https://doi.org/10.56385/magyallorv.2025.03.177-187

Examination of di- and trinucleotide microsatellites in fallow deer (*Dama dama*) for individual identification purposes

Di- és trinukleotid mikroszatelliták vizsgálata dámszarvasban (*Dama dama*) egyedi azonosítás céljából

Zorkóczy Orsolya Krisztina[1*], Wagenhoffer Zsombor[1], Lehotzky Pál[2], Zenke Petra[1]

O. K. Zorkóczy[1*]
Zs. Wagenhoffer[1]
P. Lehotzky[2]
P. Zenke[1]

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

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

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

ÖSSZEFOGLALÁS

Az állatok genetikai módszerrel történő egyedi azonosítása alapvető a tudományos kutatások, a természetvédelem, a vadgazdálkodás és a mezőgazdaság különböző területein. A hazánkban előforduló szarvasfélék közül őzben és gímszarvasban már rendelkezésre áll megfelelő azonosító erővel bíró genetikai markerszett, dámszarvasban (*Dama dama*) azonban a faj csekély genetikai diverzitása miatt a már meglévő markerszett kiegészítése szükséges. A szerzők jelen kutatásban összesen 49 szarvasfélékben leírt dimer és trimer mikroszatellitát teszteltek, amelyekből összesen hét potenciálisan megfelelő polimorfizmussal és megbízható genotípus meghatározhatósággal bír.

SUMMARY

Background: The individual identification of animals, using genetic methods is essential in various fields of scientific research, nature conservation, wildlife management, and agriculture. Among the deer species found in Hungary, genetic marker sets with sufficient identification power are already available for roe deer and red deer. However, due to the low genetic diversity in fallow deer (*Dama dama*), the existing marker set needs to be expanded.

Objectives: A previous study identified 14 suitable tetrameric microsatellites. Still, the species' low genetic diversity necessitates the addition of more markers.

Materials and Methods: In response, a total of 49 microsatellites were selected from previous studies and the GenBank database. Of these, 40 dinucleotide markers had been previously used in fallow deer, while trinucleotide markers were derived from hog deer (*Axis porcinus*) and brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). Universal primers were used for cost-efficient fluorescent labeling. Initial PCR optimization was conducted for each marker, after which they were categorized into four groups based on their evaluation results. The two best-performing categories were tested further. Subsequently, the number of alleles, effective allele numbers, and observed and expected heterozygosity of the clearly evaluable and polymorphic markers were calculated.

Results and Discussion: A total of seven suitable microsatellites (one trimer and six dimers) were found to be polymorphic and could be reliably identified on the electropherogram with high confidence. Allele numbers varied between two and four, while effective allele numbers ranged from 1.6 to 2.6. Observed heterozygosity was between 0.1 and 0.8 and expected heterozygosity ranged from 0.1 to 0.6. Although these markers still require testing on a larger population, they represent a valuable addition to the existing marker set.

VADON ÉLŐ ÁLLAT

DI- ÉS TRINUKLEOTID MIKROSZATELLITÁK VIZSGÁLATA DÁMSZARVASBAN (*DAMA DAMA*) EGYEDI AZONOSÍTÁS CÉLJÁBÓL

A dámszarvas (*Dama dama*) Magyarország egyik legnagyobb agancsos vadfaja, amely körülbelül 40 ezer egyedet számláló állománnyal rendelkezik [1]. A populáció hozzávetőlegesen 40%-a kilövésre kerül évente, ennek ellenére az állomány az utóbbi évtizedekben növekvő tendenciát mutat [1]. Az állatnak jellegzetes, lapátszerű egyedi trófeáján kívül húsa és bőre is értékes, ezenfelül kulturális és természetvédelmi jelentősége is van [2].

A DÁMSZARVAS ELTERJEDÉSE ÉS GENETIKAI VÁLTOZATOSSÁGA

A dámszarvas jelenlegi genetikai diverzitásának és struktúrájának kialakulását evolúciós események hosszú láncolata alakította ki, egészen a jégkorszakig visszanyúlóan. Az eredetileg eurázsiai elterjedésű faj fő bázisterülete Európa térsége volt, ahonnan azonban a jégkorszakok glaciális időszakai alatt nagyrészt kihalt [3]. Maradványpopulációi mindössze Törökországban, a Balkán-félsziget területén, és néhány mediterrán szigeten maradtak meg [3], azonban a genetikai diverzitás oly mértékben lecsökkent, hogy egyes feltételezések szerint a faj már képtelen volt a korábbi élettereinek újbóli meghódítására [4]. A dám mai széleskörű elterjedése javarészt a számos, ember általi transzlokációnak köszönhető. Ez már a neolitikumban megkezdődött [5, 6], majd később a bronzkorban [6], azt követően pedig a rómaiak által folytatódott, amikor is a fajt nyugati és északi irányban terjesztették [3]. A folyamat egészen a 20. századig tartott [3], ezzel kialakítva a jelenlegi kozmopolita elterjedést [7], amibe beletartoznak olyan távoli tájak is, mint Ausztrália, Új-Zéland, vagy a Karib-térség [7, 8].

Az Anjou uralkodók és Mátyás király idején kerülhetett be a dámvad hazánkba

A hazánkba történő betelepítésének pontos idejéről megoszlanak a vélemények. Legkorábban az Anjou uralkodók és Mátyás király idején kerülhetett be a dámvad, azonban a 18. század előtt nem tesznek említést szabadon élő hazai állományról. 1969-ben indították be azt a programot, amelynek során 1970 és 1987 között 81 területre telepítettek dámszarvast az országban, ezzel kialakítva a jelenlegi elterjedést [9]. Az egymást követő betelepítések valószínűleg tovább rontották a már azelőtt is kismértékű genetikai diverzitást, hiszen ezek az események valószínűsíthetően vagy bizonyítottan kis létszámú alapító egyeddel történtek (Ausztráliába mindössze hat egyed), amelyekhez az állatokat a legtöbb esetben korábbi betelepített populációkból vették. Az alapító hatás, genetikai sodródás [3, 10, 11], és beltenyésztés [11] miatt az antropogén telepítéseket nem igénylő rokonfajokkal összehasonlítva, mint a gímszarvas (*Cervus elaphus*) vagy az európai őz (*Capreolus capreolus*), a faj genetikai diverzitása rendkívül kicsi. Valamennyi, a dámszarvast különböző, mint pl. élelmiszer-biztonsági [12], populációstruktúra [3], vagy állomány-egészségügyi okból vizsgáló kutatás erre a következtetésre jutott [13].

A hazai dámvadpopuláció genetikai diverzitása igen csekély

EGYEDI SZINTŰ AZONOSÍTÁS FONTOSSÁGA ÉS MEGVALÓSÍTÁSA MIKROSZATELLITA MARKEREKKEL

A genetikai egyedazonosítás fontos a fajmegőrzési programokban, ahol a genetikai sokféleség fenntartása elengedhetetlen a populációk hosszú távú fennmaradásához [14, 15]. A vadon élő állatok egyedi azonosítása lehetővé teszi a populációk méretének és dinamikájának pontos nyomon követését, és a lehetséges beltenyészettség becslését, segítve ezzel a fenntartható vadgazdálkodást [16]. Az állományok genetikai diverzitásának fenntartása a betegségekkel szembeni rezisztencia fokozásában is elengedhetetlen [17]. Az egyedi genetikai azonosítás lehetővé tesz olyan ökológiai kutatásokat, amelyekben a populációszerkezetet, az állatok vándorlását és területhasználatát, valamint a különböző fajok közötti genetikai kapcsolatokat tanulmányozzák [18, 19]. A genetikai azonosítás segíthet továbbá az állatok származási helyének és eredetének nyomonkövetésében [20], lehetővé téve az illegális kereskedelem elleni hatékonyabb fellépést, valamint lehetőséget nyújt az orvvadászat elleni küzdelemben és a fajok közötti keresztezések nyomonkövetésében [21–23].

Egyedi szintű azonosításra leggyakrabban mikroszatellita-markereket alkalmaznak

Jelenleg egyedi szintű azonosításra leggyakrabban mikroszatellita-markereket alkalmaznak [21–26]. Ezekre jellemző, hogy a nevüket adó rövid, 1–7 bázispárnyi szakaszok ismétlődése miatt nagy a mutációs rátájuk, így egy marker nagyszámú alléllal is rendelkezhet, amelyek hosszpolimorfizmus formájában jelentkeznek [27]. Az optimális, négy bázisos ismétlődési motívummal rendelkező tetramereknél a hosszabb ismétlődési mintázatú pentamerek és hexamerek általában kevésbé polimorfak, valamint kevesebb található belőlük a genomban [24, 28]. Az ennél rövidebb trimer és dimer mikroszatelliták legtöbbször nagyobb allélszámmal rendelkeznek. Azonban a mechanizmus, ami a természetben végbemenő DNS-másolás folyamán a polimeráz enzim megcsúszását, és így új allélek keletkezését okozza az *in vitro* végbemenő PCR (polimeráz-láncreakció) során is gyakrabban eredményez melléktermék-képződést, ami megnehezíti az allélhosszak pontos leolvasását [21, 24]. Ennek ellenére a legtöbb konzervációbiológiai [29–32], populációgenetikai [33, 34], és több esetben még az igazságügyi genetika területén végzett kutatás [35, 36] is ezeket alkalmazza. Bár ez a speciális melléktermék-keletkezési forma, az úgynevezett dadogás (*stutter*) gyakrabban jelentkezik dimer és trimer mikroszatellitáknál, az egyes markerek különböző mértékben érintettek. Ennek oka legtöbbször a szerkezetükben fellelhető eltérés. Több kutatás is úgy találta, hogy a komplexebb szerkezetű, azaz többféle ismétlődő szekvenciából álló mikroszatelliták kevésbé hajlamosak a dadogásra [28, 36].

Teljes genomszekvencia dámszarvasoknál jelenleg nem áll rendelkezésre

Megfelelő markerek keresése többféle módon lehetséges. Történhet a célfaj teljes genom szekvenciájának vizsgálatával [22], más területen az adott fajt vizsgáló cikkekben leírt markerek tesztelésével helyi populációra [3], vagy rokon fajokra leírt markerek kipróbálásával [21, 26, 37–40]. Teljes genomszekvencia dámszarvasoknál jelenleg nem áll rendelkezésre, és ennek szekvenálása továbbra is igen költség- és időigényes folyamatnak számít. Tetramer markereket már vizsgált a kutatócsoportunk a fajban: 99 szarvasféléből (*Cervidae*) származó tetramer mikroszatellita tesztelése során 14, egyedazonosításra alkalmas, polimorf markert sikerült kimutatnunk [26]. Ez a markerszett bár az előzetes vizsgálatok alapján elégséges mértékű polimorfizmust mutatott, a fajra jellemző csekély genetikai diverzitás miatt szükséges további markerekkel bővíteni azt, hogy megbízhatóan alkalmazható legyen kis egyedszámú, beltenyészett populációk esetében is. Mivel azonban már valamennyi hozzáférhető, rokon fajokra leírt tetramer szerkezetű mikroszatellitát leteszteltünk az előző kutatásunkban, így a szarvasfélékben már alkalmazott trimer és dimer markerek vizsgálata a következő lépés.

Célunk olyan di- és trimer mikroszatellita markerek keresése volt, amelyek potenciálisan kiegészíthetik a korábban kifejlesztett tetramer mikroszatellitákat tartalmazó markerszettet, ezzel növelve az eredmények megbízhatóságát az alacsony genetikai diverzitású célfaj, a dámszarvas esetében. Ehhez olyan trimer vagy dimer markereket kerestünk, amelyeknél a genotipizálási hibák elhanyagolható mértékűek, valamint legalább kettő vagy több alléllal rendelkeznek.

ANYAG ÉS MÓDSZER

MINTAGYŰJTÉS ÉS DNS KINYERÉS

A kutatáshoz összesen tíz darab (2019 és 2022 közötti kilövésekből) dámszarvas tisztított DNS-mintáiat használtuk, amelyek négy különböző populációból származtak (Pilis 2 db, Isaszeg 5 db, Szekszárd 1 db, Lajosmizse 2 db).

MIKROSZATELLITA-MARKEREK KERESÉSE ÉS FLUORESZCENS JELÖLÉS

A dimer szerkezetű mikroszatellita-markereket korábbi dámszarvasokkal foglalkozó publikációkból és a GenBank adatbázisból (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) gyűjtöttük össze. A kiválasztásnál szempont volt, hogy a markerek rendelkezzenek leírt primerpárral, elkerülve ezzel a hosszas primertesztelési

folyamatokat, azonban a polimorfizmus nem volt szempont, mivel az még közeli populációknál is eltérő lehet az egyes allélok eltérő fixációja miatt.

A szerzők di- és trinukleotid mikroszatellita-markereket vizsgáltak

A trimer mikroszatellita-markerek esetében, mivel ezek nem csak a genomban, de a publikációkban is ritkábbak, megengedőbbek voltunk a forrásfajt illetően. A dámszarvason működő markerek mellett ezért beválogattunk más szarvasfélékből származó trinukleotid mikroszatellitákat is. Ezek kevésbé hajlamosak dadogásra dinukleotid társaikkal szemben, de általánosságban véve polimorfabbak, mint a tetranukleotid mikroszatelliták.

A költséghatékonyság érdekében a forward primereket nem közvetlenül jelöltük fluoreszcens jelöléssel, hanem az úgynevezett „farkazásos" jelölési technikát alkalmaztuk [41]. Ennél a módszernél a jelölő festék egy univerzális primerre kerül, aminek szekvenciája megegyezik a forward primer 5' végéhez adott szekvenciával („farokkal"), ezáltal lehetővé téve nagy számú marker tesztelését mindössze négy jelölt univerzális primer alkalmazásával.

MONOPLEX TESZTELÉS ÉS PCR-OPTIMALIZÁLÁS

A kiválasztott markerek működőképességét két-két dámszarvas mintán monoplex grádiens PCR során teszteltük különböző annelációs hőmérsékleti beállítások mellett az alábbi protokoll alapján: kezdeti denaturáció 60 másodperc (mp) 94 °C-on; majd 35 ciklus 30 mp denaturáció 94 °C-on, 60 mp anneláció markertől függően 50–67 °C-ig terjedő tartományban, 40 mp elongáció 72 °C-on; ezt követően pedig 20 perc végső elongáció 72 °C-on. Ezt követően a megfelelő minőségű és mennyiségű terméket produkáló markereket négy-négy mintán amplifikáltuk az optimális monoplex PCR-beállításokkal. Az egyenként amplifikált termékeket ezután a színjelölések és allélhosszak figyelembevételével együttesen detektáltuk a költségek csökkentése érdekében.

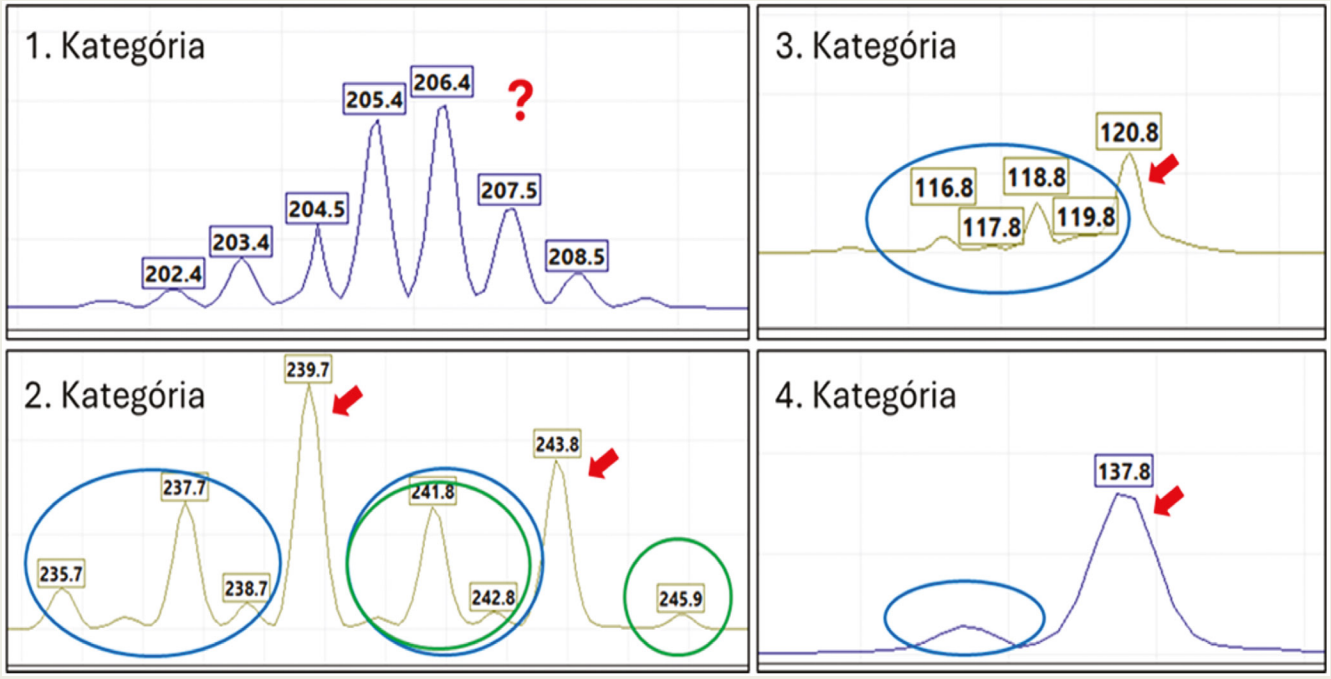
ALLÉLDETEKTÁLÁS, KATEGORIZÁLÁS, ÉS POLIMORFIZMUS FELMÉRÉS

Az amplifikált allélok mixeit kapilláris elektroforézissel választottuk el és detektáltuk ABI Prism3500 GeneticAnalyzer készüléken (AppliedBiosystems, Foster City, USA) a GeneScan™-500 LIZ™ méret standard segítségével. Ezt követően az elektroferogrammokat az OSIRIS program 2.16 verziójával (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/osiris/) elemeztük ki.

Mivel első körben a különböző mikroszatellita-markerek egyértelmű értékelhetőségét kívántuk vizsgálni, így a melléktermékképződés mértékének függvényében ezeket kategorizáltuk. A nulladik kategóriába azok a markerek kerültek, amik nem adtak megfelelő minőségű vagy mennyiségű terméket, így kiestek a további vizsgálatból. Az első kategóriába a valamilyen szempontból nem értékelhető markerek kerültek (pl. nem egyértelmű főtermék csúcs). A második kategóriát a mind upstream (a főtermék csúcshoz képest az elektroferogrammon a csúcs előtt megjelenő), mind downstream (a főtermék csúcshoz képest az elektroferogrammon a csúcs mögött megjelenő) dadogást mutató markerek képezték. A harmadik kategóriába azok a markerek kerültek, ahol megfigyeltünk upstream dadogást, de nem tapasztaltunk downstream műterméket, míg a negyedik kategóriába azok a markerek kerültek, ahol nem tapasztaltunk számottevő dadogást a vizsgált négy minta alapján *(Ábra)*.

Kategorizálást követően a legmegfelelőbb markereket PCR, majd kapilláris-elektroforézis segítségével vizsgálták

A markerek kategorizálását követően a harmadik, ill. negyedik kategóriába sorolt markereket tovább teszteltük, hogy felmérjük a polimorfizmusukat. Ehhez ezeket további hat-hat mintán az előzőekben leírt módszerhez hasonlóan monoplex PCR során sokszorosítottuk, majd kapilláris-elektroforézissel detektáltuk. Az allélhosszak leolvasásával meghatároztuk a genotípusokat, és ezek alapján kiválogattuk a polimorf markereket. Az összesen így tíz-tíz mintán felmért markereknél a GenAlEx 6.503 excel makró [42, 43] segítségével megállapítottuk a várható, ill. megfigyelt heterozigozitást, valamint az allélek számát, azok gyakoriságát, továbbá az effektív allélszámot.



ÁBRA. *A markerek felosztására használt négy kategória*
Piros nyíllal a főtermékcsúcsokat, kék körrel az upstream dadogást, zöld körrel pedig a downstream műtermékeket jelöltük. A piros kérdőjel azt jelenti, hogy a főtermékcsúcs vagy csúcsok nem állapíthatóak meg egyértelműen

FIGURE. *The four categories the markers were separated into*
The red arrows point at the allele peaks, the blue circles indicate upstream stutter, while the green circles indicate downstream stutter. The red question mark signals that the allele peak or peaks could not be determined with certainty

EREDMÉNYEK

Rokon fajokban leírt összesen 40 darab dimer és kilenc trimer, mikroszatellitát választottunk ki tesztelésre. A dimer markereket korábban már mind sikeresen alkalmazták más dámszarvas populációkban, míg a trimer markereket eddig csak más szarvasfélékben (ApoV103, ApoV104 és ApoV109 disznószarvas (*Axis porcinus*) [25]; Mgoua7, Mgoua10, Mgoua17, Mgoua18, Mgoua24 és Mgoua25 Guazauvirá-szarvas (*Mazama gouazoubira*) [44]) tesztelték.

Az optimalizálási folyamat során a 49 kiválasztott markerből 40 produkált megfelelő minőségű és mennyiségű terméket

Az optimalizálási folyamat során a 49 kiválasztott markerből 40 produkált megfelelő minőségű és mennyiségű terméket a tesztelt annelációs hőmérsékleten *(1. táblázat)*. A kiesett kilenc marker (0. kategória) közül kettő trinukleotid, és hét dinukleotid volt. A fennmaradó 40 markert a kapilláris elektroforézist és az allélok leolvasását követően a módszertani részben leírt négy kategóriába soroltuk az alábbiak szerint: hét darab az 1. kategóriába, hat darab a 2. kategóriába, 15 darab a 3. kategóriába és 12 darab a 4. kategóriába került *(1. táblázat)*.

A csoportosítás után a harmadik és negyedik kategóriába tartozó markerek további mintákon való tesztelésével felmértük a markerek felhasználhatóságát. A „monomorf" alkategóriában csak egy alléltípus volt kimutatható a vizsgált mintákon. A „nem megfelelő" alkategóriába került markerek a további mintákkal való kiegészítés után nem mutattak megbízható, konzisztens eredményt, mivel egyes mintáknál jelentős volt a dadogás. A „feltételesen megfelelő" alkategóriánál nem volt eldönthető, hogy a marker melléktermékes, vagy egy másik marker melléktermék zavarja-e a kiértékelést. Az előző kategóriával ellentétben, ahol a megjelenő extra csúcsok egyértelműen a dadogásnak voltak betudhatók, itt ezek irregulárisak voltak és nem mutattak mintázatot. A „megfelelő" alkategóriába a

1. TÁBLÁZAT. *A tesztelésre kiválasztott 49 marker tulajdonságai*

Fluoreszcens jelölés típusa (A–D) (Jelölés), annelációs hőmérsékletük °C-ban (T) (két hőmérsékleti adat esetében az első hőmérsékleten 15 ciklust, míg a másodikon 20 ciklust töltött az elegy), a besorolási kategóriájuk (Kat.) 0–4-ig (0: nem volt megfelelő amplikon, 1: nem egyértelmű allélcsúcsok, 2: upstream és downstream dadogás egyaránt, 3: csak upstream dadogás, 4: nincs számottevő dadogás), alkategória a 3. vagy 4. kategóriába tartozó markereknél (Alkat.) (M: monomorf, Ø: nem megfelelő, ?: feltételesen megfelelő, ✓: megfelelő), valamint a hozzájuk tartozó referencia (Ref.)

TABLE 1. *Information on the 49 markers selected for testing*

Fluorescent labeling (Jelölés), annealing temperature in Celsius (T) (in the case of two temperature data, the mixture completed 15 cycles at the first temperature and 20 cycles at the second temperature), classification categories (Kat.) from 0 to 4 (0: no adequate amplicon, 1: unclear allelic peaks, 2: both upstream and downstream stuttering, 3: only upstream stuttering, 4: no significant stuttering), subcategory for markers in the third or fourth categories (Alkat.) (M: monomorphic, Ø: inadequate, ?: conditionally adequate, ✓: adequate), and their corresponding reference (Ref.)

Marker	Jelölés	T	Kat.	Alkat.	Ref.	Marker	Jelölés	T	Kat.	Alkat.	Ref.
TGLA122	A	53.8	4	M	[45]	**BMS119**	A	55/50	4	?	[46]
TGLA127	B	–	0	–	[45]	**AF5**	D	60	3	?	[47]
TGLA322	A	55/50	3	✓	[45]	**HAUT27**	C	–	0	–	[48]
HEL1	B	60	4	M	[49]	**RT6**	D	55/50	3	Ø	[50]
ETH2	B	65/60	1	–	[51]	**RT9**	C	–	0	–	[50]
SR-CRSP1	D	60/55	3	✓	[52]	**RT23**	D	60	4	✓	[50]
BM1258	C	60	3	M	[53]	**RT27**	A	60/55	3	✓	[50]
BM1818	C	55/50	2	–	[53]	**RT30**	A	60/55	3	✓	[50]
BM4208	D	60/55	3	✓	[53]	**SR-CRSP24**	D	53.8	3	Ø	[54]
BM4513	A	65/60	3	Ø	[53]	**NVHRT21**	C	53.8	3	?	[55]
BM6444	A	–	0	–	[53]	**NVHRT30**	B	–	0	–	[55]
BMC1009	D	65/60	3	?	[53]	**NVHRT73**	C	65/60	2	–	[55]
BM4505	C	65/60	1	–	[53]	**Roe1**	B	–	0	–	[56]
OarFCB48	A	60	2	–	[57]	**Roe9**	C	60/55	1	–	[56]
CSSM014	C	53.8	3	?	[58]	**CSSM041**	B	–	0	–	[59]
INRA107	A	53.8	3	Ø	[60]	**Mgoua7**	C	65/60	4	M	[44]
INRA121	A	60	3	M	[60]	**Mgoua10**	B	–	0	–	[44]
OMHc1^	C	65/60	2	–	[61]	**Mgoua17**	B	65/60	4	M	[44]
MAF70	C	60	1	–	[61]	**Mgoua18**	A	60	1	–	[44]
OarCP26	A	60/55	1	–	[62]	**Mgoua24**	C	65/60	4	M	[44]
ILST011	D	60/55	4	M	[63]	**Mgoua25**	A	–	0	–	[44]
ILST029	B	53.8	1	–	[63]	**ApoV103**	A	65/60	4	M	[25]
ILST030	B	60	4	M	[63]	**ApoV104**	B	60	4	M	[25]
IDVGA8	C	65/60	2	–	[64]	**ApoV109**	A	65/60	4		[25]
ABS12	B	60/55	2	–	[65]						

jól leolvasható termékcsúcsokat adó markerek kerültek, amelyeknél a tíz vizsgált mintán legalább két alléltípus volt kimutatható.

A harmadik kategóriába sorolt markerek közül összesen kettő volt monomorf, négy nem „megfelelő", négy „feltételesen megfelelő", és öt darab volt, ami „megfelelőnek" bizonyult. A negyedik kategóriába sorolt markerek közül kilenc bizonyult monomorfnak, egy volt „feltételesen megfelelő", és kettő „megfelelő" *(1. táblázat)*. Így összesen hét darab „megfelelő" alkategóriába tartozó markert találtunk, amelyeket *a 2. táblázat*ban jelenítettünk meg a hozzájuk tartozó allélszámokkal, effektív allélszámokkal, valamint megfigyelt-, ill. várható heterozigozitási

2. TÁBLÁZAT. *A hét polimorf, megbízhatóan leolvasható mikroszatellita, valamint a hozzájuk tartozó allélszám (Na), effektív allélszám (Ne), megfigyelt- (Ho), ill. várható heterozigozitás (He)*

TABLE 2. *The seven polymorphic, reliably readable microsatellites and their number of alleles (Na), number of effective alleles (Ne), observed heterozygosity (Ho), and expected heterozygosity (He)*

	ApoV109	RT30	BM4208	SR-CRSP1	TGLA322	RT27	RT23
Na	2	2	2	3	2	4	4
Ne	1,105	1,835	1,220	1,942	1,906	2,041	2,597
Ho	0,100	0,700	0,200	0,300	0,333	0,300	0,800
He	0,095	0,455	0,180	0,485	0,475	0,510	0,615

értékekkel együtt. Az allélszámok kettő és négy között, az effektív allélszámok 1,1 és 2,6 között alakultak. A megfigyelt heterozigozitás értékek 0,1 és 0,8 között, míg a várható heterozigozitás értékek 0,1 és 0,6 közötti értékeket mutattak.

MEGVITATÁS

Annak érdekében, hogy egy korábban általunk egyedazonosítási célra kiválasztott tetramer mikroszatellitákból álló markerszettet robusztusabbá tegyünk a kisebb egyedszámú, akár erősen beltenyészett populációknál való alkalmazhatóság érdekében, további markerekkel kívántuk azt kiegészíteni. Mivel a rendelkezésre álló valamennyi, szarvasokban leírt tetramer mikroszatellita markert már korábban teszteltük, ezért a dimer és trimer szerkezetű markerek tesztelése volt a következő lépés. A vizsgálat kezdeti szakaszában általunk alkalmazni kívánt módszert, ami azon alapul, hogy a komplexebb szerkezetű mikroszatelliták az ismétlődő motívum hosszától (dimer, trimer, stb.) függetlenül kevésbé dadognak [66–70], el kellett vetnünk, mivel az általunk talált markerek vagy mind szimpla szerkezetűek voltak, vagy nem állt rendelkezésre információ a szerkezetükről.

Összesen kilenc marker esett ki az optimalizáció során

Összesen kilenc marker esett ki az optimalizáció során. Trimer mikroszatelliták esetében ennek oka lehet, hogy ezek más fajokból származtak, és a dámszarvas vizsgálatára nem alkalmas markerek. Pl. lehetséges, hogy mutáció következtében hiányzik az ismétlődő mintázat, ill., hogy az eredeti fajhoz képest a primerkötő régióban keletkezett eltérés megakadályozhatta a primerkötődést és ezzel az amplifikációs folyamatot [71, 72]. Erre már több példa volt szarvasokra fejlesztett markerszettek ún. fajok közötti (cross-species) tesztelése során [21, 22, 26, 39, 73]. Emellett azonban az általunk használt „farkazásos" jelölő technikának nagyobb eséllyel tulajdonítható egyes markerek kiesése, főleg dimerek esetében, ahol a markerek már tesztelve voltak korábban dámszarvasra. Más kutatások során is

felmerültek a jelölési technikával kapcsolatos problémák, pl. primer-dimerizáció [74], vagy az annelációs hőmérsékletoptimum eltolódása [26, 39, 75]. Az előbbi esetben a primerek összekapcsolódása miatt azok nem tudnak a DNS-hez kötődni, így a reakció nem megy végbe, míg az utóbbinál az optimum hőmérséklet oly mértékben eltolódhat, hogy az ellehetetleníti a megfelelő, melléktermékmentes amplikon képződését. Mindezen problémák ellenére azonban a technika oly mértékben csökkenti a költségeket nagy mennyiségű marker teszteléséné, hogy használata továbbra sem elvetendő.

A negyedik kategóriából, ahol nem tapasztaltunk jelentős *upstream* vagy *downstream* dadogást, kevesebb polimorf markert mutattunk ki, mint a harmadik kategóriából, ahol jelen volt *upstream* dadogás. Ennek oka abban keresendő, hogy a PCR során a dadogást kiváltó folyamat (a polimeráz enzim megcsúszása) felelős a természetben is a másolási hibák révén az új allélek keletkezéséért. Emiatt a dadogást elhanyagolható mértékben mutató mikroszatelliták kisebb valószínűséggel lesznek polimorfak, vagy kevesebb alléljük lesz, mint dadogást mutató társaiknak, a dadogás maga viszont rontani fogja a marker megbízhatóságát. A „feltételesen megfelelő" markereket, ahol egyes mintáknál irreguláris, nem dadogás jellegű csúcsokat találtunk, azonban még tovább kell tesztelnünk, és a megfelelően leolvasható, de monomorfnak bizonyult markereket is érdemes további populációkon vizsgálni.

Hét darab olyan polimorf markert sikerült találnunk, amely megfelelő a genotípus megállapításához

Összesen hét darab olyan polimorf markert sikerült találnunk, amely megfelelően kis mértékű műtermékképződéssel rendelkezett az egyértelmű genotípus megállapításához. Az ezeknél megfigyelt allélszámok, ill. heterozigozitási értékek alapján elmondható, hogy a legtöbb marker mutatta a dámszarvasnál már több kutatás által kimutatott kismértékű genetikai diverzitást [3, 10, 13, 26, 39, 73, 75–81], ami mind populáción belül [78], mind populációk között [3] megfigyelhető volt és amely jelenség mögött a már korábban leírt természetes és emberi tényezők állhatnak. Más, genetikai palacknyakhatáson átment [82–84], vagy többlépcsős betelepítések által alakított fajoknál [85, 86] is megfigyeltek már hasonlóan kicsi diverzitást.

Ugyanakkor valószínű, hogy a kapott értékekhez hozzájárult a vizsgálatban használt kis mintaszám is. Ezt a jövőben egy kibővített teszteléssel fogjuk ellenőrizni, mivel a jelenlegi kutatás csupán előkísérletként szolgált a potenciális markerek felkutatására. A kutatásunk során tesztelt markerekkel kiegészített mikroszatellita panel azonban a jövőre nézve egy megbízhatóbb és a szélesebb körű alkalmazást lehetővé tévő módszert kínál a dámszarvasok egyedi szintű azonosítása terén.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatási folyamatok finanszírozása az Állatorvostudományi Egyetem Doktori Iskolájának és az Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP) pályázatának támogatásával valósult meg (Pályázati kód: ÚNKP-23-3-II-ÁTE-15). Köszönjük mindazoknak a vadászoknak a segítségét, akik a dámvad minták biztosításával lehetővé tették vizsgálatainkat. Köszönjük továbbá Nagymihály Léna szakdolgozónak a laborban nyújtott munkáját.

IRODALOM

1. Csányi S, Márton M, Bőti S, Schally G (2023) Vadgazdálkodási Adattár 2022/2023. vadászati év. MATE VTI

2. Szabolcs J (1975) A dámvad. Mezőgazda kiadó, Budapest

3. Baker K, Gray H, Ramovs V, Mertzanidou D, Akın Pekşen Ç, Bilgin CC, Sykes N, Hoelzel A (2017) Strong population structure in a species manipulated by humans since the Neolithic: the European fallow deer (Dama dama dama). Heredity 119:16–26. https://doi.org/10.1038/hdy.2017.11

4. Pemberton J, Smith R (1985) Lack of biochemical polymorphism in British fallow deer. Heredity 55:199–207. https://doi.org/10.1038/hdy.1985.92

5. Masseti M, Pecchioli E, Vernesi C (2008) Phylogeography of the last surviving populations of Rhodian and Anatolian fallow deer (Dama dama dama L., 1758). Biol J Linn Soc 93:835–844. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00951.x

6. Yannouli E, Trantalidou K (1998) The Fallow deer (Dama dama L. 1758) in Greece. Archaeological Presence and Representation, 1999. Holocene Hist Eur Vertebr Fauna Mod Asp Res Verl Marie Leidorf GmbH Berl 247–263

7. Chapman N, Chapman D (2008) The distribution of fallow deer: A worldwide review. Mammal Rev 10:61–138. https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1980.tb00234.x

8. Perdikaris S, Bain A, Grouard S, Baker K, Gonzalez E, Hoelzel AR, Miller H, Persaud R, Sykes N (2018) From icon of empire to national emblem: new evidence for the fallow deer of Barbuda. Environ Archaeol 23:47–55. https://doi.org/10.1080/14614103.2017.1349027

9. Faragó S (2006). In: Magyar Vadász Enciklopédia. Totem Kiadó, Budapest, pp 232–233

10. Webley LS, Zenger KR, Hall GP, Cooper DW (2007) Genetic structure of introduced European fallow deer (Dama dama dama) in Tasmania, Australia. Eur J Wildl Res 53:40–46. https://doi.org/10.1007/s10344-006-0069-8

11. Say L, Naulty F, Hayden T (2003) Genetic and behavioural estimates of reproductive skew in male fallow deer. Mol Ecol 12:2793–2800. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01945.x

12. Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Rojas M, Hernández P, 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

13. Pitarch JL, Raksa HC, Arnal MC, Revilla M, Martínez D, Fernández de Luco D, Badiola JJ, Goldmann W, Acín C (2018) Low sequence diversity of the prion protein gene (PRNP) in wild deer and goat species from Spain. Vet Res 49:1–7. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0528-8

14. Hoban S, Bruford M, Jackson JD, Lopes-Fernandes M, Heuertz M, Hohenlohe PA, Paz-Vinas I, Sjögren-Gulve P, Segelbacher G, Vernesi C, Aitken S, Bertola LD, Bloomer P, Breed M, Rodríguez-Correa H, Funk WC, Grueber CE, Hunter ME, Jaffe R, Liggins L, Mergeay J, Moharrek F, O'Brien D, Ogden R, Palma-Silva C, Pierson J, Ramakrishnan U, Simo-Droissart M, Tani N, Waits L, Laike L (2020) Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. Biol Conserv 248:108654. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108654.

15. Nassar LR, Barber GP, Benet-Pagès A, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Fischer C, Gonzalez JN, Hinrichs AS, Lee BT, Lee CM, Muthuraman P, Nguy B, Pereira T, Nejad P, Perez G, Raney BJ, Schmelter D, Speir ML, Wick BD, Zweig AS, Haussler D, Kuhn RM, Haeussler M, Kent WJ (2023) The UCSC genome browser database: 2023 update. Nucleic acids res 51:D1188–D1195. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1072.

16. Ekrami B, Tamadon A, Jahromi IR, Moghadas D, Seno Ghahramani MM, Ghaderi-Zefrehei M (2016) Fertility reduction in male Persian fallow deer (Dama dama mesopotamica): Inbreeding detection and morphometric parameters evaluation of semen. Journal of Biosciences and Medicines 4:31. https://doi.org/10.4236/jbm.2016.46005

17. Ekroth AK, Rafaluk-Mohr C, King KC (2019) Host genetic diversity limits parasite success beyond agricultural systems: a meta-analysis. Proc R Soc B 286:20191811. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1811

18. Pérez-González J, Gort-Esteve A, Ruiz-Olmo J, Anaya G, Broggini C, Millán MF, Vedel G, de la Peña E, Membrillo A, Seoane JM, Azorit C, Carranza J (2023) Red deer in the Pyrenees: A risky secondary contact zone for conservation genetics. J Wildlife Manag 87:e22454. https://doi.org/10.1002/jwmg.22454

19. Carranza J, Pérez-González J, Anaya G, de Jong M, Broggini C, Zachos FE, McDevitt AD, Niedziałkowska M, Sykut M, Csányi S, others Genome-wide SNP assessment of contemporary European red deer genetic structure highlights the distinction of peripheral populations and the main admixture zones in Europe. Mol Ecol e17508. https://doi.org/10.1111/mec.17508

20. Valnisty AA, Homel KV, Kheidorova EE, Molchan VO, Nikiforov MY (2024) Between the lines: mitochondrial lineages in the heavily managed red deer population of Belarus. Mamm Biol 104:205–214. https://doi.org/10.1007/s42991-023-00397-w

21. 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

22. Morf NV, Kopps AM, Nater A, Lendvay B, Vasiljevic N, Webster LM, 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

23. 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

24. Jones K, Levine K, Banks J (2000) DNA-based genetic markers in black-tailed and mule deer for forensic applications. Calif Fish Game 86:115–126

25. Hill E, Murphy N, Toop S, Linacre A, Strugnell JM (2022) Genetic analysis of hog deer (Axis porcinus) in Victoria, Australia, and its applications to invasive species and game management. Eur J Wildl Res 68:45. http://dx.doi.org/10.1007/s10344-022-01592-9

26. 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. http://dx.doi.org/10.3390/ani13132083

27. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol Ecol 11:2453–2465. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x

28. Lu C, Sun Z, Xu P, Na R, Lv W, Cao D, Liu T, Zheng X (2022) Novel microsatellites reveal wild populations genetic variance in pike-perch (Sander lucioperca) in China. Aquac Rep 23:101031. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101031

29. Winker K, Glenn TC, Graves GR (1999) Dinucleotide microsatellite loci in a migratory wood warbler (Parulidae: Limnothlypis swainsonii) and amplification among other songbirds. Mol Ecol 8:1553–1556

30. Thiessen RJ, Heath DD (2007) Characterization of one trinucleotide and six dinucleotide microsatellite markers in bicolor damselfish, Stegastes partitus, a common coral reef fish: Seven novel microsatellites in Stegastes partitus. Conserv Genet 8:983–985. https://doi.org/10.1007/s10592-006-9207-9

31. Abdul-Muneer P (2014) Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. Genet Res Int 2014:691759. https://doi.org/10.1155/2014/691759

32. Serrote CML, Reiniger LRS, Stefanel CM, Silva KB da, Golle DP (2023) Microsatellites are important for forest genetic resources conservation in Brazilian biomes. Acta Bot Bras 37:e20220176. https://doi.org/10.1590/1677-941X-ABB-2022-0176

33. Shults P, Moran M, Blumenfeld AJ, Vargo EL, Cohnstaedt LW, Eyer P-A (2022) Development of microsatellite markers for population genetics of biting midges and a potential tool for species identification of Culicoides sonorensis Wirth & Jones. Parasit Vectors 15:69. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05189-8

34. Cortes O, Cañon J, Gama LT (2022) Applications of microsatellites and single nucleotide polymorphisms for the genetic characterization of cattle and small ruminants: An overview. Ruminants 2:456–470. https://doi.org/10.3390/ruminants2040032

35. Kleven O, Hallström BM, Hailer F, Janke A, Hagen SB, Kopatz A, Eiken HG (2012) Identification and evaluation of novel di-and tetranucleotide microsatellite markers from the brown bear (Ursus arctos). Conserv Genet Resour 4:737–741. https://doi.org/10.1007/s12686-012-9634-5

36. Linacre A (2021) Animal forensic genetics. Genes 12:515

37. Jones KC, Levine KF, Banks JD (2002) Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (Cervus elaphus canadensis). Mol Ecol Notes 2:425–427. http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00264.x

38. Meredith E, Rodzen J, Levine K, Banks J (2005) Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (Cervus elaphus) for use in forensic and population applications. Conserv Genet 6:151–153. http://dx.doi.org/10.1007/s10592-004-7735-8

39. Turi O, Wagenhoffer Z, Battay M, Lehotzky P, Zorkóczy O (2023) Mikroszatellita-markerek tesztelése dámszarvasok egyedi azonosítása céljából. Magy Állatorvosok Lapja 145:67–76. https://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.03.183-192

40. Zsinka B, Vili N, Szabó K, Tisza Á, Csonka V, Pásztory-Kovács S (2024) Mikroszatellita-markerkészlet fejlesztése parlagi sasok (Aquila heliaca) egyedi azonosításához rokon fajokban leírt markerek segítségével. Magy Állatorvosok Lapja 146:357–365. https://doi.org/10.56385/magyallorv.2024.06.357-365

41. Blacket M, Robin C, Good R, Lee S, Miller A (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. Mol Ecol Resour 12:456–463. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x

42. Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6:288–295. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

43. Smouse RPP, Peakall R (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics 28:2537–2539. https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbts460

44. Caparroz R, Mantellatto A, Bertioli DJ, Figueiredo MG, Duarte JMB (2015) Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer Mazama gouazoubira. Genet Mol Biol 38:338–345. https://doi.org/10.1590/s1415-475738320140344

45. Georges M, Massey JM (1992) Polymorphic DNA markers in Bovidae. Patent WO 92/13102.

46. Stone R, Pulido J, Duyk G, Kappes S, Keele J, Beattie C (1995) A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. Mamm Genome 6:714–724. https://doi.org/10.1007/BF00354294

47. Konfortov B, Jørgensen C, Barendse W, Miller J (1996) Five bovine polymorphic microsatellite markers (AF1-AF5). Anim Genet 27:220–221. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1996.tb00971.x

48. Thieven U, Solinas-Toldo S, Friedl R, Masabanda J, Fries R, Barendse W, Simon D, Harlizius B (1997) Polymorphic CA-microsatellites for the integration of the bovine genetic and physical map. Mamm Genome 8:52–55. https://doi.org/10.1007/s003359900348

49. Kaukinen J, Varvio S (1993) Eight polymorphic bovine microsatellites. Anim Genet 24:148. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1993.tb00304.x

50. Wilson G, Strobeck C, Wu L, Coffin J (1997) Characterization of microsatellite loci in caribou Rangifer tarandus, and their use in other artiodactyls. Mol Ecol 6:697–699. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00237.x

51. Toldo SS, Fries R, Steffen P, Neiberg H, Barendse W, Womack J, Hetzel D, Stranzinger G (1993) Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. Mamm Genome 4:720–727. https://doi.org/10.1007/BF00357796

52. Arevalo E, Holder D, Derr J, Bhebbe E, Linn R, Ruvuna F, Davis S, Taylor J (1994) Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-1, SR-CRSP-2, SR-CRSP-3, SR-CRSP-4 and SR-CRSP-5 loci. Anim Genet 25:202. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1994.tb00124.x

53. Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden S, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo J (1994) A genetic linkage map for cattle. Genetics 136:619–639. https://doi.org/10.1093/genetics/136.2.619

54. Yeh C, Kogi J, Holder M, Guerra T, Davis S, Taylor J (1997) Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP21, SR-CRSP22, SR-CRSP23, SR-CRSP24, SR-CRSP25, SR-CRSP26 and SR-CRSP27 loci. Anim Genet 28:380–381. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1997.tb03284.x

55. Røed K, Midthjell L (1998) Microsatellites in reindeer, Rangifer tarandus, and their use in other cervids. Mol Ecol 7:1773–1776. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00514.x

56. Fickel J, Reinsch A (2000) Microsatellite markers for the European Roe deer(Capreolus capreolus). Mol Ecol 9:994–995. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00939-2.x

57. Buchanan F, Galloway S, Crawford A (1994) Ovine microsatellites at the OarFCB5, OarFCB19, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB129 and OarFCB226 loci. Anim Genet 25:60. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1994.tb00069.x

58. Moore S, Byrne K, Berger K, Barendse W, McCarthy F, Womack J, Hetzel D (1994) Characterization of 65 bovine microsatellites. Mamm Genome 5:84–90. https://doi.org/10.1007/BF00292333

59. Cosse M, González S, Maldonado JE (2007) Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (Ozotoceros bezoarticus). Genet Mol Res 6:1118–1122

60. Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K, Eggen A, Ciampolini R, Lépingle A, Velmala R, Kaukinen J, Varvio S-L, Martin P, Levéziel H, Guérin G (1994) A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. Mamm Genome 5:288–297. https://doi.org/10.1007/BF00389543

61. Crawford A, Dodds K, Ede A, Pierson C, Montgomery G, Garmonsway H, Beattie A, Davies K, Maddox J, Kappes S (1995) An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. Genetics 140:703–724. https://doi.org/10.1093/genetics/140.2.703

62. Ede A, Pierson C, Crawford A (1995) Ovine microsatellites at the OarCP9, OarCP16, OarCP20, OarCP21, OarCP23 and OarCP26 loci. Anim Genet 26:129–130. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1995.tb02655.x

63. Kemp SJ, Hishida O, Wambugu J, Rink A, Teale A, Longeri M, Ma R, Da Y, Lewin H, Barendse W, Teale AJ (1995) A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. Anim Genet 26:299–306. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1995.tb02663.x

64. Mezzelani A, Zhang Y, Redaelli L, Castiglioni B, Leone P, Williams J, Toldo SS, Wigger G, Fries R, Ferretti L (1995) Chromosomal localization and molecular characterization of 53 cosmid-derived bovine microsatellites. Mamm Genome 6:629–635. https://doi.org/10.1007/BF00352370

65. 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 Genet 6:1–4. https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-16

66. Aponte RA, Gettings KB, Duewer DL, Coble MD, Vallone PM (2015) Sequence-based analysis of stutter at STR loci: characterization and utility. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser 5:e456–e458. https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.181

67. Bright J-A, Buckleton JS, Taylor D, Fernando M, Curran JM (2014) Modeling forward stutter: toward increased objectivity in forensic DNA interpretation. Electrophoresis 35:3152–3157. https://doi.org/10.1002/elps.201400044

68. Brookes C, Bright J-A, Harbison S, Buckleton J (2012) Characterising stutter in forensic STR multiplexes. Forensic Sci Int Genet 6:58–63. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.02.001

69. Hall CR (2000) Effects on stutter production during amplification of tetranucleotide STR loci. San Jose State University. San Jose.

70. Vilsen SB, Tvedebrink T, Eriksen PS, Bøsting C, Hussing C, Mogensen HS, Morling N (2018) Stutter analysis of complex STR MPS data. Forensic Sci Int Genet 35:107–112. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.003

71. Leibelt C, Budowle B, Collins P, Daoudi Y, Moretti T, Nunn G, Reeder D, Roby R (2003) Identification of a D8S1179 primer binding site mutation and the validation of a primer designed to recover null alleles. Forensic Sci Int 133:220–227. https://doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00035-5

72. Takayama T, Takada N, Suzuki R, Nagaoka S, Watanabe Y (2007) Identification of a rare mutation in a TH01 primer binding site. Leg Med 9:289–292. https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2007.04.003

73. Poetsch M, Seefeldt S, Maschke M, Lignitz E (2001) Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer—possible employment in forensic applications. Forensic Sci Int 116:1–8. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00337-6

74. Luttman AM, Komine M, Thaiwong T, Carpenter T, Ewart SL, Kiupel M, Langohr IM, Venta PJ (2022) Development of a 17-plex of penta-and tetra-nucleotide microsatellites for DNA profiling and paternity testing in horses. Front Vet Sci 9:861623. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.861623

75. Zorkóczy OK, Turi O, Lehotzky P, Zenke P (2023) Testing of microsatellite markers for individual identification of fallow deer. Danub Anim Genet Resour 8:81–86. https://doi.org/10.59913/dagr.2023.12360

76. Hartl G, Schleger A, Slowak M (1986) Genetic variability in fallow deer, Dama dama L. Anim Genet 17:335–341. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1986.tb00726.x

77. Randi E, Apollonio M (1988) Low biochemical variability in European fallow deer (Dama dama L.): natural bottlenecks and the effects of domestication. Heredity 61:405–410. https://doi.org/10.1038/hdy.1988.131

78. Kusza S, Ashrafzadeh MR, Tóth B, Jávor A (2018) Maternal genetic variation in the northeastern Hungarian fallow deer (Dama dama) population. Mamm Biol 93:21–28. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.08.005

79. Scandura M, Tiedemann R, Apollonio M, Hartl GB (1998) Genetic variation in an isolated Italian population of fallow deer Dama dama as revealed by RAPD-PCR. Acta Theriol (Warsz) 43:163–169. http://dx.doi.org/10.4098/AT.arch.98-41

80. Luikart G, Allendorf F, Cornuet J, Sherwin W (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. J Hered 89:238–247. https://doi.org/10.1093/jhered/89.3.238

81. Scandura M (2004) The use of microsatellites in the study of social structure in large mammals: Italian wolf and fallow deer as case studies. University of Bielefeld. Bielefeld,

82. de Oliveira E, Garcia J, Contel EPB, Duarte J (2005) Genetic structure of Blastocerus dichotomus populations in the paraná river basin (Brazil) based on protein variability. Biochem Genet 43:211–222. https://doi.org/10.1007/s10528-005-5212-9

83. Oliveira EJF, Garcia JE, Duarte JMB, Contel EPB (2009) Development and characterization of microsatellite loci in the marsh deer (Blastocerus dichotomus Cervidae). Conserv Genet 10:1505–1506. https://doi.org/10.1007/s10592-008-9769-9

84. Marquez A, Maldonado J, González S, Beccaceci M, Garcia J, Duarte J (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (Blastocerus dichotomus) from the Río de la Plata Basin. Conserv Genet 7:563–575. https://doi.org/10.1007/s10592-005-9067-8

85. Satta V, Mereu P, Barbato M, Pirastru M, Bassu G, Manca L, Naitana S, Leoni GG (2021) Genetic characterization and implications for conservation of the last autochthonous Mouflon population in Europe. Sci Rep 11:14729. https://doi.org/10.1038/s41598-021-94134-3

86. Meadows J, Kijas J (2009) Re-sequencing regions of the ovine Y chromosome in domestic and wild sheep reveals novel paternal haplotypes. Anim Genet 40:119–123. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01799.x

Közlésre érk.: 2024. szept. 9.