

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet



TDK DOLGOZAT

Szarvasfélék genetikai ivarazonosítása izotermális amplifikációval

Készítette:

Bujtor Zsófia Krisztina

Témavezető:

Dr. Zenke Petra

ÁTE, Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet,
tudományos főmunkatárs

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke.....	3
2	Irodalmi áttekintés	4
2.1	Az ivarazonosítás genetikai lehetőségei	4
2.2	Az ivar meghatározásának jelentősége	4
2.3	A hazai szarvasfélék vadgazdálkodási jelentősége.....	6
2.4	A szarvasfélék illegális vadászatának megfékezése a genetika segítségével	7
2.5	Genetikai vizsgálatok szarvasfélék ivarazonosítására	8
2.6	Hurok által közvetített izotermikus sokszorosítás (LAMP)	10
3	Célkitűzések	13
4	Anyag és módszer.....	14
4.1	Vizsgálati minták	14
4.2	Markerszelekció és primerek tervezése	15
4.3	Markerek szekvenálása	16
4.4	Molekuláris genetikai vizsgálatok kidolgozása, tesztelése a célfajokban	17
4.5	A reakciótermékek kimutatása.....	17
4.6	A módszer megbízhatóságának felmérése és optimalizálása.....	17
4.7	Direkt amplifikáció megvalósítása	18
5	Eredmények.....	19
5.1	Primer tervezés	19
5.2	Markerek ellenőrzése	22
5.3	LAMP reakciók kidolgozása	22
5.4	Direkt amplifikációval végzett reakciók.....	24
6	Következtetések.....	27
7	Összefoglaló	30
8	Summary.....	31
9	Irodalomjegyzék	32
10	Köszönetnyilvánítás	39

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

μl - mikroliter

Cc - európai őz (*Capreolus capreolus*)

Ce - gímszarvas (*Cervus elaphus*)

db - darab

Dd - dámszarvas (*Dama dama*)

DNS - dezoxiribonukleinsav

dNTP - dezoxi-ribonukleotid-trifoszfát

GBS - szekvenáláson alapuló genotipizálás (genotyping-by-sequencing)

LAMP - hurokközvetített izotermikus amplifikáció (loop-mediated isothermal amplification)

MEGA - molecular evolutionary genetics analysis szoftver

mM - millimol

mtDNS - mitokondriális DNS

NCBI - Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (National Center for Biotechnology Information)

ng - nanogramm

NTC - nem-DNS templát kontroll

-OH - hidroxil csoport

OVA - Országos Vadgazdálkodási Adattár

PCR - polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

RK - reagens kontroll

RNS - ribonukleinsav

RT - reverz transzkripció

SNP - egyponos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

SRY - ivart meghatározó Y kromoszómás gén (sex-determining region Y)

ZFX - ivart meghatározó X kromoszómás fehérje (zinc finger protein X-Linked)

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az ivarazonosítás genetikai lehetőségei

Az állatok ivarának megállapítása, sokszor már az embrió-, illetve magzati stádiumtól kezdve, több emlősfajban is intenzíven kutatott terület. A genetikai módszerekkel történő ivarmeghatározás sok esetben megbízhatóbban, könnyebben és gyorsabban működik, mint az egyedek külső jegyek alapján való vizsgálata [1]. Ezek a technikák olyan esetekben is használhatóak, melyek során az állat vagy annak maradványai morfológiailag nem azonosíthatók [2]. Ezen kívül pedig az egyedek számára is kisebb stresszforrást jelentenek az olyan eljárások, melyek nem-invazív módon megszerezhető mintákat (pl.: szőr, ürülék) igényelnek [3, 4].

Számos technika áll rendelkezésre az állatok ivarának genetikai megállapítására. A hagyományos polimeráz-láncreakció (PCR) az egyik legtöbbször használt módszer. A PCR technikával az ivari kromoszómák specifikus régióinak sokszorosításával és elemzésével állapítható meg a mintához tartozó egyed ivara [5, 6]. Amennyiben csak kis mennyiségű minta áll rendelkezésre, a Nested PCR (két, egymást követő reakció, két primer pár alkalmazásával) [4, 7] vagy a LAMP (hurokközvetített izotermikus amplifikáció) módszer [8–11] ajánlott a magasabb szenzitivitásuk miatt. A multiplex PCR során több DNS régió sokszorosítása zajlik egy reakción belül, így egyszerre akár több ivar-specifikus marker vizsgálata is végbemehet a megbízhatóbb eredmények érdekében [3, 12, 13]. A DNS szekvenálás folyamán a molekula pontos nukleotid sorrendjének megállapításával határozhatóak meg az ivar-specifikus markerek az egyes kromoszómákon [14, 15], a FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) technika alkalmazásával pedig a kromoszómák ivar-specifikus régiói vizsgálhatóak fluoreszcens jelölés segítségével [16].

Az emlősállatok ivarazonosítására irányuló kutatások általában a hím ivarban megtalálható, Y kromoszómához kötött gének (pl.: SRY, AMELY, ZFY [13, 17]) és ivarra nem specifikus (reakció kontrollként alkalmazott), X kromoszómához kötött gének (pl.: AMELX, ZFX [17]), egy nukleotidos polimorfizmusok (SNP) vagy mikroszatelliták vizsgálatával történnek [14].

2.2 Az ivar meghatározásának jelentősége

Az ivar meghatározásának a háziállattartás területén gazdasági szempontból, a vadon élő állatok esetén pedig vadgazdálkodási és konzervációbiológiai aspektusból van a legnagyobb jelentősége. Sok esetben az állatok ivara megállapítható azok morfológiai

jegyei, külső jellemzői alapján, azonban az ivari dimorfizmust kevésbé mutató fajok [18], a veleszületett rendellenességgel rendelkező egyedek [19], vagy az embriók vizsgálata során [20] ez nem lehetséges.

A haszonállat-állományok ivarának és ivararányának meghatározása központi szerepet játszik az állattenyésztésben, ennek ismerete segít a tenyésztőknek meghatározni a párosítási terveket, a tenyésztési stratégiákat és a takarmányozási programokat, figyelembe véve a genetikai szelekciót és a gazdasági hasznosulást. Az ivar ismerete szükséges a hatékony állománygazdálkodáshoz, a betegségek elleni védekezéshez, a termelés optimalizálásához és a megfelelő kereskedelmi döntések meghozatalához a mindenkori piaci preferenciák szerint [18, 21, 22].

Az utódok ivarának előválogatása szintén hozzájárul a termelés maximalizálásához és a tenyésztés hatékonyságának növeléséhez, mely különösen hasznos olyan fajoknál, melyek alacsony reprodukciós rátával rendelkeznek [9]. Az ivari kromoszómák vizsgálata segítséget nyújt az embriók szexálásához beültetési programoknál [20], vagy az utód sterilitását eredményezhető születési rendellenességek, például a freemartinizmus vizsgálatánál [19]. A magzat ivarának meghatározása az unipara, egy utódot ellő fajok tenyésztésénél is hasznos lehet, mivel ezek az állatok általában hosszú vemhességi idővel rendelkeznek, így a magzat ivarának tudatában számos kérdésre előzetesen lehet megoldást találni haszonállatok (pl.: ló, szarvasmarha) és fogságban tartott fajok (pl.: zsiráf, zebra, elefánt, főemlősök) vizsgálatával egyaránt [23].

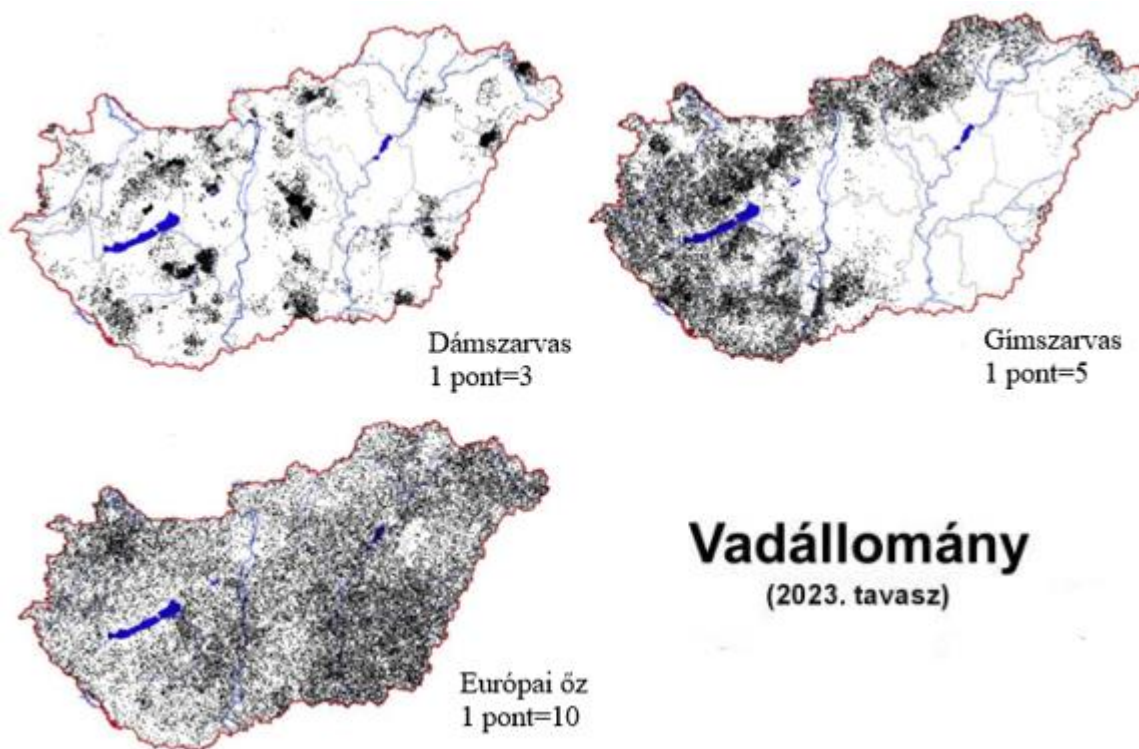
Az állatkertben tartott állatoknál fontos szerepet játszik, hogy ezen fajok közül számos veszélyeztetett, ezért náluk a fajmegőrzés és védelem szempontjából is elengedhetetlen az utódok ivarának ismerete. A csereprogramokhoz és a tenyésztési programokhoz is nagy segítséget tud nyújtani az ivar megállapítása, mely hozzájárul a fajok genetikai diverzitásának fenntartásához és az egyedek tenyésztésének tervezéséhez. Egyes fogságban tartott fajoknál a hímek agressziója vagy a háremben élő csoportok miatt az ivararányokat pontosan meghatározzák, így az adott intézmények csak limitált számú hím ivarú állatnak tudnak helyet biztosítani. A magzatok ivari elkülönítése ilyen esetekben is különösen hasznosnak bizonyul, mivel már a vemhesség ideje alatt el lehet kezdeni az előkészületeket egy esetleges csereprogramhoz más állatkertekkel, vadasparkokkal, amennyiben a születendő utód ivara miatt nem maradhat az eredeti intézményében [23].

Az vadon élő állatok ivarazonosítása főként terepen történik. Ezen állatok vizsgálata ökológiai, evolúciós és etológiai okokból is kiemelkedő jelentőségű a tenyésztési programok és fogságban tartott vadállatok szempontjából [24]. A terítékre kerülő trófeás állatok ivarának megállapítása a trófeavadászatok ellenőrzése során is segítséget nyújthat a törvények betartásához, az illegális tevékenységek kimutatásához és megfékezéséhez, és így a populációk megfelelő ivararányának fenntartásához [6].

2.3 A hazai szarvasfélék vadgazdálkodási jelentősége

A szarvasfélék (*Cervidae*) Magyarországon az ökoszisztéma fontos részét képezik, azonban sokszor válnak az orvvadászok, és illegális vadászatok áldozataivá. A gímszarvas, a dámszarvas és az európai őz a kontinens olyan leggyakoribb vadon élő fajai közé tartoznak, melyeket kiváló minőségű húsupért és értékes agancs trófeájukért vadásznak és a kultúra szerves részét is képezik, ősi történetek és legendák szereplőiként („Csodaszarvas monda”) [6].

A gímszarvas (*Cervus elaphus*) világszerte elterjedt, főként a legelőkhöz és rétekhez közeli erdőket választják életterükknek, emellett kedvelik a folyók árterei melletti élőhelyeket [25, 26]. Magyarországon főként az északi területeken és a Dunántúlon fordulnak elő (1. ábra). Az Országos Vadgazdálkodási Adattár (OVA) jelentése szerint a 2022/2023-as vadászati évben az állomány létszáma 128 ezer példány volt, melyből 81 141 került terítékre [27]. Az európai dámszarvas (*Dama dama*) a gímszarvasnál általában kisebb termetű és agancsa különleges formájú, lapát alakú, amely igen kedvelt trófeává teszi [28]. Bár betelepítések révén világszerte elterjedt [29], a három hazai faj közül ez fordul elő a legkisebb számban Magyarországon (1. ábra). A 2022/2023-as vadászati évben csaknem 46 ezer volt a dámszarvas létszáma, az ebből történt kilövések száma pedig 20 638 egyedre tehető [27]. Hasonlóan a gímszarvashoz, a dāmivad húsa és trófeája is kimagasló értéket képvisel, ezért is vadásszák a fajt nagy számban. A Magyarországon élő szarvasfélék közül az európai őz (*Capreolus capreolus*) rendelkezik a legnagyobb állománnyal (1. ábra), a 2022/2023-as vadászati évben közel 370 ezer példányszámmal, az ebből történt kilövések száma pedig a 109 423 egyedet is elérte [27]. Az európai őz az északi félteke legkisebb vadon élő kérődző faja [30].



1. ábra: A hazai agancssal rendelkező vadon élő fajok megoszlása [27]

A dámszarvas, a gímszarvas és az őz is szerepel az 1996.évi LV. törvényben, mely a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadászatról szól. A törvény előírja, hogy mely területeken, milyen eszközökkel és módszerekkel, milyen fajú, ivarú és számú állat vadászata engedélyezett; kizárólag vadászati idején, vadászati engedéllyel rendelkező személy által [31]. Ha a kilövés nem a fenti szempontok szerint valósul meg, akkor a tevékenység orvvadászatnak minősül, mely sajnos Magyarországon is jelen van [32, 33]. Az orvvadászat óriási veszteséget okoz az állatpopulációkban és a természetben is: anyagi károkat a hús és a trófea révén, az ezekkel való illegális kereskedelem pedig járványokhoz és zoonózisokhoz vezethet, valamint a hivatásos vadászok munkáját is megnehezíti [34, 35]. Az illegális vadászat ellen azonban nehéz fellépni és sokszor problémás bizonyítékot szerezni annak igazolására, hogy az adott állat vadászás áldozata lett [36].

2.4 A szarvasfélék illegális vadászatának megfékezése a genetika segítségével

Az igazságügyi állatgenetikai vizsgálatok során biológiai minták genetikai analízisével próbálják kimutatni, hogy történt-e az adott faj, egyedre érintő illegális tevékenység. Az orvvadászat [36], az illegális kereskedelem [37, 38] és a trófeákkal kapcsolatos visszaélések a *Cervidae* családba tartozó fajok elleni leggyakrabban előforduló bűncselekmények. Az esetek megoldásához számos markert használnak a vizsgálatok

során, melyet az adott üggyől függően a fajok meghatározására [39–42], egyedi azonosításra [32, 43, 44], vagy ivari elkülönítésre [45] alkalmaznak.

A gímszarvas, dámszarvas és európai őz vadászata során felmerülhetnek olyan törvénybe ütköző esetek, melyek során a bemutatásra vagy leadásra kerülő egyedek nem az akkor éppen engedélyezett ivarú állatokból kerülnek terítékre [46, 47]. Az ilyen jellegű gazdasági károkozások utólagos ellenőrzése és ezek kapcsolása a krotáliával ellátott, zsigerelt tetemekhez hagyományos módszerekkel, még a hatósági vizsgálódás során is, csak vitatható módon és eredményességgel történhet meg [48]. Ezen módszerek helyett a DNS alapú ivarmeghatározás segíthet a vadvilág ellen elkövetett ügyek megoldásában és az illegális vadászatot folytató személyek megfékezésében. Hasonló célból már 25 évvel ezelőtt megkezdődtek a DNS alapú kutatások külföldön az agancssal rendelkező vadonélő fajok ivari azonosítására [49].

2.5 Genetikai vizsgálatok szarvasfélék ivarazonosítására

A szarvasféléknél számos okból hasznos és fontos lehet az ivar meghatározása. A populáció felépítésének ismerete kulcsfontosságú információkat tartalmaz a konzervációbiológia számára, ennek segítségével ugyanis könnyebben és pontosabban befolyásolható az állatfajok egyedszáma a rájuk vonatkozó vadászati szabályok megállapításával és esetleges módosításával. A populációkon belüli ivararányok ismerete segíthet meghatározni az állatok szaporodásának mértékét [50] és lehetséges túlszaporodásuk [4, 51, 52] vagy éppen az állományuk csökkenésének [12, 13, 53] okait. Feljegyeztek olyan egyedi eseteket is, melyek során az állat ivarát csak genetikai vizsgálatokkal lehetett pontosan meghatározni, ez ugyanis a vizsgált őzek külső jegyei alapján egy veleszületett rendellenesség, a hermafroditizmus következtében nem volt pontosan megállapítható [54, 55].

A gím- és dámszarvasban, valamint európai őzben végzett eddigi ivari elkülönítésre irányuló kutatásokban hím specifikus, Y-kromoszómás markereket mutattak ki, belső kontrollként pedig autoszomális, vagy csak X-kromoszómához kötődő markereket alkalmaztak (1. táblázat). Y-kromoszómás markerként legtöbbször egyedül az SRY gént alkalmazták [3, 53–57], vagy az Amelogenin Y-al együtt [6], vagy néhány esetben utóbbit csak önmagában [58–60]. Kontrollként több kutatás során Amelogenin X-et használták [6, 58–60], de alkalmazták a ZFX gént [57], a BMC 1009 mikroszatellitát [3] vagy a Cytb markert is [51]. Ivardetektálás céljából a *Cervidae* családba tartozó egyéb fajokban is

végeztek hasonló markerekkel és módszerekkel számos kutatást az elmúlt két évtizedben, az 1. táblázatban szereplő adatok alapján.

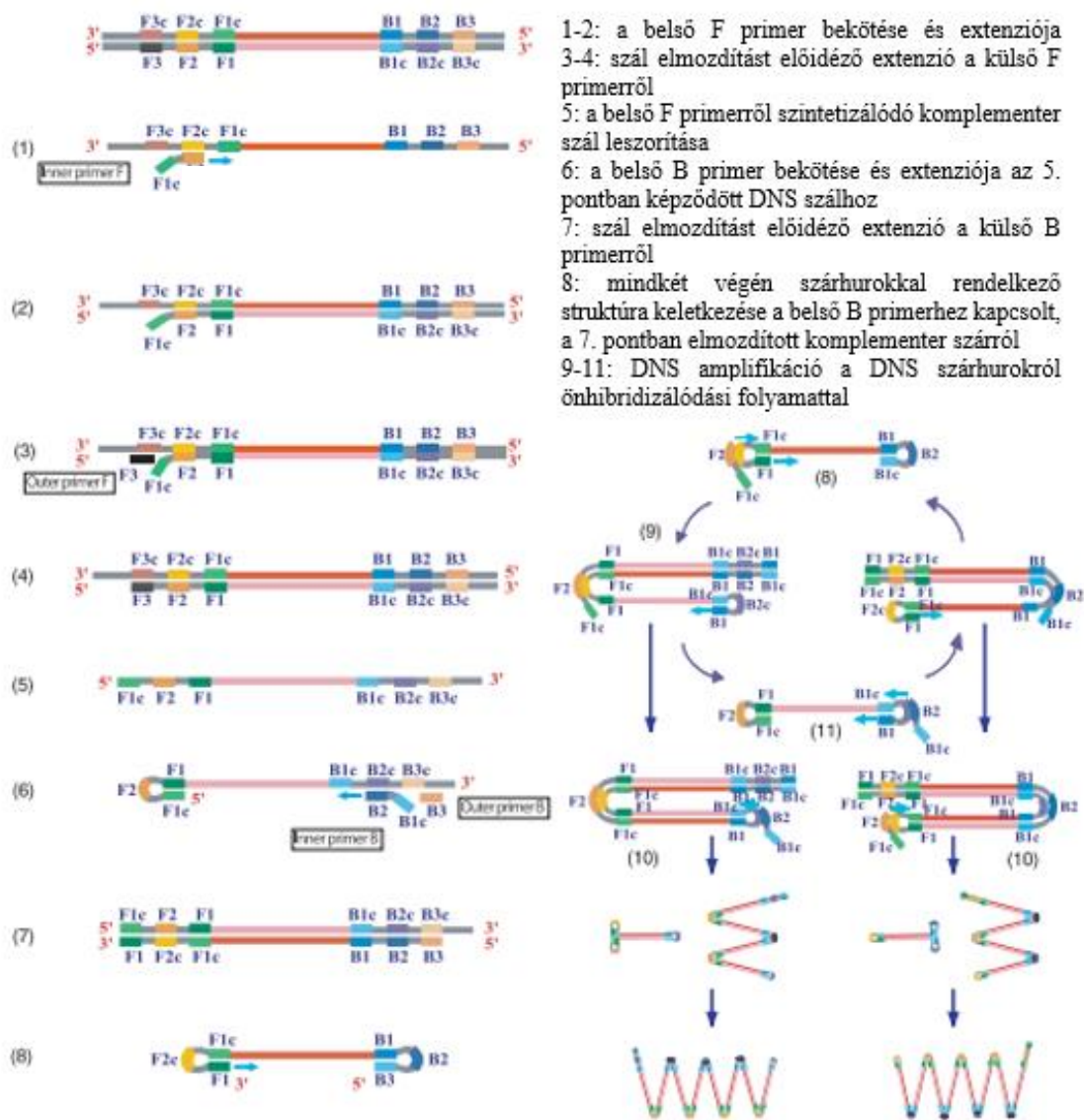
1. táblázat: Genetikai ivarazonosítási vizsgálatok szarvasfélékben

Vizsgált markerek	Módszer	Vizsgált fajok	Referencia
BRY.1, BRY.2, BRY.3	Southern, northern, dot blot	dámszarvas	[61, 62]
SRY, BMC 1009 mikroszatellita	PCR	gímszarvas	[3]
SRY	PCR	szikaszarvas	[51]
		vapiti, jávor- és fehérfarkú szarvas	[49]
		európai őz	[54–56]
		szibériai őz	[52]
		víziőz	[63]
		fehérfarkú szarvas	[64]
ZFX, ZFY	PCR	jávor- és fehérfarkú szarvas	[65]
		apró pézsmaszarvas	[12]
		fehérfarkú szarvas	[66]
Amelogenin X és Y	PCR	szikaszarvas	[50]
		gímszarvas	[58]
		dám-és gímszarvas, európai őz	[59]
		hegyi kecske, jávor-, őszvér- és rénszarvas	[67]
		gímszarvas	[60]
		vapiti	[68]
		kaukázusi gímszarvas	[69]
		japán kecskeszarvú zerge, szikaszarvas	[70]
Amelogenin X és Y, ZFX, ZFY	PCR	hosszúfarkú gorál, szibériai őz, kecske, víziőz, pézsmaszarvas	[17]
SRY, DBY	PCR	gímszarvas	[53]
DBY	PCR	líra- és disznószarvas	[71]
X és Y kromoszóma	Zoo-FISH	dámszarvas	[16]
SRY, ZFX	PCR	szikaszarvas	[4]
		dám- és gímszarvas	[57]
SNP-k	GBS (genotyping-by-sequencing)	gímszarvas	[13]
		őszvérszarvas	[15]
SRY, ZFX, ZFY	PCR	őszvér- és fehérfarkú szarvas	[5]
SRY, Amelogenin X és Y	PCR	mocsári-, számbár-, pettyes-, muntyák- és disznószarvas	[13]
		dám- és gímszarvas, európai őz	[6]

2.6 Hurok által közvetített izotermikus sokszorosítás (LAMP)

Ivarazonosítási vizsgálatok alapja lehet a japán Eiken Chemical cég által 1998-ban kifejlesztett hurok által közvetített izotermikus sokszorosítási (*Loop-mediated isothermal AMPlification, LAMP*) módszer. Ezzel az egyféle hőmérsékleten zajló reakcióval PCR készülék és elektroforetikus berendezés nélkül is megvalósítható az adott DNS szakasz sokszorosítása, illetve kimutatása [8]. A klinikai diagnosztikában főleg humán patogének detektálására alkalmazott eljárást számos állatfajban is használják fertőzések azonosítására, valamint faj- és ivar-meghatározásra is [11].

A célszekvencia amplifikálásához négy specifikus primer szükséges, melyek hat különböző helyet képesek felismerni a szekvencián (2. ábra). A két belső primer, a FIP (forward inner primer: F1c+F2) és a BIP (backward inner primer: B1c+B2) két-két különböző szekvenciát tartalmaz, melyek komplementerek a cél DNS szakaszon belül az értelmes és néma szálak szekvenciáival. Ezzel ellentétben a két külső primer (forward outer primer: F3, backward outer primer: B3) a célszekvencia két szélére köt. A reakcióhoz speciális enzimek használhatóak, például *Bst*, *Bsm* vagy *Taq* polimerázok. A belső primerek bekötése után a polimeráz egy komplementer szálát szintetizál a célszekvenciáról, melyet a külső primerekről szintetizálódó szál leszorít. Ez a szál leválasztás (*strand displacement*) a LAMP polimerázok egyik fontos tulajdonsága, mely lehetővé teszi a denaturációs hőmérséklet elhagyását. A speciális primerszekvenciáknak köszönhetően a szintetizált szálak a leválás után súlyzó alakot formáznak, két végük behajlik és önhibridizálódás következik be. A keletkező hurkokra ismét bekötnek a belső primerek, melyeket az enzim a külső primerektől indulva felnyit és a meglévő szálát tovább hosszabbítja (2. ábra). A reakció során több különböző méretű hajtúhurok, szárhurok és összetett hurokstruktúra jön létre, melyek mind a célszekvencia szerint épülnek fel [8, 19, 72, 73].



2. ábra: A LAMP technika működési elve (2013 Hirayama)

A LAMP technika felveszi a versenyt a PCR-rel gyorsaságban, szenzitivitásban és specificitásban is [8]. A reakció időigénye 20-60 perc [8, 19, 72, 74–76], amely tovább csökkenthető további, úgynevezett loop primerekkel. Ebben az esetben négy helyett hat primer amplifikálja a célszekvenciát [77–79], így hamarabb képes akár 10^9 -szeresére növelni az amplikonok mennyiségét [80]. Ezek továbbfejlesztésével hoztak létre olyan enzimeket melyek még érzékenyebbek, gyorsabbak és képesek RNS-t és DNS-t egyaránt sokszorozítani, ezért alkalmasak a reverz transzkripció polimeráz-láncreakció (RT-PCR) mintájára RT-LAMP reakciókat elvégezni [81, 82]. A rendszer érzékenysége szintén nagyon fontos kritérium a módszer használatakor, összehasonlítva a hagyományos PCR technikával kisebb mennyiségű biológiai minta elegendő a sikeres vizsgálathoz [20, 76, 79, 81, 83–87]. Bár a magasfokú szenzitivitás miatt könnyen kontaminálható a reakcióközeg, a

többszörös primer pár használata miatti fokozott specifikusság és az ún. *single tube* reakciónak köszönhetően a szennyeződés veszélye is lecsökken [77–79, 87–89]. További előnyei a költséghatékonysága, egyszerű felhasználhatósága és alacsony eszközigénye [10, 90], mivel a reakció végbemeneteléhez csak egy állandó hőt fenntartó zárt rendszer szükséges [8]. Mivel a LAMP technika kevésbé érzékeny a PCR-t gátló anyagokra, sok eljárás alkalmazza az ún. „direkt amplifikációt”, azaz a mintából kinyert DNS azonnali, tisztítás nélküli felhasználását a reakcióközegben, mely szintén elősegíti a helyszínen történő mintavételezés könnyebb kivitelezhetőségét [9, 10, 24].

A LAMP reakció termékeinek detektálása történhet szabad szemmel, interkaláló festékek vagy pH indikátorok segítségével, turbiditás mérésével, illetve agaróz gélelektroforézissel [74, 91, 92], amely az elektroforézis kivételével nem igényel újabb lépést, már a PCR csőben, a reakció végbemenetele során detektálható [20, 85]. A LAMP az egyszerűsége miatt lényegesen mobilisabb is, mint egyéb módszerek, lehetővé téve a mintavételezés helyén történő vizsgálatot [10, 24, 85, 88].

3 CÉLKITŰZÉSEK

- A Magyarországon előforduló szarvasfélék zsigerelt tetemeinek, illetve egyéb biológiai anyagmaradványainak helyszíni DNS-alapú ivar-ellenőrzésének kidolgozása egy, a célzott fajokra univerzális genetikai teszttel.
- *In silico* és *in vitro* vizsgálatokkal bizonyítani szeretnénk, hogy egyes Y-kromoszómás génszakaszok alkalmasak arra, hogy univerzális primerek tervezésével egységesen is lehetséges dámszarvasra, gímszarvasra és őzre a LAMP (*loop-mediated amplification*) módszer ivarhatározására irányuló kifejlesztése.
- Olyan genetikai módszer kidolgozása, amely rövid időn belül kivitelezhető minimális és kisebb értékű laborműszer (pl. hordozható termosztát) és eszköz (reagens csövek, pipetta) segítségével.
- Olyan munkafolyamat kialakítása, amely lehetővé teszi a minta lehető legegyszerűbb és leggyorsabb, idő- és költséghatékony helyszíni vizsgálatát (direkt amplifikáció) a hazai szarvasfélék zsigerelt tetemeinek helyszíni ivar-ellenőrzése céljából.
- A reakciót korlátozó tényezők, úgymint a specifikusság, keresztreakciók, érzékenység, megbízhatóság és egyszerű kezelhetőség felmérése.

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Vizsgálati minták

A 2020-2023 közti időszakban Magyarország több vadászterületéről regisztrált kilövések során vadászatra jogosult személyek által elejtett őz, gím- és dámszarvas egyedek izomszövetéből izolált összesen 72 DNS-minta (fajonként 24-24, 50-50%-os ivari eloszlásban), illetve fajonként és ivaronként 2-2 izomszövet minta (2.táblázat, 3.ábra).



3. ábra: A kutatásban felhasznált minták száma származási helyenként

A tisztított DNS mintákat az Állatorvostudományi Egyetem Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézete biztosította a vizsgálatokhoz, illetve az Intézet genetikai laboratóriumában történt a további izomminták feldolgozása és a genetikai tesztek végzése.

2. táblázat: A vizsgált minták faj-, és ivar szerinti megoszlása

Ivar/Faj	Gímszarvas	Dámszarvas	Európai őz
Nőstény	12 DNS + 2 húsminta	12 DNS + 2 húsminta	12 DNS + 2 húsminta
Hím	12 DNS + 2 húsminta	12 DNS + 2 húsminta	12 DNS + 2 húsminta

4.2 Markerszelekció és primerek tervezése

Az erősen konzervált Y-kromoszómás ivart meghatározó Y gént (SRY) teszteltük abból a szempontból, hogy a hazai szarvasfélékben ugyanazokkal a megfelelően tervezett, univerzális primerekkel alkalmas-e a hím ivar kimutatására. Reakció kontrollként olyan genetikai markert kerestünk, melyek mindkét ivarban jelen vannak és szintén nagy homológiát mutatnak a rokon fajokban. Ehhez a Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (NCBI) GénBank adatbázisból (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) letöltöttük mindhárom fajban az elérhető SRY és Amelogenin X gén (AmelX) szekvenciákat (3. táblázat).

3. táblázat: SRY és Amelogenin X szekvenciák a három fajban

Ivar/Faj	Gímszarvas	Dámszarvas	Európai őz
AmelX	FJ946989.1 KJ542362.1 XM_043895580.1	KJ542361.1	KJ542360.1
SRY	DQ888692.1 GQ272385.1 GQ272386.1 EF100133.1 AY244497.1 AY244499.1 EF062527.1	DQ888701.1	DQ888700.1 EU402954.1 HG326979.1 KJ558346.1 MW800126.1

A letöltött szekvenciákat MEGA X szoftverrel illesztettük egymáshoz, hogy olyan konzervált régiókat találjunk, melyek megegyeznek, illetve nagyon hasonlóak őzben, dámban és gímszarvasban [93]. Ezen szakaszokra a LAMP oligonukleotidok (primerek) tervezést *in silico* vizsgálattal végeztük a PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co., Ltd., Japan; <http://primerexplorer.jp/e/>) programmal a DQ888692 és KJ542362 szekvenciák alapján. Az SRY gént a hímivarú egyedek azonosítására, az Amelogenin X gént pedig reakció kontrollként használtuk. A primerek szintetizálása és tesztelése a 4. táblázatban szereplő adatok alapján történt.

További fajok azonos génszakaszain további egyezéseket, illetve hasonlóságokat kerestünk a GenBank-ban tárolt szekvenciák alapján, hogy a tervezett primereink lehetséges felhasználási területeiről információt kapjunk.

4. táblázat: A tervezett primerek adatai

Primer neve	Primer típusa	Szekvencia (5'-3')	Koncentráció (μM)
SRY-F3	Forward outer	CCAGCCGAGATACAACAACA	0.2
SRY-B3	Backward outer	GGGATTCTCTAGAGCCACCT	0.2
SRY-FIP	Forward Inner Primer (F1c+F2)	CACACTGATCATTTGCGCTGCG- AATCCTCTCGCCTTTGGGAA	1.6
SRY-BIP	Backward Inner Primer (B1c+B2)	AATGTTAGGGAGAGCGGCCAG- CGTTCACGAGACCACACAA	1.6
SRY-LF	Loop forward	GTCTGTGAACAAGGAAGAGGCT	0.8
SRY-LB	Loop backward	AAGCGACCCATGAACGCCTTC	0.8
AMELX-F3	Forward outer	GAACCCATGGGTGGATGG	0.2
AMELX-B3	Backward outer	GGTTTGGCTGGTGGTGT	0.2
AMELX-FIP	Forward Inner Primer (F1c+F2)	TGATGAGGCTGCAGGGCG- AAATCATTCCCGTGGTGTCC	1.6
AMELX-BIP	Backward Inner Primer (B1c+B2)	CATGGTGCCAGCTCAGCAGC- GGGTTGGAGTCATGGAGTGT	1.6

4.3 Markerek szekvenálása

Az SRY és AmelX génszakaszok szekvenálása Sanger-módszer segítségével történt, hogy megállapíthassuk, hogy valóban a megfelelő génszakaszok amplifikálódtak-e a három fajban. A két marker amplifikálását a lókuszt-specifikus F3/B3 primerekkel végeztük monoplex PCR reakciókkal.

A PCR reakciók összetétele az alábbi volt: 5 μl DreamTaq™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5 μM F3 és 0.5 μM B3 primer, 1 ng DNS templát, és PCR minőségű víz a 25 μl végtérfogat eléréséig.

A reakciót az AppliedBiosystems 2720 Thermal Cycler készülékkel végeztük a következők szerint: kezdeti denaturáció 95°C-on 10 másodpercig, majd 36 cikluson keresztül denaturáció 94°C-on 20 másodpercig, annealáció 54°C-on 20 másodpercig, és további szekvenáló reakciók 72°C-on 20 másodpercig.

A PCR termékek minőségét GelGreen™ Nucleic Acid Stain (10.000x in DMSO, Biotium, Fremont, CA, USA) interkaláló festék segítségével, 2% agaróz gélen ellenőriztük. A DNS tisztítása a GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) használatával történt. A DNS-szálak szekvenálása a BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a hozzá tartozó protokoll szerint ment végbe. A szekvencia detektálása az ABI Prism 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) segítségével zajlott, a gyártó által leírt protokoll szerint. A szekvencia analízisek a Sequencing Analysis Software 5.1 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) használatával történtek, az egymáshoz való illesztésük pedig a Sequencher™ 5.4.6 (Gene Codes Corp, Ann Arbor, MI, USA) szoftverrel ment végbe.

4.4 Molekuláris genetikai vizsgálatok kidolgozása, tesztelése a célfajokban

A tervezett primereket ivarspecifititás szempontjából vizsgáltuk az ismert fajú és ivarú kontroll mintákon (fajonként 2-2 db) LAMP reakciókkal, melyeket az Amelogenin X és SRY génekre külön-külön az alábbiak alapján állítottunk össze: 3 µl 10X Isothermal Mastermix (ISO-004) Puffer (OptiGene, Horsham, West Sussex, UK), 0,3 µl Betaine, 0,2 µl FIP/BIP primerek (40 µM stock), 0,2 µl F3/B3 primerek (5 µM stock), 0,2 µl LF/LB primerek (20 µM stock, ezeket csak az SRY reakciókban használtuk), 1 ng DNS templát, PCR minőségű víz az 5 µl végtérfogat eléréséig. A PCR csöveket PCR készülékbe helyeztük 65°C-on 60 percre. Az esetleges szennyeződések kimutatása céljából minden PCR összemérésnél használtunk egy DNS-t nem tartalmazó reagens kontrollt (RK).

4.5 A reakciótermékek kimutatása

Az amplifikációk eredményének elbírálására két módszert is használtunk, egyrészt GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (10000x stock, Biotium, Fremont, CA, USA) interkaláló festéket 1:10 (v/v) arányban hígítottunk nukleáz mentes vízzel, majd ebből 1 µl-t hozzáadtuk minden reakcióhoz és kék fény alatt értékeltük az eredményt. Másrészt 2%-os agaróz gélen, szintén GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (10000x stock, Biotium, Fremont, CA, USA) interkaláló festékkel 15 perces elektroforézis idővel vizsgáltuk az eredményeket áteső kék fényben (Glite 900 BW Gel Scanner).

4.6 A módszer megbízhatóságának felmérése és optimalizálása

A módszerünk megbízhatóságát összesen 72 db (fajonként és ivaronként 12 db) ismert fajú és ivarú tisztított, 1 ng mennyiségű DNS mintán teszteltük. A mintákból Amelogenin X és

SRY génekre készített LAMP reakciókat is lefuttattunk a 4.4-es fejezetben leírtak alapján. Az optimális reakcióidő felmérése céljából 6-6 mintán a két markerre külön összeállított reakciócsöveket (a 4.4-es fejezetben leírtak alapján) PCR készülékbe helyeztük 65°C-on 35, 40, 45, 50, 55, illetve 60 percre.

4.7 Direkt amplifikáció megvalósítása

A minták egyszerűsített, helyszíni vizsgálatához a direkt amplifikáció (a DNS tisztítási lépés kihagyása) megvalósításának lehetőségeit vizsgáltuk.

Fajonként 4-4 húsmintába (két hím és két nőstény) steril fa pálcikát (fogpiszkálót) szúrtunk, melyet a mintában megforgatva utána 200 µl 25 mM-os NaOH oldatot tartalmazó mikrocentrifuga csőbe tettünk. Az oldatban lévő mintát ezután 10 másodpercig vortexeltük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A NaOH oldat DNS koncentrációját Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) segítségével mértük. A DNS-t tartalmazó NaOH oldatokból steril vízzel ötszörösen és tízszeresen hígított mintákat is készítettünk, a Lamp reakciókhoz az oldatok felülúszójának 1 µl-ét használtuk DNS templákként. A mintavételt minden mintából (pár napos eltéréssel) még kétszer megismételtük, egyszer egy másik személy által, egyszer pedig műanyag pálcika használatával annak eldöntésére, hogy felmérjük a kapott eredmények ismételhetségét, illetve, hogy azokat mennyiben befolyásolja a mintavételt végző személy és a mintavételi eszköz anyaga.

A felülúszó mintákból Amelogenin X és SRY génekre a LAMP reakciókat a 4.4-es fejezetben leírtak alapján állítottuk össze. A direkt LAMP reakcióhoz 65°C-on, 35 és 55 perc közötti időkre helyeztük a mintákat a PCR készülékbe. Az eredmények detektálására a 4.5-ös fejezetben ismertetett kimutatási módszert alkalmaztuk.

A módszer szenzitivitását az alapján állapítottuk meg, hogy a valódi pozitív eredmények milyen arányban jöttek ki helyesen, vagyis, hogy a mintáink mekkora valószínűséggel mutattak pozitivitást az AmelX reakciók során és ugyanígy a hím eredetű mintáink a SRY-ra történő vizsgálatok alatt. A LAMP specificitásánál azt vizsgáltuk, hogy a tesztel milyen arányban sikerült azonosítanunk a valódi negatív mintákat, tehát a mi kutatásunkban mekkora valószínűséggel lettek a nőstény minták SRY-ra vizsgálva negatívak.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Primer tervezés

A három vizsgált fajban az elérhető célszekvenciák illesztésével sikerült olyan SRY génszakaszt találni, amely 100% hasonlóságot mutat gím- és dámszarvasban, illetve az előbbi két fajjal történő összehasonlításban 93-100% hasonlóságot őzben. A kiválasztott Amelogenin X génszakasz mindhárom fajban megegyezik (4. ábra). Az SRY génszakaszra csak egyféle primer kombinációt generált a primer tervező program a négy alap primerre, ugyanakkor 100 különböző loop-primer kombinációt. Az Amelogenin X génszakasz esetén azonban három különböző primer kombinációból (négy primerrel) tudtunk választani (az első lehetőséget választottuk) (5. ábra). A tesztelések során azt találtuk, hogy amíg az AmelX génszakasz négy primerrel vizsgálva is megbízható módon kimutatható, addig az SRY génszakasz hat primerrel vizsgálva (a loop-primerek hozzáadásával) ad nagyobb hatékonysággal valós eredményt.

A más országokban előforduló szarvasfélékben lévő megegyező génszakaszokra irányuló *in silico* tesztelés eredménye alapján a konzervatív génszakaszokra tervezett LAMP-primereink más fajokban is magas fokú homológiát mutatnak (5. táblázat).

5. táblázat: Szekvencia homológiák különböző szarvasfélékben a gímszarvas megfelelő génszakaszaival való összehasonlításban

Faj	SRY homológia	AmelX homológia
Vapiti (<i>Cervus canadensis</i>)	98,99-100%	94,3-100%
Fehérfarkú szarvas (<i>Odocoileus virginianus texanus</i>)	97,46%	99,48%
Rénszarvas (<i>Rangifer tarandus</i>)	97,97%	93,26-99,48%
Jávorszarvas (<i>Alces alces</i>)	98,99%	93,2-99,45%
Szikaszarvas (<i>Cervus nippon</i>)	100%	93,75%
Líraszarvas (<i>Rucervus eldii</i>)	99,49-100%	
Fehérajkú szarvas (<i>Cervus albirostris</i>)	100%	
Számbárszarvas (<i>Rusa unicolor</i>)	99,49%	
Kasmírszarvas (<i>Cervus hanglu</i>)	99,49%	
Dávid-szarvas (<i>Elaphurus davidianus</i>)	99,49%	
Disznószarvas (<i>Axis porcinus</i>)	99,49%	
Kínai muntyákszarvas (<i>Muntiacus reevesi</i>)	98,48%	
Kontyos muntyákszarvas (<i>Muntiacus crinifrons</i>)	98,48%	
Bóbitás szarvas (<i>Elaphodus cephalophus</i>)	98,48%	
Öszvérszarvas (<i>Odocoileus hemionus</i>)	97,46%	

5.2 Markerek ellenőrzése

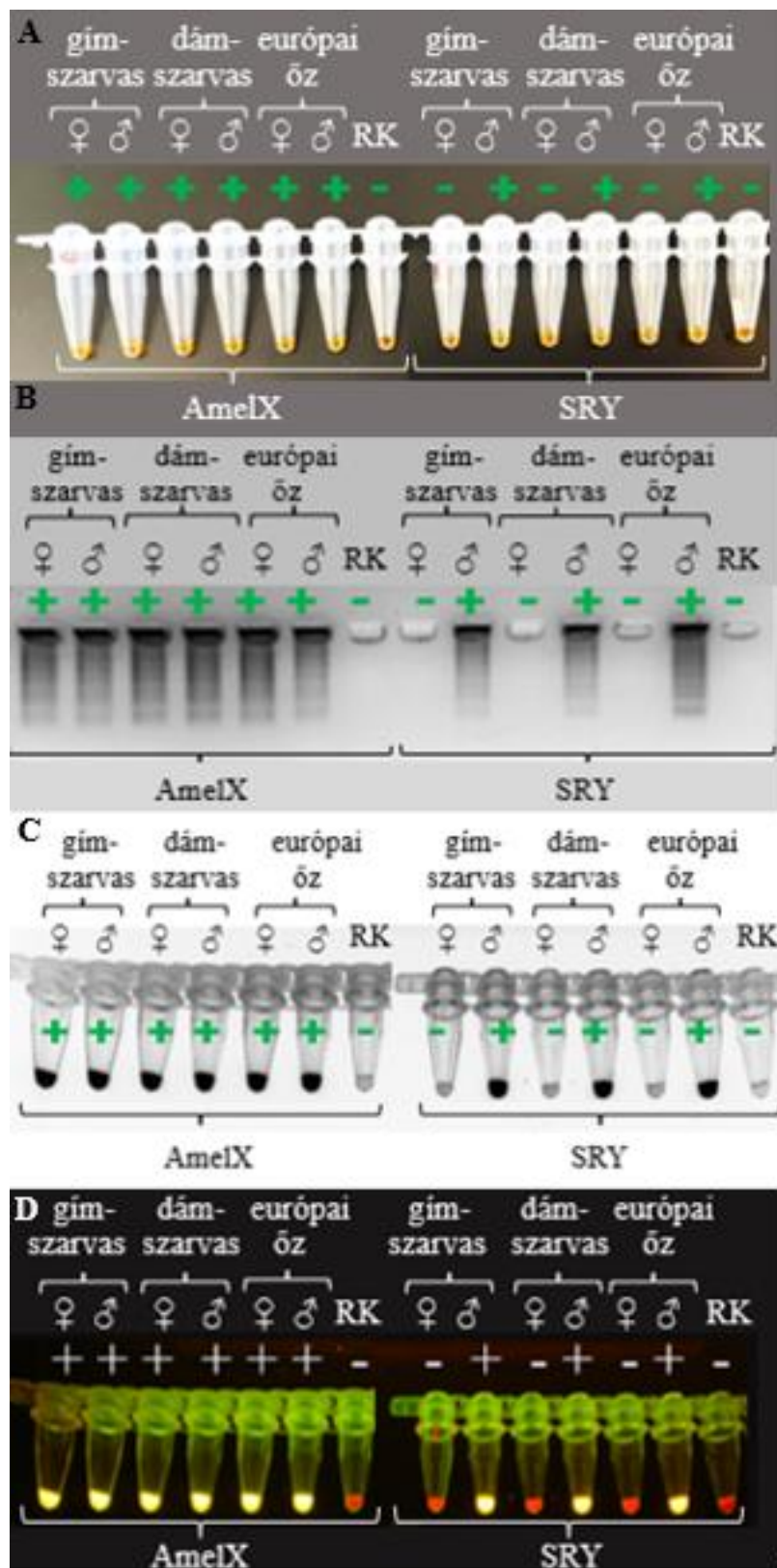
Az SRY és AmelX markerek sokszorosítása hagyományos, monoplex PCR reakcióval történt ismert ivarú őz, gím- és dámszarvas mintákon. Az SRY marker amplifikálásával a hím eredetű minták esetén a vártak megfelelően egy terméket kaptunk, míg a nőstény mintákban nem jelent meg PCR-termék. Az AmelX marker sokszorosításával mind a nőstény, mind a hím mintákból kimutatható volt a megfelelő hosszúságú specifikus génszakasz. A monoplex PCR reakciók termékeit szekvenálással ellenőriztük és a kapott bázissorrendeket a GenBank-ban található szekvenciákkal hasonlítottuk össze, melynek eredményeként a megfelelő fajhoz és ivarhoz tartozó szekvenciákkal 100%-os homológiát kaptunk. A három fajból kimutatott Amelogenin X és SRY génszakaszokat feltöltöttük az NCBI GenBank adatbázisába az OR515036-OR515041 azonosító kódokkal.

5.3 LAMP reakciók kidolgozása

A három cél faj összesen 72 mintáján az AmelX és SRY marker kimutatására párhuzamosan elvégzett LAMP reakciók minden esetben a megfelelő, helyes eredményt hozták. Az Amel X marker mindhárom fajban, hím és nőstény ivarban is pozitív eredményt adott 72 mintából. Az SRY marker kimutatására irányuló reakciók mindhárom fajban minden esetben pozitív eredményekkel zárultak a hím mintáknál, illetve negatív eredményekkel a nőstény eredetű mintáknál.

A reakció idejének optimalizálása céljából fajoként négy, összesen 12 darab mintánál teszteltük a LAMP módszert 35, 40, 45 és 50 perc alatt elvégzett vizsgálatokkal is. Az Amel X marker detektálására minden mintánál már a 40 perc is elegendőnek bizonyult, ugyanakkor az SRY marker kimutatása a két hím ivarú európai őzmintánál több időt igényelt, 45 illetve 50 percet.

A reakciók eredményének interkaláló festékkel való vizsgálata megfelelően érzékenynek és megbízhatónak bizonyult az agaróz gélen történő kimutatással való összehasonlításban (6. ábra).



6. ábra: Fajonként egy nőstény és egy hím állat mintájából az AmelX és SRY markerek LAMP módszerrel történő sokszorozásának kimutatási lehetőségei. A: szabad szemmel, B: agaróz gélen, C és D: interkaláló festékkel kék fény megvilágítással két különböző megjelenítéssel (♀ = nőstény minta, ♂ = hím minta, + = valós pozitív, - = valós negatív, RK = reagens kontroll)

5.4 Direkt amplifikációval végzett reakciók

A LAMP reakciókat direkt amplifikációval, a tisztítási lépés kihagyásával előkészített DNS mintákon is teszteltük. A szövetminták NaOH oldatban történő 10 perces inkubációja után az oldat DNS-koncentrációja 0,04-8,7 ng/μl között változott (6. táblázat). Az azonos mintából származó különböző mintavételeknél a DNS-koncentrációk között nagy volt a szórás. Volt olyan minta, mely az egyik mintavétel után 0,4 ng/μl DNS-t tartalmazott, a következő mintavétel alkalmával pedig már több, mint 20x annyit, 8,7 ng/μl-t. Azonban voltak olyan minták is, melyek a mintavételek után közel azonos mennyiségű DNS-t tartalmaztak és mindhárom alkalommal 1 ng/μl koncentráció alatt maradt a DNS tartalmuk.

6. táblázat: LAMP reakciók eredményei direkt preparációval előkészített DNS-ből fajoként négy mintára (♀: nőstény, ♂: hím, X: AmelX reakció, Y: SRY reakció, sötétzöld háttér: valós pozitív, világoszöld háttér: valós negatív, piros háttér: fals pozitív/negatív, Ce: gímszarvas, Dd: dámszarvas, Cc: európai őz)

Minta	Eredmények a különböző koncentrációk függvényében																	
	1. mintavétel						2. mintavétel						3. mintavétel					
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Ce1♀	8,2 ng	5x higitás	10x higitás				8,7 ng	5x higitás	10x higitás				0,4 ng	5x higitás	10x higitás			
Ce2♀	3,5 ng	5x higitás	10x higitás				0,9 ng	5x higitás	10x higitás				1,8 ng	5x higitás	10x higitás			
Ce3♂	1,5 ng	5x higitás	10x higitás				7,9 ng	5x higitás	10x higitás				7,0 ng	5x higitás	10x higitás			
Ce4♂	0,3 ng	5x higitás	10x higitás				2,3 ng	5x higitás	10x higitás				0,9 ng	5x higitás	10x higitás			
Dd1♀	0,5 ng	5x higitás	10x higitás				4,1 ng	5x higitás	10x higitás				4,0 ng	5x higitás	10x higitás			
Dd2♀	0,8 ng	5x higitás	10x higitás				0,42 ng	5x higitás	10x higitás				0,04 ng	5x higitás	10x higitás			
Dd3♂	1,4 ng	5x higitás	10x higitás				3,5 ng	5x higitás	10x higitás				0,4 ng	5x higitás	10x higitás			
Dd4♂	0,4 ng	5x higitás	10x higitás				7,5 ng	5x higitás	10x higitás				5,2 ng	5x higitás	10x higitás			
Cc1♀	1,2 ng	5x higitás	10x higitás				5,6 ng	5x higitás	10x higitás				0,7 ng	5x higitás	10x higitás			
Cc2♀	0,4 ng	5x higitás	10x higitás				2,3 ng	5x higitás	10x higitás				1,8 ng	5x higitás	10x higitás			
Cc3♂	3,3 ng	5x higitás	10x higitás				2,9 ng	5x higitás	10x higitás				0,2 ng	5x higitás	10x higitás			
Cc4♂	0,4 ng	5x higitás	10x higitás				0,9 ng	5x higitás	10x higitás				0,5 ng	5x higitás	10x higitás			

A direkt preparációval előkészített mintákkal (n=12) összesen 216 reakciót végeztünk, melyek közül 186 (86%) végződött helyes eredménnyel, 30 (14%) pedig fals (27 fals negatív, 3 fals pozitív) eredménnyel zárult. Az AmelX és SRY markerekkel mindhárom

fajban, mind a hímek, mind pedig a nőtények esetében is nagyobb arányban kaptunk megfelelő eredményeket tízszeres hígításnál az eredetileg több DNS-t tartalmazó mintákból. A kevesebb DNS-t tartalmazó mintákból az eredeti és az ötszörös hígítás adott megbízhatóbb eredményeket. Más hígításoknál változó arányban előfordultak fals pozitív és fals negatív eredmények is a reakciók során, melyet a 6. táblázat adataiból generált 7. ábra szemléltet a növekvő DNS koncentrációjú minták függvényében a két ivarra elkülönítve.

	AmelX			SRY		
Dd2♀	0,038	0,008	0,0038	0,038	0,008	0,0038
Cc2♀	0,37	0,074	0,037	0,37	0,074	0,037
Ce1♀	0,42	0,084	0,042	0,42	0,084	0,042
Dd2♀	0,426	0,085	0,0426	0,426	0,085	0,0426
Dd1♀	0,52	0,104	0,052	0,52	0,104	0,052
Cc1♀	0,698	0,140	0,0698	0,698	0,140	0,0698
Dd2♀	0,763	0,153	0,0763	0,763	0,153	0,0763
Ce2♀	0,87	0,174	0,087	0,87	0,174	0,0870
Cc1♀	1,19	0,238	0,119	1,19	0,238	0,1190
Cc2♀	1,81	0,362	0,181	1,81	0,362	0,1810
Ce2♀	1,81	0,362	0,181	1,81	0,362	0,1810
Cc2♀	2,3	0,460	0,23	2,3	0,460	0,2300
Ce2♀	3,5	0,700	0,35	3,5	0,700	0,3500
Dd1♀	4,02	0,804	0,402	4,02	0,804	0,4020
Dd1♀	4,14	0,828	0,414	4,14	0,828	0,4140
Cc1♀	5,6	1,120	0,56	5,6	1,120	0,5600
Ce1♀	8,18	1,636	0,818	8,18	1,636	0,8180
Ce1♀	8,7	1,740	0,87	8,7	1,740	0,8700
Cc3♂	0,199	0,040	0,0199	0,199	0,040	0,0199
Ce4♂	0,304	0,061	0,0304	0,304	0,061	0,0304
Dd4♂	0,36	0,072	0,036	0,36	0,072	0,036
Cc4♂	0,376	0,075	0,0376	0,376	0,075	0,0376
Dd3♂	0,422	0,084	0,0422	0,422	0,084	0,0422
Cc4♂	0,542	0,108	0,0542	0,542	0,108	0,0542
Cc4♂	0,91	0,182	0,091	0,91	0,182	0,091
Ce4♂	0,94	0,188	0,094	0,94	0,188	0,094
Dd3♂	1,37	0,274	0,137	1,37	0,274	0,137
Ce3♂	1,48	0,296	0,148	1,48	0,296	0,148
Cc4♂	2,3	0,460	0,23	2,3	0,460	0,23
Cc3♂	2,9	0,580	0,29	2,9	0,580	0,29
Cc3♂	3,3	0,660	0,33	3,3	0,660	0,33
Dd3♂	3,5	0,700	0,35	3,5	0,700	0,35
Dd4♂	5,18	1,036	0,518	5,18	1,036	0,518
Ce3♂	7,04	1,408	0,704	7,04	1,408	0,704
Dd4♂	7,5	1,500	0,75	7,5	1,500	0,75
Ce3♂	7,9	1,580	0,79	7,9	1,580	0,79

7. ábra: LAMP reakciók eredményei direkt preparációval előkészített DNS-ből három ismétléssel és három különböző hígítás után. A számok a reakcióba bevitt DNS tartalmát jelölik nanogrammban (♀: nőstény, ♂: hím, sötétzöld háttér: valós pozitív, világoszöld háttér: valós negatív, piros háttér: fals pozitív/negatív, Ce: gímszarvas, Dd: dámszarvas, Cc: európai őz)

A 7. ábrán zöld háttérrel jelöltük azokat a mintákat, amelyeknél mind a hat reakció helyes eredményt adott (38,9%), világos zölddel pedig azokat, amelyeknél egy fals eredményt kaptunk (38,9%). A sárga, illetve piros háttérszín a minta nevének kettő-, illetve három fals eredményt jelent az adott mintából elvégzett hat reakció közül (19,4% és 2,8%).

Az AmelX reakciók az eredeti DNS mennyiséget tartalmazó minták közül 5,55%-ban, az 5x hígítású mintáknál 2,77%-ban, a 10x hígítású mintáknál pedig 19,44%-ban adtak fals negatív eredményt. Az SRY reakciók az eredeti DNS mennyiséget tartalmazó minták közül 13,89%-ban, az 5x hígítású mintáknál 16,67%-ban, a 10x hígítású mintáknál pedig 16,67%-ban adtak fals eredményt. A tesztek specifitásának kiszámításánál a valós negatívak számának és a valós negatívak és fals pozitívak összegének hányadát vettük figyelembe. Az AmelX reakciók specifitása így 100%, az SRY reakcióké pedig 94,73% lett. A szenzitivitás megállapításához a valós pozitív eredmények számának és a valós pozitívak és fals negatívak összegének hányadát használtuk. Az AmelX reakciók szenzitivitása 91%-nak, az SRY reakciók szenzitivitása pedig 76%-nak bizonyult a direkt amplifikáció megvalósítása során. Összességében a LAMP megbízhatósága a kutatásunk során helyes eredménnyel záruló reakciók és az összes elvégzett vizsgálat számának hányada alapján az AmelX reakcióknál 90,74%, az SRY reakcióknál 81,48% volt.

A direkt amplifikáció reakció idejét is teszteltük fajonként 2-2, összesen hat darab mintával, melyek közül öt mintánál szintén 35 perc már megfelelő volt a pontos eredményekhez mindkét markernél. Az SRY markernél egy hím ivarú európai őz DNS mintánál volt szükséges az 50 perces reakcióidő.

6 KÖVETKEZTETÉSEK

A LAMP technika a humán klinikai diagnosztikában és igazságügyi vizsgálatokban betöltött jelentős szerepe mellett az állatorvosi tudományokban is kiemelkedő [11, 86, 94–97]. Különböző tesztek fejlesztettek és validáltak számos házi- és vadonélő állatokat érintő kórokozó kimutatására, úgymint vírusokra, baktériumokra, gombákra, egysejtűekre és férgekre [11]. Emellett széleskörűen alkalmazható az élelmiszerbiztonság területén fajazonosításra, az állattenyésztésben pedig az ivar detektálására [11].

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy génbanki szekvencia adatok alapján lehetséges olyan X- és Y-kromoszómás génszakaszokat találni, melyek (nagyreszt) megegyeznek a különböző szarvasfajokban, és melyekre univerzálisan alkalmazható LAMP primerek tervezhetők. Az Amelogenin X génre, mint reakciókontrollra tervezett LAMP primerek sikeresen alkalmazhatók voltak mindhárom hazai szarvasfélében, a nőstény és hím kontroll minták tesztelése során minden esetben pozitív eredményt kaptunk. Az SRY génre tervezett LAMP primerek bár az *in silico* vizsgálatok alapján kevésbé tűntek ideálisnak, az *in vitro* tesztekben hatékonyan működtek még őzből származó DNS-mintákon is, ahol több báziseltérés is előfordulhat a primerkötő régiókban.

Az izomszövetekből NaOH oldatos eljárással különböző nagyságrendekben (0,04-9 ng) kinyert DNS mintákból a LAMP módszer (direkt amplifikáció) szintén alkalmas lehet az ivar azonosítására, azonban az eredmények helyességét több tényező is befolyásolhatja. Az egyes mintavételek során tapasztalt koncentrációkülönbségek adódhattak a mintavételi eszköz különböző anyagából (fa-, illetve műanyag pálcika) és a mintavételt végző személyek különböző technikájától. Ezenkívül a minták változó minőségűek voltak és eltérő ideig tároltuk őket a hűtőben, melyek szintén hozzájárulhattak ahhoz, hogy más-más mennyiségű DNS-t sikerült kinyernünk belőlük. Az elvégzett reakciók eredményei alapján azonban azt tapasztaltuk, hogy nem csak a mennyiség befolyásolja alapvetően az eredményeket. Mivel a NaOH-oldatos eljárással a DNS-t csak feltárjuk a sejtekből és a sejttermelékeket nem távolítjuk el, így feltehetőleg a reakcióba bevitt inhibítorként funkcionáló molekulák eltérő mennyisége okozta a reakciók fals negatív eredményeit. Más kutatások is kimutatták, hogy a LAMP módszer bár kevésbé érzékeny az inhibitorokra más PCR-technikákkal összehasonlítva [98, 99], a NaOH-s eljárás során fontos a minimális mennyiségű mintabevitel, ezáltal csökkentve a mintában jelenlévő gátló anyagok koncentrációját, és így a sikertelen vizsgálat esélyét [9, 100]. Mivel a LAMP reakció másik jellegzetessége a magas fokú érzékenysége – amelyet a saját vizsgálati eredményeink is

alátámasztanak –, a néhány fals pozitív eredményt nagy valószínűséggel a minták közti kereszt-kontamináció okozhatta. Figyelembe véve vizsgálataink egyik célját, hogy a módszer alkalmas legyen nagyszámú izomszövet minta egyszerű és megbízható módon történő helyszíni ivarazonosítására, a jelenlegi eredmények alapján a protokoll módosítására, illetve sztenderdizálására van szükség a megfelelő hatékonyság elérése érdekében.

A NaOH-oldatos DNS-kivonási módszer azonban mindenképpen egyszerű és gyors, ugyanakkor költséghatékony módon és extra eszközigény nélkül teszi lehetővé a kinyert DNS LAMP reakcióban történő vizsgálatát [9]. A húsminták ivarazonosítására kifejlesztett módszerünkhöz szükséges teljes idő körülbelül egy óra, beleértve a DNS extrakciót, a LAMP reakciót és a detektálást. Mindkét marker biztonságos kimutatásához elegendő volt 40 perc tisztított DNS-minták esetén, a direkt amplifikálásnál azonban az SRY markerek detektálásához 50 perc volt szükséges. Ez annak lehet köszönhető, hogy míg a sejtek az X-kromoszómás markerből két kópiát tartalmaznak, az Y-kromoszómás markerből csak egyet, így kis mennyiségű bevitt DNS esetén többidőre van szükség a marker kimutatásához. Hasonló ok miatt döntöttünk úgy, hogy a hím ivari marker kimutatásának hatékonyabbá tételéhez szükség van a harmadik (loop) primer pár használatára, amely valóban sikeresebbé tette az előzetes vizsgálatok alapján a reakciót (jelen munka nem tartalmazza ezeket a tesztek).

Figyelemre méltó, hogy a LAMP nem feltétlenül igényel költséges reagenseket vagy elektroforézist az amplifikált termék kimutatáshoz. A reakciók eredményének interkaláló festékekkel való vizsgálata pedig megfelelően érzékenynek és megbízhatónak bizonyult, melyet az agaróz gélen történő detektálás megegyező eredményei is alátámasztanak. Bár az interkaláló festék utólagos hozzáadása a reakció végén egy plusz lépésnek számít és a reakciócsövek ismételt kinyitása a potenciális szennyeződés lehetőségét is magában foglalja [88, 89], kellő körültekintéssel végezve a módszer nem okoz problémát.

A konzervatív DNS-szakaszokra tervezett univerzális primer-rendszerrel kidolgozott módszerek több, különböző emlősfaj változatos biológiai mintájából történő ivarvizsgálatát teszik lehetővé [101]. Az általunk tervezett primerek egységesen használhatóak a Magyarországon előforduló három agancsos vadon élő fajra: a gímszarvasra, dámszarvasra és európai őzre. A kidolgozott módszerünk az *in silico* tesztelés alapján más országokban előforduló szarvasféléken is alkalmazható lehet a jövőben az állományok *in vitro* tesztelése után.

Az élelmiszeriparban szintén hasznos információ lehet a feldolgozandó szarvasfélék ivarának ismerete. A hazánkban terítékre kerülő vadhús értékesítése során nagyobb hányadban külföldi export a cél, a többi saját felhasználásra és vendéglátó egységekhez, hentesekhez kerül. Bár a vadhús fogyasztása nagyon egészséges, hazánkban mégis csekély szerepet tölt csak be az emberek étkezésében [102, 103]. Ennek egyik oka a magas ára mellett, hogy a hím állat húsa a mirigyeiből kibocsátott szag miatt nem olyan jó, a párzási időszak körül elejtett egyedek húsa erős, kellemetlen szagú. Ez viszont, az elejtett állat ivarának tudatában, megfelelő érlelés és pácolás során tompítható, finomítható. A fiatal és a nőtény állatok húsa penetráns szagoktól mentes, általában finomabb és jobb minőségű. Ezen okokból adódóan az ivarra ellenőrzött termékek nagyobb kelendőséget mutathatnak a külföldi és belföldi piacokon egyaránt (pl. igényes felvásárlók, top kategóriás éttermek [45]).

A genetikai ivarhatározás igazságügyi vizsgálatokban szarvasféléknél még csekély számban van jelen hazánkban. A megfelelő validálási vizsgálatok után a kidolgozott módszerünk alkalmas lehet a populációgenetikai és vadgazdálkodási vizsgálatok mellett igazságügyi célú ivardetektálási vizsgálatokra is. Kutatásunk elsődleges célja egy olyan módszer fejlesztése volt, amely a Magyarországon élő szarvasfélék vadászatával kapcsolatban lehetségesen előforduló bizonyos illegális tevékenységek kimutatását is lehetővé teszi. A kérdéses esetekben, az általunk kifejlesztett módszerrel kimutatott eredmények alátámaszthatják a dokumentációban szereplő ivart, eltérés esetén pedig a jogkövetkezménnyel járó ügyek követelményrendszerének is megfelelő genetikai tesztek elvégzését tehetik indokolttá [6, 33]. Az illegálisan zajló kilövések komoly gazdasági veszteséget okoznak a vadhús és trófea által, vagyoni- és eszmei károkat pedig az állatpopulációkban és vadgazdálkodásban. A projekt hozzájárulhat a fajmegőrzés és védelem elősegítéséhez, valamint a vadorzás bizonyos típusainak megelőzéséhez, visszaszorításához és a károk csökkentéséhez. Ez utóbbi nem csak Magyarországon, de a világ más országaiban is fontos feladat, mely további esetek megelőzését is magában foglalja azzal, hogy lehetőséget biztosít a kérdéses esetek gyors és költséghatékony vizsgálatára.

Tervezzük ezért a jövőben a kutatásunk nagyobb mintaszámmal történő folytatását, a módszer szenzitivitásának és alkalmazhatóságának fejlesztését, hogy minél szélesebb körben tudjuk alkalmazni a vadvilággal kapcsolatos feladatkörök részeként.

7 ÖSSZEFOGLALÓ

A tenyésztett- és vadonélő állatfajok ivarának, illetve ivararányának ismerete központi szerepet játszik (vad)gazdálkodási és konzervációbiológiai szempontból is, ezért intenzíven kutatott terület. Magyarország agancsos fajainál, a dámszarvasnál, gímszarvasnál és európai őznél szintén nagy jelentőséggel bír az állományok optimális ivararányának fenntartása, ezért az adott vadászati idényben csak meghatározott számú, fajú és ivarú állat kilövése engedélyezett. Azonban előfordulhatnak olyan esetek, amikor az előírt feltételek nem teljesülnek, ezek illegális elejtésnek minősülnek. A vadfeldolgozó üzemek hűtőházában leadott, külső jegyeik alapján ivarra már nem azonosítható zsigerelt tetemeknél genetikai vizsgálattal meghatározható az állat ivara, amely adott esetben kimutathatja az illegális elejtést, amely orvvadászatnak minősül.

Kutatásunk célja egy olyan genetikai módszer kidolgozása volt, amely lehetővé teszi a három hazai szarvasféléből származó szövetminták egyszerű, gyors és akár a helyszínen történő DNS-alapú ivarazonosítását. Vizsgálataink alapjául a hurok által közvetített izotermikus sokszorosítási (Loop-mediated isothermal AMplification, LAMP) módszert választottuk, mivel ezzel a technikával minimális laborműszer és eszköz segítségével is megvalósítható a releváns DNS markerek rövid időn belüli sokszorosítása és kimutatása költséghatékony módon.

Kutatásunk során a három szarvasfélére univerzálisan használható, az Amelogenin X és SRY gének konzervált szakaszaira tervezett LAMP-primereket először ismert fajú és ivarú kontroll DNS-mintákon teszteltük. A reakciók eredményeit interkaláló festék utólagos hozzáadásával történő kimutatással ellenőriztük, majd a reakcióelegy összetételét és idejét optimalizáltuk. A terepen történő ivarellenőrzés egyszerűsített megvalósításához kidolgoztuk a direkt sokszorosítás módszerét NaOH oldatban előkészített húsmintákra. A módszerrel a vártan megfelelően a nőstény és a hím mintákból is kimutatható volt az Amelogenin X génszakasz, amíg a hím specifikus SRY génszakasz igazolását célzó reakció a hím eredetű mintáknál adott pozitív eredményt.

Kifejlesztett módszerünk a validálási lépések után alkalmas lehet a gímszarvas, dámszarvas és európai őz eredetű minták rövid idő alatt megvalósítható ivarmeghatározására, az esetleges illegális vadászati tevékenységek mértékének kimutatására, hozzájárulva így a vadászat tisztaságának megőrzéséhez.

8 SUMMARY

Genetic sex detection of cervids by isothermal amplification

Knowledge of the sexes and sex ratios of both domestic and wild animal species plays a central role in (wildlife) management and conservation biology, making it an intensively researched area. In Hungary, maintaining the optimal sex ratio of the populations of deer species, such as fallow deer, red deer, and roe deer, is also of great significance during the hunting season. Therefore, only a specific number, species, and sex of animals are allowed to be hunted during a given hunting season. However, there may be cases where the prescribed conditions are not met, and these are considered illegal hunting. In the cold stores of game processing facilities, the sex of eviscerated carcasses can no longer be identified based on external characteristics, but genetic testing can determine the sex of the animal, potentially revealing illegal kills, which are considered poaching.

The aim of our research was to develop a genetic method that allows for simple, fast, and on-site DNA-based sex determination of tissue samples from the three native deer species. As the basis for our investigations, we chose the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, which allows for the rapid multiplication and detection of relevant DNA markers with minimal laboratory equipment and resources, in a cost-effective manner.

During our research, we first tested LAMP primers designed for conserved segments of the Amelogenin X and SRY genes, which can be universally used for the three deer species, on control DNA samples from known species and sexes. The results of the reactions were detected by the subsequent addition of an intercalating dye, and the composition and time of the reaction mixture were optimized. To simplify on-site sex determination, we developed a direct amplification method for meat samples prepared in NaOH solution. As expected, the Amelogenin X gene segment was detectable in both female and male samples, while the reaction targeting the male-specific SRY gene segment gave positive results for male-origin samples.

After validation steps, our developed method can be suitable for the rapid sex detection of fallow deer, red deer, and roe deer samples, contributing to the detection of potential illegal hunting activities and thus preserving the integrity of hunting.

9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Hrovatin K, Kunej T (2018) Genetic sex determination assays in 53 mammalian species: Literature analysis and guidelines for reporting standardization. *Ecol Evol* 8:1009–1018. <https://doi.org/10.1002/ece3.3707>
2. Gibbon V, Paximadis M, Štrkalj G, Ruff P, Penny C (2009) Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene. *Forensic Sci Int Genet* 3:74–79. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.10.007>
3. Huber S, Bruns U, Arnold W (2002) Sex determination of red deer using polymerase chain reaction of DNA from feces. *Wildl Soc Bull* 30:208–212. <https://doi.org/10.2307/3784655>
4. Yamazaki S, Motoi Y, Nagai K, Ishinazaka T, Asano M, Suzuki M (2011) Sex Determination of Sika Deer (*Cervus nippon yessoensis*) Using Nested PCR from Feces Collected in the Field. *J Vet Med Sci* 73:1611–1616. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0235>
5. Hamlin BC, Meredith EP, Rodzen J, Strand JM (2021) OdoPlex: An STR multiplex panel optimized and validated for forensic identification and sex determination of North American mule deer (*Odocoileus hemionus*) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Forensic Sci Int Anim Environ* 1:100026. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100026>
6. Zenke P, Zorkóczy OK, Lehotzky P, Ózsvári L, Pádár Z (2022) Molecular Sexing and Species Detection of Antlered European Hunting Game for Forensic Purposes. *Animals* 12:246. <https://doi.org/10.3390/ani12030246>
7. Gutiérrez-Adán, A, Anderson GB, Medrano JF (1997) Ovine-specific Y-chromosome RAPD–SCAR marker for embryo sexing. *Anim Genet* 28:135–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1997.00104.x>
8. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28:63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
9. Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Watanabe K, Kojiya S, Notomi T, Minamihashi A (2006) Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* 66:1249–1256. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.036>
10. Lee PLM (2017) DNA amplification in the field: move over PCR, here comes LAMP. *Mol Ecol Resour* 17:138–141. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12548>
11. Zorkóczy OK, Bujtor Zs, Szives A, Ózsvári L, Wagenhoffer Zs, Zenke P (2023) A LAMP- (hurok által közvetített izotermikus sokszorozás) technika fő alkalmazási lehetőségei az állatorvostudományban Irodalmi összefoglaló The main application possibilities of the LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) technique in veterinary science Literature review. *Magy Allatorvosok Lapja* 145:611–624. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.10.611-624>
12. Qiao Y, Zou F, Wei K, Yue B (2007) A Rapid Sex-Identification Test for the Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*) Based on the ZFX/ZFY Gene. *Zool Sci* 24:493–495. <https://doi.org/10.2108/zsj.24.493>
13. Paul S, Ghosh T, Pandav B, Mohan D, Habib B, Nigam P, Mondol S (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. *J Genet* 98:44. <https://doi.org/10.1007/s12041-019-1094-1>
14. Bilton T, Chappell A, Clarke S, Brauning R, Dodds K, McEwan J, Rowe S (2019) Using genotyping-by-sequencing to predict gender in animals. *Anim Genet* 50:307–310. <https://doi.org/10.1111/age.12782>
15. Burgess BT, Irvine RL, Russello MA (2022) A genotyping-in-thousands by sequencing panel to inform invasive deer management using noninvasive fecal and hair samples. *Ecol Evol* 12:8993. <https://doi.org/10.1002/ece3.8993>

16. Kozubska-Sobocińska A, Danielak-Czech B, Babicz M, Bąk A, Rejduch B (2013) Interspecies hybridizations in situ with bovine heterosome painting probes for identification of sex chromosomes in fallow deer (*Dama dama*). *J Anim Sci Biol Bioecon* 31:95–99.
17. Kim BJ, Lee Y-S, An J, Park H-C, Okumura H, Lee H, Min M-S (2008) Species and sex identification of the Korean Goral (*Nemorhaedus caudatus*) by molecular analysis of non-invasive samples. *Mol Cells* 26:314–318.
18. Chan K-W, Liu P-C, Yang W-C, Kuo J, Chang CL-T, Wang C-Y (2012) A novel loop-mediated isothermal amplification approach for sex identification of Columbidae birds. *Theriogenology* 78:1329–1338. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.034>
19. Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Minamihashi A (2013) Embryo Sexing and Sex Chromosomal Chimerism Analysis by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Cattle and Water Buffaloes. *J Reprod Dev* 59:321–326. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-028>
20. Dini P, Van Poucke M, Herrera C, Peelman L, Daels P (2016) Preimplantation gender determination on equine embryos using LAMP. *J Equine Vet Sci* 41:75–75. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.070>
21. Silversides DW, Pilon N, Behdjani R, Boyer A, Daneau I, Lussier J (2001) Genetic manipulation of sex differentiation and phenotype in domestic animals. *Theriogenology* 55:51–63. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00445-3)
22. Kadivar A, Hassanpour H, Mirshokraei P, Azari M, Gholamhosseini K, Karami A (2013) Detection and quantification of cell-free fetal DNA in ovine maternal plasma; use it to predict fetal sex. *Theriogenology* 79:995–1000. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.027>
23. Kőszegi H, Bóka G, Vincze B, Gáspárdy A, Zenke P (2020) A magzati ivar anyai vérplazmából való meghatározásának jelentősége és módszerei emlőszállatokban Irodalmi összefoglaló Genetic based methods of fetal sexing from maternal plasma and their importance in various mammal species Literature review. *Magy Allatorvosok Lapja* 142:625–633.
24. Centeno-Cuadros A, Abbasi I, Nathan R (2016) Sex determination in the wild: a field application of loop-mediated isothermal amplification successfully determines sex across three raptor species. *Mol Ecol Resour* 17:153–160. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12540>
25. Putman RJ, Staines BW (2004) Supplementary winter feeding of wild red deer *Cervus elaphus* in Europe and North America: justifications, feeding practice and effectiveness. *Mamm Rev* 34:285–306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2004.00044.x>
26. Niedziałkowska M, Doan K, Górny M, Sykut M, Stefaniak K, Piotrowska N, Jędrzejewska B, Ridush B, Pawelczyk S, Mackiewicz P, Schmölcke U, Kosintsev P, Makowiecki D, Charniauski M, Krasnodębski D, Rannamäe E, Saarma U, Arakelyan M, Manaseryan N, Titov VV, Hulva P, Bălăşescu A, Fyfe R, Woodbridge J, Trantalidou K, Dimitrijević V, Kovalchuk O, Wilczyński J, Obadã T, Lipecki G, Arabey A, Stanković A (2021) Winter temperature and forest cover have shaped red deer distribution in Europe and the Ural Mountains since the Late Pleistocene. *J Biogeogr* 48:147–159. <https://doi.org/10.1111/jbi.13989>
27. Csányi S, Márton M, Böti S, Schally G (2023) Vadgazdálkodási Adattár 2022/2023. vadászati év. MATE VTI, Országos Vadgazdálkodási Adattár, Gödöllő, pp 70.
28. Di Stefano G (1995) Identification of fallow deer remains on the basis of its skeletal features. Taxonomical considerations. *Boll Soc Paleontol Ital* 34:323–331
29. Esattore B, Saggiomo L, Sensi M, Francia V, Cherin M (2022) Tell me what you eat and I'll tell you...where you live: an updated review of the worldwide distribution and foraging ecology of the fallow deer (*Dama dama*). *Mamm Biol* 102:321–338. <https://doi.org/10.1007/s42991-022-00250-6>
30. Lechner-Doll M, Lason K, Lang D, Behrend A (2001) Evolutionary aspects of dietary selection and digestion in the European roe deer (*Capreolus capreolus*) with special reference to seasonality. *Zoosystematics Evol* 77:223–227. <https://doi.org/10.1002/mmzn.20010770208>
31. 1996. évi LV. törvény - Nemzeti Jogszabálytár. <https://njt.hu/jogszabaly/1996-55-00-00.49>. Accessed 23 Sep 2023

32. Szabolcsi Z, Egyed B, Zenke P, Padar Z, Borsy A, Steger V, Pasztor E, Csanyi 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>
33. Pádár Z, Kovács G, Nogel M, Poór VS, Zenke P (2022) The catalyst-like role of forensic genetics in the developmental process of Hungarian wildlife forensics. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 8:263–264. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2022.10.056>
34. Ristić Z, Gabriela S, Simat K, Matejević M (2013) COMPARATIVE REVIEW OF HUNTING TOURISM IN THE CZECH REPUBLIC AND HUNGARY. *Res Rev Dep Geogr Tour Hotel Manag* 42:205–220.
35. Gyurcsó A, Kasza G, Ózsvári L (2023) The history of legal regulation against illegal hunting in Hungary. Literature review with case studies (Az illegális vadászat elleni jogi szabályozás és a vadvédelem története Magyarországon. Irodalmi áttekintés esettanulmányokkal). *Magy Allatorvosok Lapja* 145:297–308. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.05.297-308>
36. Challender DWS, MacMillan DC (2014) Poaching is more than an Enforcement Problem. *Conserv Lett* 7:484–494. <https://doi.org/10.1111/conl.12082>
37. Yi-Ming L, Zenxiang G, Xinhai L, Sung W, Niemelä J (2000) Illegal wildlife trade in the Himalayan region of China. *Biodivers Conserv* 9:901–918. <https://doi.org/10.1023/A:1008905430813>
38. Upreti Y, Chettri N, Dhakal M, Asselin H, Chand R, Chaudhary RP (2021) Illegal wildlife trade is threatening conservation in the transboundary landscape of Western Himalaya. *J Nat Conserv* 59:125952. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125952>
39. 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>
40. 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>
41. Davitkov D, Glavinić U, Nešić K, Davitkov D, Vučićević M, Nešić V, Stanimirović Z (2017) Improved DNA-based identification of cervidae species in forensic investigations. *Acta Vet-Beograd* 67:449–458. <https://doi.org/10.1515/acve-2017-0037>
42. 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>
43. 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 Sci Int Anim Environ* 1:100023. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100023>
44. Jones KC, Levine KF, Banks JD (2000) DNA-based genetic markers in black-tailed and mule deer for forensic applications. *Calif Fish Game* 86:115–126.
45. Gokulakrishnan P, Kumar RR, Sharma BD, Mendiratta SK, Malav O, Sharma D (2015) Determination of Sex Origin of Meat and Meat Products on the DNA Basis: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55:1303–1314. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.690095>
46. Corlatti L, Sanz-Aguilar A, Tavecchia G, Gugiatti A, Pedrotti L (2019) Unravelling the sex- and age-specific impact of poaching mortality with multievent modeling. *Front Zoo* 16:20. <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0321-1>
47. Haines AM, Elledge D, Wilsing LK, Grabe M, Barske MD, Burke N, Webb SL (2012) Spatially explicit analysis of poaching activity as a conservation management tool. *Wildl Soc Bull* 36:685–692. <https://doi.org/10.1002/wsb.194>
48. Tobe SS, Govan J, Welch LA (2011) Recovery of human DNA profiles from poached deer remains: A feasibility study. *Sci Justice* 51:190–195. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2011.06.002>

49. Wilson PJ, White BN (1998) Sex Identification of Elk (*Cervus elaphus canadensis*), Moose (*Alces alces*), and White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) Using the Polymerase Chain Reaction. *J Forensic Sci* 43:477-482. <https://doi.org/10.1520/JFS16172J>
50. Yamauchi K, Hamasaki S, Miyazaki K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2000) Sex Determination Based on Fecal DNA Analysis of the Amelogenin Gene in Sika Deer (*Cervus nippon*). *J Vet Med Sci* 62:669-671. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.669>
51. Takahashi M, Masuda R, Uno H, Yokoyama M, Suzuki M, Yoshida MC, Ohtaishi N (1998) Sexing of Carcass Remains of the Sika Deer (*Cervus nippon*) Using PCR Amplification of the Sry Gene. *J Vet Med Sci* 60:713-716. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.713>
52. Han S-H, Chob I, Leeb S, Tandangb L, Leec H, Ohd H, Kime B, Ohe M (2007) Identification of species and sex of Korean Roe Deer (*Capreolus pygargus tianschanicus*) using SRY and CYTB genes. *Integr Biosciences* 11:165-168. <https://doi.org/10.1080/17386357.2007.9647331>
53. Barbosa AM, Fernández-García JL, Carranza J (2010) A new marker for rapid sex identification of red deer (*Cervus elaphus*). *Hystrix* 20: 169-172. <https://doi.org/10.4404/hystrix-20.2-4449>
54. Pajares G, Balseiro A, Pérez-Pardal L, Gamarra JA, Monteagudo LV, Goyache F, Royo LJ (2009) Sry-negative XX true hermaphroditism in a roe deer. *Anim Reprod Sci* 112:190-197. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.018>
55. Kropatsch R, Dekomien G, Akkad DA, Gerding WM, Petrasch-Parwez E, Young ND, Altmüller J, Nürnberg P, Gasser RB, Epplen JT (2013) SOX9 Duplication Linked to Intersex in Deer. *PLoS ONE* 8:e73734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073734>
56. Kobolák J, Majzinger I, Szabari M, Gócza E, Bodó S, Bicsérdy G, Palotás, Bősze Z (2004) Sexing of Roe Deer (*Capreolus capreolus* L.) by PCR amplification reaction. 55 th EAAP annual Meeting, Session G 4:50.
57. Powell C, Butler F, O'Reilly C (2019) The development of real-time PCR assays for species and sex identification of three sympatric deer species from noninvasive samples. *Conserv Genet Resour* 11:465-471. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1041-0>
58. Pfeiffer I, 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 Genetics* 6:16. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-16>
59. Pajares G, Álvarez I, Fernández I, Pérez-Pardal L, Goyache F, Royo LJ (2007) A sexing protocol for wild ruminants based on PCR amplification of amelogenin genes AMELX and AMELY (short communication). *Arch Anim Breed* 50:442-446. <https://doi.org/10.5194/aab-50-442-2007>
60. Gurgul A, Radko A, 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. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9852-4>
61. Matthews ME, Reed KC (1991) A DNA sequence that is present in both sexes of Artiodactyla is repeated on the Y chromosome of cattle, sheep, and goats. *Cytogenet Cell Genet* 56:40-44. <https://doi.org/10.1159/000133043>
62. Matthews ME, Reed KC (1992) Sequences from a family of bovine Y-chromosomal repeats. *Genomics* 13:1267-1273. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90045-T](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90045-T)
63. Han S-H, Lee S-S, Cho I-C, Oh M-Y, Oh H-S (2009) Species Identification and Sex Determination of Korean Water Deer (*Hydropotes inermis argyropus*) by Duplex PCR. *J Appl Anim Res* 35:61-66. <https://doi.org/10.1080/09712119.2009.9706986>
64. Vega D, Gallina S, Correa M, Parra M, Chairez I, Vega D, Gallina S, Correa M, Parra M, Chairez I (2019) White-tailed deer sex identification from faecal DNA and pellet morphometry by neural network and fuzzy logic analyses. *Acta Univ* 29:e2447. <https://doi.org/10.15174/au.2019.2447>
65. Shaw CN, Wilson PJ, White BN (2003) A Reliable Molecular Method of Gender Determination for Mammals. *J Mammal* 84:123-128. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2003\)084<0123:ARMMOG>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2003)084<0123:ARMMOG>2.0.CO;2)
66. Lindsay AR, Belant JL (2008) A simple and improved PCR-based technique for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) sex identification. *Conserv Genet* 9:443-447. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9326-y>

67. Brinkman TJ, Hundertmark KJ (2009) Sex identification of northern ungulates using low quality and quantity DNA. *Conserv Genet* 10:1189–1193. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9747-2>
68. Gao QH, Wang HE, Zeng WB, Wei HJ, Han CM, Du HZ, Zhang ZG, Li XM (2011) Embryo transfer and sex determination following superovulated hinds inseminated with frozen–thawed sex-sorted Y sperm or unsorted semen in Wapiti (*Cervus elaphus songaricus*). *Anim Reprod Sci* 126:245–250. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.05.006>
69. Farahvash T, VaezTorshizi R, Masoudi A, Rezaei H, Tavallaie M (2016) AMELX and AMELY Structure and Application for Sex Determination of Iranian Maral deer (*Cervus elaphus maral*). *Iranian J Appl Anim Res* 6:963–968.
70. Yamashiro A, Kaneshiro Y, Kawaguchi Y, Yamashiro T (2017) Species, sex, and individual identification of Japanese serow (*Capricornis crispus*) and sika deer (*Cervus nippon*) in sympatric region based on the fecal DNA samples. *Conserv Genet Resour* 9:333–338. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0665-1>
71. Sukmak M, Dejchaisri S, Thongtipsiridech S, Wajjwalku W (2010) Novel Primer Sets for Sex Identification in Eld's Deer (*Cervus eldii thamin*) and Hog Deer (*Axis porcinus*) by Using Non-Invasive Samples. *KKU Vet J* 20:11–20.
72. Woźniakowski G, Kozdruń W, Samorek-Salamonowicz E (2012) Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Virol J* 9:110. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-110>
73. Zhao K, Hu R, Ni J, Liang J, He X, Du Y, Xu Y, Zhao B, Zhang Q, Li C (2020) Establishment of a porcine parvovirus (PPV) LAMP visual rapid detection method. *J Virol Methods* 284:113924. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113924>
74. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T (2001) Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289:150–154. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>
75. Guan X, Guo J, Shen P, Yang L, Zhang D (2010) Visual and Rapid Detection of Two Genetically Modified Soybean Events Using Loop-mediated Isothermal Amplification Method. *Food Anal Methods* 3:313–320. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9132-x>
76. Kitamura M, Kubo S, Tanaka J, Adachi T (2018) Rapid screening method for male DNA by using the loop-mediated isothermal amplification assay. *Int J Legal Med* 132:975–981. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1661-z>
77. Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 16:223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
78. Gandelman O, Jackson R, Kiddle G, Tisi L (2011) Loop-Mediated Amplification Accelerated by Stem Primers. *Int J Mol Sci* 12:9108–9124. <https://doi.org/10.3390/ijms12129108>
79. Mamba TS, Mbae CK, Kinyua J, Mulinge E, Mburugu GN, Njiru ZK (2018) Lateral Flow Loop-Mediated Isothermal Amplification Test with Stem Primers: Detection of *Cryptosporidium* Species in Kenyan Children Presenting with Diarrhea. *J Trop Med* 2018:e7659730. <https://doi.org/10.1155/2018/7659730>
80. Fu S, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S, Gao S, Shen Z (2011) Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification. *Appl Biochem Biotechnol* 163:845–850. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9088-8>
81. Tian B, Ma J, Zardán Gómez de la Torre T, Bálint Á, Donolato M, Hansen MF, Svedlindh P, Strömberg M (2016) Rapid Newcastle Disease Virus Detection Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification and Optomagnetic Readout. *ACS Sens* 1:1228–1234. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00379>
82. Chander Y, Koelbl J, Puckett J, Moser MJ, Klingele AJ, Liles MR, Carrias A, Mead DA, Schoenfeld TW (2014) A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front Microbiol* 5:395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>

83. Zhou D, Guo J, Xu L, Gao S, Lin Q, Wu Q, Wu L, Que Y (2014) Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Sci Rep* 4:4912. <https://doi.org/10.1038/srep04912>
84. Cho A-R, Dong H-J, Cho S (2014) Meat Species Identification using Loop-mediated Isothermal Amplification Assay Targeting Species-specific Mitochondrial DNA. *Korean J Food Sci Anim Resour* 34:799–807. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.6.799>
85. Khamlor T, Pongpiachan P, Parnpai R, Punyawai K, Sangsritavong S, Chokesajjawatee N (2015) Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* 83:891–896. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.025>
86. Damhorst GL, Duarte-Guevara C, Chen W, Ghonge T, Cunningham BT, Bashir R (2015) Smartphone-Imaged HIV-1 Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) on a Chip from Whole Blood. *Engineering* 1:324–335. <https://doi.org/10.15302/J-ENG-2015072>
87. Wong Y -P., Othman S, Lau Y -L., Radu S, Chee H -Y. (2018) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol* 124:626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
88. Quoc NB, Phuong NDN, Chau NNB, Linh DTP (2018) Closed tube loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis B virus in human blood. *Heliyon* 4:e00561. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00561>
89. Sathish Kumar T, Radhika K, Joseph Sahaya Rajan J, Makesh M, Alavandi SV, Vijayan KK (2021) Closed-tube field-deployable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on spore wall protein (SWP) for the visual detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *J Invertebr Pathol* 183:107624. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107624>
90. Mori Y, Kanda H, Notomi T (2013) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J Infect Chemother* 19:404–411. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0590-0>
91. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I (2009) Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* 46:167–172. <https://doi.org/10.2144/000113072>
92. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC (2015) Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques* 58:59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
93. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
94. Kaewphinit T, Ckumdee J, Chansiri K, Santiwatanakul S (2017) Development and Evaluation of a Loop-mediated Isothermal Amplification Combined with Au-nanoprobe Assay for Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Microbiol* 35:302–304. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_15_333
95. Kim E-M, Jeon H-S, Kim J-J, Shin Y-K, Lee Y-J, Yeo S-G, Park C-K (2016) Uracil-DNA glycosylase-treated reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of avian influenza virus preventing carry-over contamination. *J Vet Sci* 17:421–425. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.3.421>
96. Britton S, Cheng Q, Grigg MJ, Poole CB, Pasay C, William T, Fornace K, Anstey NM, Sutherland CJ, Drakeley C, McCarthy JS (2016) Sensitive Detection of *Plasmodium vivax* Using a High-Throughput, Colourimetric Loop Mediated Isothermal Amplification (HtLAMP) Platform: A Potential Novel Tool for Malaria Elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004443. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004443>
97. Lau Y-L, Lai M-Y, Teoh B-T, Abd-Jamil J, Johari J, Sam S-S, Tan K-K, AbuBakar S (2015) Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS ONE* 10:e0138694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138694>
98. Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM (2008) Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods* 151:264–270. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.04.011>

99. Kiddle G, Hardinge P, Buttigieg N, Gandelman O, Pereira C, McElgunn CJ, Rizzoli M, Jackson R, Appleton N, Moore C, Tisi LC, Murray JA (2012) GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnology* 12:15. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-15>
100. Truett G e., Heeger P, Mynatt R l., Truett A a., Walker J a., Warman M l. (2000) Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29:52–54. <https://doi.org/10.2144/00291bm09>
101. Zorkóczy OK, Turi O, Wagenhoffer Z, Ózsvári L, Lehotzky P, Pádár Z, Zenke P (2023) A Selection of 14 Tetrameric Microsatellite Markers for Genetic Investigations in Fallow Deer (*Dama dama*). *Animals* 13:2083. <https://doi.org/10.3390/ani13132083>
102. Komarek L, Tóth S (2018) A magyar vadhúsertékesítés alakulásának főbb tendenciái és lehetséges fejlődési irányai. *Jelenkori Társadalmi és Gazdasági Folyamatok* 13:43–58. <https://doi.org/10.14232/jtgf.2018.3-4.43-58>
103. Gyurcsó A, Kasza G, Ózsvári L (2022) History and food-chain safety provisions of the public consumption of game meat in Hungary (A vadhús közfogyasztásának története és élelmiszerlánc-biztonsági előírásai Magyarországon). *Magy Allatorvosok Lapja* 144:623–639. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2022.10.623-639>

10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Dr. Zenke Petrának, a dolgozatom megvalósításához nyújtott rengeteg hasznos tanácsáért, gyakorlati útmutatásért és végtelen türelméért, amivel a munkámat segítette mind a laboratóriumi vizsgálatok során, mind a dolgozat megírásában.

Köszönettel tartozom Zorkóczy Orsolyának és Keindl Ágnesnek a laboratóriumi munkákban nyújtott segítségükért.

Emellett köszönet illeti azokat a hivatásos vadászokat, akiktől a kutatáshoz felhasznált mintákat kaptuk.

További köszönetet szeretnék mondani az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet vezetőjének, Dr. Wagenhoffer Zsombornak és az Állattenyésztési és Genetikai Tanszék vezetőjének, Dr. Gáspárdy Andrásnak, hogy számomra lehetővé tették az Intézet Genetikai laboratóriumában végzett munkát.

Munkánk finanszírozását a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal Egyetemi Innovációs Ökoszisztéma című pályázati konstrukcióján belül, az Állatorvostudományi Egyetem által elnyert, 2019-1.2.1-EGYETEMI-ÖKO-2019-00010 számú pályázat biztosította.