

**Cross-species testing of
microsatellite markers for
individual identification in
fallow deer (*Dama dama*)**

O. Turi¹

Zs. Wagenhoffer¹

M. Battay²

P. Lehotzky³

O. Zorkóczy^{1*}

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Állattenyésztési, Takarmányozástani,
és Laborállat-tudományi Intézet,
H-1078 Budapest, István utca 2.

*e-mail: zorkoczy.orsolya.krisztina@univet.hu

2. Állatorvostudományi Egyetem,
Rektori Hivatal,
Budapest

3. Országos Magyar Vadászkamara,
Fővárosi és Pest megyei
Területi Szervezete,
Budapest

Mikroszatellita-markerek tesztelése dámszarvasok egyedi azonosítása céljából

**Turi Orsolya¹, Wagenhoffer Zsombor¹, Battay Márton², Lehotzky Pál³,
Zorkóczy Orsolya^{1*}**

ÖSSZEFOGLALÁS

A dámszarvas (*Dama dama*) Magyarországon jelentős vadgazdálkodási értéket képvisel húsa és trófeája miatt. Védelme érdekében a szerzők egy egyedi szintű azonosításra alkalmas markerkészlet fejlesztését kezdték meg, amely később a vaddal kapcsolatos jogkövetkezménnyel járó esetek (pl. orvvadászat, közlekedési károkozás) megoldásában segíthet. A kutatáshoz 31 mikroszatellita-markert vizsgáltak, és a vizsgált 27 dámszarvasminta alapján négy polimorf markert azonosítottak, amelyek két-három alléllal rendelkeznek. Eddigi eredmények alapján a vizsgált magyarországi állományban vélhetően csekély a genetikai diverzitás, a sikeres egyedi szintű azonosításhoz ezért további markerek vizsgálata szükséges.

SUMMARY

Background: The fallow deer (*Dama dama*) represents a significant game management value in Hungary due to its game meat and antler trophies. Unfortunately, traffic accidents and illegal activities, such as poaching or illegal trading, threaten the species and its value.

Objectives: The aim of the authors is to develop a set of tetranucleotide microsatellite markers that are capable of individual identification of fallow deer to help law enforcement prove the abovementioned cases.

Materials and Methods: A total of 27 fallow deer individuals from three Hungarian sampling areas were examined. The authors tested 31 tetranucleotide microsatellites on the samples which were originally designed for red deer (*Cervus elaphus*) and mule deer (*Odocoileus hemionus*). Published PCR protocols were available for all markers on the original species, which were tested and optimized on fallow deer samples based on the visualized PCR products on agarose gel. Afterwards, they were examined by capillary electrophoresis so that the alleles could be separated and detected, and the polymorphic markers sorted.

Results and Discussion: Only 25 markers provided PCR products of adequate quality and quantity, from which the capillary electrophoresis detected a total of four polymorphic markers with two or three alleles. This shows a possible low genetic variation in the Hungarian fallow deer population which is in accordance with other international research on the species. It is believed that during the Pleistocene the extreme climate caused a major reduction of the species, which was followed by reintroduction by people, both of which resulted in the experienced general low genetic diversity due to a genetic bottleneck, founder effect, inbreeding, and genetic drift. As the number of polymorphic markers and the level of allele polymorphism are low, the set of microsatellites is not yet suitable for individual identification. The testing of further markers is needed and more fallow deer samples from different regions should be examined, too.

A dámszarvasnak (*Dama dama*) Magyarországon jelentős, több, mint 40 000 egyedet számláló populációja ismert; természetvédelmi, kulturális és vadgazdálkodási értéke kimagasló. Vadászata a többi vadon élő fajhoz hasonlóan jogszabályi keretek között zajlik, azaz, arra jogosított személy által, vadászati célra engedélyezett eszközzel és vadászati időnyben (október–február). Amennyiben valamelyik feltétel nem teljesül az elejtés során, akkor illegális elejtésről van szó, amely a tényállástól függően, a jogosulatlan vadásztól az orvvadászatig számos szabálysértést, ill. bűncselekményt jelenthet.

Hazánkban 40 000 egyedet számláló dámszarvas-állomány él

Sajnálatos módon az orvvadászat egyre növekvő mértékű Magyarországon [1], amely, a közlekedési károkozás (vad-gépjármű ütközés) mellett, a dámszarvasokat is érinti. Mivel értékes vadról van szó, így igény alakult ki a faj hatékonyabb védelmére. Ennek egyik módja genetikai módszerek kidolgozása, amelyek alkalmasak a dámszarvasokat érintő bűncselekmények bizonyítására. Ez egyrészt visszatartó erővel szolgálhat az orvvadászoknak, másrészt több illegális és jogkövetkezménnyel járó eset igazolását tenné lehetővé. Ilyen és ehhez hasonló törvényszéki ügyekben használható módszerek fejlesztésével foglalkozik az igazságügyi állatgenetika tudománya, amely Magyarországon is több, mint 20 éves múltra tekint vissza [2, 3], és egyre nagyobb igény mutatkozik a területen történő fejlesztések megvalósítására [4–7].

IGAZSÁGÜGYI ÁLLATGENETIKAI VIZSGÁLATOK

Az igazságügyi állatgenetika célja a törvényszéki ügyekben bizonyítékként szolgáló biológiai maradványok vizsgálata a jogkövetkezménnyel járó esetek tisztázása érdekében. A vadon élő állatok esetében a vadgázolás, illegális kereskedelem és a már említett orvvadászat a leggyakoribb bűncselekménynek minősülő esettípus [8, 9]. Továbbá élelmiszer-biztonsági ügyek is előfordulhatnak, pl. a hústermékek nem megfelelő eredetmegjelölése, vagyis amikor a termék húsösszetétele nem felel meg a címkén szereplő adatokkal [10–12].

Ezen esetek megoldásához szükség lehet ivari [13, 14], faji [10, 11, 15, 16] és alfajszintű [17] azonosításra, amely módszerek azonban nem feltétlenül relevánsak és elegendők az adott ügy megoldásához. Ilyenkor az egyedi szintű azonosítás szükséges annak érdekében, hogy a gyanúsítottnál és az elkövetés helyszínén talált biológiai bizonyítékokat egymással érdemben össze lehessen hasonlítani, és ezáltal valószínűsíteni, ill. kizárni lehessen azok megegyező egyedtől való eredetét [18–22].

Az egyedi szintű azonosítást több vad- és háziállat esetében megvalósították már úgynevezett mikroszatellita-markerkészlet fejlesztésével (pl. szarvasfélék, nagymacskák, vaddisznó, sertés, medve, kutyafélék) [22–27]. Magyarországon is a jelentősebb állatfajok alomellenőrző, genetikai diverzitást és beltenyésztettséget vizsgáló genetikai kutatásai mellett [28–35] kidolgozták ezeket a bűncselekményeknél használható genetikai módszereket is [19, 34]. Dámszarvasokra azonban jelenleg nem áll rendelkezésre sem Magyarországon, sem nemzetközi szinten ilyen jellegű genetikai egyedazonosító markerkészlet.

MIKROSZATELLITA-MARKERKÉSZLET FEJLESZTÉSE EGYEDI SZINTŰ AZONOSÍTÁSHOZ

A mikroszatelliták vagy másnéven STR markerek (short tandem repeat, rövid tandem szerű ismétlődések) a szekvenciájukban egy többszörösen ismétlődő bázismotívummal rendelkeznek, ami 1–7 bázispár hosszúságú (pl. ATC–ATC). Az előnyük, hogy nagy mutációs rátával rendelkeznek [36], ezáltal nagymértékű polimorfizmust mutatnak az egyedek között. Ez hosszpolimorfizmus formájában jelenik meg, vagyis az egyes allélok a szekvenciában megfigyelhető ismétlődések

Az igazságügyi állatgenetika célja a törvényszéki ügyekben bizonyítékként szolgáló biológiai maradványok vizsgálata

Vadgázolás, illegális kereskedelem, orvvadászat, ill. élelmiszer-biztonsági ügyekben is szükség lehet az állatok egyedi szintű azonosítására

A mikroszatellitákon belül az igazságügyi célú vizsgálatokhoz általában tetranukleotidokat alkalmaznak

Az egyedi szintű azonosításra alkalmas markerkészletek fejlesztésének első lépése a markerek keresése

Egyedi szintű azonosításra alkalmas tetramer mikroszatellita-markerkészletet már több szarvasféléknél is kifejlesztettek

számában térnek el egymástól [18]. A polimorfizmus azért fontos tulajdonságuk, mert az egyedekben előforduló változatos allélok és allélvariációk teszik lehetővé az egyedek elkülönítését és így az egyedi szintű azonosítást.

A mikroszatellitákon belül az igazságügyi célú vizsgálatokhoz általában a minimum négy bázispár ismétlődésű tetranukleotidokat (pl. ATCC-ATCC) alkalmazzák gyakori előfordulásuk és a kevesebb genotipizálási hiba miatt [18–20]. Az ennél rövidebb di- és trimer hosszúságú mikroszatelliták kevésbé egyértelműen meghatározhatók, ugyanis nagyobb valószínűséggel eredményeznek műterméket a PCR-reakció során az ún. „dadogás” (a „dadogás” az amplifikálás során a polimeráz enzim hibája miatt fellépő jelenség, amikor a várt terméken kívül pár mikroszatellita-ismétléssel nagyobb és kisebb termékek is keletkeznek, amelyek zavarják az allélhosszak leolvasását) jelenségének köszönhetően [18, 19]. A tetramereknél hosszabb egységekből álló mikroszatelliták pedig ritkábbak a komplexebb élőlények genomjában [18], és általában kevés allélváltozattal rendelkeznek.

Az egyedi szintű azonosításra alkalmas markerkészletek fejlesztésének első lépése a markerek keresése. Ez történhet a célfaj genomszekvenciájának vizsgálatával [20], vagy korábbi publikációban más fajokra leírt markerek kiválasztásával [19, 21, 26]. Ezt követően optimalizálni kell a PCR programot, mely specifikus, megfelelő minőségű és mennyiségű marker-terméket eredményez. A fejlesztés során figyelembe kell venni a vizsgálandó markerek együttes tesztelésének lehetőségét, azaz, hogy idő- és költséghatékony formában egy multiplex reakcióban több marker párhuzamos vizsgálata is megvalósulhasson [18–21, 25, 26].

Ezután a mikroszatelliták különböző alléljainak szétválasztása és detektálása következik, a cél a több allállal rendelkező, vagyis polimorf mikroszatelliták kiválogatása, hiszen egyedi szintű azonosításra ezek alkalmasak. Ehhez a sokszorosított mikroszatelliták kapilláris-elektroforézises vizsgálata szükséges. A sikeres detektálás feltétele a PCR-termékek fluoescens jelölése, aminek hagyományos módja a forward primerek fluorofór festékkel való ellátása, ami a PCR-reakció során keletkező termékekre is rákerül [37, 38]. Nagyszámú potenciális marker és primerjeik tesztelése esetén költségkímélő módszer az ún. „farkazásos” jelölési technika, amely markerenként három primert használ [39]. A hagyományos reverz primer mellett a reakcióba kerül egy 15–18 bázis hosszú adapter szekvenciával („tail”, azaz fark) ellátott forward primer és egy fluorofórt hordozó adapter szekvencia (másnéven univerzális primer). A PCR-reakció első ciklusait követően létrejönnek a forward primer működésének köszönhetően adapter szekvenciával ellátott termékek, amelyekhez a fluoescens jelű univerzális primer kötődni tud, és ezáltal jelölt termékeket állít elő [39]. Így a költséges fluoescens jelöléseket nem szükséges minden forward primerhez kapcsolni, azokkal igény szerint több primer/marker is megjelölhető, ill. a vizsgálatok során (megfelelő adapter szakaszokkal) szabadon kombinálhatók.

Egyedi szintű azonosításra alkalmas tetramer mikroszatellita-markerkészletet már több szarvasféléknél is kifejlesztettek. Az eddig vizsgált szarvasfélék közé többek közt a gímszarvas (*Cervus elaphus*) [19], a brit kolumbiai öszvérszarvas (*Odocoileus hemionus columbianus*) [18], az öszvérszarvas (*Odocoileus hemionus hemionus*) [18], az európai őz (*Capreolus capreolus*) [20], a vapiti (*Cervus canadensis*) [21, 26] és a jávorszarvas (*Alces alces*) [22] tartozik. A fejlesztések során azt tapasztalták, hogy az egyik fajra tervezett primerek gyakran működőképesek voltak más szarvasfélékben is, tehát érdemes a korábbi kutatásokban leírt markerek tesztelése rokon fajok esetében [18, 20]. Az is fontos tapasztalat, hogy a különböző szarvasféléknél eltérő számú mikroszatellita alkalmazása tette lehetővé az egyedi szintű azonosítást. A legkevesebb erre alkalmas marker nyolc (5–15 allél/marker) [18], míg a legtöbb 14 marker volt (2–7 allél/marker) [26]. Vagyis a célfaj genetikai változatossága nagyban meghatározza a fejlesztendő markerkészletet, legtöbb-ször minél több allállal rendelkeznek a mikroszatelliták az adott populációban, annál kevesebb szükséges belőlük.

A dámszarvas-populációkra világszerte kismértékű genetikai diverzitás jellemző

A szerzők célja egy törvényszéki ügyekben is használható tetramer mikroszatellita-markerkészlet fejlesztése

GENETIKAI KUTATÁSOK A DÁMSZARVASOKNÁL

A dāmvd a Nyugat-Palearktis szarvasféléje, eredeti elterjedési területe Törökország és a Nyugat-Balkán volt, ám mára kozmopolita fajjá vált [40]. Európa majdnem valamennyi országában jelen van, de betelepítették Ausztráliába, Új-Zélandra és az amerikai kontinensre is. A dámszarvas genetikai vizsgálata világszerte zajlik különböző célokból, mint pl. populációs struktúra [41], állomány-egészségügy [42] és élelmiszer-biztonság [10]. Az egyes kutatások többféle DNS-markert és fehérjét is teszteltek, többek között mitokondriális DNS-t [41], vér- és szövetfehérjéket [43, 44], különböző magi fehérjekódoló géneket (pl. PRNP) [42], ill. di- és trimer mikroszatellitákat [41, 45]. Valamennyi esetben kismértékű genetikai változatosságot tapasztaltak a dámszarvas-populációkon belül, aminek több okát is feltérképezték.

Az egyik ilyen, genetikai diverzitást csökkentő jelenség a jégkorszakok extrém klímája miatt bekövetkezett tömeges kihalás volt (genetikai palacknyakhatás) [41]. Ezt valószínűleg csak néhány populáció élte túl a Balkánon, Szicíliában és Kis-Ázsiában [41], így rendkívül megcsappant a faj egyedszáma és vélhetően genetikai diverzitása is. Egyes vélemények szerint olyan mértékű lehetett ez a leromlás, hogy emiatt nem volt képes elterjedni a dāmvd a jégkorszakok befejeződése után sem a korábbi területein [46]. Ehhez emberi beavatkozásra volt szüksége, ami már a neolitikum idején megkezdődött, és egészen a 20. századig tartott [40, 47]. Az ember által végrehajtott be- és áttelepítések miatt lett végül kozmopolita elterjedésű a faj. Ezek a telepítések ugyanakkor legtöbbször kevés egyeddel történtek [45], ami az alapító hatás, genetikai sodródás [41, 45, 48] és beltenyészettség miatt [48] szintén csökkentette az új populációk genetikai változatosságát.

Magyarországon is történtek már dámszarvassal kapcsolatos genetikai vizsgálatok mikroszatelliták és mitokondriális DNS vizsgálatával (14 egyed Dél-Magyarországról [41] és 41 egyed Északkelet-Magyarországról [49]), amelyek más szarvasfélékhez képest szintén kismértékű genetikai változatosságot mutattak ki. A dámszarvas magyarországi eredetéről megoszlanak a vélemények, hogy a dām őshonos fajunk, vagy sem. Az általánosabb nézet szerint legkorábban az Anjou uralkodóink, ill. Mátyás korában telepíthették be. A XVIII. század előttről nincs feljegyzés szabadon élő dāmokról. 1969-ben indították be hazánkban azt a programot, amelynek során 1970–87 között 81 helyre telepítettek be dámot az országban, kialakítva mai elterjedését [50]. A magyar populáció esetében egyelőre nem ismert, hogy mely hatások alakították a genetikai diverzitását.

A kutatásunk célja egy törvényszéki ügyekben is használható tetramer mikroszatellita-markerkészlet fejlesztésének megkezdése volt, mely lehetővé teszi a dámszarvasok egyedi szintű azonosítását. Ehhez nagy számú mikroszatellita-markert teszteltünk három hazai dámszarvas-populáció összesen 27 egyedén.

ANYAG ÉS MÓDSZER

MINTAGYŰJTÉS ÉS DNS KINYERÉS

A kutatáshoz 27 dámszarvasegyed izom- és szőrösbőr szövetmintáját gyűjtöttük össze 2019–2022 között történt legális kilövések során elejtett állatoktól. A minták három területről származnak: Vértes ($n = 3$), Pilis ($n = 13$) és Isaszeg ($n = 11$) környékéről. A DNS kinyerése a FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kittel történt, a hozzá tartozó protokoll alapján. A kinyerést és tisztítást követően a kapott DNS-minta minőségét agarózgél-elektroforézissel ellenőriztük, a DNS-koncentráció mérése pedig Qubit® 2.0 fluorometer használatával történt.

MIKROSZATELLITA-MARKEREK KIVÁLASZTÁSA (TETRAMER MIKROSZATELLITÁK)

A tesztelni kívánt tetramer mikroszatellita-markereket korábbi publikációkból nyertük [18, 19], mivel ebben a fajban még nem áll rendelkezésre teljes genom-

szekvencia. Összesen 31 markert választottunk ki, amelyből tíz eredetileg gímszarvasra (*Cervus elaphus*; DeerPlex markerek) [19], 21 pedig öszvérszarvasra (*Odocoileus hemionus*; Ohe markerek) lett tesztelve [18] (1.táblázat). Azért esett a választás ezekre a markerekre, mivel az eredeti fajok közeli rokonságban állnak a dámszarvassal, így várható volt, hogy a legtöbb marker működőképes dámszarvadásokban is. A DeerPlex markerek további előnye volt, hogy dámszarvasokban kereszttesztelték őket a fajspecifititás vizsgálatokor, és bizonyítottan ebben a fajban is működnek.

1. TÁBLÁZAT. A kutatás során vizsgált 31 tetramer mikroszatellita adatai: forrásfaj (félkövér betűvel a marker csoport neve), lokusznév, forrás publikációk

TABLE 1. Data of the tested 31 tetranucleotide microsatellite markers: source species (name of the marker groups marked with bold), locus name and references

Vizsgált faj	Mikroszatellita-marker	Publikáció
gímszarvas (<i>Cervus elaphus</i>) - DeerPlex	C01, C229, T26, T108, T123, T156, T172, T193, T501, T507	[19]
öszvérszarvas (<i>Odocoileus hemionus</i>) - Ohe	OheA, OheB, OheC, OheD, OheE, OheF, OheG, OheH, OheI, OheJ, OheK, OheL, OheM, OheN, OheO, OheP, OheQ, OheR, OheS, OheT, OheV	[18]

Elsőként a mikroszatelliták monoplex PCR-tesztelését végezték el két-két dámszarvas mintán

MONOPLEX TESZTELÉS ÉS PCR-OPTIMALIZÁLÁS

A markerkészlet-fejlesztés következő lépése a mikroszatelliták monoplex PCR-tesztelése volt két-két dámszarvasmintán. Ennek a lépésnek a célja az volt, hogy megállapítsuk, a más fajra tervezett markerek közül melyik eredményez terméket dámszarvasoknál is, ill. ezt milyen PCR-beállítások mellett teszi. Valamennyi marker rendelkezett eredeti publikált PCR-programmal, így elsőként ezeken teszteltük őket. Amennyiben a kapott PCR-termékek nem voltak megfelelőek (melléktermék keletkezése, méretbeli eltérések, ill. a termékhiány miatt), akkor a PCR-beállításokat megváltoztattuk és optimalizáltuk.

Az allélok kapilláris-elektroforézissel történő detektálásához a PCR-reakció során keletkező termékeket fluoreszcens jelöléssel láttuk el a „farkazásos” jelölési technika alkalmazásával [39]. Ehhez összesen négy univerzális primert használtunk, tehát négy különböző színű fluorofórunk volt a markerek multiplex sokszorosítását követő azonosításához (2.táblázat) [39, 51].

2. TÁBLÁZAT. Az alkalmazott négy univerzális primer adatai: primernév (színek a fluorofór színét jelölik), primerszekvencia (5'-3'), kapcsolt fluorofór típusa, primerhossz, primer olvadási hőmérséklete (T_m), forráspublikáció

TABLE 2. Data of the four used universal tailed primers: primer name (the colours indicate the colour of fluorophores), primer sequence (5'-3'), attached fluorophore type, primer length, primer melting temperature (T_m), and references

Univerzális primer	Farok szekvencia (5'-3')	Fluorofór	Hossz (bázispár)	Olvadási hőmérséklet (T_m)	Publikáció
Tail A	GCCTCCCTCGCGCCA	FAM	15	63 °C	[51]
Tail B	GCCTTGCCAGCCCGC	VIC	15	57 °C	[51]
Tail C	CAGGACCAGGCTACCGTG	NED	18	59 °C	[39]
Tail D	CGGAGAGCCGAGAGGTG	PET	17	59 °C	[39]

*A monoplex rendszerek
tesztelése után a
működő markereket
multiplexekbe rendezték*

MULTIPLEX PCR-RENDSZEREK ÖSSZEÁLLÍTÁSA

A monoplex tesztelések után a működő markereket multiplexekbe rendeztük a költség- és időhatékony munkafolyamat érdekében, amelyeket két-két dámszarvasmintán teszteltünk. A multiplex rendszerek összeállításakor több szempontot vettünk figyelembe: az egy reakcióban használt primerek hasonló PCR-programon működjenek, eltérő termék hosszúságú markerek kerüljenek egybe, vagy a közel ugyanolyan hosszú termékek eltérő színű fluoreszcens jellel legyenek ellátva. A multiplexek megfelelő működését agarózzgél-elektroforézissel ellenőriztük, majd az optimalizált multiplex rendszerekkel megvizsgáltuk a három dámszarvas-állomány mintáit ($n = 27$).

ALLÉLOK DETEKTÁLÁSA KAPILLÁRIS-ELEKTROFORÉZISSSEL ÉS A POLIMORFIZMUS FELMÉRÉSE

A sokszorosított allélok elektroforetikus elválasztása ABI Prism3500 Genetic-Analyzer készüléken (AppliedBiosystems), GeneScan™-500 LIZ™ méret standard segítségével történt (Biomi Kft, Gödöllő). Az eredményeket GeneScanAnalysis Software v3.1, Peak Scanner™, és OSIRIS programokkal elemeztük.

A meghatározott genotípusokból a markerkészlet PI- (probability of identity, identitásvalószínűség) értékét számoltuk ki GenAlEx 6.503 segítségével, ugyanis a PI megadja, hogy mekkora valószínűséggel egyezik meg a populációból véletlenszerűen kiválasztott két egyed genotípusa a markerkészlet szerint [52]. Számítása markerenként (lokuszonként): $PI = 2 * (\sum p_i^2)^2 - \sum p_i^4$, ahol a p_i a marker i -edik alléljának gyakorisága. A markerkészlet PI-értékét a lokuszonként kiszámított PI-értékek összege adja meg. Emellett kiszámoltuk az allélgyakoriságot, a várt és megfigyelt heterozigotizást mintavételi helyenként, ill. a teljes mintaelemszámra ($n = 27$), hogy képet kapjunk a területek közötti különbségekről.

*Kiszámolták,
hogy mekkora
valószínűséggel egyezik
meg a populációból
véletlenszerűen
kiválasztott két
egyed genotípusa a
markerkészlet szerint*

EREDMÉNYEK

A kutatásban használt 27 dámszarvas-szövetmintából minden esetben sikeres volt a DNS-kinyerés az agarózzgélén történt minőségellenőrzés és Qubit-mérés (1–50 ng/μl) alapján. A korábbi publikációkból kiválogatott 31 tetramer mikroszatelita közül a vizsgálatok során kiderült, hogy három darab eltérő névvel, azaz duplán szerepelt a közleményekben (duplikumok: OheA = C01, OheL = C229 és OheT = OheP). Ezeket a lokuszokat mindkét leírt primerpárral leteszteltük, majd közülük az optimálisabban működőt választottuk ki a további vizsgálatokhoz (C01, C229 és OheP). A figyelembe vett szempontok: ne keletkezzen aspecifikus melléktermék, megfelelő mennyiségű és minél rövidebb PCR-termék keletkezzen.

*A kiválasztott 25
markert 5 multiplex
rendszerbe sorolták*

A 28 marker közül a monoplex tesztelés és optimalizálás során további három esett ki a vizsgálatból, mivel vagy nem keletkezett PCR-termék (T26 és OheD), vagy melléktermékek képződtek (OheS). A multiplex reakciók tesztelése a 25 megfelelően működő markerrel zajlott. Az eredeti publikációkban leírt markerkombinációkat vizsgáltuk elsőként, ezek esetleges változtatásakor a PCR-programok az eredetiek maradtak. A 25 markert öt multiplex rendszerbe sikerült besorolni.

*A PCR-termékek
kapilláris-
elektroforézise
alapján négy marker
bizonyult polimorfnek*

A multiplex reakciókban keletkezett PCR-termékek kapilláris-elektroforézis detektálásával összesen négy marker bizonyult polimorfnek (13%), amelyekből a C229 és T156 két-két alléllal rendelkezik (C_1/C_2 ; T_1/T_2), az OheF és OheQ mikroszateliták pedig három allélváltozatot ($F_1/F_2/F_3$; $Q_1/Q_2/Q_3$) mutattak a vizsgált minták alapján (3. táblázat). Mind a négy marker esetében volt olyan allél, amely az eddig vizsgált minták szerint csak egy-egy mintavételi helyen fordult elő (C229- C_2 Isaszeg, T156- T_2 Isaszeg, OheF- F_2 Pilis és OheQ- Q_2 Pilis). A megfigyelt heterozigotizás az összes vizsgált egyedre nézve ($n = 27$) 0,07 (OheQ) és 0,25 (C229) között változott, míg a várt heterozigotizás 0,07 (OheQ) és 0,23 (C229) között (3. táblázat). A 25 markerre kiszámított PI-érték a vizsgált 27 egyed alapján 0,035-nek bizonyult.

3. TÁBLÁZAT. A négy polimorf mikroszatellita-marker statisztikai adatai: lokusznev, allélszám (db), megfigyelt heterozigotitás (Ho), allélgyakoriság, várt heterozigotitás (He) és mintavételi helyek (n = mintaelemszám): Vértes (V), Pilis (P), Isaszeg (I), teljes mintaelemszám (Σ)

TABLE 3. Statistical data of the four polymorphic microsatellite markers: locus name, number of alleles, observed heterozygosity (Ho), allele frequencies, expected heterozygosity (He) examined fallow deer samples, number of alleles, number of heterozygotes and locations (n = sample size): Vértes (V), Pilis (P), Isaszeg (I), total sample size (Σ)

Lokusz	Allélszám (db)				Ho			
	V (n = 3)	P (n = 13)	I (n = 11)	Σ (n = 27)	V (n = 3)	P (n = 13)	I (n = 11)	Σ (n = 27)
C229	1	1	2	2	0	0	0,27	0,25
T156	1	1	2	2	0	0	0,27	0,11
OheF	2	3	2	3	0,33	0,15	0,18	0,19
OheQ	1	2	1	3	0	0,15	0	0,07
Lokusz	Allélgyakoriság				He			
	V (n = 3)	P (n = 13)	I (n = 11)	Σ (n = 27)	V (n = 3)	P (n = 13)	I (n = 11)	Σ (n = 27)
C229	$C_1 = 1,00$	$C_1 = 1,00$	$C_1 = 0,85$ $C_2 = 0,15$	$C_1 = 0,87$ $C_2 = 0,13$	0	0	0,25	0,23
T156	$T_1 = 1,00$	$T_1 = 1,00$	$T_1 = 0,86$ $T_2 = 0,14$	$T_1 = 0,94$ $T_2 = 0,06$	0	0	0,25	0,11
OheF	$F_1 = 0,83$ $F_3 = 0,17$	$F_1 = 0,92$ $F_2 = 0,04$ $F_3 = 0,04$	$F_1 = 0,91$ $F_3 = 0,09$	$F_1 = 0,91$ $F_2 = 0,02$ $F_3 = 0,07$	0,33	0,15	0,17	0,17
OheQ	$Q_1 = 1,00$	$Q_1 = 0,92$ $Q_2 = 0,08$	$Q_1 = 1,00$	$Q_1 = 0,96$ $Q_2 = 0,04$	0	0,15	0	0,07

MEGVITATÁS

Vizsgálataink során összesen hat marker esett ki a 31 vizsgált tetramer mikroszatellitából, a PCR-termék hiánya, melléktermék-képződés és a kevésbé megfelelő duplikum elhagyása miatt. A duplikumok közüli választásnál az egyik legfontosabb szempont a keletkező termék hosszúsága volt. Ha a két primerpár közel ugyanolyan minőségű és mennyiségű terméket eredményezett, akkor mindig a rövidebb terméket eredményező primerpárt választottuk. Ennek egyik oka, hogy a külső, környezeti hatásoknak kitett helyszíneken elkövetett igazságügyi esetekben leggyakrabban csak erősen károsodott DNS áll rendelkezésre, amelyből a rövidebb DNS-szakaszok nagyobb valószínűséggel mutathatók ki. A másik előnye a rövid ampliconoknak a preferenciális amplifikálódás jelenségéhez köthető, amikor a multiplex PCR-reakció során a kisebb méretű markerek nagyobb arányban termelődnek a hosszabbakhoz képest, így a hosszabb markerek kieshetnek [53].

A multiplex fejlesztés során azt tapasztalattuk, hogy a költségek csökkentése érdekében kiválasztott „farkazásos” fluoreszcens jelölési technika megnehezítette a multiplexek összeállítását. Ugyanis, mikor a fluoreszcens jelet hordozó univerzális primert is hozzáadtuk a reakciókhoz, a primerpárok addigi működési optimuma enyhén megváltozott. Így az addig azonos PCR-beállításon működő markerek eltérő körülmények között tudtak csak működni, az eredetileg publikált multiplexek összetételét tehát meg kellett változtatnunk. Az eddig leközölt kutatások még nem számoltak be hasonló tapasztalatokról a „farkazásos” jelölési technika alkalmazásakor, mindössze primerdimerizáció problémája merült fel [54].

Törekedtek a rövidebb terméket adó primerpárok kiválasztására

Az eredmények a vizsgált egyedek kismértékű genetikai diverzitását mutatja

A kutatás további fázisában a felmerült probléma miatt a hagyományos (forward primerhez kapcsolt) fluoreszcens jelölést tervezzük alkalmazni.

A kapilláris-elektroforézis során vizsgált 25 markerből 21 monomorf (1 allélos) és négy polimorf mikroszatellita-markert mutattunk ki. Ez kismértékű genetikai diverzitásra utalhat a vizsgált dámszarvas-populációkon belül, hiszen nagy volt a monomorf markerek száma, ill. a polimorf markerek is csak két, ill. három alléllal rendelkeznek. Összehasonlításként más hazai agancsos fajjal, mind a tíz DeerPlex mikroszatellita a vizsgált gímszarvasállományon (összesen $n = 303$) polimorfnak bizonyult, a legkevesebb kimutatott allélszám hét volt (C229), míg a leginkább polimorf marker 27 alléllal rendelkezett (T156) [55]. Ugyanakkor az is előfordulhat, hogy a vizsgált, eredetileg más fajra kifejlesztett mikroszatelliták a dámszarvasban nem jó markerek. Ez azt jelenti, hogy nem mikroszatellitaként viselkednek ebben a fajban, így az egyébként diverz populációkat is monomorfnak mutatják. Ennek oka többféle lehet, pl. felhalmozódó pontmutációk megszüntethetik az ismétlődést tartalmazó tandem régiót. A megfigyelt csekély polimorfizmus és a monomorf allélok nagy számának oka tehát még nem tisztázott, így messze-menő következtetéseket nem lehet levonni a magyarországi állomány genetikai változatosságára vonatkozóan. A kutatásban használt kis mintaelemszám ($n = 27$) és a kevés mintavételi hely (3) is nehezíti ennek megállapítását.

Fontos azonban megjegyezni, hogy korábbi kutatások világszerte kimutatták a dámszarvasok csökkent genetikai diverzitását többféle genetikai markert alkalmazva. Ezt a pleisztocén korabeli kihalásnak (palacknyakhatás) és az azt követő antropogén beavatkozásoknak tulajdonítják (genetikai sodródás, alapító hatás és beltenyészettség) [41]. Így előfordulhat, hogy a magyar dámvadpopuláció esetében is érvényesültek az említett hatások, és emiatt ténylegesen csekély genetikai diverzitású az állomány (erre utalhatnak a kis heterozigócia-értékek is).

Hasonlóan kicsi genetikai varianciát mutattak ki más vadon élő állatfajoknál is, pl. a lápi szarvas (*Blastocerus dichotomus*) esetében. Többféle genetikai markert megvizsgáltak ennél a fajnál is (proteineket [56], mitokondriális DNS-t [57] és dimer mikroszatellitákat [58]), és valamennyi esetben a dámszarvashoz hasonlóan kismértékű polimorfizmust találtak. Ezt ennél a fajnál elsősorban a beltenyészettség és a szaporodási rendszer eredményezhette [56].

Összességében a dámoknál eddig kimutatott kismértékű polimorfizmus az egyedi szintű azonosítást nem teszi lehetővé a vizsgált 25 markerből álló készlettel. A kiszámított PI-érték (0,035) alapján 100 egyedből 3,5 egyednél ugyanazt a genotípust mutatná ki, ami nem elégséges a megbízható azonosításhoz. Ezen markerek tesztelése tehát a markerkészlet fejlesztés első lépése volt, a kutatás jelenleg is zajlik, hogy törvényszéki ügyekben használható és egyedi szintű azonosításra alkalmas markerkészletet kapjunk. A jövőbeli terveink ennek elérésére további rokonfajokra fejlesztett tetramer mikroszatelliták tesztelése, ill. több dámszarvas-szövetmintát szeretnénk gyűjteni az ország különböző, eddig nem vizsgált régióiból, hogy növeljük a mintaelemszámot.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatási folyamatok finanszírozása az Állatorvostudományi Egyetem Doktori Iskolájának és a Normatív Kutatásfinanszírozási Bizottság (NKB) pályázatának támogatásával valósul meg. Köszönjük DR. ZENKE PETRÁNAK a kutatás során nyújtott szakmai útmutatását és mindazoknak a vadászoknak a segítségét, akik a dámvad minták biztosításával lehetővé tették vizsgálatainkat.

A dámoknál eddig kimutatott kismértékű polimorfizmus az egyedi szintű azonosítást nem teszi lehetővé a vizsgált markerekkel

IRODALOM

1. Elek B (2019) The criminalization of poaching in Hungary. Zbornik radova Pravnog fakulteta, Novi Sad 53:639–648 <https://doi.org/10.5937/zrpfns53-20330>
2. Pádár Zs, Kovács G, Nogel M, Czebe A, Zenke P, Kozma Zs (2019) Genetika és bűnüldözés – Az igazságügyi célú DNS-vizsgálatok első negyedszázada Magyarországon. I. Belügyi Szemle 67:7–34 <https://doi.org/10.38146/BSZ.2019.12.1>
3. Pádár Zs, Kovács G, Nogel M, Czebe A, Zenke P, Kozma Zs (2020) Genetika és bűnüldözés – Az igazságügyi célú DNS-vizsgálatok első negyedszázada Magyarországon II. Belügyi Szemle 68:9–32 <https://doi.org/10.38146/BSZ.2020.1.1>
4. Zenke P, Egyed B, Pádár Zs, Kovács G (2015) Increasing relevance of non-human genetics in Hungarian forensic practice. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5:e250–e252 <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.100>
5. Zenke P, Egyed B, Pádár Zs (2017) A vadászható fajok védelme: az orrvadászat bizonyíthatósága az igazságügyi genetika segítségével: Eseti alkalmazások. Magy Állatorvosok Lapja 139:631–639 <http://hdl.handle.net/10832/2754>
6. Pádár Zs, Nogel M, Kovács G, Gárdonyi G, Zenke P (2022) A vadvilági bűnözés sajátos kriminalisztikai kihívásai Magyarországon. Belügyi Szemle 70:1727–1748 <https://doi.org/10.38146/BSZ.2022.9.1>
7. Pádár Zs, Kovács G, Nogel M, Poór SV, Zenke P (2022) The catalyst-like role of forensic genetics in the developmental process of Hungarian wildlife forensics. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 8:263–264 <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2022.10.056>
8. Ferreras P, Aldama JJ, Beltrán JF, Delibes M (1992) Rates and causes of mortality in a fragmented population of Iberian lynx *Felis pardina* Temminck, 1824. Biological Conservation 61:197–202 [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91116-A](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91116-A)
9. Wilson-Wilde L (2010) Wildlife crime: a global problem. Forensic Sci Med Pathol 6:221–222 <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9167-8>
10. Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Rojas M, Hernández PE, García T, Martín R (2007) Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. Meat Sci 76:234–240 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.11.004>
11. Brodmann PD, Nicholas G, Schaltenbrand P, Ilg EC (2001) Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. Eur Food Res Technol 212:491–496 <https://doi.org/10.1007/s002170000284>
12. Gyurcsó A, Kasza Gy, Ózsvári L (2022) A vadhús közfogyasztásának története és élelmiszerláncbiztonsági előírásai Magyarországon. Hung Vet J 144:623–639 <https://doi.org/10.56385>
13. Gilson A, Syvanen M, Levine K, Banks J (1998) Deer gender determination by polymerase chain reaction: Validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. California Fish and Game 84:159–169 ISSN/ISBN: 0008-1078
14. Zenke P, Zorkóczy KO, Lehotzky P, Ózsvári L, Pádár Zs (2022) Molecular Sexing and Species Detection of Antlered European Hunting Game for Forensic Purposes. Animals 12:246 <https://doi.org/10.3390/ani12030246>
15. Dajana D, Uroš G, Nesic K, Davitkov D, Vucicevic M, Nesic V, Stanimirovic Z (2017) Improved DNA-Based Identification of *Cervidae* Species in Forensic Investigations. Acta Veterinaria 67:449–458 <https://doi.org/10.1515/acve-2017-0037>
16. Kim M-J, Lee Y-M, Suh S-M, Kim H-Y (2020) Species Identification of Red Deer (*Cervus elaphus*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), and Water Deer (*Hydropotes inermis*) Using Capillary Electrophoresis-Based Multiplex PCR. Foods 9:982 <https://doi.org/10.3390/foods9080982>
17. Wu H, Wan Q-H, Fang S-G, Zhang S-Y (2005) Application of mitochondrial DNA sequence analysis in the forensic identification of Chinese sika deer subspecies. Forensic Science International 148:101–105 <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.072>
18. Jones KC, Levine KF, Banks JD (2000) DNA-based genetic markers in black-tailed and mule deer for forensic applications. California Fish and Game 86:115–126
19. Szabolcsi Z, Egyed B, Zenke P, Pádár Z, Borsy A, Steger V, Pásztor E, Csányi S, Buzas Z, Orosz L (2014) Constructing STR multiplexes for individual identification of Hungarian red deer. J Forensic Sci 59:1090–1099 <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12403>
20. Morf NV, Kopps AM, Nater A, Lendvay B, Vasiljevic N, Webster LMI, Fautley RG, Ogden R, Kratzer A (2021) STRoe deer: A validated forensic STR profiling system for the European roe deer (*Capreolus capreolus*). Forensic Science International: Animals and Environments 1:100023 <https://doi.org/10.1016/j.fisiae.2021.100023>
21. Jones K, Levine K, Banks J (2002) Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). Molecular Ecology Notes 2:425–427 <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00264.x>
22. Sim Z, Monderman L, Hildebrand D, Packer T, Jobin RM (2021) Development and implementation of a STR based forensic typing system for moose (*Alces alces*). Forensic Science International: Genetics 53:102536 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102536>
23. Singh A, Gaur A, Shailaja K, Satyare Bala B, Singh L (2004) A novel microsatellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India. Forensic Sci Int 141:143–147 <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.01.015>
24. Lorenzini R, Fanelli R, Tancredi F, Siclari A, Garofalo L (2020) Matching STR and SNP genotyping to discriminate between wild boar, domestic pigs and their recent hybrids for forensic purposes. Sci Rep 10:3188 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59644-6>
25. Meredith E, Adkins J, Rodzen J (2019) UrsaPlex: An STR multiplex for forensic identification of North American black bear (*Ursus americanus*). Forensic Science International: Genetics 44:102161 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102161>
26. Meredith EP, Rodzen JA, Levine KF, Banks JD (2005) Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. Conserv Genet 6:151–153 <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7735-8>
27. Zenke P, Egyed B, Zöldág L, Pádár Zs (2011) Population genetic study in Hungarian canine populations using forensically informative STR loci. Forensic Science International: Genetics 5:e31–e36 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.03.013>
28. Pádár Zs, Egyed B, Kontadakis K, Zöldág L, Fekete S (2001) Resolution of parentage in dogs by examination of microsatellites after death of putative sire: Case report. Acta Veterinaria Hungarica 49:269–273 <https://doi.org/10.1556/004.49.2001.3.2>
29. Zenke P, Pádár Zs, Zöldág L (2006) Molekuláris genetika és kutyatenyésztés: Molecular genetics and dog breeding. Magy Állatorvosok Lapja 128:544–550
30. Zenke P, Maróti-Agóts Á, Pádár Zs, Gáspárdy A, Komlósi I, Zöldág L (2007) Adatok a kutyaaállományok beltenyésztettségének értékeléséhez: Molecular genetic data to evaluate inbreeding in dog populations. Magy Állatorvosok Lapja 129:484–489

31. Mihalik B, Frank K, Astuti KP, Szemethy D, Szendrei L, Szemethy L, Kusza Sz, Stéger V (2020) Population Genetic Structure of the Wild Boar (*Sus scrofa*) in the Carpathian Basin. *Genes* 11:1194 <https://doi.org/10.3390/genes11101194>
32. Tóth B, Khosravi R, Ashrafzadeh MR, Bagi Z, Fehér M, Bársóny P, Kovács G, Kusza S (2020) Genetic Diversity and Structure of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) in the Centre of Carpathian Basin: Implications for Conservation. *Genes* 11:1268 <https://doi.org/10.3390/genes11111268>
33. Loukovits D, Szabó M, Chatziplis D, Monori I, Kusza Sz (2022) Genetic diversity and substructuring of the Hungarian merino sheep breed using microsatellite markers. *Animal Biotechnology* 0:1–9 <https://doi.org/10.1080/10495398.2022.2042307>
34. Zenke P, Egyed B, Kovács G, Pádár Zs (2019) Implementation of genetic based individualization of White stork (*Ciconia ciconia*) in forensic casework. *Forensic Science International: Genetics* 40:e245–e247 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.02.001>
35. Szabolcsi Z, Egyed B, Zenke P, Borsy A, Pádár Z, Zöldág L, Buzás Z, Raskó I, Orosz L (2008) Genetic identification of red deer using autosomal STR markers. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1:623–624 <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2007.10.003>
36. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453–2465 <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x>
37. Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, Smith FP (1998) A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 92:75–88 [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00010-3)
38. Zianni M, Tessanne K, Merighi M, Laguna R, Tabita FR (2006) Identification of the DNA Bases of a DNase I Footprint by the Use of Dye Primer Sequencing on an Automated Capillary DNA Analysis Instrument. *J Biomol Tech* 17:103–113 PMID: PMC2291779
39. Blacket M, Robin C, Good R, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular ecology resources* 12:456–463 <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x>
40. Chapman N, CHAPMAN D (2008) The distribution of fallow deer: A worldwide review. *Mammal Review* 10:61–138 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1980.tb00234.x>
41. Baker K, Gray H, Ramovs V, Mertzaniou D, Akin Pekşen Ç, Bilgin C, Sykes N, Hoelzel R (2017) Strong population structure in a species manipulated by humans since the Neolithic: the European fallow deer (*Dama dama dama*). *Heredity* 119:16–26 <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.11>
42. Pitarch JL, Raksa HC, Arnal MC, Revilla M, Martínez D, Fernández de Luco D, Badiola JJ, Goldmann W, Acín C (2018) Low sequence diversity of the prion protein gene (PRNP) in wild deer and goat species from Spain. *Vet Res* 49:33 <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0528-8>
43. Hartl GB, Schlegel A, Slowak M (1986) Genetic variability in fallow deer, *Dama dama* L. *Anim Genet* 17:335–341 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1986.tb00726.x>
44. Randi E, Apollonio M (1988) Low biochemical variability in European fallow deer (*Dama dama* L.): natural bottlenecks and the effects of domestication. *Heredity* 61:405–410 <https://doi.org/10.1038/hdy.1988.131>
45. Webley LS, Zenger KR, Hall GP, Cooper DW (2007) Genetic structure of introduced European fallow deer (*Dama dama dama*) in Tasmania, Australia. *Eur J Wildl Res* 53:40–46 <https://doi.org/10.1007/s10344-006-0069-8>
46. Pemberton JM, Smith RH (1985) Lack of biochemical polymorphism in British fallow deer. *Heredity* 55:199–207 <https://doi.org/10.1038/hdy.1985.92>
47. Yannouli E, Trantalidou K (1998) The Fallow deer (*Dama dama* L. 1758) in Greece. Archaeological Presence and Representation, 1999. In: N. Benecke (eds) *The Holocene history of the European Vertebrate Fauna: Modern Aspects of Research*. Verlag Marie Leidorf GmbH, Berlin, pp 247–263
48. Say L, Naulty F, Hayden TJ (2003) Genetic and behavioural estimates of reproductive skew in male fallow deer. *Mol Ecol* 12:2793–2800 <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01945.x>
49. Kusza S, Ashrafzadeh M, Tóth B, Jávora A (2018) Maternal genetic variation in the northeastern Hungarian fallow deer (*Dama dama*) population. *Mammalian Biology* 93:21–28 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.08.005>
50. Faragó S (eds) (2006) *Magyar Vadász Enciklopédia*. Totem Kiadó, Magyarország, pp 232–233
51. Roche Applied Science (2006) *GS Guide to Amplicon Sequencing*. Roche Diagnostics. GmbHUSM00022.B - December 2006
52. Peakall R, Smouse P (2012) GenAEx Tutorial 4: Advanced Frequency-Based Analysis. In: GenAEx. <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAEx/Tutorials.html> Accessed 7 Nov 2022
53. Chung DT, Drábek J, Opel KL, Butler JM, McCord BR (2004) A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR Miniplex primer sets. *J Forensic Sci* 49:733–740 PMID: 15317187
54. Luttman AM, Komine M, Thaiwong T, Carpenter T, Ewart SL, Kiupel M, Langohr IM, Venta PJ (2022) Development of a 17-Plex of Penta- and Tetra-Nucleotide Microsatellites for DNA Profiling and Paternity Testing in Horses. *Front Vet Sci* 9:861623 <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.861623>
55. Frank K, Szepesi K, Bleier N, Sugár L, Kusza S, Barta E, Horn P, Orosz L, Stéger V (2022) Genetic traces of dispersal and admixture in red deer (*Cervus elaphus*) populations from the Carpathian Basin. *Eur J Wildl Res* 68:55 <https://doi.org/10.1007/s10344-022-01602-w>
56. de Oliveira EJF, Garcia JE, Contel EPB, Duarte JMB (2005) Genetic Structure of *Blastocerus dichotomus* Populations in the Paraná River Basin (Brazil) Based on Protein Variability. *Biochem Genet* 43:211–222 <https://doi.org/10.1007/s10528-005-5212-9>
57. Márquez A, Maldonado JE, González S, Beccaceci MD, Garcia JE, Duarte JMB (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conserv Genet* 7:563–575 <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9067-8>
58. Oliveira EJF, Garcia JE, Duarte JMB, Contel EPB (2008) Development and characterization of microsatellite loci in the marsh deer (*Blastocerus dichotomus Cervidae*). *Conserv Genet* 10:1505 <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9769-9>

Közlésre ér.: 2022. dec. 21.