

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
ÁLLATTENYÉSZTÉSI, TAKARMÁNYOZÁSTANI ÉS LABORÁLLAT-TUDOMÁNYI
TANSZÉK

**A magyarországi agancsos vadfajok igazságügyi célú DNS alapú
ivarmeghatározása**

szakdolgozat

Készítette: Bartal Balázs

Témavezető: Dr. Zenke Petra
tudományos főmunkatárs

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	- 3 -
1 Bevezetés, Irodalmi áttekintés	- 4 -
1.1 A magyarországi agancsos vadfajok és vadászatuk	- 4 -
1.2 Igazságügyi állatgenetika	- 6 -
1.3 A szarvas- és őzfélék genetikai ivarmeghatározása.....	- 7 -
1.4 Esettanulmány	- 10 -
2 Célkitűzések	- 11 -
3 Anyag és módszer	- 12 -
3.1 Mintagyűjtés.....	- 12 -
3.2 Minta feldolgozás, DNS preparálás	- 13 -
3.3 Gélelektroforézis.....	- 14 -
3.4 Primer tervezés.....	- 15 -
3.5 Primerek tesztelése, monoplex PCR	- 17 -
3.6 PCR termékek ellenőrzése agaróz gélen	- 18 -
3.7 PCR termékek szekvenálása	- 19 -
3.8 Duplex PCR optimalizálása	- 19 -
3.9 Kapilláris elektroforézis.....	- 20 -
3.10 Esettanulmány	- 20 -
4 Eredmények.....	- 21 -
4.1 DNS kinyerése	- 21 -
4.2 Monoplex PCR.....	- 21 -
4.3 Szekvencia analízis.....	- 22 -
4.4 Duplex PCR optimalizálása	- 23 -
4.5 Kapilláris elektroforézis.....	- 24 -
4.6 Esettanulmány.....	- 25 -
5 Következtetések.....	- 26 -
6 Összefoglalás	- 29 -
7 Summary.....	- 30 -
Irodalomjegyzék	- 31 -
Köszönetnyilvánítás	- 34 -

Rövidítések jegyzéke

μl - Mikroliter

BFK - brómfenolkék

bp - Bázispár

BSA - Bovine serum albumin (Szarvasmarha szérum albumin)

CITES - Convention on International Trade in Endangered Species Fauna and Flora
(Egyezmény a veszélyeztetett vadon élő állat- és növényfajok nemzetközi kereskedelméről)

DNS - Dezoxiribonukleinsav

dNTP - Dezoxi-ribonukleotid-trifoszfát

MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis

mg - Milligramm

mp - Másodperc

-OH - Hidroxil csoport

OVA - Országos Vadgazdálkodási Adattár

PCR - Polymerase chain reaction (Polimeráz-lánreakció)

Rk – Reagens kontroll

RNS – Ribonukleinsav

SRY - Sex-determining Region Y (Ivart meghatározó régió Y)

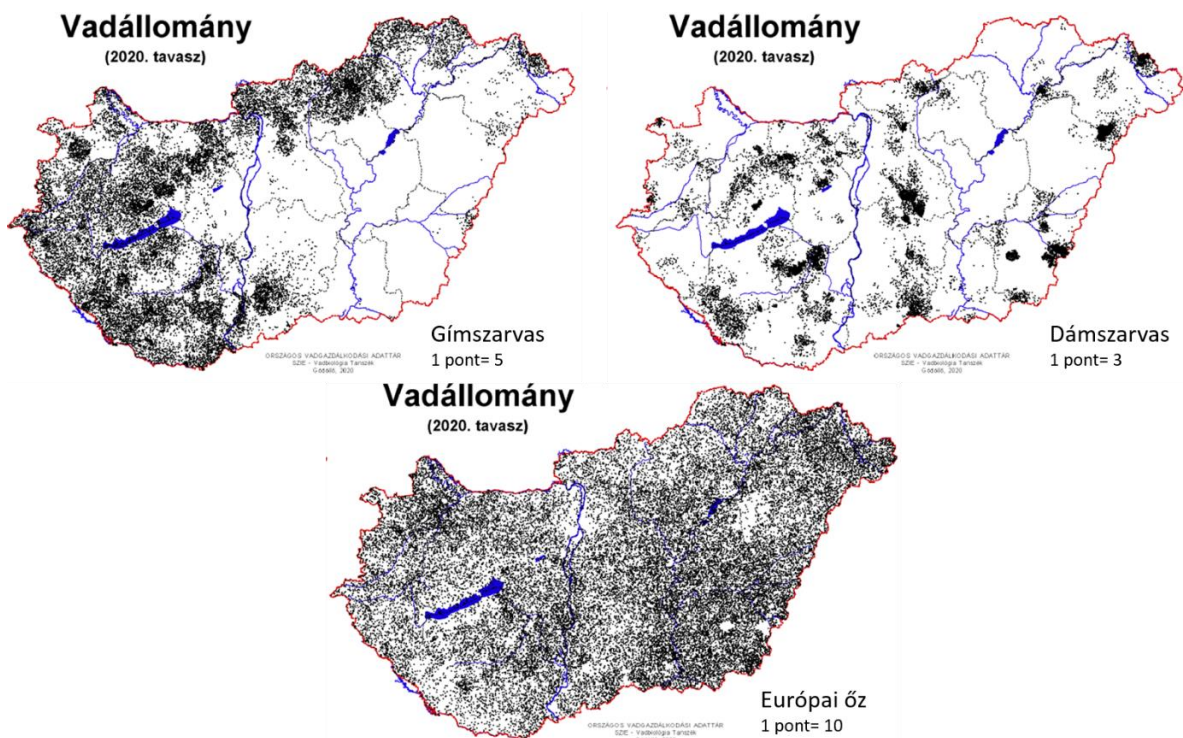
1 Bevezetés, Irodalmi áttekintés

Az agancsral rendelkező trófeás hazai vadfajok (gím- és dámszarvas, őz) vadászata során előfordulnak olyan visszaélések, amikor a leadott, zsigerelt, morfológiailag már nem azonosítható tetem ivara nem egyezik meg az adott időszakban legálisan vadászható ivarral. Ezekben az esetekben segíthetnek a genetikai vizsgálatok. Egy egyszerű és a fent felsorolt mindhárom fajban egységesen alkalmazható ivarhatározási módszer gyorsan kiszűrheti az ilyen jellegű visszaéléseket az egyedi azonosítás szüksége nélkül.

A konzervációbiológia már régóta használ genetikai markereket különböző állatfajoknál, köztük trófeás vadfajoknál is az ivar meghatározására (Aasen és Medrano, 1990; Takahashi és mtsai, 1998; Huber és mtsai, 2002). Ezek a módszerek, bár jó alapot nyújtanak, nem alkalmazhatók univerzálisan a Magyarországon előforduló trófeás kérődzők esetében. A DNS alapú ivarmeghatározás segíthet a felmerülő jogviták, nézeteltérések eldöntésében, ezzel szűrve a vadásztársadalom azon részét, akik tisztességtelen módon vadásznak.

1.1 A magyarországi agancsos vadfajok és vadászataik

Hazánkban három agancsral rendelkező jelentőségteljes vadfaj él, a gímszarvas (*Cervus elaphus*), mely Észak- és Közép-Magyarországon, Dunántúlon és a Dél-Alföldön terjedt el, ezen belül is a legtöbb példány Somogy, Baranya, Zala, Veszprém és Borsod- Abaúj- Zemplén megyében fordul elő (1. kép). Nagy számban van jelen hazánkban az európai őz (*Capreolus capreolus*) szinte mindenhol, különösképp az Alföldön és a Kisalföldön nagy az állománysűrűség (1. kép). Az európai dámszarvas (*Dama dama*) a fent említett kettő fajhoz viszonyítva kisebb számban van jelen Magyarországon, Somogy, Bács- Kiskun, Tolna, Pest, Hajdú- Bihar és Békés megye egyes erdeiben fordul elő főként (1. kép). Az Országos Vadgazdálkodási Adattár (OVA) éves jelentése szerint a trófeás kérődző fajokból a 2019/20-as évben történt kilövések száma összesen meghaladja a 200 ezret: 115 450 őz, 66 486 gímszarvas, 16 602 dámszarvas és 4 102 muflon (Csányi és mtsai, 2020).



1. kép: A magyarországi agancsos vadfajok területi megoszlása (Csányi és mtsai, 2020)

Magyarországon a vadászatnak nagy kultúrája és tiszteletteljes hagyománya van a vad irányába, így maga a vadászat menete, az elejtés módja és ideje, illetve a vadászati idények megtervezése mind a vad éves életciklusán alapszik, hogy a vadat a lehető legkevésbé terhelje és ne zavarja természetes életmódjában (Heltay, 1997). Fontos, hogy ne nyúljon bele úgy a természet rendjébe, hogy azzal populáció szintű problémákat okozzon. A vad elejtése a lehető legkevésbé kártékony időszakban kell történjen, mely lehetőség szerint kis mértékben van kihatással fajtársai életére. Példának okáért nem lehet elejteni vemhes, vagy gidát nevelő őz sutát, mert ezzel megpecsételődik a gida sorsa is, illetve ugyanígy kímélendő egy vezér tehén (gím-, dámszarvas), mert a rudli (szarvas csapat) minden tagja rá támaszkodik, az ő tapasztalatai és rátermettsége segíti az életben maradásukat (Heltay, 1997).

Sajnos a tisztességtelen vadászok és az orvvadászok ezzel nem törődve, tetszés szerint ejtik el az állatokat akkor és olyan módszerekkel, amikor és ahogy kedvük tartja. Sokszor olyan illegális eszközöket és módszereket alkalmaznak (ld. 1996. évi LV. törvény 37/A. §, 37/B. §), melyek az állatnak vagy szenvedést okoznak (hurkoló-, lábfogó csapdák, mérgek), vagy pedig a bioritmusának azon szakaszát használják ki, amikor nem éber, nem számít „támadásra” (éjjel látó-, hőkamerás távcső) (Heltay, 1997). Az ilyen típusú elejtések hatalmas károkat okoznak populációs szinten, vagyoni- (akár milliárdos - vadhús, trófea) és eszmei értékek terén, ételbiztonsági szempontból (orvvadász nem vizsgálhatja be a vadhúst, amit el fog adni), a szakszerű vadgazdálkodást pedig akadályozza vagy ellehetetleníti (Makai, 2019).

1.2 Igazságügyi állatgenetika

Noha a kriminalisztikai genetika hagyományosan arra irányult, hogy az emberi DNS használatával bűnügyi nyomozások és polgári peres ügyek megoldását segítse, ez jelenleg már sokkal szélesebb alkalmazási kört jelent. Néhány nehézség ellenére a jelenlegi forenzikus genetika fokozatosan és egyre nagyobb mértékben építi be a nem humán genetikai anyag elemzését, így a különböző állati eredetű mintákét is (Zenke és mtsai, 2015). Ezek analízisét ma gyakran alkalmazzák, mintegy kiegészítő bizonyítékokat szolgáltatva a bíróság számára. Egyes esetekben, mint például az állatkínzás (pl. kilőtt fehér gólyák – Zenke és mtsai, 2019; felgyújtott sündisznók), állat támadások (elvadult kóbor kutyák, urbanizálódott vaddisznók), orrvadászat (Zenke és mtsai, 2017), (vad-)állatok által okozott közlekedési balesetek, állatviadatok (Pádár és mtsai, 2001) és a tárgyi bizonyítékon maradt állati szövetminták döntő erejük lehetnek az ítélet meghozatalában (pl. a gyanúsított összekapcsolása a helyszínnel macskaszőr alapján; Menotti-Raymond és mtsai, 1997).

Nagy szerepet játszanak az állati DNS vizsgálatok az illegális kereskedelemben is, ahol a feketepiacon állati maradványokat, testrészeket árulnak illegálisan (elefántcsont tárgyak, medve epe, tigris testrészek, szarvas- és őzfélék nemiszerve stb.). Ezzel hatalmas károkat okoznak a természetben és legtöbb esetben szenvedést hoznak az állatokra. A vadvilág megőrzése szempontjából hasznos kriminalisztikai eszköz az állati DNS elemzés például a trófeás vadfajok esetében történt visszaélések mérséklése, gátlása céljából (pl. morfológiailag nem azonosítható ivarú gímszarvas bika beszolgáltatása a vadfeldolgozó üzem számára, a trófea ellopása és illegális eladása céljából).

Fontossága miatt az igazságügyi állatgenetika éppen ezért majdnem olyan messzire visszanyúló múlttal rendelkezik, mint a humán igazságügyi genetika, alkalmazhatóságát pedig alátámasztja a genetikai markerek fajonként egyre növekvő száma. Az egyik első és jelentős lépés a vadvilág védelmének érdekében a Washingtoni Egyezmény (CITES) volt, mely szabályozza az állatokkal és azok testrészeivel való nemzetközi kereskedelmet, visszaszorítva ezzel az orrvadászatot és az állatok illegális adásvételét. Az állatok védelmének fejlődésével szükségessé vált, hogy a technológia is fejlődjön, így létrejött az első vadvilági és halászati eseteket feldolgozó forenzikus laboratórium az Egyesült Államokban (U.S. Fish and Wildlife Service), majd a The Society for Wildlife Forensic Science nemzetközi szervezet, amely a vadvilág védelme érdekében alkalmazott igazságügyi tudományokkal foglalkozik (Goddard, 2005). Az igazságügyi genetikai módszereknek az állatvilágot érintő bűnesetekben való felhasználása már több esetben segített bűnesetek felderítésében és a megalapozottabb

ítélethozásban több hazai esetben is (Pádár és mtsai, 2001; Szabolcsi és mtsai, 2014; Zenke és mtsai, 2015; 2017).

1.3 A szarvas- és őzfélék genetikai ivarmeghatározása

Az agancsral rendelkező vadfajok DNS alapú ivarmeghatározásának kutatása már az 1990-es évek végén megkezdődött, ami lehetőséget nyújtott az egzakt azonosításra akkor is, ha maga az állat nem, csupán szőr-, bélsár- vagy vérminta állt rendelkezésre az azonosításhoz (Takahashi és mtsai, 1998; Huber és mtsai, 2002; Pfeiffer és Brenig, 2005).

A szarvas- és őzféléknél többször is előfordult már, hogy a nem megfelelően kezelt, túlszaporodott populációk már gondot jelentettek az emberek mindennapi életére nézve (Yamauchi és mtsai, 2000; Han és mtsai, 2007; Yamazaki és mtsai, 2011). Komoly mezőgazdasági terméskárokat okoztak a túlszaporodás és az ennek következtében kialakult táplálékhiány miatt, de nem elhanyagolható probléma a rengeteg közlekedési balesett sem, amit a megnövekedett területi igényük miatt kialakult emberi településekre való behatolásuk eredményezett. Azokon a területeken, ahol a tél zord és nem kímélte az állományt, nagy számban hullottak el egyedek a nagy havazás és a téli táplálékhiány miatt, azonban ez sem tudta megfelelően szabályozni az egyedszámot (Takahashi és mtsai, 1998). Ezért a populációs mechanizmusok alaposabb megismerését szolgáló módszereket kezdtek el kifejleszteni – melynek kulcsfontosságú szerepét játszották az állati mintákból történő ivarmeghatározásra alkalmas vizsgálatok –, hogy jobban átlássák ezen vadon élő állatok ivararányát, szaporodásuk mértékét és a túlszaporodásuk esetleges okát (Takahashi és mtsai, 1998; Yamauchi és mtsai, 2000; Han és mtsai, 2007; Qiao és mtsai, 2007; Yamazaki és mtsai, 2011). A hímek és nőstények megoszlása értékes adat a konzervációbiológia szempontjából, ugyanis ennek ismeretében könnyebben lehet befolyásolni ezen állatfajok egyedszámát, például az éves kilövésszám meghatározásával. Olyan esetekben is végeztek ivarmeghatározáson alapuló kutatásokat, ahol pont ellenkezőleg, az állatállomány vészes fogyatkozása miatt voltak ezek rendkívül fontos információk (Barbosa és mtsai, 2009; Shrutarshi és mtsai, 2018).

Sok esetben nem megállapítható az állat ivara a természetes közegében morfológiai jegyek alapján, mivel eltakarhatja az erre utaló jeleket a szőrzet, esetleg olyan periódusában vannak az éves biológia ciklusuknak, ahol a hímek nem viselnek agancsot vagy egyszerűen csak elfutnak és nincs elég idő arra, hogy ezeket felmérjük. Ennek kiküszöbölésére több olyan módszert dolgoztak is, ahol az ürüleből meg lehet határozni az állat ivarát (Huber és mtsai, 2002; Yamazaki és mtsai, 2011).

Előfordul, hogy születési rendellenesség (hermafroditizmus) miatt a fenotípus alapján nem lehetett meghatározni az állat nemét, ellenben a genetikai vizsgálatok megbízhatóan helyt állnak ilyen esetekben is (Pajares és mtsai, 2009; Kropatsch és mtsai, 2013). A hazai gyakorlatban a hatóságok és a vadászok napjainkban is sokszor szubjektív tényezők alapján ítélik meg az állat ivarát, mint például a testméret, az agancs megléte, illetve a nemiszerv milyensége. Utóbbi kettővel az a probléma, hogy a hermafroditizmus – bár kis valószínűséggel – megjelenhet ezen állatfajokban, így a helyes azonosításhoz a molekuláris genetikára van szükség.

A hazai vadállomány ivarmeghatározásának kevés kutatásban volt eddig forenzikus vonzata, de más nem hazai és hazai állatfajokban, mint például elefántokban, fehér gólyákban és egyéb vadon élő, veszélyeztetett vadállatok esetén már történt előrelépés ezzel kapcsolatban (Gupta és mtsai, 2006; Zenke és mtsai, 2019; Vincze és mtsai, 2019). Ez egy potenciálisan kiaknázatlan terület, amiben születtek már ugyan használható, de nem teljesen megbízható eredmények szarvas- és őzfélekkel kapcsolatban is (Pfeiffer és Brenig, 2005).

A hazai és nemzetközi irodalmak alapján az eddigi kutatások európai őzben, gím- és dámszarvasban csak egy Y-kromoszómás (hím specifikus) markert vizsgáltak (1. táblázat), megnövelve így a fals eredmények esélyét. Egyedül a mocsári szarvasnál alkalmaztak két Y-kromoszómához kapcsolódó gént (SRY és Amelogenin Y) együttesen. A pézsmaszarvas kivételével, ahol a ZFY génszakasz kimutatása alapján határozták meg a hím ivart, a többi agancsos faj esetében vagy az SRY, vagy az AmelogeninY markert használták ivar azonosításra, kiegészítve még egy autoszómás, vagy mitokondriális kontroll szakasszal (Huber és mtsai, 2002; Pfeiffer és Brenig, 2005; Barbosa és mtsai, 2009; Gulgur és mtsai, 2009).

Az ivarmeghatározási módszerek nagyrésze egy, az Y-kromoszómán lévő markergén kimutatására alapszik, esetleges X-kromoszómás vagy autoszómás kontrollt alkalmazva (1. táblázat). A két Y-markerre alapuló duplex ivarmeghatározás magasabb megbízhatóságot eredményez és az esetleges pl. allélkiesés miatt kialakuló fals eredmények lehetőségét is jelentősen lecsökkenti (Shrutarshi és mtsai, 2018). Fontos tulajdonsága az Amelogenin génnek, hogy nem csupán az Y-kromoszómán lévő markert lehet vizsgálni, hanem ugyanazon módszerrel az X-kromoszómás allél is detektálható vele (Amelogenin X), ezzel kimutatva a nőstény egyedeket és már magában is reakció kontrollként alkalmazható. Azonban előfordulhat, hogy egy mutáció a primer kötő régióban manifesztálódik és így az Amelogenin Y nem mutatható ki a hím egyedeknél (Shadrach és mtsai, 2004; Cadamuro és mtsai, 2014). Ezt hivatott kiküszöbölni egy másik Y-kromoszómás, pl. az SRY gén egyidejű vizsgálata, mely ettől függetlenül is kimutatható. Tehát amennyiben az állatnál fennáll egy pontmutáció az egyik marker primerkötő szekvenciájában (és így fals negatív eredménnyel szolgálna, azt mutatva,

hogy az egyed nőstény) egy másik Y markerre is vizsgálva a mintát látszani fog a vizsgált egyed valós ivara.

1.táblázat: A feldolgozott irodalomban szereplő módszerek, vizsgált markerek

Faj	Módszer	Y-marker Kontroll	Referencia
Gímszarvas (<i>Cervus elaphus</i>)	Multiplex PCR	SRY <i>BMC 1009</i> <i>mikroszatellita</i>	Huber, 2002
	Low stringency-PCR	AmelogeninY <i>AmelogeninX</i>	Pfeiffer, 2005
	Low stringency-PCR	SRY <i>DBY</i>	Barbosa, 2009
	Hagyományos PCR	AmelogeninY <i>AmelogeninX</i>	Gulgur, 2009
	Hagyományos PCR	AmelogeninY <i>AmelogeninX</i>	Pajares, 2007
Európai Őz (<i>Capreolus capreolus</i>)	Hagyományos PCR	AmelogeninY <i>AmelogeninX</i>	Pajares, 2007
	Hagyományos PCR	SRY	Pajares, 2009
Európai dámszarvas (<i>Dama dama</i>)	Hagyományos PCR	AmelogeninY <i>AmelogeninX</i>	Pajares, 2007
Szikaszarvas (<i>Cervus nippon</i>)	Multiplex PCR	SRY <i>CYTB</i>	Han, 2007
	Multiplex PCR	SRY <i>mikroszatellita</i>	Takahashi, 1998
	Hagyományos PCR	AmelogeninY <i>AmelogeninX</i>	Yamauchi, 2000
	Nested PCR	SRY <i>ZFX</i>	Yamazaki, 2011
Mocsári szarvas (<i>Rucervus duvaucelii</i>)	Multiplex PCR	SRY AmelogeninY <i>AmelogeninX</i>	Shrutarshi, 2018
Pézsmaszarvas (<i>Moschus moschiferus</i>)	Multiplex PCR	ZFY <i>ZFX</i>	Qiao, 2007
Szarvasmarha (<i>Bos primigenius</i>), juh (<i>Ovis aries aries</i>), kecske (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Hagyományos PCR	ZFY <i>ZFX</i>	Aasen, 1990
Főemlős fajok	Multiplex PCR	UTX/UTY, SRY	Cadamuro, 2014

1.4 Esettanulmány

A Zalavölgye Vadásztársaság területén 2019. augusztus 16-án hivatalosan, vadászatra jogosult személy kilövésével gímszarvast ejtett el. A fejét eltávolította és a kizsigerelt tetemet szarvastehén megnevezéssel adta le a hűtőházban (2. kép). A területen vadászó vadászok gyanúja alapján azonban indokoltá vált a tetem ivarának megállapítása, mivel ebben az időszakban a szarvasbikák kilövése tilos. A hűtőházban, az azonosító jellel (krotáliával) ellátott tetemből hatósági eljárás során, igazságügyi szakértő által szövetmintákat (izom, bordacsont) rögzítettek (7. kép), melyeket genetikai vizsgálatra küldtek be annak eldöntése céljából, hogy azok hím-, vagy nőivarú állattól származnak.



2. kép: Hűtőházba leadott szarvas tetem
(Hatósági állatorvos által készített felvétel a hűtőházban.)

2 Célkitűzések

A Magyarországon előforduló agancsos vadfajokban egységesen alkalmazható DNS alapú ivarmeghatározás kidolgozása, mely az igazságügyi felhasználás igényeinek megfelelően validált markerek fejlesztését és tesztelését foglalja magában.

A jelenleg is használatban lévő, ivarmeghatározásra alkalmas eljárások általában csak egy fajra vannak tervezve, illetve csak egy Y-kromoszómás markert vizsgálnak a kontroll marker mellett.

Kutatásunk célja egy olyan módszer fejlesztése, melynek két markeres (SRY, AmelogeninX/Y) rendszere már tartalmazza a kontrollt is (AmelogeninX), így azt nem kell külön hozzátenni.

További célunk, hogy a genetikai teszt egységesen alkalmazható legyen mindhárom Magyarországon élő agancsos vadfajra (őr, gím-, és dámszarvas) és kellően precíz a törvényszéki elvárásoknak megfelelően.

3 Anyag és módszer

3.1 Mintagyűjtés

Három trófeás kérődző faj (gím-, dámszarvas és őz) ismert ivarú, kilövésből származó tetemeiből gyűjtöttünk szőr, bőr, izomszövet és/vagy vérmintát (3. kép, 2. táblázat). Ezek Magyarország több vadászterületéről kerültek begyűjtésre, melyben segédkeztek a Pilisi Parkerdő, Telki, Nyugat- és Kelet-Zselic és a Fizkút vadásztársaság hivatásos vadászai.



3. kép: Vadászok által gyűjtött szőrös-bőr minták (Saját fénykép)

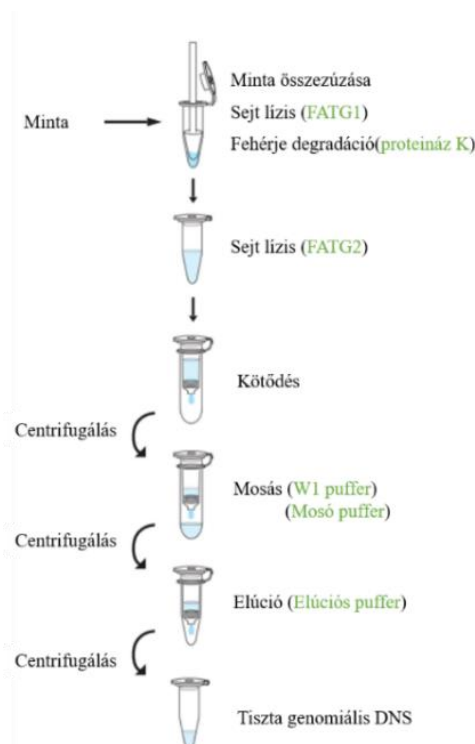
2.táblázat: A vizsgált kontrollminták számának faji- és ivari megoszlása.

Ivar	Gímszarvas	Őz	Dámszarvas
♀	2	3	3
♂	8	6	7

A mintákat fagyasztva (-80°C) tároltuk a további felhasználásig. A genetikai vizsgálatokat az Állatorvostudományi Egyetem Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi tanszékének DNS laboratóriumában végeztük.

3.2 Minta feldolgozás, DNS preparálás

A genetikai vizsgálatok első lépése, hogy ki kell nyerni az örökítőanyagot a sejtekből. Ehhez először a szövetet össze kell zúzni, homogenizálni, hogy a sejtek tartalma kiszabadulhasson (sejtfalak, membránok roncsolása). A szövetmintákat a FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit-tel (Favorgen) kezeltük, hogy a végén kinyerjük a tiszta DNS-t (4. kép). Először a mintákból megközelítőleg 25 mg tömegű szövetet metszettünk ki steril olló és csipesz segítségével, ügyelve rá, hogy az a minta közepéből származzon (ezzel is csökkentve a kontamináció esélyét, amit a vadász kése okozhatott). Ezután a szövetet a gyűjtő csőbe helyeztük és összezúztuk egy erre alkalmas pálcával, ráértünk 200 µl FATG1 puffert és 20 µl fehérjebontó proteináz K enzimet, majd 3 órán keresztül inkubáltuk 60°C-on míg a lízis végbe nem ment. Következő lépésként 200 µl FATG2 puffert adtunk hozzá, 10 percig 70°C-on inkubáltuk, ez követően 200 µl etanolt (96-100%) mértünk rá és vortexeltük. Az így kapott folyadékot átmértük a FATG Mini Column csőbe és azt egy gyűjtő csőbe állítva maximális fordulaton 1 percig centrifugáltuk. A Mini Column csövet egy új gyűjtő csőbe raktuk, ráértünk 400 µl W1 puffert és újabb 1 percig centrifugáltuk. Ezután mosó pufferből 750 µl-t pipettáztunk a Mini Columnra és 3 perc centrifugálás következett. A Mini Column csövet átraktuk egy elúciós csőbe és 100 µl elúciós puffert mértünk rá, majd 3 perc centrifugálás után megkaptuk a tiszta DNS-t, melyet további felhasználásig hűtőben 4°C-on tároltunk.



4. kép: DNS preparálás folyamata

http://www.favorgen.com/favorgen/serv_1/mem_t1/h_1/pdf/genomic/FATGK%20000%20001%20001-1%20001-2.pdf

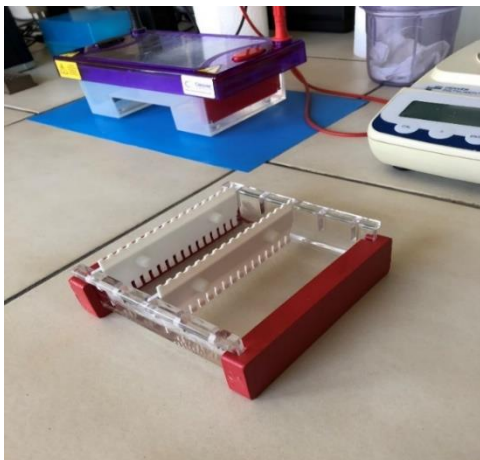
3.3 Gélelektroforézis

A gélelektroforézis során méret szerint elválaszthatók a különböző méretű DNS darabok. A töltéssel rendelkező molekulák a gélben az ellentétes töltésű elektróda felé vándorolnak (negatívtól a pozitív felé), míg a gél maga (agaróz, akrilamid vagy más polimer) molekulaszűrőként funkcionál. A nagyobb méretű molekulák lassabban haladnak az elektróda felé, míg a kisebbek gyorsabban, egységnyi idő alatt nagyobb utat megtéve. A gélben a folyamat végén megfelelő megvilágítással (pl. UV fényben) láthatóvá válnak az elkülönült fragmentek. A kinyert, tisztított DNS minőségét és megközelítőleges mennyiségét agaróz gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk meg. Ehhez az alábbi anyagokat használtuk:

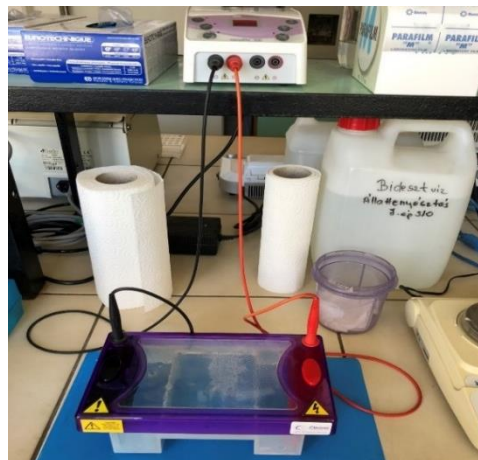
- 1,25 g agaróz (Serva)
- 50 ml 0,5xTris-borat puffer
- 4 μ l GR Safe (Biotium) interkaláló gélfesték
- 2 μ l brómfenolkékes (BFK) glicerines töltőpuffer
- 5 μ l tisztított DNS minta

Először az agarózt és a Tris-borat puffert összekevertük és felforraltuk az elegyet, hogy az agaróz megfelelően feloldódjon a pufferben. Miután vízsugár alatt megközelítőleg 60°C-ra hűtöttük az oldatot, belemértük a 4 μ l GR Safe gélfestéket mikropipettával, alaposan elkevertük és mielőtt megköthetett volna a gél, formába öntöttük (5. a. kép). A gél megkötése után kivettük a fésűket, amik a zsebeket hivatottak létrehozni a gélben és behelyeztük a tálcát a géllal együtt a gélelektroforézis gépbe, amit 0,5xTris-borat pufferrel töltöttünk fel (5. b. kép). Parafilmre 2 μ l BFK glicerines töltőpuffert és 5 μ l tisztított DNS mintát mikropipettával kimértünk, ezeket összekevertük, és ebből 5 μ l-t a zsebekbe belemértünk, majd elindítottuk a műszert.

5. a. kép: Agaróz gél formába öntés után



5. b. kép: Gélelektroforézis folyamat közben



(Saját fénykép)

3.4 Primer tervezés

Kutatásunk során két markerre terveztünk primerpárt a PrimerDesigner4 szoftverrel (<http://www.scied.com>): az SRY (Sex-determining Region Y) génre, ami csak az Y kromoszómán található meg, illetve az AmelogeninX/Y génre, mely megtalálható mind az X és az Y kromoszómán is. Az utóbbi markernél az ivari kromoszómás allélek között az a különbség, hogy az Y kromoszómán történt egy deléció, így ez az allél rövidebb. A primerek tervezésénél az egyik fő szempontunk az volt, hogy mind a három vizsgálni kívánt fajban működjenek, emellett fontos volt, hogy a PCR termék mérete ne haladja meg a 200 bázispárt lehetővé téve ezzel a degradált, kis mennyiségű minták sikeres vizsgálatát is.

3.táblázat: A vizsgált genetikai markerek méretei fajok szerint.

Marker	PCR termék mérete (bázispár)					
	Gímszarvas		Őz		Dámszarvas	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
SRY	-	113	-	113	-	113
AmelY	-	149	-	140	-	149
AmelX	194		194		194	

Rövid, 200 bázispár alatti primereket terveztünk az X- (Amelogenin X) és Y-kromoszómás markergének (SRY és Amelogenin Y) konzervált szakaszaira. Az *in silico* vizsgálatok alapján, amit MEGA X szoftverrel (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar és mtsai, 2018) végeztünk, mindhárom vizsgálni kívánt hazai agancsos fajban egyaránt jól működnek egyéb őz- és szarvasfajokkal egyetemben (6. kép).

The screenshot shows a multiple sequence alignment in the Mega program. The sequences are from various species, including Cervus elaphus, Capreolus capreolus, Dama dama, and others. The forward primer binding site, TCAGCAAGCAGCTGGGGTAT, is highlighted in yellow in all sequences.

6. kép: Forward primer kötődési helye (sárga színnel) agancsos fajok SRY génjének konzervatív szakszán (Mega program)

A tervezésnél figyelembe vettük a képződő PCR termék hossza mellett annak stabilitását (G/C arány), a primerek más DNS-szakasszal (*fals priming*), egymással (*primer dimer*) illetve önmagával (*hairpin*) való összetapadásának lehetőségét, A primer szekvenciájában az egymást követő azonos bázisok (3 vagy több) szintén megzavarhatják a primer pontos kötődését. A tervezés végén készítettünk egy jelentést (*PrimerPair Report*) a primer párijainkról, amin az összes előbb felsorolt adat megtalálható.

4. Táblázat: Tervezett univerzális primer készletek az SRY és GAPDH génre. A degenerált bázisok az IUPAC kódokkal jelölve (Y=C, T; S=C, G), és piros színnel kiemelve.

Primer készlet	Pozíció	Szekvencia 5'-3' irányban
SRY	Forvard	TCAGCAAGCAGCTGGGGTAT
	Reverz	ATAGCCCGGGTATTTGTCTC
Amelogenin X/Y	Forvard	GCTGCACCACCAAATCATTCCC
	Reverz	AGGTTTGGCTGGTGGTGGTGGG

3.5 Primerek tesztelése, monoplex PCR

A továbbiakban polimeráz-lánreakció (PCR) segítségével vizsgáltuk a kinyert DNS-t. Az eljárás igényel DNS mintát, primereket – rövid, 18-25 bázispár hosszúságú oligonukleotidok, melyek a replikálni kívánt szakasz két végéhez kötődnek –, nukleotidokat, melyek az új DNS szál építőegységeiként szolgálnak, valamint hőstabil DNS-polimeráz enzimet.

Annak érdekében, hogy a reakció megfelelően játszódjon le, szükséges biztosítani egy ideális puffer közeget. A hőmérséklet beállítása is kulcsfontosságú, a PCR programok általában 25-35 alkalommal ismétlődő ciklusokat foglalnak magukba, melyek mindegyike három hőmérsékletet tartalmaz. A kezdeti hőfokon a DNS templát két szála elválik egymástól (denaturáció), majd a primerek kötődnek a megfelelő régiókhoz (anelláció) és a DNS-polimeráz enzim elkezd felépíteni az új szálakat (elongáció). Ez a folyamat ismétlődik újra meg újra, elindítva ezzel egy lánreakciót, aminek a végén a DNS minta adott szakaszáról több millió újonnan készült DNS templát keletkezik.

A tervezett primerek tesztelését első körben monoplex (csak egy primerpárt tartalmazó) reakcióban végeztük. A PCR termékhez szükség van a kinyert DNS-en kívül egy úgy nevezett Master Mixre, amely tartalmazza a DNS polimeráz enzimet, dNTP-t, magnézium-kloridot és egy PCR optimalizált puffert. A reakcióhoz összemértünk 4 µl ultra tiszta vizet, 2 µl Master Mixet, 1 µl BSA-t (segíti az amplifikáció hatékonyságát), 1 µl 10 µM-os primert (SRY vagy Amelogenin) és 1 µl DNS-t, így összesen 10 µl végtérfogatot kapva. Az összemérések során mindig alkalmaztunk reagens kontrollt (amiben nem volt DNS), hogy lássuk nincs-e kontamináció. Mindezek után a PCR gépet (ABI 2720 Thermal Cyclers, Applied Biosystems) beállítottuk a megfelelő, az egyes markerekre kalkulált optimális hőmérsékleteket tartalmazó programokra, 32 cikluson keresztül:

- kezdeti denaturáció: 94°C 1 perc
- denaturáció: 94°C 30 mp
- primer anelláció: 54°C 30 mp
- elongáció: 72°C 30 mp
- végső elongáció: 72°C 30 perc

3.6 PCR termékek ellenőrzése agaróz gélen

A monoplex PCR során sokszorosított génszakaszokat az agaróz gélelektroforézis (ld. 2.3. fejezet) után a GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) segítségével tisztítottuk, az alábbi protokoll alapján:

1. oszlopok behelyezése a gyűjtőcsövekbe
2. 0,5 ml Column Preparation Solution rámerése az oszlopokra, centrifugálás (1 perc, 12000g), ezután a csövek alján megjelent folyadékok elöntése
3. 20 µl PCR-termék elegyítése 100 µl Binding Solution-nal, majd a keverék felvitele az oszlopokra (minél inkább a közepére), újabb centrifugálás (1 perc, 16000g) és a folyadékok elöntése
4. 0,5 ml Wash Solution felvitele az oszlopokra, majd újabb centrifugálással (1 perc, 16000g) és a folyadékok elöntésével
5. az oszlopokat visszahelyezve a gyűjtőcsövekbe újra lecentrifugáljuk (2 perc, 16000g) szárítás céljából
6. az oszlopok új gyűjtőcsövekbe való helyezése
7. 50 µl Elution Solution rámerése az oszlopok közepére, majd 1 perc inkubálás szobahőmérsékleten
8. végezetül egy utolsó centrifugálás (1 perc, 16000g), amely segítségével a csövek alján ott lesznek a megtisztított PCR-termékek

A tisztított PCR-termékeket egy újabb agarózgél elektroforézissel visszaellenőriztük (ld. 3.3. fejezet), majd további felhasználásig 4°C-on tároltuk.

3.7 PCR termékek szekvenálása

A szekvenálás során a PCR-termékek bázis sorrendjét (adenin, guanin, citozin, timin) lehet megvizsgálni. Mái is az egyik legelterjedtebb szekvenálási módszer a Sanger-módszer. Ennek alapja, hogy a reakcióhoz adott, négy különböző fluoreszcens festékkel jelölt didezoxi (3' -OH csoporttal nem rendelkező) nukleotidok beépülnek a láncba, a szintézis leáll mivel nincs olyan hidroxilcsoport, amihez tudna kapcsolódni a következő bázis. Az így lezajló szekvenálási reakcióban eltérő hosszúságú láncok jönnek létre, melyek fluoreszcens jelölésű véggel rendelkeznek, amik eltérő hullámhosszú fognak fluoreszkálni, ezeket a gép képes leolvasni. A kapott eredményekből meg lehet határozni, hogy milyen bázisra végződik a lánc, és mivel méretben növekedő láncok keletkeznek, így a DNS-láncok végén lévő fluoreszcens bázis leolvasása megadja a DNS-lánc bázis sorrendjét.

A sokszorosított SRY és Amelogenin génszakaszok szekvenálást a mórachalmi SeqOmics Biotechnológiai Kft. végezte. A szekvenálás után kapott adatokat a Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp) szoftver használatával kiértékeltek, majd a GenBank-ban tárolt szekvenciákkal való összehasonlítás alapján ellenőrizték (National Center for Biotechnology Information, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)), hogy valóban a megfelelő génszakaszok amplifikálódtak.

3.8 Duplex PCR optimalizálása

A továbbiakban elkezdünk duplex (azaz két primerpárt tartalmazó) PCR-el tesztelni, mivel együtt szeretnénk alkalmazni a két markert a vizsgáló módszer során, ezzel időt, munkát és anyagot megtakarítva.

A reakcióhoz összemértünk 4,5 µl ultra tiszta vizet, 2 µl Master Mixet, 1 µl BSA-t, 1,5 µl 10 µM-os SRY és 10 µM-os Amelogenin primermixet (1:2 arányban) valamint 1 µl DNS-t, így összesen 10 µl végtérfogatot kapva. Az összemérések során itt is alkalmaztunk reagens kontrollt. A két kimutatni kívánt marker együttes sokszorosításához két PCR beállítást teszteltünk. Az első program 32 ciklusszámmal 50°C-on ment végbe, a másik programot touch-down módon állítottuk be, hogy 20 ciklus alatt 54°C-ról fokozatosan vigye le a hőmérsékletet 52°C-ra és még további 12 ciklus erejéig folytatódjon ezen a hőfokon az amplifikálás. A PCR programok többi beállítása megegyezett a 1.1. fejezetben leírtakkal.

Miután lejárt a program agarózgél elektroforézissel ellenőriztük az eredményt (ld. 3.3. fejezet), hogy minden kívánt marker megfelelően látszik-e.

3.9 Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézissel olyan PCR-termékek mutathatók ki, melyeket fluoreszcens festékekkel jelölt primerrel lettek sokszorosítva. A jelölt DNS darabok detektálása már alacsonyabb koncentrációban és akár 1 bázispár méretkülönbséggel rendelkező PCR termékek elkülönítésére esetén is kiválóan használható.

Mindkét marker forward primerjét 6-FAM fluoreszcens jelöléssel láttuk el, majd a jelölt primerekkel végzett duplex PCR eredményeként létrejött fragmensek méret szerinti elválasztásához és detektálásához kapilláris elektroforézist alkalmaztunk. Az elektroforetikus elválasztás ABI Prism3130XL GeneticAnalyzer készüléken (AppliedBiosystems), GeneScan™-500 LIZ™ méret standarddal (AppliedBiosystems) és a GeneScanAnalysis v3.1 software (AppliedBiosystems) segítségével történt (Biomi Kft, Gödöllő).

3.10 Esettanulmány

Vizsgálat: A vadásztársaság hűtőházában tárolt szarvastetemből kivágással biztosított húsmintákból (7. kép) DNS-t tisztítottunk majd agaróz gélen kvantáltuk (ld. 3.2. és 3.3. fejezet).



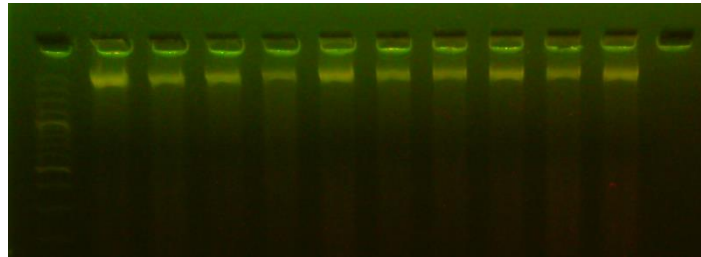
7. kép: Igazságügyi szakértő által rögzített szövetminták (Saját fénykép)

A mintában két eltérő, ivarspecifikus genetikai markert (SRY és Amelogenin) vizsgáltunk a 3.8. és 3.9. fejezetekben leírt módon. A kérdéses mintát ismert ivarú (szarvasbika, illetve szarvastehén) kontrollmintákkal hasonlítottuk össze.

4 Eredmények

4.1 DNS kinyerése

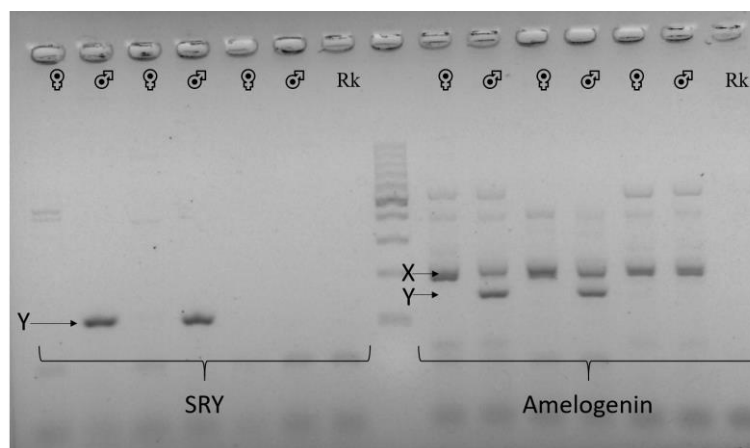
A vizsgálatok során vadászok segítségével összesen 29 db izomszövet és/vagy szőrös bőrmintát gyűjtöttünk mindhárom agancsos faj ismert ivarú kilőtt egyedeiből és a mintákból DNS-t izoláltunk. A vizsgált minták mindegyikéből sikerült megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t tisztítani (8. kép).



8. kép: Alléllétra illetve 10 szövetmintából izolált DNS (és egy reagens kontroll) agarózgél elektroforézis képe

4.2 Monoplex PCR

A primerek laboratóriumi tesztelését ismert nőstény, illetve hímivarú őz, gím- és dámszarvas mintákon végeztük monoplex reakcióval. Az SRY marker amplifikálásával a hím eredetű minták esetén a vártnak megfelelően egy terméket kaptunk, míg a nőstény mintákban nem jelent meg PCR-termék. Az Amelogenin marker sokszorosításával a nőstény minták esetén kizárólag az Amelogenin X génszakasz volt kimutatható, hím mintákból pedig mindkét (X és Y) allél (9. kép).



9. kép: PCR eredmények agaróz gélen az SRY és Amelogenin X/Y marker monoplex sokszorosítása után

4.3 Szekvencia analízis

A monoplex reakcióval kapott specifikus PCR termékek bázissorrendjét szekvenálással igazoltuk, melyek 100%-os homológiát mutattak a megfelelő fajhoz és ivarhoz tartozó GenBank-ban található szekvenciákkal (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (10. kép).

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Capreolus capreolus SRY gene, exon 1 and partial cds
Sequence ID: [EU402964.1](#) Length: **573** Number of Matches: **1**

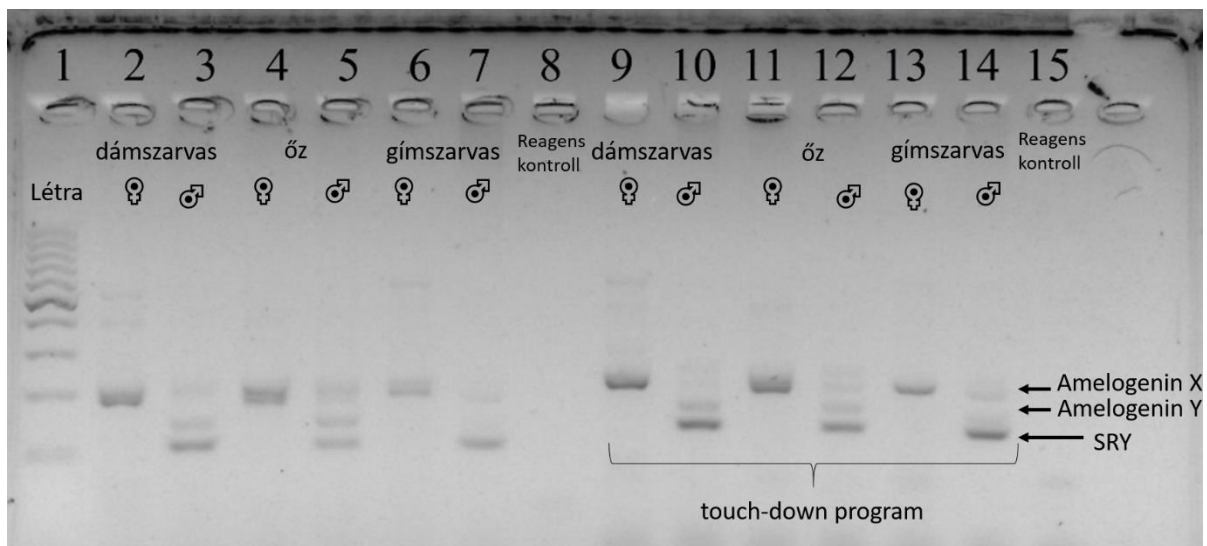
Range 1: **176 to 288** [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
209 bits(113)	2e-50	113/113(100%)	0/113(0%)	Plus/Plus
Query 1	TCAGCAAGCAGCTGGGGTATGAGTGGAAAAGGCTTACAGATGCTGAAAAGCGCCCATCT			60
Sbjct 176	TCAGCAAGCAGCTGGGGTATGAGTGGAAAAGGCTTACAGATGCTGAAAAGCGCCCATCT			235
Query 61	TTGAGGAGGCACAGAGACTACTAGCCATACACAGAGACAAATACCCGGGCTAT			113
Sbjct 236	TTGAGGAGGCACAGAGACTACTAGCCATACACAGAGACAAATACCCGGGCTAT			288

10. kép: SRY génszakasz ellenőrzése az NCBI BLAST honlapján, teljes homológia az európai őzzel

4.4 Duplex PCR optimalizálása

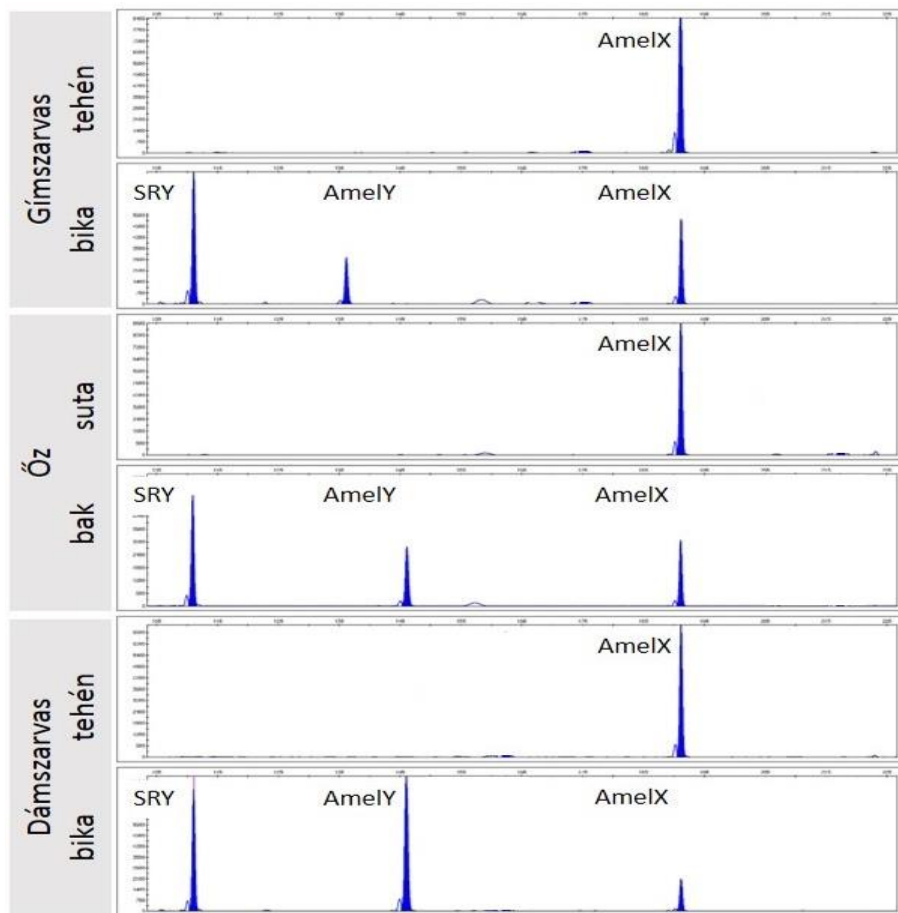
Miután stabilan és megbízhatóan működött a monoplex PCR protokoll, különböző PCR programokat teszteltünk annak érdekében, hogy mind a két markert eredményesen tudjuk egy reakcióban sokszorozítani (duplex PCR). A touch-down program megfelelőbbnek bizonyult erre a célra, mint az egyféle anellációs hőmérsékleten végzett beállítás, mivel az utóbbi esetben vagy nem látszódott mindegyik vizsgált marker. A kapott PCR termékeket gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk, ahol jól látszott, hogy az SRY és az Amelogenin X/Y markerek már együtt szerepelnek a gélen és együtt is jól működtek a duplex PCR-el. Emellett az is látszik az agarózgélről készült fotón, hogy a touch-down beállítások erőteljesebb és szebb képet adnak a vizsgált DNS szakaszokról, illetve egyik marker sem hiányzik (11. kép).



11. kép: Duplex PCR eredmények – agarózgél elektroforézis

4.5 Kapilláris elektroforézis

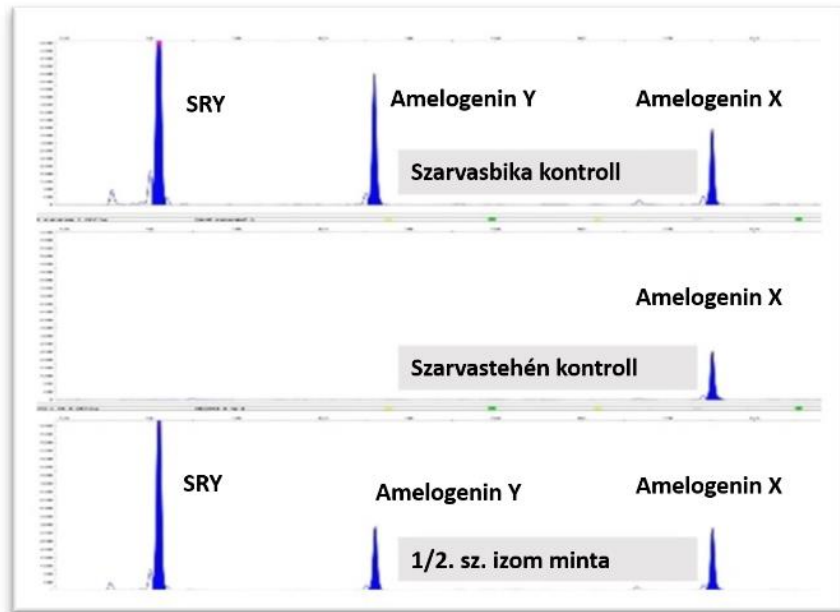
A duplex reakcióval sokszorosított és kapilláris elektroforézissel elválasztott PCR allélek méret-, faj- és ivar szerinti eloszlása szintén alátámasztják a kapott eredményeinket és a módszer megbízhatóságát a genetikai ivarmeghatározásban (12. kép). Az ábrán jól látszik az Amelogenin X/Y hosszpolimorfizmusa – az Amelogenin Y esetében történt deléció miatt kisebb az allél hosszúsága (gím-, dámszarvas: 149 bp, őz: 140 bp), mint az Amelogenin X-nek (gím-, dámszarvas, őz: 194 bp) –, illetve az SRY marker (gím-, dámszarvas, őz: 113 bp) megléte, melyek csak a hím egyedek esetén figyelhetők meg, ezzel egyértelművé téve, hogy melyik minta származik hím és melyik nőstény állattól.



12. kép: Duplex PCR eredmények - kapilláris elektroforézis vizsgálat

4.6 Esettanulmány

Egy hűtőházban lefoglalt kérdéses ivarú szarvastetemből származó mintán a megfelelő kontrollok használatával is elvégezve a kifejlesztett eljárást, az igazságügyi genetika területén is alkalmas módszernek bizonyult az ivar egyértelmű meghatározására (13. kép).



13. kép: Kapilláris elektroforézis vizsgálat a kérdéses ivarú tetem meghatározására

5 Következtetések

A vad védelme egy kiemelten fontos kérdés, amint ez a korábban felsorolt értékek alapján is világossá válik, így az emberiség számára igen lényeges a megőrzésük. Az illegálisan folytatott vadászatot vissza kell szorítani, mert káros hatással van a vadállatok populációira, vagyoni- és eszmei értékekre, élelmiszerbiztonsági szempontból is veszélyes és a vadgazdálkodást rendkívüli módon megnehezíti (Makai, 2019). Az engedély nélküli vadászat mértékét pontosan nem tudjuk felmérni, mivel ezen tevékenységeket akkor és oly módon folytatják, amikor alig lehet tetten érni az elkövetőket, azonban becslések alapján – a hibahatárokat is figyelembe véve – még így is rendkívül nagy számot valószínűsíthetünk (Zenke és mtsai, 2017). Jelenleg ezek az akár bünszövetkezeti formában elkövetett visszaélések és illegális tevékenységek jövedelmezőségük, viszonylag kis büntetési vonzatuk és a bizonyítóerő hiánya miatt nehezen visszaszoríthatóak még akkor is, ha komoly erőfeszítéseket tesznek az illetékes hatóságok.

A hivatásos vadászok, és az orvvadászat esetében eljáró rendfenntartó hatóság nagy hasznát vehetné az általunk kifejlesztett genetikai módszernek, mellyel könnyen és pontosan meghatározható az állat ivara akkor is, ha a test már morfológiailag nem azonosítható, illetve ha csak szőr, izomszövet vagy vérminta áll rendelkezésre. Eddig ezzel nem, vagy kevéssé foglalkoztak, így nem is közismert a magyarországi agancsos vadfajok DNS alapú ivarmeghatározásnak lehetősége vadász berkeken belül.

Hosszútávra tekintve a vadászat „fehérítése” Magyarországon és a világ más országaiban is egy fontos feladat, mely kiterjed a preventív védekezésre is azáltal, hogy egy megbízható és egyértelmű eredményt képes szolgáltatni az igazságügyi állatgenetika segítségével, mely az ezzel kapcsolatos jogi eljárások során bizonyítékként szolgálhat. Sokan azért élnek illegális módszerekkel, mert a jelenlegi szabályozás nyújtotta kiskapukat könnyen ki tudják használni, azonban ezzel a módszerrel ezen kiskapuk egy jó részét fel lehetne számolni.

Az általunk kifejlesztett módszer nagy pontossággal képes megállapítani az állat ivarát ügyelve arra, hogy kiszűrje az esetleges fals eredményeket köszönhetően annak, hogy két marker gént vizsgálunk, melyből az Amelogenin X allél alkalmas kontrollként szolgálni. Saját tervezésű primereink egységesen alkalmazhatóak a Magyarországon előforduló agancssal rendelkező vadfajokra (gím-, dámszarvas, európai őz), valamint a duplex PCR használatával a két markerre egyszerre és gyorsan lefuttatható a vizsgálat. További előnye ennek a módszernek az is, hogy mivel 200 bázispár alatti markereket vizsgálunk, akár a nagyon kis mennyiségű, vagy degradált DNS mintákból is nagy valószínűséggel kimutatható az állat ivara. Bár az átfogó

validálási vizsgálatok, mellyel szeretnénk felmérni a módszer alkalmazhatóságának korlátait még előttünk állnak, de ezek elvégzésével alkalmassá tehetjük a módszert az igazságügyi vizsgálatokra.

Ez a módszer alkalmas a populációk ivararányának meghatározásán felül – ami rendkívül fontos az állatállományok kezelésének megfelelő megtervezéséhez – a kis mennyiségű minták kriminalisztikai célú vizsgálatára is (Takahashi és mtsai, 1998; Yamauchi és mtsai, 2000; Han és mtsai, 2007; Qiao és mtsai, 2007; Yamazaki és mtsai, 2011). Ugyan a kriminalisztikában alkalmazott ivarmeghatározási módszerek fejlesztésével is foglalkoztak már, azonban a populáció genetikai kutatásokhoz viszonyítva ezek száma elenyésző, így a mi kutatásunk során olyan területre koncentráltunk, mely még sok téren kiaknázatlan, ellenben lenne rá kereslet az igazságügyi állatgenetikára való igények növekedésével (Pfeiffer és Brenig, 2005). Jelenleg is sok olyan eset van hazánkban, ahol nagy értékű vadhús, illetve trófea eltulajdonításának ügyében nyomoznak, de nem áll rendelkezésükre megfelelő bizonyíték, hogy az ügyet lezárhassák. Néhány esetben már segítségül hívták a genetikai vizsgálatokat, amikkel bizonyító erejű eredményeket tudtak felmutatni az elkövetőkkel szemben (Zenke és mtsai, 2017).

A módszer a szabálytalan vadászaton kívül más potenciális területeken is alkalmazható lehet, mint például a genetikai rendellenességgel született egyedek vizsgálata (hermafroditák), ahol a szubjektív külső vizsgálatok alapján nem lehet biztos döntést hozni (Pajares és mtsai, 2009; Kropatsch és mtsai, 2013). Ígéretes eredményeket produkálhat még az élelmiszeriparban is, a húsfeldolgozók és a húsfelvásárlók (hentesek, éttermek, kereskedések) szintjén. Minden húsnak és hústerméknek megvannak az ideális paraméterei, amik alapján osztályozásra kerülnek, ez megszabja a hús és a belőle készült hústermék kívánatosságát és árát. Ezen paraméterek egyike az állat ivara, mivel a hús minőségét befolyásolják a hormonális hatások, az állat életében történő hasznosítása és tartása. Példának okáért egy ivartalanított szarvasmarha bika húsa kívánatosabb, mint egy tehéné, amit az állomány növelésre használnak és legtöbb esetben csak a termelési mutatók romlása után vágják le, amikor az izomrostok hossza és rigiditása megnő, a kollagén szintje magasabb, mindezek keményebb, rágósabb és így kevésbé értékes húst eredményeznek (Gokulakrishnan és mtsai, 2015). A vadhús esetében ez fordítva van, ugyanis a természetben elejtett és utána feldolgozásra kerülő szarvas- és őzfélék esetében a bikák és bakok húsa kevésbé kelendő. Mivel ezen állatok nem voltak ivartalanítva, a hormonális hatások olyan kellemetlenségeket okozhatnak a vadhús minőségében, amire nem lesz nagy a kereslet, ellenben a tehének, ünők és suták húására igen.

Végeredményben sikerült kidolgoznunk egy olyan módszert, mely alkalmas a gímszarvas, a dámszarvas és az európai őz ivarmeghatározására egységes eljárással.

Módszerfejlesztésünk hitelesen járulhat hozzá az esetleges orvvadászattal kapcsolatos jogviták felmerülésének csökkentéséhez, illetve azok megoldásához. Mivel további, az igazságügyi standardoknak megfelelő validálási folyamatok szükségesek, így tervezzük a módszer érzékenységének és megbízhatóságának tesztelését nagyobb számú mintán, fajonként és ivaronként. Az alkalmazott primerek fajspecifikusságának tesztelését további kérődző fajokon szeretnénk elvégezni.

A Magyarországon eddig elért forenzikus genetikai eredményeket figyelembe véve úgy gondolom szükséges ezen terület további kutatása, fejlesztése, valamint a vadászat mindennapi rendjébe iktatása, hogy csökkentsük az illegális vadászati tevékenységeket.

6 Összefoglalás

A hazai agancsos vadfajok (őz, gím- és dámszarvas) vadászata során előfordulnak olyan visszaélések, amikor a leadott, zsigereelt, morfológiailag már nem azonosítható tetem ivara nem egyezik meg az adott időszakban legálisan vadászható ivarral.

A konzervációbiológia már régóta használ genetikai markereket a trófeás vadfajoknál is az ivar meghatározására, ezek a módszerek azonban nem alkalmazhatók univerzálisan a Magyarországon előforduló agancsos fajokra és nem felelnek meg a törvényszéki genetikai alkalmazás kritériumainak. Kutatásunk célja ezért egy olyan módszertani fejlesztés volt, mellyel pontosan és megbízhatóan kimutatható mindhárom állatfaj ivara akkor is, ha a tetem vagy maradvány, mint vér, szőr, zsigerek, vagy csonkolt testrészek, morfológiailag már nem azonosítható.

A vizsgálatok során vadászok segítségével izomszövet és/vagy szőrös bőrmintát gyűjtöttünk mindhárom agancsos faj ismert ivarú kilőtt egyedeiből és a mintákból DNS-t izoláltunk. Rövid, 200 bázispár alatti, az X- (Amelogenin X) és Y-kromoszómás markergének (SRY és Amelogenin Y) konzervált szakaszaira terveztünk primereket. A primerek laboratóriumi tesztelését ismert nőstény-, illetve hímivarú őz, gím- és dámszarvas mintákon végeztük monoplex reakcióval, majd a specifikus termékek bázissorrendjét szekvenálással igazoltuk. Ezután optimalizáltuk a PCR beállításokat és egy ún. „touch-down” programot hoztunk létre, mellyel az X- és Y-markereket együttesen tudtuk vizsgálni. A fluoreszcens jelölésű primerekkel sokszorosított fragmenseket agarózgél- és nagy pontosságú kapilláris elektroforézissel ellenőriztük.

A kidolgozott protokollal a hím eredetű minták esetén a vártak megfelelően mind a két Y-kromoszómás (SRY és Amelogenin Y), míg nőstény minták esetén kizárólag az Amelogenin X génszakasz volt kimutatható. Egy eseti mintán – hűtőházban lefoglalt kérdéses ivarú szarvastetem – , a megfelelő kontrollok használatával is elvégezve a kifejlesztett eljárást, az igazságügyi genetikai területén is alkalmas módszernek bizonyult az ivar egyértelmű meghatározására.

Végeredményben sikerült kidolgoznunk egy olyan módszert, mely alkalmas a gímszarvas, a dámszarvas és az európai őz ivarmeghatározására kis mennyiségű mintából is, bár az igazságügyi standardoknak megfelelő validálási folyamatok még folyamatban vannak. Módszerfejlesztésünk hitelesen járulhat hozzá az esetleges orvvadászattal kapcsolatos jogviták felmerülésének csökkentéséhez, illetve azok megoldásához.

7 Summary

There is a considerable amount of misuse related to hunting game with antler (roe deer, red deer and fallow deer). Cases, such as when the carcass is not from the timeframe it should be or does not match with the individual showed on the documentation. Verifying the sex of the eviscerated, morphologically unidentifiable carcasses using traditional methods can only happen in an uncertain manner and provide questionable results.

Conservation biology has been using genetic markers for sexing in various species including trophy game for a long time. However, these studies while they provide a good foundation, do not meet the criterion set by forensic science, and cannot be universally applied to all three of the target species. Exactly for this reason we aim to create an efficient, fast and widely useable sexing method for roe deer, red deer and fallow deer, that can be used even if the carcass or remnants, such as blood, fur, guts, or cut down body parts, morphologically cannot be identified anymore.

In our research, with the help of hunters, muscle and hide samples were obtained from the forementioned game species with known sex. We designed primers for the conserved parts of the Amelogenin X, the SRY and the Amelogenin Y markers, which produce less than 200 basepair PCR fragments. The laboratory-testing of these primers were done in a monoplex reaction on roe deer, red deer and fallow deer samples, then the nucleotide sequences of the specific products were confirmed by sequencing. After this we put the markers together into a duplex PCR, to be able to examine the X and Y markers simultaneously and tested several methods then optimized the duplex PCR with “touch-down” technique providing us with the best results. The fragments amplified using fluorescently labelled primers were detected by agarose gel electrophoresis and then by a high precision capillary electrophoresis.

After the duplex PCR optimization process, as expected, both Y-chromosomal (SRY and the Amelogenin Y) and X-chromosomal (Amelogenin X) segments were detected in male samples, while only the Amelogenin X gene segment was detected in female samples. The developed genetic test was successfully used on a case related sample – red deer carcass with a questionable sex from the refrigerator – , which also shows the putative applicability in the field of forensic genetics.

To summarize, we were able to create a genetic method to determine the sex of red deer, fallow deer and roe deer with the same primer set, however, the validation process to reach the forensics standards is still in progress. Hopefully, our developed method could contribute credibly to the resolution of potential poaching disputes and reduce the number of illegal hunting activities.

Irodalomjegyzék

1. Aasen E. and J.F. Medrano J.F., (1990) Amplification of the Zfy and Zfx Genes for Sex Identification in Humans, Cattle, Sheep and Goats, *Bio/Technology* 8(12):1279-81.
2. Barbosa A. M., Fernández-García J. L., J. Carranza J., (2009) A new marker for rapid Sex Identification of red deer (*Cervus Elaphus*), *Hystrix It. J. Mamm. (n.s.)* 20(2): 169-172.
3. Cadamuro V. Ch., C. Bouakaze C., M. Croze M., S. Schiavinato S., L. Tonasso L., P. Ge´rard P., Fausser J.-L., M. Gibert M., Dugoujon J.-M., J. Braga J., P. Balaesque P., (2015) Determined about sex: Sex-testing in 45 primate species using a 2Y/1X sex-typing assay, *Forensic Science International: Genetics* 14, 96–107.
4. Csányi S., M. Márton M., K. Kiss K., P. Köteles P. és G. Schally G. 2020. Vadgazdálkodási Adattár - 2019/2020. vadászati év. Országos Vadgazdálkodási Adattár, Gödöllő, 66 pp.
5. Dr. Heltay István (1997, szerk.): *Vadásziskola*, Budapest, Hubertus Vadkereskedelmi Kft.
6. Goddard K. W., (2005) *Veterinary Aspects of Forensic Medicine, Wild Animals*, Elsevier, Ltd. 1: 344-349.
7. Gokulakrishnan P., Kumar R. R., Sharma B. D., Mendiratta S. K., O. Malav O. and D. Sharma D., (2015) Determination of Sex Origin of Meat and Meat Products on the DNA Basis: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:1303–1314.
8. Gupta S. K., K. Thangaraj K. and L. Singh L., (2006) A Simple and Inexpensive Molecular Method for Sexing and Identification of the Forensic Samples of Elephant Origin, *J Forensic Sci*, Vol. 51, No. 4. 805-807.
9. A. Gurgul A., A. Radko A., E. Słota E., (2010) Characteristics of X- and Y-chromosome specific regions of the amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in red deer (*Cervus elaphus*), *Mol Biol Rep* 37:2915–2918.
10. Han S.-H., Cho I.-Ch., Lee S.-S., L. Tandang L., H. Lee H., Oh H.-Sh., B.S. Kim B.S. and Oh M.-Y., (2007) Identification of Species and Sex of Korean Roe Deer (*Capreolus pygargus tianschanicus*) Using SRY and CYTB Genes, *Integrative Biosciences* 11: 165-168.
11. Hrovatin K. and, T. Kunej T., (2017) Genetic sex determination assays in 53 mammalian species: Literature analysis and guidelines for reporting standardization, *Ecology and Evolution*. 2017;1–10.
12. Huber S., U. Bruns U., and W. Arnold W., (2002) Sex determination of red deer using polymerase chain reaction of DNA from feces, *Wildlife Society Bulletin* 30(1):208-212.
13. kKőszegi H., G. Bóka G., B. Vincze B., A. Gáspárdy A., P. Zenke P., (2020) A magzati ivar anyai vérplazmából való meghatározásának jelentősége és módszerei emlősállatokban, *Magyar Állatorvosok Lapja* 142. / 625-633.

14. Kropatsch R., G. Dekomien G., Akkad D. A., Gerding W. M., E. Petrasch-Parwez E., Young N. D., J. Altmüller J., P. Nürnberg P., Gasser R. B., Epplen J. T., (2013) SOX9 Duplication Linked to Intersex in Deer, PLoS ONE 8(9): e73734.
15. Kumar S., G. Stecher G., M. Li M., C. Knyaz C., and K. Tamura K., (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms, Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
16. Linacre A., L. Gusmaõ L., W. Hecht W., A.P. Hellmann A.P., W.R. Mayr W.R., W. Parson W., M. Prinz M., P.M. Schneider P.M., N. Morling N., (2011) ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations, Forensic Science International: Genetics 5 (2011) 501–505.
17. Makai Krisztián (2019): *A jogosulatlan vadászat büntetőjogi jogkövetkezményei, különös tekintettel az orvvadászat tényállására.* Büntügyi szakértői pályamunka. Kézirat. PTE ÁJK az ÓNSZ Büntügyi Tagozata, Pécs.
18. Menotti-Raymond M. A., David V. A., O'Brien S. J., (1997) Pet cat hair implicates murder suspect, Nature 1997 Apr 24;386(6627):774.
19. Pádár Z., Angyal M., Egyed B., Füredi S., Woller J., Zöldág L., Fekete S., (2001) Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in Hungarian Zoological Gardens, Int J Legal Med 115: 79-81.
20. Pajares G., I. Álvarez I., I. Fernández I., L. Pérez-pardal L., F. Goyache F. and Royo L. J., (2007) A sexing protocol for wild ruminants based on PCR amplification of amelogenin genes AMELX and AMELY (short communication), Arch. Tierz., Dummerstorf 50 5, 442-446.
21. Pajares G., A. Balseiro A., L. P´erez-Pardal L., J.A. Gamarra J.A., L.V. Monteagudo L.V. , F. Goyache F., L.J. Royo L.J., (2009) Sry-negative XX true hermaphroditism in a roe deer, Animal Reproduction Science 112 190–197.
22. I. Pfeiffer I. and B. Brenig, Brenig Brenig B., (2005) X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*), BMC Genet. Mar 16; 6:16. doi: 10.1186/1471-2156-6-16.
23. Qiao Y., F. Zou F., K. Wei K. and B. Yue B., (2007) A Rapid Sex-Identification Test for the Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*) Based on the ZFX/ZFY Gene, Zoological Science 24: 493–495.
24. Shadrach B., M. Commane M., C. Hren C. and I. Warshawsky I., (2004) A Rare Mutation in the Primer Binding Region of the Amelogenin Gene Can Interfere with Gender Identification, Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 6, No. 4, 401-405.
25. Shrutarshi P., G. Tista G., P. Bivash P., M. Dhananjai M., H. Bilal H., N. Parag N. and M. Samart M., (2019) Rapid molecular assays for species and sex identification of swamp deer and

other coexisting cervids in human-dominated landscapes of the Terai region and upper Gangetic plains, northern India: implications in understanding species distribution and population parameters, *Journal of Genetics* 98:44.

26. Takahashi M., R. Masuda R., H. Uno H., M. Yokoyama M., M. Suzuki M., Yoshida M. C. and N. Ohtaishi N., (1998) Sexing of Carcass Remains of the Sika Deer (*Cervus nippon*) Using PCR AMplification of the Sry Gene, *J. Vet. Med. Sci.* 60(6): 713-716.
27. Vincze B., A. Gáspárdy A., A.a Biácsi A., Papp E. Á., L. Garamvölgyi L., E. Sós E., S. Cseh S., G. Kovács G., Zs. Pádár Zs. and P. Zenke P., (2019) Sex determination using circulating cell-free fetal DNA in small volume of maternal plasma in elephants, *Scientific Reports* 9:15254.
28. Yamauchi K., S. Hamasaki S.), K. Miyazaki K., T. Kikusui T., Y. Takeuchi Y. and Y. Mori Y., (2000) Sex Determination Based on Fecal DNA Analysis of the Amelogenin Gene in Sika Deer (*Cervus nippon*), *J. Vet. Med. Sci.* 62(6): 669–671.
29. Yamazaki S., Y. Motoi Y., K. Nagai K., T. Ishinazaka T., M. Asano M. and M Suzuki M., (2011) Sex Determination of Sika Deer (*Cervus nippon yesoensis*) Using Nested PCR from Feces Collected in the Field, *J Vet Med Sci.* 73(12):1611-6.
30. Zenke P., B. Egyed B., G. Kovács G., Z. Pádár Z., (2019) Implementation of genetic based individualization of White stork (*Ciconia ciconia*) in forensic casework, *Forensic Science International: Genetics* 40 (2019) e245–e247.
31. Zenke P., Egyed B., Pádár Z., Kovács G., (2015) Increasing relevance of non-human enetics in Hungarian forensic practice, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 5, e250–e252.
32. Zenke P., B. Egyed B., Zs. Pádár Zs., (2017) A vadászható fajok védelme: az orvvadászat bizonyíthatósága az igazságügyi genetika segítségével, *Magyar Állatorvosok Lapja* 139. / 631-639.i.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Zenke Petrának a rengeteg segítséget, hasznos tanácsot és a kifogyhatatlan türelmét, melyet a laboratóriumi munka során és a dolgozat megírásához nyújtott.

Emellett köszönet illeti az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállattudományi tanszék vezetőjét, Dr. Gáspárdy András, hogy bekapcsolódhattam a tanszék egyik kutatásába.

Továbbá köszönettel tartozom Zorkóczy Orsolyának a sok hasznos tanácsért, és meglátásért, melyek a dolgozat megírásához nagy segítséget nyújtottak.

Köszönet illeti Sipos Barnabást a támogatásáért és az angol nyelvű absztrakt megírásához nyújtott segítségéért.

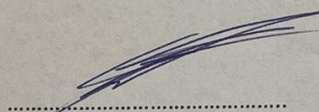
Ezen felül hálával tartozom Várfalvai Gábor hivatásos vadásznak és jó barátomnak, hogy segítségével belátást nyerhettem a vadászatot nap mint nap hivatásszerűen űzők munkájába és ezáltal fontos ismeretekre tettem szert.

Nem utolsó sorban köszönöm a rengeteg támogatást a családomnak és a barátaimnak, akik mindig lelket öntöttek belém a nehéz pillanatokban.

NYILATKOZAT

Alulírott Bartal Balázs..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe A magyarországi agancsos vadfajok igazságszűri célú DNS alapú ivar meghatározása..... tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2020 évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023. 11. 06......



.....
a hallgató neve és aláírása



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Bartal Balázs

Neptun-kódja: YVG4HS

A témavezető neve és beosztása: Dr. Zenke Petra, tudományos főmunkatárs

Tanszék: ÁTLI

A diplomadolgozat címe: A magyarországi agancsos vadfajok igazságügyi célú DNS alapú ivarmeghatározása

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2020	05	04	irodalmi áttekintés	<i>Bartal</i>
2.	2020	05	12	módszertervezés	<i>Bartal</i>
3.	2020	05	28	labormunka (DNS izolálás)	<i>Bartal</i>
4.	2020	06	08	labormunka (PCR)	<i>Bartal</i>
5.	2020	06	12	labormunka (agarózgél elektroforézis)	<i>Bartal</i>

Érdemjegy az első félév végén: 5 (jeles)

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2020	09	07	labormunka	<i>Bartal</i>
2.	2020	09	22	TDK téma összefoglalás megbeszélése	<i>Bartal</i>
3.	2020	10	05	TDK dolgozat írása	<i>Bartal</i>
4.	2020	10	26	TDK beszámolóra felkészülés	<i>Bartal</i>
5.	2020	11	09	TDK előadásra ppt készítése	<i>Bartal</i>

Érdemjegy a második félév végén: 5 (jeles)

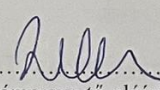
A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: 


.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása:  Átvétel dátuma: 2023. 11. 09.

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!