutatók a feketecsőrű gólyák (*Ciconia boyciana*) teljes mitokondriális genom nukleotid sorrendjét állapították meg, meghatározva így a kontroll régió egyes haplotípusait is. Ennek az információnak a segítségével mérték fel a fogságban szaporított madarak genetikai variációját, amely adat nagy segítséget nyújt a beltenyésztettség elkerülése érdekében tett erőfeszítésben, mivel a vad populáció 1971-ben kihalt a szigeten (Yamamoto és mtsai, 2000).

Kínában, szintén a feketecsőrű gólyák egyik fő telelő helyén az elmúlt években olyan egyedeket fedeztek fel, melyek itt is szaporodnak. Ezekben a kolóniákban a mitokondriális DNS kontroll régiójának vizsgálata alapján végeztek populációgenetikai és konzervációbiológiai felméréseket, melyek eredményeként genetikai sodródást tapasztaltak az új fészkelő csoport hatására. (Zan és mtsai, 2008)

Az európai fehér gólya populációt egy keleti és egy nyugati migrációs részre lehet osztani. A hatalmas egyedcsökkenés miatt az 1950-es évektől számos országban újratelepítési programba kezdtek, melynek hatására a két populáció keveredésével történt genetikai változásokat elsőként Shephard és munkatársai vizsgálták mikroszatelliták segítségével (Shephard és mtsai, 2009). Később mind a mitokondriális DNS, mind pedig mikroszatelliták segítségével vizsgálták a genetikai szerkezet feltételezett különbségét az eltérő repülési útvonalú, így eltérő fészkelő- és telelő helyű gólyákban. Az eredmények alapján – melyek nem mutattak szignifikáns eltérést a vizsgált genetikai szakaszokon – azt feltételezik, hogy még az újratelepítési programok előtt természetes módon keveredhetett a keleti és nyugati populáció (Shephard és mtsai, 2013).

A gólyapopulációk struktúrájának és dinamikájának megértéséhez elengedhetetlen a párosodási stratégia ismerete. Míg a szociális és ivari monogámia felmérhető a madarak viselkedésének megfigyelésével, addig a genetikai monogámia csak a szülő-utód és/vagy testvérek DNS vizsgálatával lehetséges (Turjeman és mtsai, 2016b). A fehér gólya hagyományosan a monogámia és az erény szimbóluma, bár tizenegy polimorf

mikroszatellita marker vizsgálata alapján inkább a vegyes párosodási mód jellemző rájuk (Turjeman és mtsai, 2016a, b).

1.8 Igazságügyi vadvilág genetica

Az igazságügyi genetikai létfontosságú szerepét már senki sem vitatja napjainkban. A tudomány fejlődésével egyre gyakoribbá válik a nem humán eredetű DNS maradványok molekuláris biológiai módszerekkel való vizsgálata és az eredmények figyelembevételével történő ítélethozatal. Általában olyan bűnügyi esetekben van szükség erre, amikor két, vagy több – hagyományos módszerekkel nem beazonosítható – anyagmaradványról kell bebizonyítani azok egyezőségét illetve különbözőségét. Ezen kívül több törvényszéki esetben a genetica szintjén végzett faj- és egyedazonosítás is perdöntő bizonyítékként szolgál.

Az orvvadászat és az állatbántalmazás mértéke világszerte igen nagy, és ez alól sajnálatos módon sem hazánk, sem pedig a fehér gólya nem kivétel. Magyarországon csak a tavalyi évben két gólyakínzással kapcsolatos esetről is beszámolt a média (**2. ábra**).

2. ábra: A Jászapátiban megkínzott, törött lábú gólya teteme



Jelen dolgozatunk témája egy magyarországi eset kapcsán merült fel, melyben egy ismeretlen eredetű vérmintát kellett faji és egyedi szinten azonosítani és összehasonlítani egy megcsonkított gólyatetemből származó mintával. A molekuláris DNS vizsgálatok eredménye azonban csak akkor interpretálható megfelelő módon, amennyiben az érintett faj adott populációjára vonatkozó allélgyakorisági adatok rendelkezésre állnak.

2 Célkitűzések

A magyarországi gólyapopulációnak sem a nukleáris sem a mitokondriális genetikai szerkezetét eddig nem vizsgálták.

Célunk olyan génszakaszok felmérése volt, ami a faji szint mellett egyedi szintű azonosítást is lehetővé tesz.

A mitokondriális kontroll régió mutációkban gazdag szakaszának szekvenálásával a különböző anyai leszármazási vonalak (haplotípusok) meghatározását terveztük.

Az egyedi szintű azonosításhoz egy, a nukleáris genomban kódolt, mikroszatellita marker polimorfizmusát szeretnénk volna felmérését a hazai fehér gólya populációban.

A kifejlesztett vizsgálati módszer hatékonyságát egy igazságügyi eset kapcsán kívántuk tesztelni.

3 Anyag és Módszer

3.1 Mintavétel

A vizsgálatokhoz hat magyarországi megyéből gyűjtöttünk összesen 58 tollmintát (**1. táblázat**), a Magyar Madártani Egyesület, a Fővárosi Állat- és Növénykert, valamint a Hortobágyi Madárkórház segítségével (az 59. mintát a Baranya megyei esettanulmányból vettük). A legtöbb minta a 2016. és 2017. évek gyűrűzési időszakából származik, fészkenként egy fiókatól és feltételezhetően nem rokon felnőtt egyedektől.

Kód	Gyűjtés helye	Megye	Kód	Gyűjtés helye	Megye
1	Margitsziget	Budapest	30	Kisterenye	Nógrád
2	Margitsziget	Budapest	31	Csécse	Nógrád
3	Margitsziget	Budapest	32	Felfalu	Nógrád
4	Margitsziget	Budapest	33	Nógrádmegyer	Nógrád
5	Állatkert	Budapest	34	Szécsény	Nógrád
6	Hort. Madárkórház	Hajdú-Bihar	35	Ludány	Nógrád
7	Hort. Madárkórház	Hajdú-Bihar	36	Szécsény	Nógrád
8	Hort. Madárkórház	Hajdú-Bihar	37	Ludány	Nógrád
9	Hort. Madárkórház	Hajdú-Bihar	38	Kisbágyon	Nógrád
10	Hort. Madárkórház	Hajdú-Bihar	39	Litke	Nógrád
11	Hort. Madárkórház	Hajdú-Bihar	40	Ludányhalászi	Nógrád
12	Margitsziget	Budapest	41	Szurdokpüspöki	Nógrád
13	Margitsziget	Budapest	42	Devecser	Veszprém
14	Ósi	Veszprém	43	Somlóvásárhely	Veszprém
15	Hugyag	Nógrád	44	Mátételke	Bács-Kiskun
16	Nógrádgárdony	Nógrád	45	Tataháza	Bács-Kiskun
17	Hugyag	Nógrád	46	Tataháza	Bács-Kiskun
18	Szügy	Nógrád	47	Bácsalmás	Bács-Kiskun
19	Órhalom	Nógrád	48	Bácsalmás	Bács-Kiskun
20	Mihályháza	Veszprém	49	Kunbaja	Bács-Kiskun
21	Nádasladány	Veszprém	50	Csikéria	Bács-Kiskun
22	Nádasladány	Veszprém	51	Zalaszöntgyörgy	Zala
23	Ósi	Veszprém	52	Zalaistvánd	Zala
24	Berhida	Veszprém	53	Mikekarácsonyfa	Zala
25	Öskü	Veszprém	54	Miklósfa	Zala
26	Szente	Nógrád	55	Letenye	Zala
27	Zagyvaszántó	Nógrád	56	Nagyrada	Zala
28	Ipolytarnóc	Nógrád	57	Murarátka	Zala
29	Homokterenye	Nógrád	58	Nagypáli	Zala

1. táblázat: A minták származási helye

3.2 DNS-kivonás és agaróz gélelektroforézis

A DNS-t tollak tövi részénél lévő beszáradt vérből nyertük. A QIAamp® DNA Mini Kit-et (Qiagen) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A kivágott tollvég darabkákat mikrocentrifuga csövekbe helyeztük, majd ATL puffert, Proteináz K oldatot és DTT-t adtunk hozzá. A mintákat a teljes feloldódás eléréséig 56°C-on inkubáltuk. Ezt követően AL puffert mértünk rá az oldatra, vortex segítségével kevertük, majd 96%-os etanolt adtunk az elegyhez. Következő lépésként az oszlopot tartalmazó csövekbe bemértük a DNS tartalmú mintát. Ezután az előmosás következett, majd centrifugálás, ami után az oszlopok alatti folyadékfázist elöntöttük. A következőként a mosás jött, amit szintén centrifugálás és a folyadék elöntése követett. Az Eppendorf csőben így már csak az DNS-t tartalmazó oldat maradt vissza.

A DNS meglétét és minőségét, valamint szemikvantitatív módon megbecsülhető mennyiségét agaróz gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) segítségével.

Ehhez az alábbi anyagokat használtuk fel:

- 0,4 g agaróz (Serva) 50 ml 1xTris-EDTA bórásav (TEB) (10,78 g/l Tris, 5,5 g/l bórsav, 0,74 g/l EDTA pH=8,3)
- 4 µl GrSafe DNA Stain
- 2 µl glicerines brómfenolkék (BFK) töltőpuffer/minta
- 5 µl tisztított DNS-minta

Első lépésként 0.8 %-os agaróz oldatot készítettünk. A kiöntés és a gél megdermedése után a zsebekbe 5 µl tisztított DNS mintát helyeztünk, amit előzőleg 2 µl BFK töltőpufferrel kevertünk össze. Az elektroforézist 100 V-on, 100 mA áramerősséggel, 40 percen keresztül végeztük a nanoPAC-300 (Cleaver Sci. Ltd.) készülék alkalmazásával. Ezután a gél átvilágítását és a genomi DNS detektálását a Glite 900BW Gel Scanner System berendezés végezte.

3.3 A mitokondriális kontroll régió (mtCR) vizsgálata

3.3.1 PCR amplifikáció

A mitokondriális kontroll régió 829 bázispár hosszúságú szakaszát amplifikáltuk a CR195F (5'TGT TGA AAT GAT GCG TGG AT3') és a CR1024R (5'GAG TCT GTG GACACG CCA TAA CTA A3') primerek segítségével. Referencia szekvenciaként a Gén Bankban lévő fehér gólya (*Ciconia ciconia*) teljes mtDNS szerkezetét vettük (GenBank, NC_002197).

Az amplifikáció 25 µl térfogaton, a következő anyagok felhasználásával történt:

- 12,5 µl DreamTaq™ Green DNS polimeráz tartalmú mestermix (Thermo Fisher Scientific)*
- 0,5-0,5 µM forward és reverz primer
- 1-10 ng DNS minta
- ionmentes steril víz a térfogat kiegészítéshez

*DreamTaq Green PCR Master Mix összetevői: DreamTaq DNS polimeráz enzim, DreamTaq Green puffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP és MgCl₂.

A PCR kivitelezése 2720 Thermal Cycler készüléken (Applied Biosystems) történt a következő körülmények között:

- Kezdeti denaturáció: 94°C, 1 perc
 - Denaturáció: 94°C, 30 mp
 - Primer anelláció: 55°C, 45 mp
 - Elongáció: 72°C, 120 mp
 - Végső elongáció: 72°C, 10 perc
- } 36 ciklus

A PCR termék sokszorosításának eredményességét gélelektroforézissel ellenőriztük, a 3.2. fejezetben leírt módon (azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben nem kellett BFK festékanyagot hozzáadni, mert a PCR termék már festve volt).

3.3.2 PCR termékek tisztítása és szekvenálása

A kapott PCR termékeket GenElute™ PCR Clean-Up Kit-el (Sigma-Aldrich) tisztítottuk. A gyűjtőcsövekbe oszlopokat helyeztünk majd erre ráértünk 0.5 ml Column Preparation Solution-t. Ezt követően centrifugáltuk, majd a folyadékot elöntöttük a cső aljából. 20 µl PCR terméket elegyítettünk 100 µl Binding Solution-nal, majd ezt rávittük az oszlopra. Ezután ismét centrifugáltuk, majd a gyűjtőcső alján lévő folyadékot újra elöntöttük. 0,5 ml 96%-os etanollal hígított Wash Solution-t adtunk hozzá, majd megint centrifugáltuk és elöntöttük a folyadékot. Az oszlopot visszahelyezve szárítás céljából ismételtén centrifugáltuk, majd az oszlopot áthelyeztük egy új gyűjtőcsőbe, majd ráértünk 40 µl Elution Solutiont és szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 percig. Az utolsó centrifugálás után a tisztított PCR termék maradt csak vissza a cső alján. A csövet a szekvenálásra való küldésig hűtőben tároltuk.

A kontroll régió szakasz bázissorrendjének meghatározását a mórthalmi Seqomics Kft. végezte (referencia).

3.3.3 Statisztikai számítások a mitokondriális genomszakasz alapján

Az eredmények elemzéséhez a kapott szekvencia-analízis adatokat vettük figyelembe és az alábbi diverzitási paramétereket számítottuk ki:

Polimorf nukleotidok: a CR régióban a referencia szekvenciához viszonyítva megfigyelt összes polimorf nukleotid pozíció.

Megfigyelt/Egyedi haplotípusok: a populációban megfigyelt összes eltérő haplotípus, továbbá, hogy ebből hány fordul elő egyszer.

3.4 Mikroszatellita vizsgálat

Ezidáig 18 fehér gólya specifikus és hat kereszt-specifikus STR markert írtak le strukturális és variancia adatokkal (Shephard és mtsai, 2009; Turjeman és mtsai, 2016b). Ezek közül a legmagasabb változatossággal, valamint a könnyű azonosítás érdekében pentamer szerkezettel rendelkező Cc4 lokuszra esett a választásunk (Shephard és mtsai, 2009).

3.4.1 PCR amplifikáció és fragmens analízis

Saját tervezésű primerekkel (Cc4-F: NED5'CTTGGCTGAAATGTCTGTCC3'; Cc4-R: 5'GGATGTGGTCACTACAAGGA3') monoplex PCR amplifikációt végeztünk 20 µl térfogaton, a következő összetevőkkel:

- 10 µl DreamTaq™ Green DNS polimeráz tartalmú mestermix (Thermo Fisher Scientific)*
- 5 ng DNS templát
- 1 µl fluoreszcensen jelölt primer mix (10 µM)
- ionmentes víz térfogatkiegészítéshez

*DreamTaq Green PCR Master Mix összetevői: DreamTaq DNS polimeráz enzim, DreamTaq Green puffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP és MgCl₂.

A PCR 2720 Thermal Cyclers (Applied Biosystems) alkalmazásával történt, az alábbi körülményekkel, 36 cikluson keresztül:

- kezdeti denaturáció: 94°C, 1 perc
- denaturáció: 94°C, 30 mp
- primer anelláció: 58°C, 45 mp
- elongáció: 72°C, 45 mp
- végső elongáció: 72°C, 30 perc

A PCR reakció sikerességét és szemikvantitatív módon történő mennyiség meghatározását gélelektroforézissel ellenőriztük (ld. 3.2. fejezet).

A PCR termékek méret szerinti elválasztásához és detektálásához kapilláris elektroforézist alkalmaztunk, az ABI Prism3130XL Genetic Analyzer, GeneScan™-500 LIZ™Size Standard (Applied Biosystems) és a Gene Scan Analysis v3.1 software (Applied Biosystems) segítségével (Biomi Kft, Gödöllő).

3.4.2 A repetíciós struktúrák elnevezése

A szekvencia adatok alapján az ismétlődő egységek számán alapuló allélnevezésként a nemzetközi összehasonlításra is alkalmas módon alakítottuk ki (Eichmann és mtsai, 2004).

3.4.3 Genotipizálás

Az allélok típusának félautomata meghatározása – genotipizálás – Genotyper® 2.5.2 szoftverrel (Applied Biosystems) történt. A program a referencia allélek és a minta méretének összehasonlítása útján végezte a fragmentumok tipizálását.

3.4.4 Statisztikai számítások a Cc4 mikroszatellita allélgyakorisági értéke alapján

Az adott lokuszon megfigyelhető allélgyakoriságot vizsgálva a populációt jellemző értékeket számítottunk ki (Nei, 1973).

H_(obs): Observed Heterosigosity: A vizsgált mintában (populáció) ténylegesen megfigyelhető heterozigóták arányát adja meg.

H_(exp): Expected Heterosigosity: Megadja a populációs mintában megfigyelt allélszámból kalkulált heterozigóták várt arányát.

$$1 - \sum P_i^2 * \frac{n}{n-1}$$

(P_i: a megfigyelt allélok gyakorisága, n:a vizsgált kromoszómák száma)

PD – az igazságügyi genetikában annak kifejezése, hogy a populációból két egyedet véletlenszerűen kiválasztva mekkora az átlagos valószínűsége annak, hogy a két egyed a vizsgált lokuszon eltérő genotípust mutat (Power of Discrimination).

$$PD = 1 - \sum p_i^2, \text{ ahol } p_i \text{ a megfigyelt allélok gyakorisága}$$

PIC: polimorfizmus információ tartalom

$$1 - \sum P_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

A **beltenyésztettség becslése** (heterozigotizáció veszteségen alapuló fixációs index-beltenyésztettség koefficiens):

$$F = 1 - H_{(obs)}/H_{(exp)}$$

3.5 Esettanulmány–összehasonlító genetikai vizsgálat állatbántalmazás ügyében

Előzmény: Hatósági megkeresés ismeretlen eredetű vérminta faji- és egyedi azonosítása céljából.

3. ábra: Helyszíni mintavétel és a megcsonkított gólyatetemből származó véres tollminta



Vizsgálat: A helyszínen mintavételi pálcára rögzített vérgyanús szennyeződésből, valamint a fellelt, megcsonkított gólyatetemből biztosított véres tollmintából (3. ábra) DNS-t tisztítottunk majd agaróz gélen kvantáltuk. Fajspecifikus primer párok segítségével felszorzottuk a mitokondriális kontroll régió egy szakaszát, valamint a sejtmagi Cc4 mikroszatellitát. A kapott PCR-termékek szekvencia- ill. fragmens analízise segítségével összehasonlítottuk a két minta haplo- és genotípusát.

4 Eredmények

4.1 DNS kinyerése

A mintákból történő DNS-kinyerés sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Összesen 59 mintát vizsgáltunk, ezek mindegyikéből sikerült a DNS-tisztítás.

4.2 Mitokondriális DNS vizsgálata

Szekvencia-analízissel 59 fehér gólya mitokondriális kontroll régió szakaszának (kb. 700 bp) szekvenciáját sikerült meghatározni. A kapott nukleotid sorrendeket Yamamoto és mtsai 2000-ben közölt cikkében szereplő (referencia) szekvenciával vetettük össze, az ettől való eltéréseket az **2. táblázat** szemlélteti.

A hazai populációban 16 különböző haplotípust (H) mutattunk ki. Vizsgált mintáink több, mint fele (50,9%) a H1 haplotípusba, 16,9%-a a H2, 8,5%-a a H3, 3,4%-a pedig a H4 haplotípusba tartozik. A többi madárban (20,3%) megfigyelt haplotípus (H5-H16) csak egyszer fordult elő („egyedi” haplotípus).

A szekvenciák bázissorrendje 15 helyen különbözött a referencia szekvenciától (polimorf nukleotid pozíciók: 308, 338, 358, 388, 395, 398, 408, 423, 468, 470, 495, 498, 521, 842 és 907). Legtöbbször a 338-as és a 398-as bázispozícióban figyeltünk meg báziscserét – a minták 98,3%, illetve 96,6%-ában (**2. táblázat**).

Bázispozíció	308	314	338	358	388	395	398	408	423	467	468	470	474	495	498	521	842	907	
Referencia szekvencia	A	T	G	T	G	A	C	A	G	A	G	A	G	G	A	C	T	T	db
H1	G		A				T												30
H2			A				T												10
H3			A	C			T												5
H4			A				T					A/G							1
H5	G		A		G/A		T												1
H6	G		A																1
H7			A				T							G/A					1
H8			A	C			T								G/A				1
H9	G		A				T				A/G								1
H10							T												1
H11			A												G	T		C	1
H12			A				T	G											1
H13			A	C		G	T												1
H14	G		A				T		A/G										1
H15			A				T												2
H16	G		A				T										G/T		1
																			Σ59

2. táblázat: A magyarországi gólyapopulációban kimutatott eltérések a referencia szekvenciától

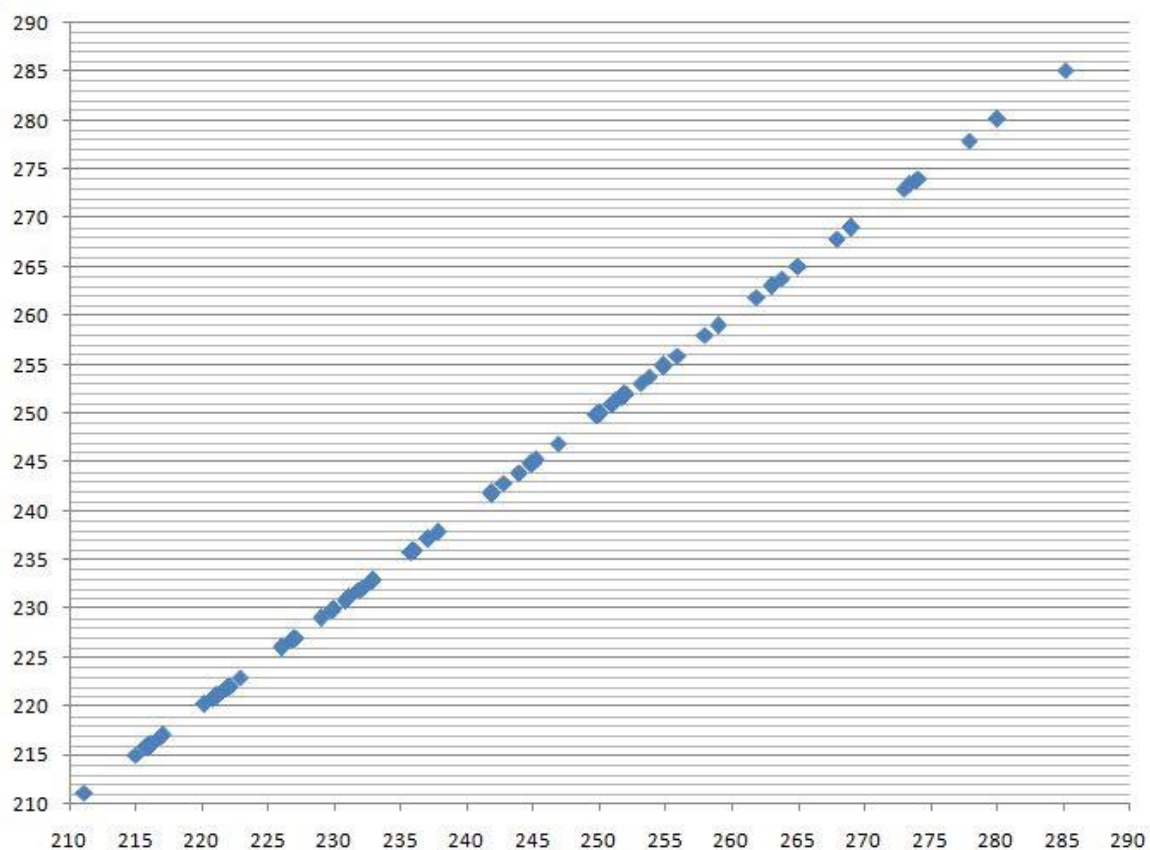
(Lila színnel az eseti mintákból kimutatott haplotípust (H5) emeltük ki.)

4.3 Mikroszatelliták vizsgálata

4.3.1 A Cc4 lokusz polimorfizmusának vizsgálata

A PCR-reakcióval sokszorosított és kapilláris elektroforézissel elválasztott allélek méret szerinti eloszlása alapján meghatároztuk a mikroszatellita lokusz mérettartományát a vizsgált fehér gólya populációban. A populációs minták 211-285 bp hosszú fragmens tartományában az allélhosszúságok alapján történő csoportosítással összesen 43 allélt figyeltünk meg (4. ábra).

4. ábra: A Cc4 lokusz alléljeinek méret (bázispár) szerinti csoportosítása a hazai fehér gólya populációban



4.3.2 A Cc4 lokusz jellemzése

Az allélok repetíciós struktúrájának megállapítását szekvencia analízis alapján végeztük. A lokusz szerkezeti jellegzetessége alapján – ellentétben az eddig leírtakkal

(Shephard és mtsai, 2009) – összetett struktúrát mutat. Az eddig ismert pentamer (TCCTA*) ismétlődéshez egy hexamer (TTCCTC) szerkezetű mikroszatellita kapcsolódik, és ezek kombinációjából alakul ki az adott allél mérete (**5. ábra**).

5. ábra: A 211 bázispár hosszú, 8+18-as allél szekvenciája és szerkezete

CTTGGCTGAAATGTCTGTCC-CTGATCTC-TTCCTC TTCCTC TTCCTC TTCCTC TTCCTC
TTCCTC TTCCTC TTCCTC-CTCCTT-TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA
TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA* TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA TCCTA
TCCTA-TTCTTTTATTTTCTGCTAT-TCCTTGTAGTGAC CACATCC

(TCCTA*): A csillaggal jelölt pozícióban allélenként egyszer – változó helyen (pirossal kiemelve) – az adenin cseréjét timinre figyeltük meg. Sárga színnel a primereket, kékkel a heptamer, lilával a pentamer szerkezetű ismétlődéseket emeltük ki. A fehér háttérszín konstans régiókra utal.

Ennek ismeretében az allélok nevezéktanát módosítottuk és nemzetközileg is megfeleltethető módon, mindkét ismétlődő motívum számának alapján alakítottuk ki (**3. táblázat**).

Egy adott allél – „X+Y” – elnevezése a két egymást követő repetíció: (TTCCTC)_X,(TCCTA*)_Y száma alapján történt.

Az „X” ismétlődésnek öt különböző allélváltozatát figyeltük meg (7-11 számú egység), míg az „Y” ismétlődésnek 14 allélváltozatát (17-29, valamint 32 számú egység), illetve az ezek kombinációjából kialakuló 43 allélváltozatot (**3. táblázat**).

Allél-méret (bp)	Allél neve	Az ismétlődés szerkezete	Allél-méret (bp)	Allél neve	Az ismétlődés szerkezete	Allél-méret (bp)	Allél neve	Az ismétlődés szerkezete
210	7-19	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₁₉	235			260	7-29*	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₂₉
211	8-18*	(TTCCTC) ₈ (TCCTA) ₁₈	236			261		
212	9-17	(TTCCTC) ₉ (TCCTA) ₁₇	237	9-22*	(TTCCTC) ₉ (TCCTA) ₂₂	262		
213			238	10-21	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₁	263	10-26	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₆
214			239	11-20	(TTCCTC) ₁₁ (TCCTA) ₂₀	264	11-25	(TTCCTC) ₁₁ (TCCTA) ₂₅
215	7-20	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₂₀	240	7-25*	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₂₅	265		
216	8-19*	(TTCCTC) ₈ (TCCTA) ₁₉	241			266		
217	9-18*	(TTCCTC) ₉ (TCCTA) ₁₈	242	9-23	(TTCCTC) ₉ (TCCTA) ₂₃	267		
218	10-17*	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₁₇	243			268	10-27	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₇
219			244			269	11-26*	(TTCCTC) ₁₁ (TCCTA) ₂₆
220			245	7-26	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₂₆	270		
221	8-20	(TTCCTC) ₈ (TCCTA) ₂₀	246	8-25	(TTCCTC) ₈ (TCCTA) ₂₅	271		
222	9-19	(TTCCTC) ₉ (TCCTA) ₁₉	247	9-24	(TTCCTC) ₉ (TCCTA) ₂₄	272		
223	10-18*	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₁₈	248	10-23*	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₃	273	10-27	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₇
224	11-17*	(TTCCTC) ₁₁ (TCCTA) ₁₇	249	11-22*	(TTCCTC) ₁₁ (TCCTA) ₂₂	274	11-26*	(TTCCTC) ₁₁ (TCCTA) ₂₆
225	7-22*	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₂₂	250	7-27*	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₂₇	275		
226	8-21	(TTCCTC) ₈ (TCCTA) ₂₁	251	8-26	(TTCCTC) ₈ (TCCTA) ₂₆	276		
227	9-20	(TTCCTC) ₉ (TCCTA) ₂₀	252			277		
228	10-19*	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₁₉	253	10-24	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₄	278	10-28	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₈
229			254			279		
230			255			280	7-32	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₃₂
231	8-22	(TTCCTC) ₈ (TCCTA) ₂₂	256	8-27*	(TTCCTC) ₈ (TCCTA) ₂₇	281		
232	9-21*	(TTCCTC) ₉ (TCCTA) ₂₁	257			282		
233	10-20	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₀	258	10-25	(TTCCTC) ₁₀ (TCCTA) ₂₅	283		
234	11-19	(TTCCTC) ₁₁ (TCCTA) ₁₉	259	11-24*	(TTCCTC) ₁₁ (TCCTA) ₂₄	284		
						285	7-33*	(TTCCTC) ₇ (TCCTA) ₃₃

3. táblázat: A populációs mintában megfigyelt allélok (fekete színnel) mérete (bp), elnevezése és az ismétlődő motívumok szerkezete (a csillaggal jelölt allélok struktúrája szekvencia vizsgálattal igazolt; szürke színnel a hipotetikus, általunk nem detektált allélméreteket tüntettük fel)

4.4 Genotipizálás

Az egyedek genotípusának pontos megállapítását a szekvenált allélokból összeállított referencia méretek segítségével végeztük.

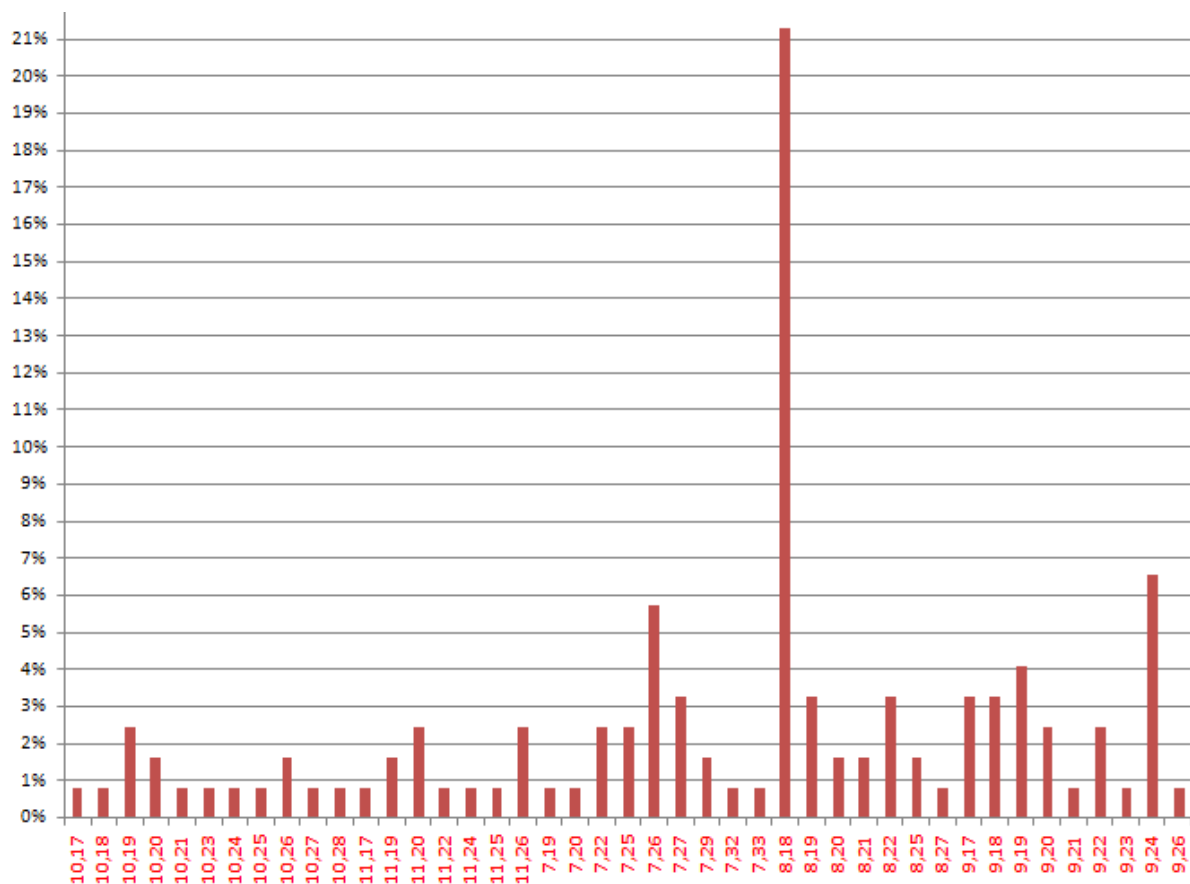
4.5 Populációstatisztikai elemzések

A statisztikai elemzések adatait 59 magyarországi fehér gólyától származó DNS-minta genotipizálásával nyertük.

4.5.1 Allélgyakoriság

A Cc4 lokuszon megfigyelt 43 allélvariáns alapján a megfigyelt allélgyakorisági értékek tartománya a hazai fehér gólya populációban 0,96% és 21,3% között változott (**6. ábra**). Leggyakrabban a 8+18-as allél előfordulását figyeltük meg.

6. ábra: Az egyes allélvariánsok megfigyelt allélgyakorisága



4.5.2 Populációgenetikai alapértékek

A vizsgált gólya populációra vonatkozó heterozigotitási, és megkülönböztető erő értékeket, valamint a polimorfizmus információs tartalmat a **4. táblázat**ban tüntettük fel.

$H_{(obs)} = 0,89$
$H_{(exp)} = 0,94$
$PD = 0,98$
$PIC = 0,93$

4. táblázat: A magyarországi fehér gólyák főbb populáció genetikai adatai

4.5.3 Beltenyésztettség felmérése

A megfigyelt és várt heterozigotitási adatokból számolt beltenyésztettségű koefficiens adata alapján $F=0,053$, ezért a magyarországi fehér gólya populáció nem mondható beltenyésztettnek.

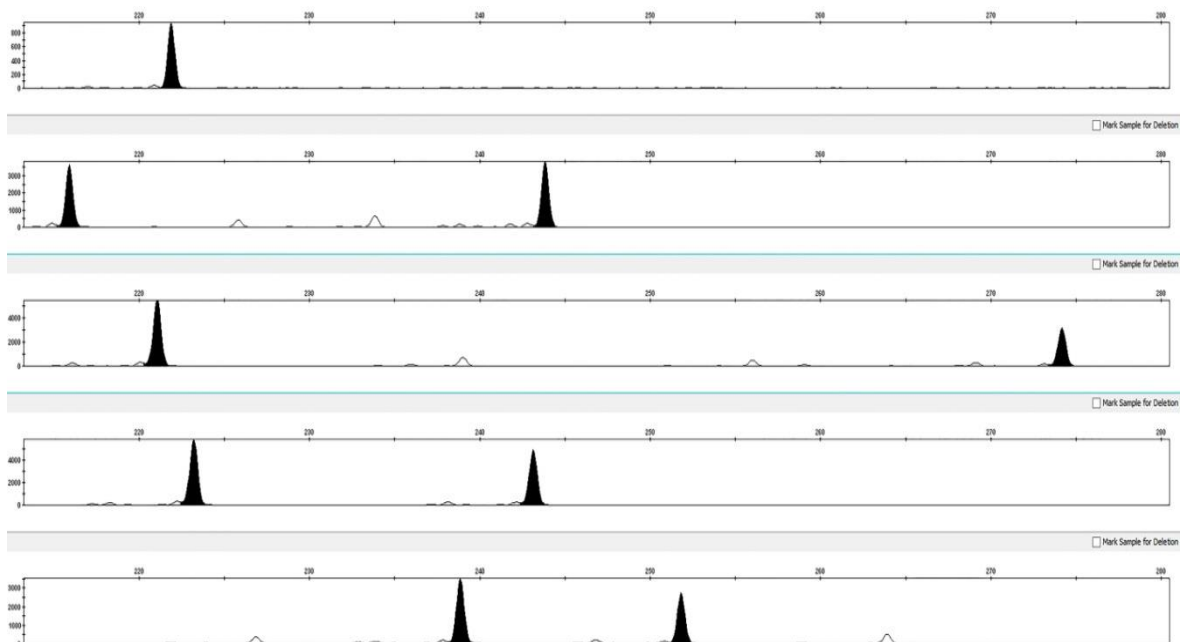
4.6 Eseti alkalmazás – esettanulmány

A helyszíni vérszennyeződésből és a gólyatetemből biztosított véres tollmintából a mitokondriális kontroll régió vizsgálatának eredményeképpen ugyanazt a haplotípust (H5) mutattuk ki (**2. táblázat**).

A Cc4 mikroszatellita lokuszon szintén mindkét mintában megegyező, homozigóta genotípust (9+18/9+18) határoztunk meg (**7. ábra**).

Az eseti mintából kimutatott haplo-, és genotípus a vizsgált populációs mintában többször nem fordult elő.

7. ábra: Az alkalmazott Cc4 mikroszatellita marker kapilláris elektroferogramja öt egyed tollmintájából



(1. sor: az eseti mintákból kimutatott homozigóta genotípus; 2-5 sor: négy egyed heterozigóta genotípusa)

5 Megbeszélés/Következtetések

5.1 Módszertani jellemzők

A vizsgálatainkhoz használt tollminták megfelelőnek bizonyultak mind a mitokondriális, mind pedig a nukleáris DNS kinyerésére, amelyekből ezt követően sikeres PCR reakciót, illetve a mitokondriális kontroll régió esetén sikeres bázissorrend meghatározást végeztünk.

5.2 Mitokondriális kontroll régió

Az 59 vizsgált madarunk CR szakaszának szekvencia analízisével kimutatott, 16 különböző haplotípus jól összevethető a korábbi kutatásokban ismerttetett variancia adatokkal és megoszlásokkal. Shephard kutatócsoportja 459 egyed alapján 106 haplotípust detektált – bár jóval rövidebb, 373 bp hosszú szakaszon –, és az öt leggyakoribb típusba tartozott a vizsgált fehér gólyák több mint 50%-a (Shephard és mtsai, 2013). A feketecsőrű gólyák vizsgálata során – melyben 83 vizsgált egyedből 37 haplotípust mutattak ki kínai kutatók – magasabb variancia eredmények születtek, melynek oka két különböző (japán és kínai) populáció együttes vizsgálata lehet (Zan és mtsai, 2008).

5.3 A Cc4 mikroszatellita jellemzése

Az általunk alkalmazott polimorf STR marker jól definiáltnak, egyértelműen meghatározhatónak bizonyult, valamint megfelelően magas fokú polimorfizmussal rendelkezik. Technikai szempontból megfelelően érzékeny – hullott tollak sikeres genotipizálása –, és az esettanulmány kapcsán is bizonyította gyakorlati alkalmazhatóságát.

A szekvenált mikroszatellita allélok segítségével felderítettük a marker valós szerkezetét, így értelmezhetővé vált az eddig egyszerű pentamer struktúrájának vélt (Shephard és mtsai, 2009) allélok mérete közti, egy-, két-, három-, ill. négy bázispáros eltérés. A szerkezet tisztázása és az ennek alapján kialakított nevezéktan következtében megbízhatóvá vált az allélmeghatározás.

A szekvenciák alapján egyértelmű, a szakmai ajánlásoknak megfelelő (Budowle és mtsai, 2005), laboratóriumok közötti adatcserére és összehasonlításra alkalmas repeat

alapú allél-nevezéktant használtunk, amely egyezik a javaslatokkal (Eichmann és mtsai, 2004).

5.4 Populációgenetikai felmérés STR markerek alapján

Meghatároztuk a Cc4 mikroszatellita markernek a hazai fehér gólya populációban megfigyelhető allél tartományát, melyek az általunk tervezett primerekkel 290 bázispárnál rövidebb PCR termékeket eredményeznek.

A populációs mintánkból kimutatott 43 allél (ill. allél kombináció) a külföldi eredményekkel – ahol 30 gólya alapján 10 alléltípust közöltek (Shephard és mtsai, 2009) – való összehasonlításban jóval magasabb. Ez részben a nagyobb populációs mintánknak ($n = 59$) köszönhető, részben pedig annak, hogy szekvencia vizsgálatainkkal igazolhatóan gyakorlatilag két kapcsolt mikroszatellita együttes vizsgálata történt.

Az allélgyakorisági értékek megoszlási adatai (**6.ábra**) – egy kiugró alléltípus (8+18) kivételével – kiegyenlítettnek mondhatók.

A kettős lokusszerkezetnek köszönhetően a megfigyelt 0,89-es heterozigotizációs érték összehasonlítva más, fehér gólyákban megfigyelt STR lokuszok értékeivel – $H_{(obs)} = 0,13-0,56$ (Shephard és mtsai, 2009) – igen magasnak bizonyult. A várt és megfigyelt heterozigotizáció között észlelt szignifikáns különbség a genetikai egyensúly hiányára utalhat a vizsgált populációban.

A kapott PD-értékünk (0,98) az azonos elvű humán igazságügyi értékeléshez viszonyítva ($PD_{min} > 99,999999999\%$) nem kellőképpen magas, ezért az egyedi azonosítás és származás biztosabb megállapításához, több genetikai marker vizsgálata szükséges.

A genetikai diverzitás jellemzésére szolgáló polimorfizmus információ tartalom értéke ($PIC = 0,93$) alapján a Cc4 mikroszatellita igen polimorfnak mondható, összehasonlítva a hazai egerész ölyvek polimorf BwsD220w lokusz eredményeivel ($PIC = 0,88$) (Bóka, 2016). Ez feltehetően összetett szerkezetének és ezáltal az allélkombinációk nagy számának köszönhető.

5.4.1 Beltenyésztettség

A vizsgált gólya populáció beltenyésztettségi értékei meglehetősen alacsonynak bizonyultak ($F = 0,053$), amit a magas arányú heterozigotizáció eredményezett. Ezzel kapcsolatban azonban meg kell jegyezni, hogy az csak valószínűsítő érték, mivel a pontos

rokonsági kapcsolatok adatai nem álltak rendelkezésünkre, így a nem szigorú monogámia miatt előfordulhat, hogy a különböző fészkekből gyűjtött tollak féltestvérektől származnak.

5.5 Esettanulmány

5.5.1 Faji besorolás lehetősége

Mivel mind a mitokondriális, mind pedig a nukleáris szakasz vizsgálatára használt primerpár fajspecifikus (Gén Banki adatok alapján nem kapcsolódik specifikusan más fajú állat genetikai anyagához), így a keletkezett, megfelelő hosszúságú PCR-termékek alátámasztják, hogy egy feltételezetten ismeretlen eredetű minta fehér gólyától származik. Ennek bizonyítására több, a gólyákhoz rendszertanilag közel álló madárfaj bevonásával kiszélesített spektrumú vizsgálat szükséges.

5.5.2 Egyedi szintű azonosítás

Populációgenetikai felmérésünk alapján a Cc4 mikroszatellita marker összetett jellegéből fakadóan igen magas statisztikai megkülönböztető-erővel (PD) bír, így igen nagymértékben valószínűsíthető – a Bayes-elvű hipotézistesztesztelés alapján –, hogy a helyszíni vérminta ugyanattól a madártól származik, amelynek tetemét fellelték. Ezt a hipotézist a mitokondriális vizsgálatok is alátámasztják, ugyanis a megegyező haplotípus alapján a két minta ugyanattól az anyai leszármazási vonalból eredeztethető.

5.6 A kutatás értékelése, további lehetőségei

Összességében elmondható, hogy a mitokondriális (CR) és nukleáris (Cc4 mikroszatellita) génszakaszokat érintő vizsgálataink a faji azonosítás mellett az egyedi szintű azonosítást is megalapozták. Ez utóbbi esetén, a megbízhatóbb eredmények érdekében azonban a módszer kiegészítése más polimorf STR markerekkel, illetve a populációs minta bővítése szükséges. Az alkalmazott primerek fajspecifikusságának tesztelésére további madárfajok bevonását tervezzük.

6 Összefoglalás

A fehér gólyák genetikai anyagának vizsgálatával számos kutatás foglalkozik, mivel a természetvédelmi, populációgenetikai felmérések mellett a faj modellállatként szolgál a madarak migrációjának és viselkedésének tanulmányozása során is. Az állatok bántalmazása, orvvadászata a közel-keleti és afrikai országok mellett Európában is egyre gyakoribb, így Magyarországon is felmerült az igény a gólyák büntetőperekben történő azonosítására.

Hazánkban a múlt évben egy megcsonkított gólyatetem kapcsán hívták segítségül az igazságügyi állatgenetikát, mikor is ismeretlen eredetű vérmintát kellett faji- és egyedi szinten azonosítani, illetve a fellelt gólyatetemmel összehasonlítani. A fenti eset tisztázása, egyúttal a fehér gólya, mint védett madarunk genetikai diverzitásának jobb megismerése kapcsán szükségessé vált a hazai gólyaállomány populációgenetikai felmérése polimorf markerek alapján.

Célunk ezért olyan génszakaszok feltérképezése volt, melyek a faji besoroláson túl egyedi szintű azonosításra is alkalmasak, így a mitokondriális kontroll régió mellett a nukleáris genomban kódolt mikroszatellita (STR) marker polimorfizmus-vizsgálatát terveztük.

Hat magyarországi megyéből összesen 59 tollmintát gyűjtöttünk a Magyar Madártani Egyesület, a Budapesti Állat- és Növénykert és a Hortobágyi Madárkórház segítségével.

A mitokondriális kontroll régió esetében szekvencia analízissel azonosítottuk az anyai leszármazási vonalakat (haplotípusokat), ami a génbanki adatokkal való összehasonlítás során a faji besorolást is lehetővé tette.

A sejtmagi STR marker (Cc4) polimorfizmusának felméréséhez a kapott, különböző méretű PCR termékeket (alléleket) kapilláris elektroforézissel választottuk el. Az allélek szekvencia analízisével felderítettük az ismétlődő egységek szerkezetét, amely alapján – a nemzetközi gyakorlathoz igazodva – megfelelő nevezéktant alakítottunk ki. A Cc4 lokuszon megfigyelt allélgyakoriság értékek alapján statisztikai teszteléssel felmértük a magyarországi fehér gólya populáció heterozigotizációját ($H_{obs} = 0,89$), és kalkuláltuk a marker megkülönböztetési valószínűségét ($PD = 0,98$) valamint a polimorfizmus információs értékét ($PIC = 0,93$).

Az általunk gólyákra kidolgozott genetikai módszer bűnügyi mintákból is megfelelően alkalmazhatónak bizonyult mind a faji, mind pedig egyedi szintű azonosításra,

mivel a helyszíni és összehasonlító mintákból kimutatott megegyező geno- és haplotípus a vizsgált populációs mintában másik egyednél nem fordult elő.

7 Summary

As the White stork is a model species for studies of bird migration and behavior, numerable researches dealing with the genetic material of white stork. Unfortunately the forensic relevance of storks is growing too, more and more poaching cases are reported in Europe, in the Near East and in Africa. The species is not only hunted for food, trophy and sport, but only in Hungary two fatal abuse cases were reported last year.

In one of these cases a decapitated corpse of a White stork was discovered in a plastic bag at a wayside pit. Feathers from the corpse and a bloody swab from the putative scene of abusing were collected for genetic analysis. Because neither nuclear nor mitochondrial genetic variance of the Hungarian White stork population were investigated so far, the main reason of our project was to reveal the genetic diversity with forensically applicable markers.

For the population study 59 feather sample from six Hungarian county were collected from unrelated individuals (from one nestling per nest), with the help of the BirdLife Hungary, the Budapest Zoo & Botanical Garden and the Bird Hospital in Hortobágy.

For determination the nucleotide variances for the maternal lineages the mitochondrial Control Region (CR) was analyzed with species specific primer pairs. Altogether 16 haplotypes were identified from 15 polymorphic sites based on the investigated, approx. 700 nucleotide long sequence.

For the reason of individual identification we investigated the polymorphisms' level of the Cc4 microsatellite marker in the Hungarian White stork population. Forensically recommended nomenclature was developed based on the allele sequences of the polymorphic region. Population-statistical analysis using the observed allele frequencies was performed, calculating the heterozygosity ($H_{obs} = 0.89$), power of discrimination ($PD = 0.98$) and the polymorphic information content ($PIC = 0.93$).

However the requirement of extended set of loci for individual identification is suggested, our results can support the potential use and efficiency of both the hyperpolymorphic Cc4 microsatellite marker and the mitochondrial control region for forensic purposes.

Irodalomjegyzék

Bairlein, F. Population studies of White Storks (*Ciconia ciconia*) in Europe, Bird Population Studies. Relevance to conservation and management (C. M. Perrins, J.-D. Lebreton and G. J. M. Hirons, Eds.), Oxford University Press, Oxford (1991)

Biomi Kft., URL: <http://www.biomi.hu/>

Bóka, G.: A magyar ölyvpopuláció (*Buteo*) genetikai változatosságának felmérése, TDK dolgozat (2016)

Budowle, B., Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., van Haeringen, W., Fain, S., Broad, T. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal of Legal Medicine* 119(5):295-302 (2005)

Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C.: A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis, *Nucleic Acid Research* 19(6): 1349. (1991)

Eichmann, C., Berger, B., Parson, W.: A proposed nomenclature for 15 canine-specific polymorphic STR loci for forensic purposes, *International Journal of Legal Medicine* 118(5); 249-266. p. (2004)

GenBank, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., Wallace D. C.: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(11):6715-9. (1980)

Hagemeijer, W.J.M., Blair, M.J. (eds): *The EBCC atlas of European breeding birds: their distribution and abundance*, London, T & AD Poyser (1997)

Howell, N.: mtDNA Recombination: What do in vitro data mean?, *American Journal of Human Genetics* 61(1): 19–22. doi: 10.1086/513910 (1997)

Lovászi P.: A fehér gólya (*Ciconia ciconia*) helyzete Magyarországon az 1941-1994 közötti országos állományfelmérések tükrében, *Ornis Hungarica* 8 Suppl. 1: 1-8. (1998)

Magyar Madártani Egyesület, URL: <http://www.mme.hu/>

Nei, M.: Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12 Pt 1-2): 3321–3323. (1973)

Satoh M., Kuroiwa T.: Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell, *Experimental Cell Research* 196(1):137-40. (1991)

Seqomics Kft., URL: <http://www.seqomics.hu/hun/>

Shephard, J. M. Galbusera, P. Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y.: Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork,

Ciconia ciconia; Conservation Genetics 10:1525–1528 doi: 10.1007/s10592-008-9784-x (2009)

Shephard, J. M., Ogden R., Tryjanowski P., Olsson O., Galbusera P.: Is population structure in the European white stork determined by flyway permeability rather than translocation history?, Ecology and Evolution 3(15): 4881– 4895 doi:10.1002/ece3.845 (2013)

Turjeman, S., Centeno-Cuadros, A., Eggers, U., Rotics, S., Blas, J., Fiedler, W., Kaatz, M., Jeltsch, F., Wikelski, M., Nathan, R.: Extra-pair paternity in the socially monogamous white stork (*Ciconia ciconia*) is fairly common and independent of local density, Scientific reports 6:27976 doi: 10.1038/srep27976 (2016a)

Turjeman, S., Centeno–Cuadros, A., Nathan, R.: Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite markers for the white stork, *Ciconia ciconia*: applications in individual–based and population genetics, Animal Biodiversity and Conservation 39.1: 11–16. (2016b)

Weber, J. L., May, P. E.: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, American Journal of Human Genetics 44(3):388-96. (1989)

Yamamoto, Y., Murata K., Matsuda H., Hosoda T., Tamura K., Furuyama J.: Determination of the complete nucleotide sequence and haplotypes in the D-loop region of the mitochondrial genom in the Oriental white stork, *Ciconia boyciana*, Genes&Genetic Systems 75, p. 25-32 (2000)

Zan S., Zhou L., Jiang H., Zhang B., Wu Z., Hou Y.: Genetic structure of the oriental white stork (*Ciconia boyciana*): implications for a breeding colony in a non-breeding area, Integrative Zoology 3: 235–244 doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00096.x (2008)

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Zenke Petrának a dolgozat elkészítéséhez nyújtott rengeteg segítségért és a hasznos tanácsokért mind a munka laboratóriumi részében mind pedig a papírra vetés fázisainál.

Emellett köszönet illeti az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállattudományi Intézetből Dr. Gáspárdy András tanszékvezető urat, hogy bekapcsolódhattam a tanszék egyik kutatásába és Keindl Ágnes, amiért bevezetett a laboratóriumi munka világába és türelemmel válaszolt a kérdéseimre (a nyári hőség viszontagságai ellenére is).

Szeretnék köszönetet mondani Szinai Péternek, az MME Gyűrűző- és Vonuláskutató Szakosztály elnökének a mintagyűjtés koordinálásáért, Huszák Péternek a Fővárosi Állat- és Növénykertből, illetve a Hortobágyi Madárkórház munkatársainak a rendelkezésünkre bocsátott mintákért.

Szeretném megköszönni Selymes Ritának, egy barátnőm barátnőjének, aki az angol nyelvű absztrakt elkészítésében segédkezett.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom a családomnak és a barátaimnak, akik mindig támogatnak a tanulmányaim során és lelket öntenek belém, ha nehézség adódik. Legfőképpen édesanyámnak szeretném megköszönni a türelmét, amiért mindig meghallgatja a panaszkozásaimat és megpróbál megnyugtatni 180 kilométer távolságból.

A dolgozat az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Pető Dorina

Elérhetőség (e-mail cím): peto.dorina16@gmail.com

A feltöltendő mű címe: "Fehér gólyák egyedi azonosítása - bűnügyi eset tisztázása genetikai vizsgálatok segítségével"

A mű megjelenési adatai: Diplomamunka

Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

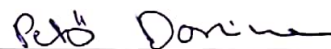
Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyv- tárbán.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2020. év 11. hó 05. nap



aláírás

szerző/a szerzői jog
tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyont elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvostudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

Nyilatkozat TDK- és diplomamunka azonosságáról

NYILATKOZAT

Alulírott **Pető Dorina** nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe "**Fehér gólyák egyedi azonosítása - bűnügyi eset tisztázása genetikai vizsgálatok segítségével**" tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2017. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2020.11.05.

PETŐ DORINA, *Pető Dorina*

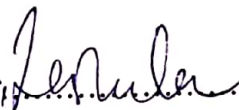
a hallgató neve és aláírása

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott **Dr. Zenke Petra** igazolom, hogy **Pető Dorina,**

"Fehér gólyák egyedi azonosítása - bűnügyi eset tisztázása genetikai vizsgálatok segítségével" című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020.11.05.

DR. ZENKE PETRA .....

a témavezető neve és aláírása

Állattenyésztési, Takarmányozástani és

Laborállat-tudományi tanszék