

Állatorvostudományi Egyetem
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi
Intézet

Magyarországi dámszarvas populációk genetikai diverzitásának
felmérése igazságügyi célú vizsgálatokhoz

Készítette:

Turi Orsolya

III. évfolyam biológia BSc hallgató

Témavezetők:

Dr. Zenke Petra, tudományos főmunkatárs

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet

Zorkóczy Orsolya, tudományos segédmunkatárs

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet

2023

Absztrakt

A vadvilág ellen elkövetett bűncselekmények egyre nagyobb mértékben fordulnak elő, így a vadgazdálkodási szempontból is értékes dámszarvas állomány védelme szükséges. Kutatásunk célja egy igazságügyi célú felhasználásra is alkalmas genetikai markerkészlet fejlesztése volt. Ehhez kétféle markertípust használtunk: a geográfiai elkülönítésre potenciálisan alkalmas mitokondriális kontroll régió haplotípusait, és az egyedi szintű azonosításra használható nukleáris tetramer mikroszatellitákat (100 db). Mindkét markertípussal alacsony genetikai változatosságot mutattunk ki a magyar dām vad állományon belül (5 haplotípus 100 mintában, illetve 16 polimorf mikroszatellita 2-5 alléllal 20 mintán vizsgálva), ami a mitokondriális marker esetében nem teszi lehetővé a földrajzi elkülönítést, de kizárásos vizsgálatokra így is alkalmazható. A mikroszatelliták esetében a megfigyelt diverzitás az identitás valószínűség ($PI=1,2 \cdot 10^{-5}$) alapján alkalmas egyedi szintű azonosításra, vagyis sikeres volt a markerkészlet fejlesztése.

Assessing the genetic diversity of Hungarian fallow deer populations for forensic use

Wildlife crime is on the rise in Hungary, therefore, there is a need to protect the valuable fallow deer populations. The aim of our research was to develop a genetic marker set for forensic use. For this purpose, we used two types of genetic markers: the mitochondrial control region for possible geographic isolation and nuclear tetranucleotide microsatellites (100) for individual identification. Both types of markers showed low genetic variation within the Hungarian fallow deer population (5 haplotypes in 100 samples, 16 polymorphic microsatellites with 2-5 alleles in 20 samples). Based on our results the mitochondrial control region was proven to be unsuitable for identifying the geographic origin, however, it could still be useful for exclusion studies. Concerning microsatellites, the probability of identity ($PI=1.2 \cdot 10^{-5}$), calculated based on the observed diversity, suggests that it is suitable for individual identification, hence the marker set development was successful.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
1.1. Az európai dámvad (<i>Dama dama</i>) általános leírása.....	4
1.2. A magyarországi dámszarvas-gazdálkodás jellemzői.....	5
1.3. Igazságügyi célú állatgenetika kutatások.....	7
1.3.1 Mitokondriális DNS előnyei és alkalmazása igazságügyben.....	7
1.3.2 Mikroszatellita alapú genetikai vizsgálatok.....	8
1.4. Dámszarvassal kapcsolatos genetikai kutatások.....	11
2. Célkitűzések.....	13
3. Anyag és módszer.....	14
3.1. Mintagyűjtés és feldolgozás.....	14
3.2. Mitokondriális DNS kontroll régiójának vizsgálata.....	14
3.3. Mikroszatellita markerek vizsgálata.....	16
3.3.1. Markerek kiválasztása (tetranukleotid mikroszatelliták).....	16
3.3.2. A három tesztelt marker csoport.....	17
3.3.3. Markerek monoplex tesztelése és PCR optimalizálása.....	18
3.3.4. Primerek fluoreszcens jelölése „farkas” technikával.....	20
3.3.5. Multiplex PCR vizsgálati rendszerek összeállítása.....	20
3.3.6. Nem működő primerpárok újratervezése.....	22
3.3.7. Markerek polimorfizmusának detektálása kapilláris elektroforézissel.....	22
3.3.8. Populációgenetika és statisztikai elemzések.....	23
4. Eredmények.....	24
4.1. Mitokondriális DNS kontroll régió vizsgálata.....	24
4.2. Mikroszatelliták vizsgálata.....	26
4.2.1. Monoplex tesztelés.....	26

4.2.1.1.	A. markercsoport.....	26
4.2.1.2.	B. markercsoport.....	26
4.2.1.3.	C. markercsoport.....	27
4.2.1.4.	Újratervezett primerpárok.....	27
4.2.2.	Multiplex tesztelés.....	29
4.2.3.	Markerek polimorfizmusának felmérése és statisztikai elemzések.....	29
5.	Következtetések.....	31
5.1.	Mitokondriális DNS kontroll régió.....	31
5.2.	Mikroszatellita markerkészlet fejlesztése.....	32
5.2.1.	Monoplex PCR tesztelés.....	32
5.2.2.	Multiplex fejlesztés és a „farkas” fluoreszcens jelölési technika alkalmazhatósága.	33
5.2.3.	A markerkészlet alkalmazhatósága és a magyar dámvad populáció genetikai diverzitása.....	33
6.	Összefoglalás.....	36
7.	Irodalomjegyzék.....	37
8.	Köszönetnyilvánítás.....	41

1. BEVEZETÉS

A dámszarvas (*Dama dama*) jelentős, több, mint 40 000 egyedet számláló populációval rendelkezik Magyarországon, melynek közel 45%-a évente kilövésre kerül. A dämadvadászatára épült szolgáltatások, illetve a kilövésekből származó vadhús és trófea miatt a faj nagy vadgazdálkodási értéket képvisel, emellett kulturális és természetvédelmi jelentősége is van. Bár törvények szabályozzák a faj vadászatát, ennek ellenére az egyre növekvő mértékű orvvadászatnak olykor a dámszarvas is áldozatul esik. Az ilyen jogkövetkezményekkel járó eseteknél nehéz bizonyítani a gyanúsított bűnösségét. Ebben nyújthat segítséget a helyszínen és a gyanúsított személynél talált biológiai anyagmaradványok (pl. szarvashús) genetikai azonosítása, amivel az inkriminált állathoz, illetve a bűneset helyszínéhez köthető az elkövető. Ehhez azonban szükség van olyan genetikai markerekre, melyek lehetővé teszik a dámszarvasok egyedi szintű azonosítását, mely jelenleg nem áll rendelkezésre. Kutatásunk célja egy erre alkalmas markerkészlet összeállítása, mely további módszertani fejlesztéssel jogkövetkezményekkel járó esetekben is alkalmazható.

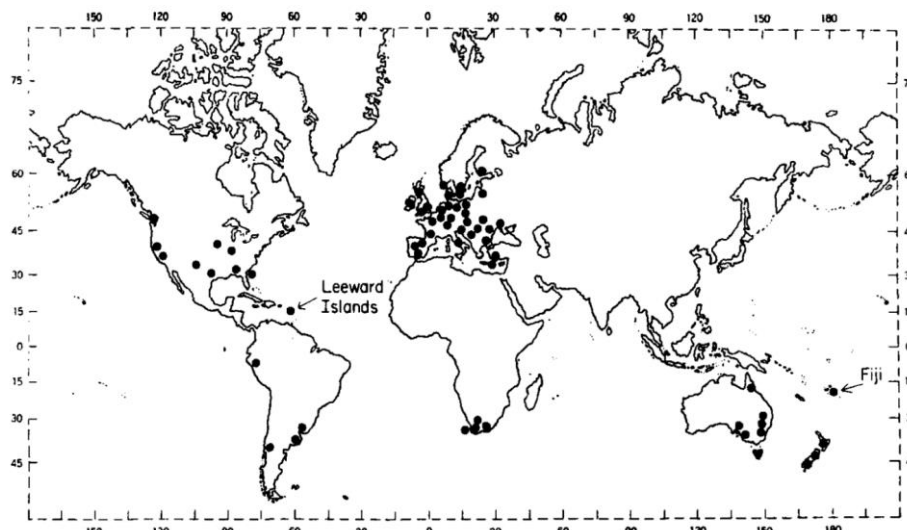
1.1. Az európai dämadvad (*Dama dama*) általános leírása

A dámszarvas a szarvasfélék (*Cervidae*) családjába tartozó nagytestű vad, melynek jellegzetes, lapátszerű agancsa megkülönbözteti a többi rokonfajtól [1]. A bikák és tehének az év nagy részében külön csoportokban élnek, általában csak szaporodási időszakban gyűlnek össze október környékén, szaporodási rendszerükre pedig a poligínia jellemző (egy hím több nőténnyel is párosodik egy szaporodási időszakban) [2, 3]. A dámszarvas által kedvelt élőhelytípusok a ritkásabb fás társulások, de ez évszakok, nemek, kor és területek szerint változhat [2, 4]. A füves és zárt erdei társulásokban is megfigyelhető a faj. Korábban az európai dämadvad alfajként (*Dama dama dama*) tartották számon a *Dama* genus-on belül a mezopotámiai dämadvaddal együtt (*Dama dama mesopotamica*) [5]. Ma már a molekuláris genetikai vizsgálatok alapján külön fajként jegyzik őket [6, 7].

Az európai dámszarvas nevével ellentétben eurázsiai eredetű, több kutatás is megerősítette, hogy a mai Törökország (Kis-Ázsia) területén élő dämadvadok alkotják az utolsó őshonos populációt [8, 9]. A faj mára kozmopolita elterjedésűvé vált (1. ábra) [5], melyet elsősorban nem természetes folyamatok, hanem ember általi be- és áttelepítések eredményeztek, melyek már a római civilizáció kora előtt megkezdődtek [9]. Erre azért volt szükség, mert korábban, a Pleisztocén (jégkorszakok) idején, a faj szinte teljesen kipusztult Európából, ami akkor a fő elterjedési területe volt [10]. A klimatikus hatásokat a legújabb kutatások szerint csak

Szicíliaiban, a Balkánon és Kis-Ázsia területén élte túl a dámszarvas [9]. A megmaradt kis populációk valószínűleg nem rendelkeztek a szükséges alkalmazkodó képességgel és genetikai diverzitással, hogy maguktól visszahódítsák területeiket, ezért ez csak emberi beavatkozással volt lehetséges [11].

A Pleisztocént követően a korai Neolitikum idején kezdődött meg a dámszarvas telepítése [9, 12]. Elsőként az Égei-tenger egyes szigeteire (Rodosz [12], Kréta [9]), majd a Bronzkorban több mediterrán területre is betelepítették nyugati irányban [12]. Később az egyik legnagyobb hatást a faj elterjedésére a Római Birodalom gyakorolta, hiszen a rómaiak telepítették be Közép-és Észak-Európában [13]. Így egészen Portugáliáig [14] és a spanyol szigetvilágig (Mallorca [15]) elterjedt, sőt Britanniába is a rómaiak vitték be a dámszarvast [16]. A késő középkorban a Brit-szigeteken, és más Észak-európai régiókban újabb telepítési hullám következett, ami valószínűleg nagyban meghatározta a mai populációkat [13]. Ezt követően a 18-20. században zajlott nagyobb mértékű transzlokációja a dámszarvasnak, így az 1900-as évektől az Antarktisz és Ázsiát leszámítva (kivéve Kis-Ázsia), valamennyi kontinensen jelen van, egészen a Karib-tenger térségétől Új-Zéland és Ausztrália szigetvilágáig (1. ábra) [5, 17].



1. ábra: Az európai dámvad (*Dama dama*) elterjedési területei (fekete pontok) [5].

1.2. A magyarországi dámszarvas-gazdálkodás jellemzői

A magyar dámszarvas populáció eredetéről megoszlanak a vélemények, egyik elterjedtebb nézet, hogy legkorábban az Anjou uralkodók, illetve Mátyás idejében történtek meg a betelepítések. Írásos feljegyzések csak a XVIII. századot követően vannak szabadon élő dámszarvasokról. Mai hazai elterjedése az 1969-ben induló betelepítési programnak köszönhető, melynek során 1970-1987 között 81 területre jutott el a faj [18, 19].

Manapság a legfrissebb adatok szerint több mint 40 000 a dāmavad populáció egyedszáma [20]. A legjelentősebb állományok Pest és Tolna megyében találhatóak (kb. 5000 egyed), amik már az 1980-as években is meghatározóak voltak [5, 20]. A legkevesebb dámszarvas Jász-Nagykun-Szolnok és Borsod-Abaúj-Zemplén megyékben van (kb. 200-200 egyed) [20].

A fajnak jelentős vadgazdálkodási értéke van az országban, egyrészt a vadhús, másrészt az agancs trófeák miatt. Ezt bizonyítja az is, hogy 2021/2022-es vadászati évben az egyedek 42,5%-a kilövésre került (közel 17 000 dāmavad), melyből majdnem 500 000 kg vadhús és 1906 érmes trófea származott. Az utóbbiak közül 783 a legrangosabb arany minősítést kapta [20]. Az érmes trófeák önmagukban is nagy értéket képviselnek, illetve az értékesített vadhús is, de a dámszarvas (és egyéb vad) vadászata köré épült szolgáltatások további bevételt nyújtanak az egyes vállalkozásoknak és az államnak. A 2021/2022-es vadászati évben a vadgazdálkodásból származó összbevétel 3780 millió Ft volt, tehát a faj gazdasági értéke nemcsak a belőle származó termékekből, hanem a vadászati engedélyekből és szolgáltatásokból is áll [20]. Emellett természetvédelmi és kulturális értékekkel is rendelkezik.

Ennek köszönhetően a dámszarvas vadászata jogszabályi keretek között zajlik (pl. 1996.évi LV.-ös törvény [21]). Az elejtés csak arra jogosult személy által, vadászati célra engedélyezett eszközzel és vadászati idényben történhet. Amennyiben bármelyik feltétel nem teljesül a kilövés során, akkor illegális vadászatról van szó.

Sajnálatos módon több kutatás is kimutatta az orvvadászat növekvő tendenciáját Magyarországon, de pontos számokat nehéz mondani [22, 23]. A dámszarvasok különösen csábító zsákmányt jelenthetnek ezeknek a vadászoknak, hiszen az országból kerülnek ki az egyik legjobb minőségű trófeák. Különösen Gyulaj környékén találhatóak a legértékesebb példányok, innen már több, a Nemzetközi Vadászati és Vadvédelmi Tanács (CIC) világranglistáján szereplő agancs is származik [24].

Az orvvadászatot azonban nehéz felfedezni és bizonyítani. Bár sokszor még a vadásznál van az illegálisan elejtett vad, de annak minden kétséget kizáró bizonyítása, hogy az adott egyedet ténylegesen nem megfelelő körülmények között lőtte ki, sokszor lehetetlen. A törvényszéki alkalmazottak munkáját tovább nehezíti a tény, hogy egyelőre nem áll rendelkezésre a hazai dāmokat egyedi szinten azonosítani képes validált genetikai módszer, amellyel a kilövés helyszínén és az elkövetőnél talált dámszarvastól származó biológiai anyagmaradványokat össze lehetne hasonlítani, és a vadászt az elkövetés helyszínéhez vagy az elejtett állathoz kötni [25].

A dámok védelme érdekében tehát szükség lenne egy, a jogkövetkezményekkel járó esetekben is használható, egyed szintű azonosításra alkalmas genetikai markerszett létrehozására, mely alkalmas lenne a fent említett ügyek megoldására. A kutatásunk egyik célja tehát ennek a markerkészletnek a kifejlesztése. Ilyen kutatásokkal az igazságügyi állatgenetika tudománya foglalkozik.

1.3. Igazságügyi célú állatgenetika kutatások

Az igazságügyi genetika célja a bűnesetekkel kapcsolatos biológiai bizonyítékok vizsgálata a bűntény megoldásának érdekében. A 2000-es évektől már nemcsak embereken elkövetett bűncselekmények esetében alkalmaznak genetikai vizsgálatokat, hanem megkezdődtek a vadvilág védelme érdekében végzett kutatások is [23, 26–30]. A vadon élő állatok ellen elsősorban az orvvadászat és illegális kereskedelem a leggyakrabban elkövetett bűncselekmény [31]. Emellett előfordulhatnak vadgázolások [32], illetve azok az esetek is, mikor a hústermékeket nem az árumegjelölésen feltüntetett állatfajból állítják elő [33, 34]. Az említett ügyek megoldásához sokféle genetikai markert alkalmaznak a kutatók, melyek a fajok elkülönítésére [33–37], az ivar meghatározására [38] vagy sok esetben egyed szintű azonosításra [23, 26–29] alkalmasak.

1.3.1 Mitokondriális DNS előnyei és alkalmazása igazságügyben

Az alkalmazott genetikai módszerek közé tartozik a mitokondriális DNS (mtDNS) vizsgálata, mely használható faji/alfaji megkülönböztetésre [33, 34, 37, 39–41], illetve egyes esetekben populációk elkülönítésére is [42, 43]. A nukleáris génszakaszoknál általában magasabb mutációs rátájával rendelkezik, amit a kevésbé hatékony másolási hibát javító mechanizmusok eredményeznek [44], uniparentális (anyai) öröklődése miatt pedig a rekombinációk hiányoznak [45]. A mitokondriális szakaszok vizsgálata fontos lehet a geográfiai eredet meghatározásánál, mivel egy-egy haplotípus adott régióban történő fixálódásával egy ismeretlen eredetű biológiai minta haplotípusa alapján az egyed származási helye meghatározható [13]. A mtDNS-t az alkalmazási lehetőségei miatt ajánlott lehet az egyedi szintű azonosításra alkalmas genetikai markerek mellett használni, mint kiegészítő vizsgálatot.

A mtDNS széleskörben alkalmazott szakasza a kontroll régió (D-loop), mely a mitokondrium cirkuláris genomjának nem kódoló része, ami egy centrális konzervált és két perifériális hipervariábilis régióból áll [46]. Több kutatás is kimutatta a hatékony inter- és intraspecifikus elkülönítési képességét a perifériák hipervariabilitásának köszönhetően [30, 39, 45, 47, 48], így jól alkalmazható az említett kiegészítő vizsgálatokhoz.

A mtDNS további előnye, hogy erős fehérje burok veszi körül, illetve sejtenként akár több ezer kópiában is előfordulhat, ezáltal kis mennyiségű degradált mintákból is általában sikeresen kimutatható [49]. Mivel jogkövetkezményekkel járó eseteknél gyakran a környezeti hatások miatt erősen sérült mintákat kell vizsgálni (pl. UV, nedvesség és baktérium okozta bomlás) [50], így a nukleáris DNS mellett érdemes a mtDNS vizsgálata is, hiszen előfordulhat, hogy csak ez mutatható ki a mintából.

1.3.2 Mikroszatellita alapú genetikai vizsgálatok

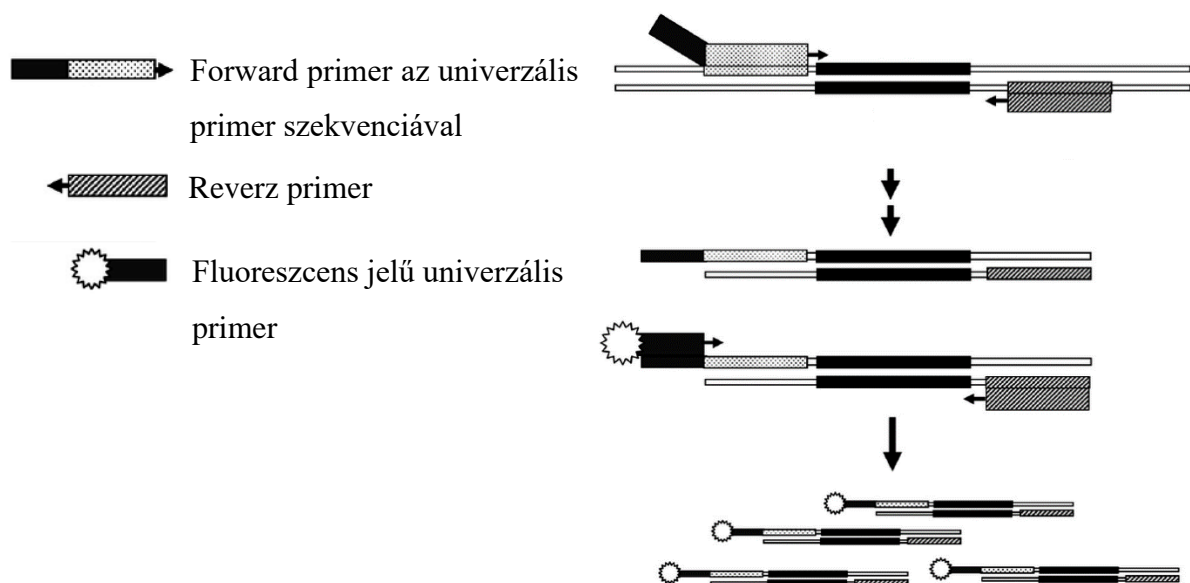
A vadvilági bűnesetek megoldásához sokszor egyed szintű azonosítás szükséges [23, 26–29], a csupán ivari vagy faji azonosítást célzó módszerek ugyanis csak bizonyos esetekben elégségesek (pl. hústermékek összetételének vizsgálata [33]). Az egyedi szintű azonosítás elterjedt módja a mikroszatelliták alkalmazása, melyeket STR-eknek (rövid tandem ismétlődések) is hívják. Ezek a DNS részek 2-6 bázispár hosszúságú egységekből állnak (pl. ATC-ATC), melyek egymás után többször ismétlődnek a szekvenciában. A mikroszatelliták mutációs rátája igen magas [51], így nagy mértékű polimorfizmust mutatnak. A variabilitás a bázismotívum ismétlődésének számában mutatkozik meg, tehát hosszpolimorfizmusról van szó [26]. Adott lokuszon minden eltérő számú ismétlődést tartalmazó mikroszatellita egy-egy allélt jelent. Egy taxon adott populációján belül több allél fordulhat elő egy lokuszon, de egy egyeden belül maximum két különböző lehet (egy apai és egy anyai). Mivel a komplexebb élőlények genomjában nagy számú mikroszatellita található, melyeknek egyenként is sok allélja lehet populációs szinten, így ezeknek az alléleknek a kombinálásával egyedi szintű genetikai „mintázatot” (genotípus) kapunk, amely kimutatása fontos része a forenzikus célú vizsgálatoknak [26]. Emellett mikroszatellitákat alkalmaznak például populáció struktúra [52, 53] és genetikai diverzitás kutatásához is [54].

Forenzikus vizsgálatoknál a mikroszatellitákon belül a tetranukleotidok alkalmazása javasolt, vagyis azon markerek, melyekben négy bázispárból áll az ismétlődő motívum (pl. TAGA-TAGA) [23, 26–29]. Az ennél hosszabb penta- és hexamer mikroszatelliták ugyanis nem annyira gyakoriak az élőlényekben, és rendszerint kevés alléllal rendelkeznek ahhoz, hogy egyedi azonosításra használhassák őket [26]. A rövidebb di- és trimer mikroszatelliták pedig a PCR során sokszor áterméket adnak, vagyis kevesebb vagy több ismétlődést tartalmaz a termék, mint a kiindulási DNS [23, 26]. Ez az ún. „dadogás” jelensége, ami abból adódik, hogy hurok képződik a DNS-en a PCR során, ami miatt megszakad a DNS szálát szintetizáló enzim (DNS polimeráz) működése [55]. A szintetizálás újra indulásakor a hurkolódott rész (általában egy motívum) kimarad, tehát rövidebb lesz a termék, vagy többször szintetizálódik, vagyis

hosszabb lesz a termék. Mivel az igazságügyi célú vizsgálatoknál kifejezetten fontos az eredeti mikroszatellita ismétlődés számának megállapítása, különösen például kevert minták esetében, így ezek a markerek sem ajánlottak a kriminalisztikában.

A mikroszatellitákkal való hatékony munka része a multiplex PCR-ben való felszaporításuk és kimutatásuk lehetősége is. A multiplex PCR lényege, hogy párhuzamosan több marker terméke amplifikálódik a reakció során ugyanabban a reakció elegyben. A tapasztalatok alapján ez nem mindig lehetséges, egyes esetekben például a primerek dimerizációja léphet fel, ami gátolja a PCR reakció működését [28].

A PCR amplifikáció során sokszorosított DNS fragmenteket (mikroszatellita allélokat) ki is kell mutatni a reakciót követően, erre legszélesebb körben használt módszer a kapilláris elektroforézis, amely egy bázispár különbséget is érzékelni képes precíz technika [56]. Ehhez fluoreszcens jelöléssel kell ellátni a PCR során keletkező termékeket, mivel így lehetségessé válik a fluorofór lézeres gerjesztésén alapuló detektálás. A jelölés leggyakrabban alkalmazott módja a forward primerek fluoreszcens jellel való ellátása, ami így a keletkező termékekre is rákerül [57]. Az egyes primerek fluoreszcens jelölése azonban meglehetősen költségigényes, szemben a három primeres „farkas” (másnéven *tailing*) technikával. Ez ugyanis egy univerzális primerhez (másnéven fark szekvencia vagy adapter) kapcsolt fluoreszcens jelet használ, a hagyományos reverz és fark szekvenciával ellátott forward primer mellett. Így amikor a PCR kezdeti ciklusaiban az adapter szekvenciával ellátott forward primer termékeket képez, ezekhez már a jelölt univerzális primer is kapcsolódni tud, és jelölt termékeket hoz létre (2.ábra) [58].



2. ábra: A „farkas” fluoreszcens jelölési technika működése a PCR ciklusaiban [58].

A mikroszatellita markerkészletek fejlesztésének utolsó lépése a módszer validálása, ami lehetővé teszi a jogkövetkezményekkel járó eseteknél való alkalmazását. A kifejlesztett markerkészletek nagy része azonban nem rendelkezik validáltsággal, így csak korlátozott mértékben használhatóak. A validálási folyamat ugyanis rendkívül sok követelményt állít a módszer elé, egyrészt fel kell tüntetni a fejlesztéshez használt releváns referencia cikkeket, a vizsgált faj pontos adatait (pl. taxonómiai besorolás), a minták feldolgozásához használt módszereket (pl. DNS kinyerés módja), illetve a primerek információit (lokusz, szekvencia) [59]. A markerkészlethez meg kell továbbá állapítani valamennyi statisztikai adatot, ami információt nyújt a markerkészlet azonosítási erejéről. Ilyen lehet a megegyezési valószínűség (MP: *match probability*), a valószínűségi ráta (LR: *likelihood ratio*) [27] és az identitás valószínűség (PI: *probability of identity*) [60]. Az MP annak a valószínűsége, hogy adott populációból random kiválasztott egyed DNS profilja megegyezik a populáció egy másik egyedének genetikai profiljával [27]. Ez főként a populációs besorolás során fontos (*assignment*), vagyis, ha adott egyed származási populációját akarjuk meghatározni, így ez a mérőszám akár kisebb variabilitásnál is működhet (pl. nagy a populációk közötti genetikai elkülönülés). Az LR megmutatja, hogy mennyire valószínű egy bizonyos állapot egy alternatíva teljesülése esetén [27]. A PI pedig megadja, hogy mekkora valószínűséggel egyezik meg a populációból véletlenszerűen kiválasztott két egyed genotípusa a markerkészlet szerint [60].

További fontos szempontok a módszerfejlesztés során az érzékenység, stabilitás, faj-specificitás, ismételhetőség és robusztusság [27, 59]. Érzékenység alatt a módszer limitáló tényezőit értjük, vagyis milyen körülmények között nem alkalmazható már a módszer (pl. DNS mennyiség, PCR (polimeráz-láncreakció) beállítás) [59]. Stabilitásnál azt vizsgálják, hogy milyen mértékű DNS degradáció mellett működik még a markerkészlet [27]. Faj-specificitás esetében a rokon fajokra kell kereszt-tesztelni a markereket, és megállapítani, hogy náluk milyen mértékben működik a markerkészlet [23, 27]. A megismételhetőségnél azt kell vizsgálni, hogy a markerek ugyanannak a DNS mintának az ismételt vizsgálata során hányszor produkálják ugyanazt az eredményt [27, 59]. A robusztusság is ehhez hasonló, de itt a körülmények, eltérő típusú berendezések, illetve elemzési módszerek változatossága mellett kell ugyanazt az eredményt kapni [27].

A *Cervidae* család (szarvasfélék, ahova a dámszarvas is tartozik) esetében is több fajra kifejlesztettek mikroszatellita markerkészleteket, de validáltsággal csak néhány rendelkezik [23, 27]. Azonban a nem validált azonosítási módszerek eredményei és tapasztalatai így is értékes információt adhatnak a dámszarvasok egyedi szintű azonosítását megcélzó

módszerfejlesztés szempontjából. Például a felsorolt fajok esetében valósultak meg ezek a kutatások: gímszarvas (*Cervus elaphus*) [23], brit kolumbiai öszvérszarvas (*Odocoileus hemionus columbianus*) [26], öszvérszarvas (*Odocoileus hemionus hemionus*) [26], európai őz (*Capreolus capreolus*) [27], vapiti (*Cervus canadensis*) [28, 29] és a jávorszarvas (*Alces alces*) [61].

Fontos tisztában lenni azzal, hogy fajonként és régióként változhat, hogy hány mikroszatellita alkalmazásával érhető el az egyedi szintű azonosítás [23, 26–29]. Az öszvérszarvas és brit kolumbiai öszvérszarvas esetében az USA-ban elég volt nyolc marker [26], ugyanitt a vapitinél több, mint tíz kellett [28, 29]. Magyarországon a gímszarvas azonosításához tíz mikroszatellita szintén elégnak bizonyult a vizsgált populációknál [23], míg Svájcban az európai őznél 12 markert alkalmaztak [27]. A fajok és területek közötti különbséget az okozza, hogy a mikroszatelliták eltérő számú allélokkal és eltérő allél-gyakorisággal rendelkezhetnek az egyes régiókban/fajokban. Így adott területen adott fajra kifejlesztett markerszett legtöbbször csak változtatásokkal alkalmazható máshol, és főleg más fajra [26].

A mikroszatelliták primer kötő régióinak konzerváltsága miatt előfordulhat, hogy egyik fajra tervezett primer egy másik rokon fajban is működőképes. Például a gímszarvas és európai őz markerkészletének tesztelésekor egyes mikroszatelliták specifikus terméket eredményeztek dámszarvasok esetében is [23, 27], így ezeket érdemes belevonni a saját fejlesztésbe.

Összességében a tapasztalatok azt mutatják, hogy az egyes szarvasfajoknál viszonylag kevés számú, nagy polimorfizmust mutató marker alkalmas lehet az egyedi azonosításra [26]. Ez azonban függ az adott taxon genetikai adottságaitól és diverzitásától is, így a fejlesztésünkhöz mindenképp szükséges megismerni a dámszarvason végzett eddigi genetikai kutatásokat, hogy átfogóbb képet kapjunk a faj genetikai hátteréről.

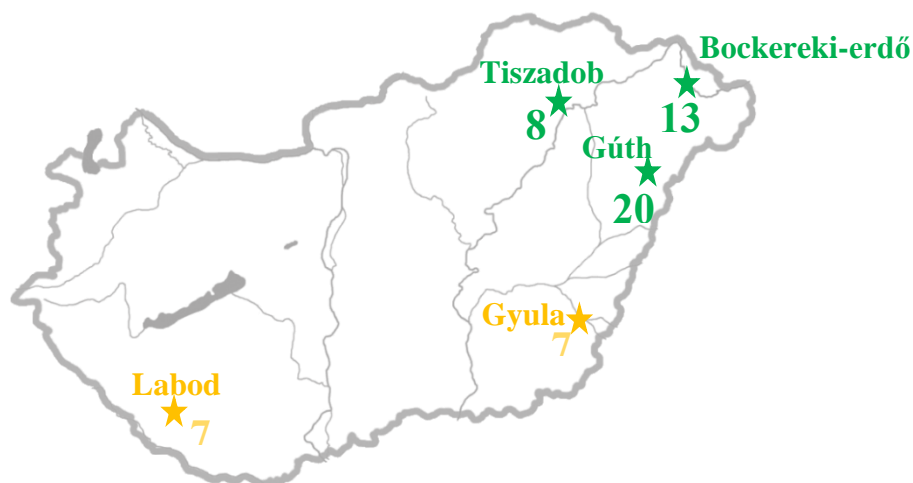
1.4. Dámszarvassal kapcsolatos genetikai kutatások

Számos területen végeztek már kutatást a dámszarvassal kapcsolatban, legyen az egészségügyi [62], evolúcióbiológiai [39] vagy éppen populációstruktúrára vonatkozó vizsgálat [13]. Az eddigi kutatások egyöntetűen a dámszarvas populációk alacsony genetikai diverzitását mutatták ki többféle genetikai marker vizsgálatával is [3, 13, 18, 62–67]. A vizsgált markerek a PRNP gén (prion protein gén), vér és szövet proteinek, mtDNS és mikroszatelliták voltak. Érdekes módon a mikroszatelliták sem mutattak sokkal nagyobb mértékű polimorfizmust a fajon belül, pedig közel 40 dinukleotid markert teszteltek ír és tasmán populációkban (általában hét-három allél/marker) [3, 63].

Az eddigi egyik legátfogóbb kutatás nemcsak egy adott régió belül mérte fel a dámszarvasok genetikai diverzitását, hanem tíz európai országból (köztük 14 darab Magyarországról) és Kanadából is vett dāmivad mintákat [13]. A mintákon (nem tetranukleotid) mikroszatelliták mellett mitokondriális DNS-t (kontroll régió) is vizsgáltak. A kutatás kimutatta, hogy bár regionálisan alacsony a polimorfizmus, az egyes régiókban élő populációk között nagy lehet a genetikai diverzitás. Ennek elképzelhető oka a populációk közötti vándorlás (génáramlás) hiánya, és az eltérő biotikus és abiotikus hatásokhoz való alkalmazkodás [13].

Több kutatás is vizsgálta a regionálisan alacsony genetikai diverzitás lehetséges okait. Egyrészt a Pleisztocéni jégkorszakok miatt jelentős egyedszám csökkenés következett be, ami palacknyakhatást (*bottleneck*) okozott [13]. Az ezt követő ember általi transzlokációk szintén tovább rontották a faj genetikai diverzitását, hiszen ezek a betelepítések legtöbbször kis egyedszámmal történtek (pl. tasmán populációnál 12 egyeddel [68]) [13, 63]. A kis populációk hátránya, hogy érvényesül az alapítóhatás és a genetikai sodródás, mindkettő jelenség diverzitáscsökkentő [3, 13, 63]. Emellett egyes kutatások kimutatták a dāmivad populációkon belüli beltenyészettséget is [3, 18]. A dámszarvasok szaporodási rendszere sem támogatja a genetikai diverzitás növekedését, hiszen a fajra poligínia jellemző, aminél a domináns hímeknek nagyobb a szaporodási sikere [3]. Ez azt vonja maga után, hogy a domináns egyedek alléljai terjednek el nagy mértékben a populáción belül, míg a nem domináns hímek alléljai rendkívül ritkák lesznek, így az effektív populációméret a tényleges populációméretnél kisebb.

Ami a magyar dámszarvas populációt illeti eddig két genetikai kutatás foglalkozott vele részletesebben [13, 18]. Az egyik a már említett kutatás, melyben 14 darab hazai mintát is elemeztek [13], míg a másik kifejezetten az északkelet-magyarországi dámszarvas populációt vizsgálta 41 mintával [18] (3.ábra). A két kutatás összesen öt haplotípust talált a mintavételezett



3.ábra: A magyar dámszarvas populációból eddig történt mintavételezések helyei (csillag és név), a minták száma (szám) és a hozzájuk kapcsolódó kutatások: sárga [13], zöld [18].

területeken az mtDNS kontroll régiójának vizsgálatával, ebből az egyik haplotípus mindössze egy egyedben volt jelen. Ez a többi országhoz képest viszonylag magas diverzitást jelent [13], de a más fajokban kimutatott haplotípus változatosságához képest ez is alacsonynak tekinthető, tehát mtDNS-t nézve Magyarországon is érvényesül a regionális alacsony genetikai diverzitás.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk egy olyan polimorf mikroszatellita markerkészlet kifejlesztése, mely alkalmas a magyar dámvadak egyedi szintű azonosítására, figyelembe véve annak későbbi, jogkövetkezményekkel járó esetekben (pl. orvvadászat) történő alkalmazhatóságát is. Emellett kiegészítő vizsgálatként a mtDNS kontroll régióját is megvizsgáljuk, hogy felmérjük alkalmas-e a hazai dámvad állományok regionális elkülönítésére.

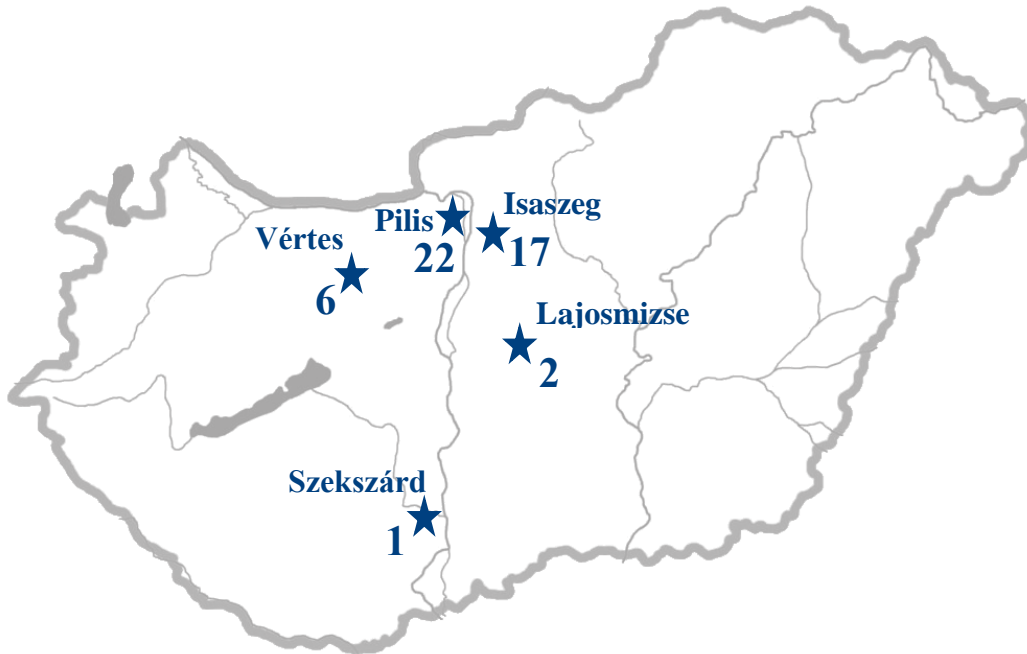
Ennek eléréséhez az alábbi lépéseket terveztük véghez vinni:

- dámszarvas minták gyűjtése olyan hazai területekről, amelyek populációjáról genetikai információ eddig nem állt rendelkezésre
- mtDNS kontroll régiójának szekvenálása és elemzése a különböző területekről származó mintákon
- a szarvasfélék (*Cervidae*) genetikai vizsgálatára eddig használt tetramer mikroszatelliták nemzetközi irodalomban való felkutatása
- a kiválasztott mikroszatelliták tesztelési módszerének kidolgozása, szükséges esetekben primerek tervezésével
- markerek tesztelése monoplex PCR rendszerben, az optimális működési feltételek kialakítása érdekében
- az idő- és költséghatékony módon történő elemzések megvalósításához a specifikus terméket adó markerek multiplexekbe rendezése (az úgynevezett „farkas” fluoreszcens jelöléses technikát is alkalmazva)
- kapilláris elektroforézis alkalmazása a vizsgált mikroszatelliták polimorfizmusának meghatározására a magyar dámszarvasokban
- a polimorf markerekkel a dámszarvasok egyedi szintű azonosítása.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Mintagyűjtés és feldolgozás

A markerek teszteléséhez használt dámszarvas minták 2019-2022 közötti legális kilövés során elejtett példányokból származnak. Ilyen módon 48 dámszarvas egyed szövetmintája állt rendelkezésünkre a vizsgálatokhoz, melyek az ország több pontján kerültek elejtésre (4.ábra).



4. ábra: A kutatásban felhasznált dámszarvas minták származási helye (csillag és név) és száma.

A kilövést követően az egyedekből kimetszett kis mennyiségű izomszövetből, illetve szőrös bőrmintából történt a DNS kinyerése a FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kittel, a hozzá tartozó protokoll szerint. A minták előkészítésekor a rendelkezésünkre bocsátott szövetdarab belsejéből történt a kinyeréshez szükséges anyag steril szikével történő kimetszése annak érdekében, hogy minél kisebb esélye legyen a kontaminációnak. A genetikai anyag kinyerését követően a tisztított DNS-minta minőségét agarózgél elektroforézis segítségével ellenőriztük, míg a mennyiségi ellenőrzés a Qubit® 2.0 Fluorometer használatával történt. A megmaradt szövetmintákat és a kiproparált DNS-oldatokat a további felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az elejtést és a szövetdarab kimetszését vadászok végezték, az ezt követő munkafolyamatokat mi hajtottuk végre steril labor körülmények között.

3.2. Mítokondriális DNS kontroll régiójának vizsgálata

A kinyert DNS mintákból (n=46, mivel nem rendelkezünk még a lajosmizsei mintákkal) PCR során amplifikáltuk a majdnem teljes kontroll régiót (944 bp), a reakcióban saját tervezésű primereket alkalmaztunk, amiket PrimerDesigner4 (<http://www.scied.com>) segítségével

terveztünk: CervCR1 (forward) 5'-GCCCCACTATCAACACCC-3', DamaCR 16 330 (reverz) 5'-TATGCATAATTAGAGAAAAATTGG-3'.

A PCR paraméterei:

- Kezdeti denaturáció: 94°C - 1 perc
- 32 ciklusszámban ismétlődő három szakasz:
 - o Denaturáció: 94°C - 40 másodperc
 - o Anelláció: 56°C - 40 másodperc
 - o Elongáció: 72°C - 80 másodperc
- Végző elongáció: 72°C - 2 perc

A kapott termékek megfelelő ampliton méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A sikeresen felszorosított kontroll régiókat NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit segítségével tisztítottuk (a megadott protokoll szerint), majd a BIOMI Biotechnológiai Szolgáltató Kft. közreműködésével szekvenáltuk őket. A kész szekvenciákat a Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp) programmal dolgoztuk fel, vagyis ezzel javítottuk a hibásan azonosított nukleotidokat és létrehoztuk a konszenzus szekvenciákat (a forward és reverz irányú szekvenciákból).

A mintaelemszám növelése érdekében korábbi magyarországi kutatások kontroll régió szekvenciáit is meg akartuk vizsgálni, melyeket az NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) GenBank adatbázisából válogattunk ki. Ez összesen 55 további mintát jelentett volna (lásd 11. oldal 3. ábra), de csak 54 volt megfelelő minőségű és hosszúságú. Ezek a kutatások a kontroll régió rövidebb szakaszait vizsgálták: Dél-Magyarországon (n=13) 530 bp, Északkelet-Magyarországon (n=41) 450 bp. Mivel a hosszabb szekvenciáknak több információ tartalma van, így elsőként a saját szekvenciákat elemeztük, majd haladtunk a rövidebbek felé (végén mind a 100 mintát egyben vizsgálva, a közös 450 bp hosszú részen).

A konszenzus és letöltött szekvenciákat MEGA X szoftverrel illesztettük (ClustalW alapbeállítással). A kapott illesztést NETWORK programmal elemeztük, hogy megállapítsuk és vizualizáljuk a minták földrajzi származása és genetikai távolsága közötti összefüggéseket (*median joining* módszerrel készítettünk ábrákat).

Fontos volt, hogy megállapítsuk mennyire alkalmazható a kontroll régió a hazai dámvad állományok regionális elkülönítésére, és ezáltal mennyire tud segíteni jogkövetkezményekkel járó eseteknél. Ehhez DNA Sequence Polymorphism szoftverrel Wright-féle F-statisztikát

számoltunk. Az így kapott F_{st} (fixációs index) érték a populációk tagoltságáról ad információt, mivel megmutatja, hogy mekkora a heterozigóták arányának csökkenése annak köszönhetően, hogy a metapopuláció két vagy több szubpopulációból áll, amikben eltérő az allélgyakoriság. Minél nagyobb a fixációs index, annál alkalmasabb a genetikai marker a populációk elkülönítésére, $F_{st} \geq 0,15$ már szignifikáns genetikai különbséget jelez a szubpopulációk között [69], az F_{st} értéket populáció páronként (esetünkben mintavételi hely páronként) számoltuk. Emellett mintavételi helyenként és az összes mintára megállapítottuk a szekvenciában talált polimorf helyek és haplotípusok számát, illetve a haplotípus és nukleotid diverzitást is. A haplotípus diverzitás (H) annak a valószínűsége, hogy két véletlenszerűen kiválasztott egyed haplotípusa különbözik, míg a nukleotid diverzitás (π) a szekvenciák közötti átlagos nukleotid különbségek száma bázis helyenként [70] (mindkét paraméternél a nagyobb érték az egyes egyedek/populációk jobb elkülöníthetőségére utal).

3.3. Mikroszatellita markerek vizsgálata

3.3.1. Markerek kiválasztása (tetranukleotid mikroszatelliták)

Az egyedi azonosításra alkalmas markerkészlet fejlesztéséhez nukleáris, tetranukleotid egységekkel rendelkező mikroszatellita markereket kerestünk a dámszarvashoz közel álló *Cervidae*-be tartozó rokonfajokban. A markereket és a vizsgálatukra alkalmas primer szekvenciákat (amennyiben ezek elérhetőek voltak) korábbi közleményekből, illetve a GenBank-ból (NCBI) kerestük ki, és végül 100 potenciális STR markert választottunk ki tesztelésre (1.táblázat).

Huszonhat marker esetében nem volt publikált primerszekvencia, ezeknél mi terveztük a primerpárokat a PrimerDesigner4 programmal (csak a későbbi tesztelések alapján működőképes primerpárokat közöljük le, 21.oldal 5.táblázat). Az alábbi szempontokat vettük figyelembe a tervezésnél: forward és reverz primerek olvadási hőmérsékletének közelsége, megfelelő guanin-citozin arány (40-60%), megfelelő primerhossz (kb. 18-25 bázispár), lehetőleg 200 bázispár alatti PCR termékek képződése, forward és reverz primer szekvenciájának különbözősége és a homo-dimerizáció („hairpin”) elkerülése érdekében a primeren belüli komplementer részek hiánya [71].

A kutatásunkhoz a korábbi publikációkból kiválasztott, illetve tervezett primereink forward (F) szekvenciáit univerzális primer szekvenciákkal ellátva rendeltük meg [58, 72]. Ezek az adapterek lehetővé teszik a „farkas” fluoreszcens jelölés alkalmazását a további vizsgálatok

során. A megfelelő adapterek kiválasztásánál figyelembe vettük a későbbi multiplexek kialakításának lehetőségét.

3.3.2. A három tesztelt markercsoport

A kutatás során három csoportba osztottuk a tesztelni kívánt markereket (1.táblázat), a hozzájuk tartozó, rendelkezésre álló információk alapján. Ezzel a fejlesztés eredményeinek könnyebb követhetőségét tettük lehetővé.

1.táblázat: A kutatásunkhoz kiválasztott 100 mikroszatellita marker, a tesztelés során időrendben vizsgált markercsoportok (A-C) és az eredeti kutatásban célzott fajok szerint csoportosítva. A vizsgált faj mellett szereplő vastagon kiemelt elnevezések (STRoe, DeerPlex, Ohe és ApoV) a markereket vizsgáló multiplexek közös elnevezése, ahogy publikálva lettek és ahogy hivatkozunk rájuk a szövegben. A publikációnál szereplő betű-szám kombinációk a markerek GenBank-i elérhetősége, mivel ezeket a mikroszatellitákat nem közölték le, de szerepelnek a NCBI GenBank adatbázisban.

Marker-csoport	Vizsgált faj	Mikroszatellita marker	Publikáció
A	európai őz <i>(Capreolus capreolus)</i> – STRoe	Capcap2, Capcap10, Capcap15, Capcap25, Capcap29, Capcap31, Capcap36, Capcap37	[27]
	gímszarvas <i>(Cervus elaphus)</i> - DeerPlex	C01, C229, T26, T108, T123, T156, T172, T193, T501, T507	[23]
	őszvérszarvas <i>(Odocoileus hemionus)</i> - Ohe	OheA, OheB, OheC, OheD, OheE, OheF, OheG, OheH, OheI, OheJ, OheK, OheL, OheM, OheN, OheO, OheP, OheQ, OheR, OheS, OheT, OheV	[26]
B	disznószarvas <i>(Axis porcinus)</i> - ApoV	ApoV17, ApoV19, ApoV43, ApoV47, ApoV49, ApoV53, ApoV54, ApoV56, ApoV75, ApoV79, ApoV81, ApoV94, ApoV101, ApoV118, ApoV127, ApoV133, ApoV135, ApoV144, ApoV145, ApoV146	[73]
		ApoV85	KX269170
C	disznószarvas <i>(Axis porcinus)</i>	ApoV61	[73]
	Guazauvirá-szarvas <i>(Mazama gouazoupira)</i>	Mgoua16, Mgoua19, Mgoua20, Mgoua21	[74]
	szitka szarvas <i>(Odocoileus hemionus sitkensis)</i>	SBTD01, SBTD02, SBTD03, SBTD04, SBTD05, SBTD06, SBTD07	[75]
		WY37, WY62, WY68, WY69, WY82	[76]
	szikaszarvas <i>(Cervus nippon)</i>	SD03, SD04, SD05, SD06, SD07, SD08, SD09, SD10, SD11, SD12	JN643715-22, JN563734-35
		C89, T56	[28]
	vapiti <i>(Cervus canadensis)</i>	C02, C32, C36, C105, C276, T40, T107, T115, T267	
		T268, T530	[29]

A. markercsoport: három publikáció mikroszatellitáit (összesen 39 db) vizsgáltuk először, melyek az STRoe [27], DeerPlex [23] és Ohe [26] neveket kapták. Azért kerültek egy

csoportha, mivel valamennyi markerre multiplex PCR-t is fejlesztettek az eredetileg vizsgált fajnál. Az STRoe multiplexben a PCR beállítás az összes 13 primerpár együttes tesztelésére volt kialakítva, de mi öt markert nem teszteltünk, mivel ezek bizonyítottan nem eredményeznek terméket dámszarvasban [27]. Így az eredetileg igen hosszú PCR programot grádiens PCR alkalmazásával próbáltuk a kiválasztott nyolc markerre optimalizálni és lerövidíteni.

B. marker csoport: a 2021-ben megjelent, Hill által leírt ApoV mikroszatelliták közül 21 db-ot tartalmaz [73], melyekre szintén fejlesztettek multiplexeket, de a lepublikálásukkor már zajlott az A. marker csoport tesztelése, ezért kerültek külön csoportba.

C. marker csoport: azok a markerek (összesen 40 db) kerültek ebbe a csoportba, melyek nem lettek multiplexekben tesztelve [74–76] vagy pedig kevés számú markerrel voltak multiplexeik [75]. Az ApoV markerek közül is egy ebbe a csoportba került (ApoV61), mivel az eredeti kutatásban bizonyítottan nem működött multiplexben [73].

3.3.3. Markerek monoplex tesztelése és PCR optimalizálása

A kiválasztott mikroszatellitákat két-két dámszarvas mintán első körben monoplex PCR-ben teszteltük, tehát egy dámszarvas mintából mindössze egy marker termékét sokszorosítottuk fel a reakcióban. A legtöbb marker esetében volt már publikált PCR protokoll, így először ezeket a beállításokat használtuk. Az amplifikálási reakciók eredményét agarózgél elektroforézissel ellenőriztük, hogy milyen minőségű (mennyire specifikus) és mennyiségű termék keletkezett.

A mellékterméket adó, nem megfelelő méretű, túl gyenge, vagy kiesett termékek esetében változtattunk az eredeti PCR beállításokon: ciklusszámot, anellációs hőmérsékletet és időt, denaturációs és elongációs időt. Továbbá maguk az univerzális primerek is saját hőmérsékleti optimummal rendelkeznek, ezt is figyelembe vettük az optimalizálásakor.

Amennyiben többféle PCR beállítás mellett sem adott terméket egy marker, vagy nem megfelelő minőségűt és/vagy mennyiségűt, akkor grádiens PCR segítségével próbáltuk optimalizálni a reakciót. Ennek lényege, hogy ugyanazt a marker-monoplexet több anellációs hőmérsékleti beállításon egyszerre amplifikáltuk, és megnéztük, hogy melyik hőmérsékleti beállítás eredményezi a legjobb terméket [67]. Ezekkel a lépésekkel hét saját PCR programot fejlesztettünk ki (2. táblázat).

2. táblázat: A kutatás során kifejlesztett PCR protokollok, a következőkben a megfelelő PCR program számával (1. oszlop) hivatkozunk rájuk.

PCR program	Kezdeti denaturáció	Ciklus	1.denaturáció	1.anelláció	1.elongáció	2.denaturáció	2.anelláció	2.elongáció	Végső elongáció
1.	1 min 94°C	35	30 sec 94°C	30 sec 56°C	1 min 72°C				30 min 60°C
2.	1 min 94°C	35	30 sec 94°C	30 sec 58°C	1 min 72°C				30 min 60°C
3.	1 min 94°C	35	30 sec 94°C	30 sec 64°C	1 min 72°C				30 min 60°C
4.	1 min 94°C	15+20	30 sec 94°C	1 min 55°C	40 sec 72°C	30 sec 94°C	1 min 50°C	40 sec 72°C	20 min 72°C
5.	1 min 94°C	15+20	30 sec 94°C	1 min 60°C	40 sec 72°C	30 sec 94°C	1 min 55°C	40 sec 72°C	20 min 72°C
6.	1 min 94°C	35	30 sec 94°C	1 min 58,8°C	40 sec 72°C				20 min 72°C
7.	1 min 94°C	35	30 sec 94°C	1 min 63,3°C	40 sec 72°C				20 min 72°C

3.3.4. Primerek fluoreszcens jelölése „farkas” technikával

A „farkas” technika egy alternatív fluoreszcens jelölési módszer kapilláris elektroforézises detektáláshoz, melynek során mindössze négy fluoreszcensen jelölt szekvenciadarabot kell használnunk (univerzális primerek). Ezek a forward primerekhez kapcsolt megegyező adapter szekvenciákkal szabadon kombinálhatók, így költséghatékonyan használhatók multiplex fejlesztéshez is (3. táblázat).

3.táblázat: A kutatás során használt négy univerzális primer adatai, a fluorofórok színei a nevekben jelöltek.

Univerzális primer	Farok szekvencia (5'-3')	Fluorofór	Hossz (bázispár)	Olvadási hőmérséklet (T _m)	Publikáció
Tail A	GCCTCCCTCGCGCCA	FAM	15	63 °C	[72]
Tail B	GCCTTGCCAGCCCGC	VIC	15	57 °C	[72]
Tail C	CAGGACCAGGCTACCGTG	NED	18	59 °C	[58]
Tail D	CGGAGAGCCGAGAGGTG	PET	17	59 °C	[58]

3.3.5. Multiplex PCR vizsgálati rendszerek összeállítása

A monoplex reakciók eredménye alapján a jól működő primerpárokat multiplexekbe rendeztük, vagyis egy PCR reakcióban több mikroszatellita amplikont állítottunk elő egy DNS mintából. Ez egy költséghatékony és gyors tesztelési forma, ezért alkalmaztuk, a fejlesztés során ügyeltünk arra, hogy az egy multiplexbe kerülő markerek más színű fluoreszcens jelöléssel rendelkezzenek a hasonló vagy átfedő hosszúságú PCR termékek esetében (4. táblázat).

Az összeállított multiplex PCR rendszereket kezdetben két-két dámszarvas mintán teszteltük. Az eredményeket agarózgél elektroforézissel ellenőriztük az alábbi szempontok alapján: jött-e az összes termék, megfelelő hosszúságúak voltak-e, volt-e melléktermék, a különböző markerek termékei kiegyensúlyozottan jöttek-e. Amennyiben ezek valamelyike nem teljesült, a primerarányok vagy a PCR hőmérsékleti, esetleg időparaméterein módosítva próbáltunk javítani az eredményeken. A multiplex reakciókban nem sokszorosítható markereket monoplex reakciókban teszteltük tovább (4. táblázat).

4. táblázat: A működő markerek forward primereinek univerzális primer jelölése, valamint a markereknél használt PCR program (2.táblázatban feltüntetett PCR program számok vagy a forrás publikáció alapján). A multiplexekben együttesen sokszorosítható markerek bekeretezve láthatók, a PCR programjaik alatt a publikált markerszett neveik találhatóak, melyekre a szövegben is hivatkozunk.

Lokusz	Univerzális primer	PCR protokoll	Lokusz	Univerzális primer	PCR protokoll	
C01	Tail B	[23] DeerPlex	ApoV43	Tail A	2. ApoV	
T156	Tail B		ApoV94	Tail D		
T172	Tail C		ApoV145	Tail D		
T501	Tail A		ApoV47	Tail A	3. ApoV	
T507	Tail D		ApoV56	Tail B		
C229	Tail A	[23] DeerPlex	ApoV79	Tail B	2. ApoV	
T123	Tail D		ApoV118	Tail D		
T108	Tail B		C02	Tail C	4.	
T193	Tail C		C32	Tail A	5.	
OheB	Tail A	[26] Ohe	C105	Tail C	5.	
OheC	Tail C		C276	Tail A	7.	
OheF	Tail A		T40	Tail A	7.	
OheN	Tail C		T56	Tail B	5.	
OheO	Tail C		T107	Tail D	4.	
OheE	Tail C	[26] Ohe	T115	Tail A	7.	
OheG	Tail A		T267	Tail D	6.	
OheI	Tail A		T268	Tail B	4.	
OheJ	Tail A		SBTD01	Tail B	6.	
OheK	Tail A		SBTD02	Tail C	6.	
OheR	Tail A		SBTD04	Tail A	5.	
OheH	Tail A	[26] Ohe	SBTD06	Tail B	4.	
OheM	Tail A		SBTD07	Tail A	7.	
OheP	Tail C		Mgoua16	Tail C	4.	
OheQ	Tail C		Mgoua19	Tail A	4.	
OheV	Tail A		Mgoua20	Tail B	4.	
CapCap2	Tail A		[27] STRoe	Mgoua21	Tail C	4.
CapCap29	Tail C			SD03	Tail D	5.
CapCap37	Tail C	SD04		Tail A	7.	
CapCap10	Tail A	[27] STRoe	SD08	Tail B	6.	
CapCap15	Tail C		WY37	Tail B	4.	
CapCap25	Tail B		WY62	Tail A	7.	
CapCap31	Tail B		WY68	Tail D	6.	
ApoV17	Tail A	1. ApoV	WY69	Tail C	5.	
ApoV49	Tail B		WY82	Tail D	6.	
ApoV127	Tail D		ApoV53	Tail D	7.	
ApoV19	Tail A	2. ApoV	ApoV54	Tail B	7.	
ApoV135	Tail B		ApoV61	Tail D	7.	
ApoV146	Tail D		ApoV75	Tail A	7.	

3.3.6. Nem működő primerpárok újratervezése

A monoplex tesztek során nem megfelelően működő markerek esetében újraterveztük a primerpárokat a PrimerDesigner4 programmal. Ez azoknál a mikroszatellitáknál volt lehetséges, melyek rendelkeztek NCBI GenBank-ba feltöltött vagy lepublikált szekvenciával, és ez megfelelő minőségű és hosszúságú volt (csak a későbbi tesztek alapján működőképes primerpárokat közöljük le, 5.táblázat). A tervezést követően végrehajtottuk a „Markerek monoplex vizsgálata és PCR optimalizálása” részben leírt lépéseket, a multiplex fejlesztésbe viszont nem vontuk be őket költséghatékonyság miatt.

5. táblázat: A kutatás során tervezett és a későbbi tesztek alapján megfelelően működő primerpárok forward (F) és reverz (R) primereinek szekvenciája (5'-3' irányban), az újratervezett primerpárok mellett a „Markerek kiválasztása (tetranukleotid mikroszatelliták)” részben leírt működőképes primerek is szerepelnek.

Lokusz	Primer szekvencia (5'-3')	Lokusz	Primer szekvencia (5'-3')
OheB	F: GTCTGCTCATCCACCATCTA R: CTCTGCTGCCTTCTCAAGT	SBTD01	F: TCACTCACCCACTCATCT R: TGGATGGTTGGATATGTAG
OheC	F: TTCCATCCACTCATCATTCT R: ACATATTGGAGGCATGTAGG	SBTD02	F: CTCTGCTGACCTGTTATCTC R: ATGGAAGAAAGGATGTCTG
OheE	F: AGACAGGGTTCCAATGAGAC R: CAGCCTTCCTGGACTAGAGA	SBTD07	F: TCCAGAAGTGTGTGTGAGCC R: ACTTGTATCAGTCTGGGTTCTG
OheF	F: CAGGCGATCAAGAAATGTGG R: GTGGCTTCTGGATGGAGAAC	SD03	F: GAGCCTGGCCAACATGGTA R: CTGCCACCACAACCAGCTAA
OheG	F: AGAGTTAAGTGCAGCCTAAG R: CTGTGTTTCATGGACCACACT	SD04	F: TTCTCCACCACTCCTTCT R: AGTAATAGATGTGCGGTCTC
OheH	F: CTTGCTGCCATTGCCAGATA R: TCCAGAGGGCAGATGTCTAT	SD08	F: ACAGGTATGAGCCACCGC R: TGGGGACAGAGCGAGATTCA
OheI	F: ACATGGTGGGCATTTCAGTAG R: CATCAGGGTTCTCTGAAGAC	ApoV53	F: ACATGTGACGAGCAGCTTCA R: TGTGATCCAGGTGAGAGCAG
OheJ	F: ATCACAGTTGCCAAGACGAC R: CGGATGGATGAGTAGGTTGA	ApoV54	F: AGGGCAGCTGATACCCATTT R: ACACACCTAAGTCCCAAGCA
OheV	F: TCAGGCAGGTAGTAAGTGTC R: GAGCACAGGACCTGACTT	ApoV75	F: CACTTCACACTCAGGATGGC R: TACTGAGATGCCGACTCCCA

3.3.7. Markerek polimorfizmusának detektálása kapilláris elektroforézissel

Következő lépésként 20-20 dámszarvas DNS-mintán vizsgáltuk a specifikusnak látszó mikroszatelliták polimorfizmusát (újratervezett primerpárok markereinek esetében is), mind az öt mintavételi helyről alkalmazva mintákat (Vértes=3, Pilis=8, Isaszeg=6, Lajosmizse=2, Szekszárd=1). A fluoreszcens jelöléssel ellátott fragmensek (allélok) méret szerinti elválasztásához és detektálásához kapilláris elektroforézist alkalmaztunk. Az elektroforetikus elválasztás ABI Prism3500 GeneticAnalyzer készüléken

(AppliedBiosystems), GeneScan™-500 LIZ™ méret standard segítségével történt (Biomi Kft, Gödöllő). A kapott eredményeket a Peak Scanner™, OSIRIS és GeneScanAnalysis v3.1 programmal elemeztük.

3.3.8. Populációgenetika és statisztikai elemzések

A kapott eredményekkel statisztikai elemzéseket hajtottunk végre. Elsőként számításokat végeztünk a GenAEx 6.5 software segítségével. Egyrészt kiszámítottuk vele a PI értéket, mely a markerkészlet egyedi szintű azonosításra való alkalmasságáról nyújt információt, ugyanis megmutatja, hogy mekkora valószínűséggel egyezik meg a populációból véletlenszerűen kiválasztott két egyed genotípusa a markerkészlet szerint. Számítása lokuszonként történik: $PI = 2 * (\sum p_i^2)^2 - \sum p_i^4$, ahol p_i a marker (lokusz) i -edik alléljának gyakorisága. A markerkészlet PI értékét a lokuszonként kiszámított PI értékek összege adja meg [77]. A PI_{sb} értéket is megvizsgáltuk, mely a PI érték abban az esetben, ha testvérek genotípusait hasonlítjuk össze. Az allélszámokat és allélgyakoriságot is GenAEx 6.5 software-rel összegeztük, mivel mintavételi helyenként csak kevés egyedet vizsgáltunk ($n < 10$), ezért a 20 kiválasztott dámvad egyedet egy populációból származónak tekintettük. Emellett meghatároztuk a megfigyelt (H_o) és várt heterozigóciát (H_e), illetve a hozzájuk kapcsolódó Fis értéket (Wright-féle F-statisztika egyik beltenyésztségi koefficiense). A H_o a populáción (itt 20 mintán) belül megfigyelt heterozigóták aránya az összes egyedhez képest, a H_e az allélgyakoriságok alapján várható heterozigóta arány a populáción belül (lokuszonként számoltuk mindkét értéket). Amennyiben megfigyelt heterozigócia jelentősen kisebb a vártnál ($H_o < H_e$), ez a populáció beltenyésztségére utal, hiszen ez a jelenség növeli a homozigóták számát [78]. A beltenyésztség másik mérőszáma az Fis, melyet az előbbi paraméterek (H_o , H_e) felhasználásával számolunk. Az Fis a heterozigócia csökkenését mutatja meg, melyet a pánmixis hiánya okoz [79].

Az FSTAT program [80] segítségével megnéztük lokuszonként a Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) fennállását is. Az ettől való eltérés azt jelenti, hogy generációnként eltérő lenne az allél- és genotípusgyakoriság valamely hatásnak köszönhetően (pl. pánmixis hiánya, kis populáció, migráció stb.) [81].

Végezetül a MICRO-CHECKER [82] felhasználásával megvizsgáltuk a null allélok, „dadogás” (lásd 7. oldal) és hosszú allélok kiesésének előfordulását. Null allélok alatt azokat értjük, melyeket nem tudunk amplifikálni PCR-rel a primer kötő régió hiányának vagy mutációjának köszönhetően [83]. Így hibásan homozigótának azonosítunk egy heterozigótát,

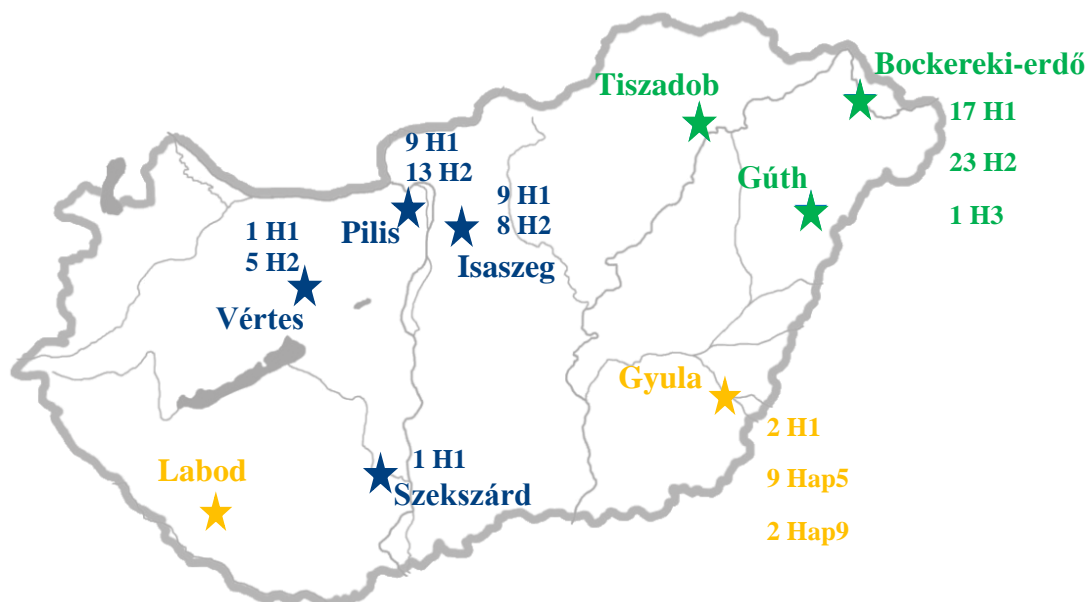
vagyis a null allélok jelenléte torzítja az elemzéseket. A hosszú allélok kiesése a preferenciális amplifikációhoz vagy másnéven rövid allél dominanciához köthető, ilyenkor a PCR során a rövidebb termékek keletkeznek csak detektálható mennyiségben, mivel ezek tudnak a dNTP-kért folytatott kompetícióban gyorsabban felépülni (rövidségük miatt).

4. EREDMÉNYEK

A kutatáshoz összegyűjtött 48 dámvad szövetminta használható állapotúnak bizonyult a DNS kinyerést követő agarózgél elektroforézis és Qubit kvantálás (1-50 ng/μl) alapján.

4.1. Mitokondriális DNS kontroll régió vizsgálata

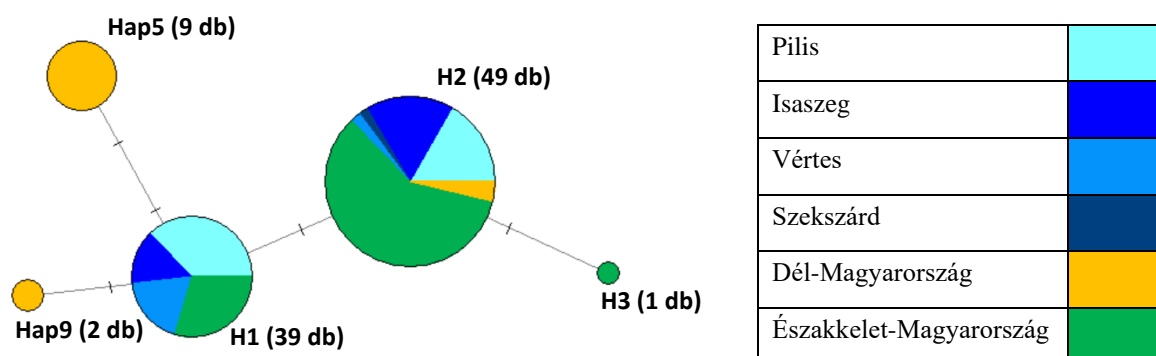
Elsőként az általunk gyűjtött dámszarvas minták haplotípus szekvenciáit vizsgáltuk meg 875 bp hosszú szakaszon. A négy mintavételi helyről származó 46 dámvad egyedben két haplotípust mutattunk ki, melyeket korábbi kutatásokban már leírtak [13, 18]: 20 db **H1** és 26 db **H2** haplotípus (pontosabb eloszlásuk mintavételi helyenként az 5.ábrán látható). Ezután a korábbi kutatásokból kiválasztott haplotípusokat is illesztettük saját szekvenciáinkhoz, kezdve az 530 bp hosszú 13 db dél-magyarországi mintával [13]. Ezekben három haplotípust találtak, közöttük kettő újat: 2 db **H1** (publikációban Hap17 elnevezésű), 9 db **Hap5** és 2 db **Hap9** (5.ábra). Végezetül a 41 db legrövidebb (450 bp) északkelet-magyarországi mintát is bevettük az elemzésbe [18], ezekből is három haplotípust mutattak ki, köztük egy új szerepelt: 17 db **H1**, 23 db **H2** és 1 db **H3** (5.ábra).



5.ábra: A kutatás során vizsgált 100 dámszarvas haplotípusa mintavételi helyenként ábrázolva (kék - saját, sárga - dél-magyarországi [13], zöld – északkelet-magyarországi minták [18]). A déli és északkeleti mintáknál nem közölték le a haplotípusok számát mintavételi helyenként, így csak az összesített számokat tudtuk megadni.

Összesen tehát öt haplotípust lehetett kimutatni a vizsgált 100 mintából, ebből három ritkább és két gyakoribb haplotípus volt (6.ábra).

6.ábra: A haplotípusokat ábrázoló gócpontok színekkel vannak jelölve, méretük egyenesen arányos a hozzájuk tartozó egyedek számával. A gócpontok színei a minták származási helyét ábrázolják, egy gócponton belül előforduló több szín esetén azok arányosak a mintaszámmal. A haplotípusok közötti összeköttetések hossza a haplotípusok közötti genetikai távolságot szimbolizálják, a merőleges kis vonalak pedig a szubsztitúciókat. Készítve: NETWORK programban.



Az illesztések alapján kiderült, hogy összesen öt polimorf hely volt a szekvenciákon belül (6.táblázat), és valamennyi a legrövidebb (450 bp) kontroll régió szakaszban már megtalálható volt, vagyis a hosszabb szekvenciák nem rendelkeztek több változatos hellyel. Mindegyik polimorf pozíciót szubsztitúció eredményezte (indel nem volt).

6.táblázat: A magyar dámvad haplotípusok illetve a dámszarvasok referencia szekvenciájához (GenBank: JN632629), szemléltetve az öt polimorf pozícióban található különbségeket (a pontok a referenciával való egyezést jelölik).

Polimorf pozíciók	15589	15671	15703	15745	15927
Referencia	T	G	C	G	A
H1	C	.	.	.	G
H2	G
H3	C	.	.	A	G
Hap5	.	A	T	.	G
Hap9

A DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) programmal végzett számítások során kiszámoltuk az Fst értékeket, amik megmutatták, hogy a mintavételi helyek milyen mértékben különböznek a haplotípusok alapján (párosával történt a területek összehasonlítása, Szekszárd nem szerepelt az elemzésben, hiszen onnan csak egy mintánk volt). Az eredmények alapján a dél-magyarországi területek szignifikánsan különböznek az összes többi mintavételi hely egyedétől, az Fst értékek 0,4950 (Északkelet-Magyarország) és 0,5103 (Isaszeg) között mozogtak. A többi mintavételi hely között nem volt szignifikáns különbség (Fst<0,15). Szintén a DnaSP programmal számítottuk ki mintavételi helyenként

a haplotípus és nukleotid diverzitást, illetve egyéb belső genetikai struktúrára utaló paramétereket (7.táblázat).

7.táblázat: A DnaSP programmal elemzett öt mintavételi hely paraméterei (Szekszárd kimaradt az elemzésből, mivel csak egy minta volt onnan, rövidítések jelentése DélMo=Dél-Magyarország, ÉKMo=Északkelet-Magyarország): mintavételi helyenként és összesítve (=Összes) szerepel az egyedszám, szekvencián belüli polimorf helyek száma, haplotípusok száma, haplotípus diverzitás (H) és nukleotid diverzitás (π).

Mintavételi hely	Vértés	Pilis	Isaszeg	DélMo	ÉKMo	Összes
Egyedszám	6	22	17	13	41	99
Polimorf helyek száma	1	1	1	4	2	5
Haplotípusok száma	2	2	2	3	3	5
Haplotípus diverzitás (H)	0,33	0,51	0,53	0,51	0,53	0,61
Nukleotid diverzitás (π)	0,33	0,51	0,53	1,49	0,55	0,88

4.2. Mikroszatelliták vizsgálata

4.2.1. Monoplex tesztelés

A tesztelés során kiderült, hogy a kiválogatott 100 tetramer mikroszatellita közül kilenc eltérő névvel szerepelt a különböző kutatásokban (eltérő primerekkel vizsgálták őket), de azonos lokuszt jelentenek a szekvenciáik összehasonlítása alapján (duplumok). Ezek közül az egyiket választottuk ki: a specifikus, rövid és erős terméket eredményező markert. A teljes monoplex tesztelés eredményei a 8.táblázatban láthatóak.

4.2.1.1. A. markercsoport

A legtöbb Ohe primerpár esetében a leírt módszertan jónak bizonyult, egyedül az OheA és OheD nem adott semmilyen terméket, ezeket a markereket nem használtuk tovább. További három primerpárt (OheL, OheT, OheS) szintén kivettünk a tesztelésből, mivel ezek duplumként szerepeltek. A többi 16 Ohe marker specifikus terméket adott az eredeti PCR programjukon, így ezeket tovább alkalmaztuk [26]. A tíz DeerPlex markerből a T26 kivételével minden primerpár specifikus terméket eredményezett. A megmaradt kilenc markert a saját protokolljukkal teszteltük tovább [23]. A nyolc STRoe markernél az eredeti PCR beállításnál valamennyi mikroszatellita működött, de a CapCap36 duplumként szerepelt és hosszabb terméket adott, így kikerült a tesztelésből. A PCR program lerövidítése érdekében a többi hét markert grádiens PCR-en is amplifikáltuk. Azonban az eredményeink azt mutatták, hogy az eredeti protokollal jobban működnek [27].

4.2.1.2. B. markercsoport

A 21 darab ApoV marker publikált PCR beállításokkal [73] öt esetben (ApoV75, ApoV81, ApoV85, ApoV101 és ApoV133) egyáltalán nem eredményezett terméket. A többi

mikroszatellita a specifikus termék mellett mellékterméket is produkált, ami zavarta volna később az eredmények kiértékelését, így gradiens PCR programmal is megvizsgáltuk őket, hogy megállapítsuk a primerpárok működési optimumát. Az ApoV53 és ApoV54 esetében gyenge terméket kaptunk, így ezeket nem alkalmaztuk tovább. A többi markernél három új PCR protokollt sikerült kialakítanunk, amikkel specifikus termékeket kaptunk (**1.-3.** PCR program, 2.táblázat). A három új beállítás előnye, hogy így minden primerpár a lehető legközelebb áll a hőmérsékleti optimumához. Az ApoV144 duplumként szerepelt, és hosszabb terméke miatt kiesett a tesztelésből.

4.2.1.3. C. markercsoport

A markerek az eredeti PCR beállításokon nem adtak specifikus termékeket, mellékterméket eredményeztek vagy nagyon gyenge terméket hoztak létre, ezért két új PCR protokollt (**4-5.** program, 2. táblázat) dolgoztunk ki nekik. Mindkét protokoll alapja a STRoe PCR beállítása volt [27], mivel ezen a programon több, különböző igényű primerpár volt képes egyszerre működni, és itt is ezt szerettük volna elérni. A programok során tehát először magasabb, majd alacsonyabb anellációs hőmérsékleten végeztünk ciklusokat.

Tíz marker egyik PCR beállítás mellett sem eredményezett terméket: SBTD01, SBTD03, SD05, SD06, SD07, SD08, SD09, SD10, SD11 és SD12. A C36 és T530 esetében (duplumok) a megegyező lokuszt sokszorosító primerpár jobban működött, tehát ezek is kiestek a tesztelésből. Tizenhárom marker egyik PCR beállítással sem adott megfelelő terméket, ezeket gradiens PCR-en is vizsgáltuk. A C89, SBTD05 és SBTD07 markerek terméke a gradiens egyik hőmérsékletén sem volt alkalmazható minőségű. A C276, T40, T115, T267, WY62, WY68, WY82, SBTD02, SD04 és ApoV61-nél viszont sikeresen megállapítottuk a megfelelő anellációs hőmérsékleteket (**6.-7.** PCR program, 2.táblázat).

4.2.1.4. Újratervezett primerpárok

A három markercsoportból összesen 30 marker esett ki a fejlesztésből a monoplex teszteléseknél. Ezek közül 20 mikroszatellitánál újraterveztük a primerpárokat, hiszen a primer kötő régió mutációja vagy az alacsony primer specificitás okozhatta a nem megfelelő PCR termék keletkezésüket, ami újratervezéssel megoldható probléma. Az újratervezésből kimaradt markerek a duplumok közé tartoztak, vagyis az általuk amplifikált lokuszt már tudtuk vizsgálni egy másik primerpárral. Az ApoV133 esetében pedig nem volt leközölt szekvencia, így ehhez nem tudtunk primert tervezni.

A 20 újratervezett primerpárral először gradiens PCR-t végeztünk, hogy megállapítsuk melyik PCR beállításon működnek, majd ezeken a programokon amplifikáltuk őket. A teszteléskor 14 marker továbbra sem adott terméket, ezeket végleg elvetettük: T26, ApoV75, ApoV85, ApoV101, SBTD03, SBTD05, SD05, SD06, SD07, SD09, SD10, SD11, SD12 és C89. A több (hat) mikroszatellita viszont megfelelő terméket eredményezett, így ezeket alkalmaztuk később (6.-7. PCR programon működtek, 2.táblázat).

8.táblázat: A kutatás során tesztelt 100 mikroszatellita marker monoplex tesztelésének eredményei az újratervezést követően. Az azonos színnel jelölt markerek ugyanannak a mikroszatellitának különböző elnevezései, más-más primerpárral vizsgálva (duplumok). Dólt betűvel kiemelt lokuszok: újratervezett primerpáros markerek. A vízszintes vonallal áthúzott mikroszatelliták nem működtek dámszarvasban vagy duplumok voltak (24 db). A vizsgált faj mellett szereplő vastagon kiemelt elnevezések (STRoe, DeerPlex, Ohe és ApoV) a markereket vizsgáló markerszettek közös elnevezése, ahogy hivatkozunk rájuk a szövegben.

Marker-csoport	Vizsgált faj	Mikroszatellita marker	Publikáció
A	európai őz (<i>Capreolus capreolus</i>) – STRoe	Capcap2, Capcap10, Capcap15, Capcap25, Capcap29, Capcap31, Capcap36 , Capcap37	[28]
	gímszarvas (<i>Cervus elaphus</i>) - DeerPlex	C01 , C229 , T26 , T108, T123, T156, T172, T193, T501, T507	[23]
	őszvérszarvas (<i>Odocoileus hemionus</i>) - Ohe	OheA , OheB, OheC, OheD , OheE, OheF, OheG, OheH, OheI, OheJ, OheK, OheL , OheM, OheN, OheO, OheP , OheQ, OheR, OheS , OheT , OheV	[27]
B	disznószarvas (<i>Axis porcinus</i>) -ApoV	ApoV17, ApoV19, ApoV43, ApoV47, ApoV49, ApoV53, ApoV54, ApoV56, ApoV75, ApoV79, ApoV81 , ApoV94, ApoV101 , ApoV118, ApoV127, ApoV133 , ApoV135, ApoV144 , ApoV145, ApoV146 ApoV85	[62] KX269170
	disznószarvas (<i>Axis porcinus</i>)	ApoV61	[62]
C	Guazauvirá-szarvas (<i>Mazama gouazoupira</i>)	Mgoua16, Mgoua19, Mgoua20, Mgoua21	[63]
	szitka szarvas (<i>Odocoileus hemionus sitkensis</i>)	SBTD01 , SBTD02, SBTD03 , SBTD04, SBTD05 , SBTD06, SBTD07	[64]
		WY37, WY62, WY68, WY69, WY82	[65]
	szikaszarvas (<i>Cervus nippon</i>)	SD03, SD04, SD05 , SD06 , SD07 , SD08, SD09 , SD10 , SD11 , SD12	JN643715-22, JN563734-35
		C89 , T56	[27]
	vapiti (<i>Cervus canadensis</i>)	C02 , C32, C36 , C105, C276, T40, T107 , T115, T267 T268 , T530	[29]

Az újratervezést követően a három marker-csoport eredményei a következők: A. marker-csoport 39 markeréből 32 alkalmazható, B. marker-csoportnál 21-ből 16

mikroszatellita működik, míg *C. markercsoportnál* 40-ből 28 darab. Tehát 24 marker esett ki a tesztelésből, 76-on pedig további vizsgálatot végeztünk.

4.2.2. Multiplex tesztelés

A multiplex tesztelés a monoplex futtatások során működő 70 markerrel zajlott (az újratervezett markerek időhiány miatt nem kerültek bele a multiplex fejlesztésbe). Az eredeti publikációkban leírt multiplexek tesztelése során a DeerPlex, Ohe, STRoe és ApoV markerek esetében sikerült bizonyos változtatásokkal működő multiplexeket létrehozunk az univerzális adapterrel és fluoreszcens jellel ellátott primereinkkel (4.táblázat).

A DeerPlex markerek esetében annyi változás történt, hogy a T26 kikerült az egyik multiplexből, mivel ez a monoplex tesztelésnél kiesett [23]. Az Ohe markereknél a leírt PCR protokollt alkalmaztuk [26], de a markerek multiplexbe rendezését mi végeztük. Az STRoe markereknél két multiplexbe szedtük szét az eredetileg együtt működő nyolc primerpárt. A használt PCR protokoll az eredeti maradt [27]. Az ApoV markerek esetében több változtatást kellett elvégeznünk. Egyrészt a monoplex tesztelésnél kifejlesztett három új PCR protokollt (1-3., 2. táblázat) alkalmaztuk, illetve a multiplexek összetételét is átalakítottuk a 4. táblázatban feltüntetett módon.

A *C. markercsoportnál* nem voltak publikált multiplexek, így saját multiplex fejlesztést végeztünk. Több lehetséges multiplex összeállítást is leteszteltünk, de sok esetben kiestek markerek, melléktermék keletkezett, vagy éppen gyenge termékek jöttek létre, így egyiket sem alkalmaztuk a további teszteléshez.

Összesen tehát 12 multiplex rendszert sikerült kialakítanunk a „farkas” primerjelöléssel, melyekben a 70 működő marker közül 45 szerepel. A 25 darab multiplexbe nem sorolt mikroszatellita markert monoplex reakcióban sokszorosítottuk (a 6 működő újratervezett markert is) (4.táblázat).

4.2.3. Markerek polimorfizmusának felmérése és statisztikai elemzések

Az összes (76 db) működőképes mikroszatellitán elvégeztük az allélok elválasztását és detektálását kapilláris elektroforézissel. Mindegyik markert ugyanazon a 20 kiválasztott dâm vad mintán vizsgáltuk, mind az öt mintavételi helyről válogatva egyedeket (Pilis n=8, Isaszeg n=6, Vértes n=3, Lajosmizse n=2, Szekszárd n=1).

9. táblázat: A 16 polimorf marker allélszáma, allélgyakorisága (Freq1-5, az allélok növekvő hosszúságú sorrendben vannak), megfigyelt (Ho) és várt heterozigócia (He), fixációs index (Fis).

Lokusz	CapCap29	C229	T108	T156	OheF	OheQ	ApoV47	ApoV49	ApoV75	ApoV146	Mgoua20	WY62	C32	C276	T107	T268
Allélszám	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	3
Freq1	0,90	0,75	0,10	0,90	0,93	0,93	0,80	0,20	0,78	0,63	0,63	0,70	0,12	0,69	0,08	0,88
Freq2	0,10	0,25	0,90	0,10	0,08	0,08	0,20	0,80	0,23	0,38	0,38	0,30	0,90	0,31	0,43	0,05
Freq3															0,08	0,06
Freq4															0,28	
Freq5															0,15	
Ho	0,20	0,30	0,00	0,10	0,15	0,15	0,30	0,30	0,35	0,45	0,45	0,40	0,00	0,50	0,80	0,25
He	0,18	0,38	0,18	0,18	0,14	0,14	0,32	0,30	0,35	0,47	0,47	0,42	0,19	0,42	0,71	0,23
Fis	-0,11	0,20	1,00	0,44	-0,08	-0,08	0,06	0,06	-0,01	0,04	0,04	0,05	1,00	-0,18	-0,13	-0,12

Az *A. markercsoportban* 32 mikroszatellita adott specifikus PCR terméket, ezekből hat marker bizonyult polimorfnek (2-2 allél), a többi marker monomorf. A *B. markercsoportban* 16 volt működőképes, melyekből négy mikroszatellita volt polimorf (2-2 allél), a többi marker monomorfnek bizonyult. A *C. markercsoport* 28 működő markeréből öt bizonyult polimorfnek (2/3/5 allél). Összességében 16 marker bizonyult polimorfnek (2-5 allél) és 60 mikroszatellita volt monomorf (1 allél).

A markerkészlet dámszarvasok egyedi szintű azonosítására való alkalmasságát a PI (identitás valószínűség) érték kiszámításával lehet megállapítani, ehhez a polimorf markerek adatait vizsgáltuk GenAlEx 6.5. programmal. A kapott $PI=1,2 \cdot 10^{-5}$, míg a testvérek esetében számolt érték $PI_{sib}=4,2 \cdot 10^{-3}$. A program segítségével számítottuk ki a polimorf markerekre jellemző több paramétert is (9. táblázat): allélszám, allélgyakoriság, megfigyelt (Ho) és várt heterozigócia (He), illetve fixációs index (Fis). Mivel a mintavételi helyekről egyenként csak kevés egyedet vizsgáltunk ($n < 10$), így a paraméterek lokuszonkénti számításakor a 20 egyedet egy helyről származónak tekintettük.

A Hardy-Weinberg egyensúlyt a 76 markernél FSTAT programmal elemeztük, és három marker esetében szignifikáns eltérést találtunk: C32 ($P < 0,0001$), T108 ($P < 0,0001$) és T156 ($P = 0,047$). A C32 és T108 esetében a MICRO-CHECKER program null allélok jelenlétét is

kimutatta, ami okozhatta a HWE-től való eltérést. Ezen kívül a CapCap37 és ApoV56 markereknél mutatta ki a null allélok lehetséges meglétét. „Dadogást” és hosszú allélok kiesését egyik markernél sem jelezte.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásunk célja a dámszarvasok egyedi szintű azonosításának megvalósításához szükséges potenciális genetikai markerkészlet összeállítása volt, melyet polimorf mikroszatelliták segítségével kívántunk elérni. Ehhez tetranukleotid mikroszatellitákat kerestünk, és valamennyi hozzáférhető, a *Cervidae* családban korábban leírt és tesztelt tetramer STR-t megvizsgáltuk (100 primerpár, 91 lokusz). Emellett megvizsgáltuk a mitokondriális DNS kontroll régióját, hogy megállapítsuk van-e a haplotípusoknak területi elkülönülése, ami szintén segítheti a jogkövetkezményekkel járó esetek megoldását.

5.1. Mitokondriális DNS kontroll régió

Saját vizsgálatainkkal együtt Magyarországon eddig 100 dámszarvas egyed haplotípusát szekvenálták a kontroll régió különböző hosszúságú szakaszain (ebből mi 46 egyed mintáját dolgoztuk fel teljesen, 54-et csak elemeztünk). Az egyedekben öt haplotípus detektálható (H1, H2, H3, Hap5 és Hap9), melyek mindössze öt polimorf pozícióban különböztek a szekvenciákban. A polimorf pozíciók egymáshoz közel helyezkednek, így elég egy rövid (450 bp) hosszú kontroll régió szakasz vizsgálata is. Összehasonlításként az európai őz (*Capreolus capreolus*) esetében Magyarországon 39 haplotípust mutattak ki 118 egyedet megvizsgálva, míg gímszarvasoknál 71 haplotípust 169 egyedből (még nem publikált adatok). Ezek az eredmények igazolják a kontroll régió feltételezhetően nagy mértékű változatosságát [39], ezzel szemben a dámszarvas esetében csak kifejezetten kis mértékű polimorfizmus figyelhető meg. Ez összhangban áll a nemzetközi irodalom több eredményével, ugyanis világszinten többféle genetikai markerrel alacsony genetikai diverzitást mutattak ki az egyes dámvad populációkon belül (részletesen később) [3, 13, 18, 62–67].

A haplotípusok eloszlását illetően a H3 eddig csak Északkelet-Magyarországon fordult elő (1 egyedben), a Hap5 és Hap9 pedig kizárólag Dél-Magyarországon (9 és 2 egyedben). A másik két haplotípus (H1, H2) nagyon gyakori volt, szinte az egész országban előfordult. A mintavételi helyek elkülöníthetőségére vonatkozó F_{st} értékek alapján a déli területek szignifikánsan eltérnek az összes többi mintavételezési helytől. Ezeket az eredményeket

azonban óvatosan kell kezelni a kis mintaelemszám, kevés vizsgált populáció és kevés haplotípus miatt (szignifikáns eltérést adott mindössze két ritka haplotípus jelenléte).

Eredeti célunk az volt, hogy megvizsgáljuk van-e a haplotípusoknak területi elkülönülése, vagyis egy ismeretlen eredetű dámszarvas mintánál kizárólag a haplotípus vizsgálatával megállapítható-e a minta származási helye. Az eredmények alapján ez nem valószínű a magyar populáción belül, hiszen előfordulhat, hogy az eddig csak délen és északkeleten megfigyelt haplotípusok rendkívül ritkák a populáción belül. Így nagyobb valószínűséggel kaphatunk egy bizonyos területhez nem köthető H1 vagy H2 haplotípust. Továbbá az ország középső és nyugati feléről még nem vizsgáltunk meg egyedeket, lehetséges, hogy a H3, Hap5 és Hap9 haplotípusok ott is jelen vannak.

A kontroll régiót tehát nem tudjuk felhasználni a haplotípusok geográfiai elkülönítésére, de továbbra is hasznos lehet kutatásunkban, hiszen fajelkülönítésre és anyai leszármazási ágak elkülönítésére alkalmas [33, 34, 37, 39–41]. Ezeket a tulajdonságokat kizárásos vizsgálatoknál lehetne alkalmazni, vagyis abban az esetben, ha a két vizsgált minta már faji vagy anyai leszármazási ág szintjén különbözik, tehát azonnal el lehet vetni a minták azonos egyedtől való származását. Ezek a vizsgálatok gyorsabban és egyszerűbben kivitelezhetőek, mint az egyedi szintű azonosítást célzó mikroszatellita készletek alkalmazása, vagyis ilyen szempontból is előnyös a kontroll régió vizsgálata.

5.2. Mikroszatellita markerkészlet fejlesztése

5.2.1. Monoplex PCR tesztelés

A fejlesztésünk első lépése a kiválasztott markerek monoplex PCR-es tesztelése volt, hiszen markereink vizsgálati módszerei eredetileg nem dámszarvasokra lettek optimalizálva. Márpedig adott fajra optimalizált primerpárok és PCR beállítások egy másik faj esetében eltérően működhetnek, illetve a sokszorosított termékek mérete és száma (specifikus termékek) is különböző lehet. A letesztelt 100 primerpár közül végül 76 működött dámszarvasokban (a primerpár újratervezéseket követően).

A kutatás során kizárt 24 marker többféle okból került ki a fejlesztésből. Kilenc primerpár duplumként szerepelt, vagyis egy másik primerpárral azonos lokuszt amplifikált, és a melléktermék nélküli, erősebb terméket adó, illetve rövidebb terméket eredményező primerpárt használtuk a további vizsgálatokhoz. A rövidebb PCR termékek előnye, hogy kis mennyiségű, degradálódott (pl. töredezett) DNS-ből nagyobb valószínűséggel kimutathatók, illetve a preferenciális amplifikálódás miatt a hosszabb markerek sokszor kiesnek a

multiplexekből [84]. Tizenöt mikroszatellita esetében több PCR beállítás és újratervezés mellett is melléktermék keletkezett vagy nem jött létre amplikon. A PCR termék hiányát feltehetően a primerkötő régióban bekövetkezett pontmutációk okozhatták, amik miatt nem tudott végbe menni a reakció [85, 86]. Másrészt előfordulhat, hogy primer hibridizáció (összekapcsolódás) történt, ami rövid duplaszálú melléktermékeket eredményez [87]. A melléktermék keletkezést a primerpárok nem megfelelő specificitása eredményezhette, vagyis be tudtak kapcsolódni nem csak a célzott, de komplementer DNS szakaszokhoz is, ezeket szintén felsokszorosítva [86].

5.2.2. Multiplex fejlesztés és a „farkas” fluoreszcens jelölési technika alkalmazhatósága

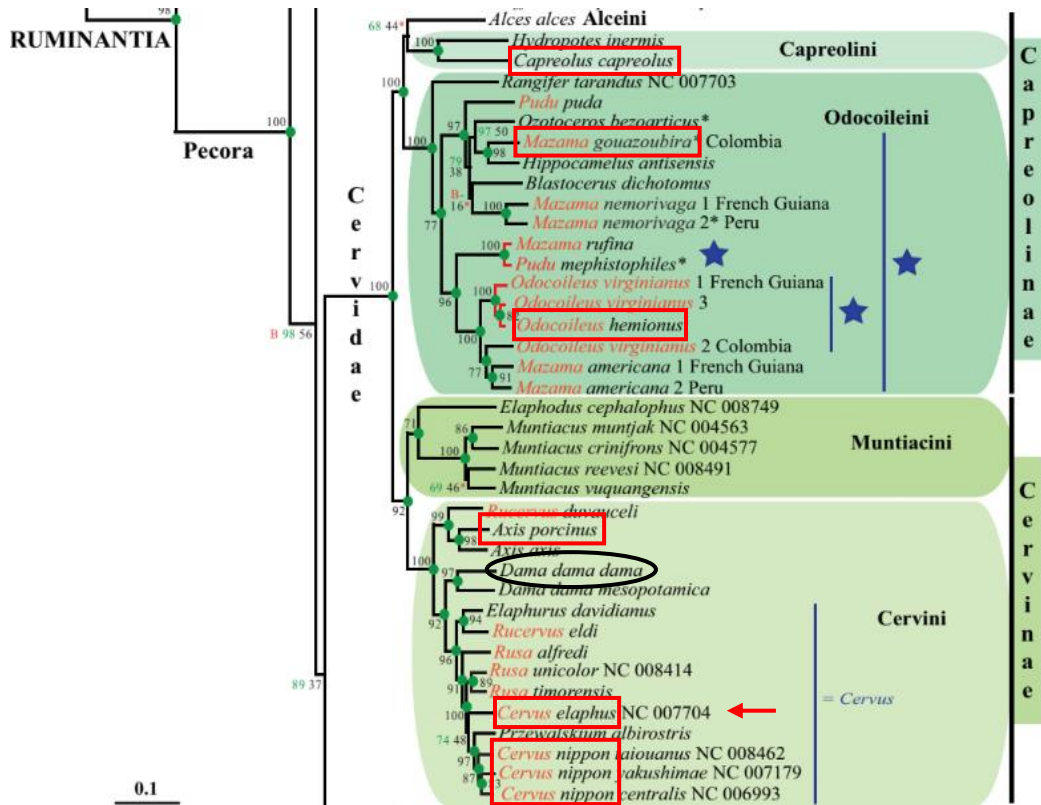
A multiplex fejlesztésbe 70 markert vontunk be, ezekből 45 markert tudunk 12 multiplexbe rendezni. A fejlesztés során több nehézség is felmerült. Egyrészt előfordult, hogy a primerek gátolták egymás működését, ennek egyik oka a primerek dimerizálódása volt [88]. A másik probléma forrás az alternatív fluoreszcens jelölés, a „farkas” technika használata volt. A kutatás során ugyanis megfigyeltük, hogy a fluoreszcens jel hozzáadása nélkül specifikus terméket adtak az adapter szekvenciával ellátott primerek. A jelölt univerzális primerek hozzáadásával viszont ez megszűnt, tehát a primer bizonyos mértékben megváltoztatta a markerek működési optimumait. Ez az optimumot érintő változás a legtöbb esetben nem volt összhangban az univerzális primer saját leközölt optimumával, és egyazon univerzális primernél is eltérő lehetett a különböző markerekre. Ennek hátrányos következménye volt, hogy az eredetileg hasonló körülmények között működő primerek, amik egy multiplexbe kerültek, többet nem voltak képesek ugyanazon a PCR beállításon együtt működni. Korábbi publikációk nem számoltak be hasonló tapasztalatokról az univerzális primerekkel kapcsolatban [pl. 58, 89], ugyanakkor azt említették, hogy az univerzális primerek használata primer dimerizációt okozhat, ami miatt nem keletkezik megfelelő minőségű és mennyiségű termék [90]. Így a „farkas” technika saját tapasztalataink alapján megnehezítette a multiplexek tesztelését és fejlesztését (25 markert kizárólag monoplex reakcióban sikerült sokszorosítanunk), ezért a jövőben a hagyományos fluoreszcens jelölés használatát tervezzük.

5.2.3. A markerkészlet alkalmazhatósága és a magyar dámvad populáció genetikai diverzitása

A 76 működőképes mikroszatellita közül 16 bizonyult polimorfnak, valamennyi markert 20 dámvad egyeden vizsgálva (az öt mintavételi hely legalább egy-egy mintáját megnéztük). A

polimorf markerek közül három eredetileg gímszarvasra (*Cervus elaphus*) lett optimalizálva, kettő öszvérszarvasra (*Odocoileus hemionus*), egy európai őzre (*Capreolus capreolus*), négy disznószarvasra (*Axis porcinus*), négy vapitire (*Cervus canadensis*), egy Guazauvirá-szarvasra (*Mazama gouazoubira*) és egy szikaszarvasra (*Cervus nippon*). A felmért hazai dámszarvasokban egyedül a szitka szarvasra leírt markerek között nem találtunk több alléllal rendelkezőt. Ha megvizsgáljuk ezeknek a *Cervidae* családba tartozó fajoknak a rokonsági viszonyát (7. ábra) [91], megfigyelhető, hogy a rokonság mértékének nem volt köze ahhoz, hogy melyik fajból kiválasztott marker működött megfelelően, illetve mutatott polimorfizmust.

A 16 polimorf marker allélszámai lokuszonként 2-5 allél volt. A megfigyelt heterozigócia



7. ábra: A Cervidae család törzsfája [91], amin piros keretben szerepelnek a dámszarvasra polimorf markerek eredeti fajai (fentről lefelé): európai őz, Guazauvirá-szarvas, öszvérszarvas, disznószarvas, gímszarvas, szikaszarvas. A vapiti nem szerepel a törzsfán, így hozzávetőleges helye pirossal nyíllal jelölt, míg a vizsgált dámszarvas fekete körben szerepel.

(Ho) 0,000 (C32, T108) és 0,800 (T107) értékek között mozgott, míg a várt heterozigócia (He) 0,139 (OheF, OheQ) és 0,710 (T107) között. A legtöbb esetben nem volt nagy eltérés a várt és megfigyelt értékek között, erre utalnak az 0-hoz közeli fixációs indexek (Fis) is. Ez a paraméter a populációk beltenyészettségéről ad információt (hiszen a beltenyészettség miatt növekedő megfigyelt homozigóták arányát figyelembe tudja venni) [79], a kicsi értékek alapján a magyar dämadvad populáció nem annyira beltenyészett. Két marker esetében

(C32, T108) azonban nagyon magas az index ($F_{is}=1,000$), ami utalhat például a pánmixis hiányára, migrációra stb. [81]. Ugyanakkor ezeknél a markereknél null allélok jelenlétét is kimutattuk, ami megmagyarázhatja a magas F_{is} és a HWE-től való szignifikáns eltérésüket is. Emellett a kis mintaelemszám ($n=20$) is okozhatja az eltérést (a HWE-től szintén eltérő T156 esetében is).

A 16 polimorf mikroszatellitának legtöbb esetben csak két allélja volt a felmért hazai dámszarvasokban (14 marker 2 allél, 1 marker 3 allél, 1 marker 5 allél). Összehasonlításként mind a tíz DeerPlex marker polimorf lett a magyar gímszarvas populációban ($n=303$), a legkevesebb allélszám hét (C229) a legtöbb pedig 27 volt (T156) [23]. A kapott eredményünk tehát, hasonlóan a korábbi nemzetközi publikációkhoz [3, 13, 18, 62–67], a dámszarvas populáció regionális szintű alacsony genetikai diverzitását mutatja. Ezt támasztja alá a mitokondriális DNS kontroll régiójának vizsgálati eredménye is, hiszen csak öt haplotípust találtunk a hipervariábilis régióon belül. Az alacsony változatosságnak több okát is kimutatták korábbi kutatások: alapító hatás [3, 13, 63], genetikai sodródás [3, 13, 63], beltenyészettség [3, 67], palacknyak hatás [3, 67] és a dámszarvasok szaporodási rendszere [3]. Feltételezhető, hogy a magyar populáció esetében is ezek okozhatják a csökkent polimorfizmust.

Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy kevés dámszarvas mintán vizsgáltuk a mikroszatelliták polimorfizmusát ($n=20$), illetve a minták nem fedik le Magyarország teljes területét. Továbbá az is előfordulhat, hogy a vizsgált mikroszatelliták a dámszarvasban nem megfelelő markerek, így az egyébként polimorf populációt is monomorfnek mutatják. Ennek több oka is lehet, például a felhalmozódó pontmutációk megszüntették az ismétlődést tartalmazó tandem régiókat. A megfigyelt kis mértékű polimorfizmus és a monomorf allélek magas arányának oka tehát nem egyértelmű, és messzemenő következtetéseket még nem lehet levonni a magyar dámvad populáció genetikai változatosságával kapcsolatban.

Annyi bizonyos, hogy a jelenlegi markerkészlet a kapott PI érték alapján már alkalmas lehet egyedi szintű azonosításra a dámszarvas állományon belül. Az $1,2 \cdot 10^{-5}$ ugyanis azt jelenti, hogy 1 000 000 egyedből csak 12 egyednek egyezne meg a genotípusa, ami egy 40 000 egyedből álló állomány esetében meglehetősen jó eredmény. Az NCR II ajánlásainak is megfelel ez az érték, mivel éppen a határán van az alkalmazhatósági tartománynak ($4,1 \cdot 10^{-11}$ – $1,2 \cdot 10^{-5}$) [92].

Vagyis összességében a markerkészlet fejlesztése sikeres volt, a jövőben megkezdődhet a validálás folyamata, melynek szigorú szempontrendszere van (pl. érzékenység, robusztusság és ismételhetőség). A markerkészlet fontossága az egyre növekvő mértékű orvvadászatban rejlik, hiszen ez eredményezte a faj hatékonyabb védelmének igényét. A kifejlesztett markerszett egyéb jelentősége, hogy más országokban is alkalmazható lehet a helyi állományokon való előzetes tesztelések után. Illetve a magyarországi dámvad-állomány genetikai felmérésére szintén használható, ami információt szolgáltat a populáció hatékonyabb szabályozásához/fenntartásához is. Látható, hogy ez a markerkészlet nemcsak forenzikus célokra lenne alkalmazható később, hanem vadgazdálkodási tanácsadásra és a populáció struktúra vizsgálatára is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A dámszarvas vadgazdálkodásilag értékes faj. Értékének hatékonyabb védelme érdekében célul tűztük ki egy jogkövetkezményekkel járó eseteknél alkalmazható genetikai markerkészlet fejlesztését a magyar dámvad állományban. A markerkészlet fejlesztésének célja a populációk elkülönítése haplotípusok alapján és az egyedi szintű azonosítás volt.

Előbbit a mtDNS kontroll régiójának hipervariábilis szakaszának vizsgálatával akartuk elérni, azonban a feldolgozott és kiválogatott 100 dámvad mintában csak öt haplotípust találtunk. A haplotípusok alacsony száma és változó gyakorisága miatt (voltak ritka és nagyon gyakori haplotípusok) nem tudtuk a geográfiai populáció elkülönítést megvalósítani, de a mtDNS markert így is tudjuk alkalmazni fajelkülönítés és anyai leszármazási ágak elkülönítése esetén.

Az egyedi szintű azonosításra korábban más *Cervidae* fajra publikált tetramer mikroszatellita markereket alkalmaztunk, összesen 100 darabot. Ebből 76 működött megfelelően, így ezekkel végeztük el a polimorfizmus felmérését 20 mintán, hiszen csak több alléllal rendelkező markerekkel lehet elérni az egyedek beazonosítását. A 76-ból 16 mikroszatellita volt polimorf (2-5 allél).

A mtDNS és mikroszatellita markerek is a magyar dámvad populáció alacsony genetikai diverzitását mutatták ki, mely összhangban van más területek kutatási eredményeivel. A világszinten megfigyelt jelenséget több okra vezethető vissza (pl. palacknyak hatás, alapító hatás), amik valószínűleg hazánkban is hatottak. Azonban az alacsony mintaelemszám ($n=20$), és a nem megfelelő markerek vizsgálata is okozhatta a túlzott monomorfizmust.

A mikroszatellita markerkészletünk egyedi szintű azonosításra való alkalmasságát az identitás valószínűséggel vizsgáltuk, ami $1,2 \cdot 10^{-5}$ volt. Ez pontosan az ajánlott forenzikus alkalmassági tartomány határán van, vagyis sikeresen zárult a fejlesztésünk, alkalmas a készlet egyedi szintű azonosításra. Azonban a markerkészlet tényleges törvényszéki alkalmazhatóságához még hátra van a validálási folyamat.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. 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. https://www.researchgate.net/publication/293152444_Identification_of_fallow_deer_remains_on_the_basis_of_its_skeletal_features_Taxonomical_considerations Accessed 26 March 2023
2. Apollonio M, Focardi S, Toso S, Nacci L (1998) Habitat selection and group formation pattern of fallow deer *Dama dama* in a submediterranean environment. *Ecography* 21:225–234. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1998.tb00560.x>
3. Say L, Naulty F, Hayden TJ (2003) Genetic and behavioural estimates of reproductive skew in male fallow deer. *Mol Ecol* 12:2793–2800. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01945.x>
4. Thirgood SJ (1995) The effects of sex, season and habitat availability on patterns of habitat use by fallow deer (*Dama dama*). *Journal of Zoology* 235:645–659. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1995.tb01775.x>
5. Chapman N, CHAPMAN D (2008) The distribution of fallow deer: A worldwide review. *Mammal Review* 10:61–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1980.tb00234.x>
6. Ghassemi-Khademi T (2014) A review of the biological status of Persian fallow deer (*Dama mesopotamica*), a precious and endangered animal species in Iran. *Journal of Middle East Applied Science and Technology* https://www.researchgate.net/publication/318815709_A_review_of_the_biological_status_of_Persian_fallow_deer_Dama_mesopotamica_a_precious_and_endangered_animal_species_in_Iran Accessed 26 March 2023
7. Randi E, Mucci N, Claro-Hergueta F, Bonnet A, Douzery EJP (2001) A mitochondrial DNA control region phylogeny of the *Cervinae*: speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Animal Conservation* 4:1–11. <https://doi.org/10.1017/S1367943001001019>
8. Arslangündoğdu Z, Kasperek M, Sarbaçak H, Kaçar MS, Yöntem O, Şahin MT (2010) Development of the population of the European Fallow Deer, *Dama dama dama* (Linnaeus, 1758), in Turkey. *Zoology in the Middle East* 49:3–12. <https://doi.org/10.1080/09397140.2010.10638383>
9. Masseti M, Pecchioli E, Vernesi C (2008) Phylogeography of the last surviving populations of Rhodian and Anatolian fallow deer (*Dama dama dama* L., 1758). *Biological Journal of the Linnean Society* 93:835–844. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00951.x>
10. Chapman D (1997) *Fallow Deer: Their History, Distribution, and Biology*. Coch-y-bonddu Books, Machynlleth
11. Pemberton JM, Smith RH (1985) Lack of biochemical polymorphism in British fallow deer. *Heredity* 55:199–207. <https://doi.org/10.1038/hdy.1985.92>
12. Yannouli E, Trantalidou K (1998) The Fallow deer (*Dama dama* L. 1758) in Greece. *Archaeological Presence and Representation*, 1999. In: N. Benecke (eds) *The Holocene history of the European Vertebrate Fauna: Modern Aspects of Research*. Verlag Marie Leidorf GmbH, Berlin, pp 247–263
13. Baker KH, Gray HWI, Ramovs V, Mertzanidou D, Akın Pekşen Ç, Bilgin CC, Sykes N, Hoelzel AR (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>
14. Davis S, MacKinnon M (2009) Did the Romans bring fallow deer to Portugal? *Environmental Archaeology* 14:15–26. <https://doi.org/10.1179/174963109X400646>
15. Valenzuela A, Baker K, Carden R, Evans J, Higham T, Hoelzel R, Lamb A, Madgwick R, Miller H, Alcover J, Cau Ontiveros M, Sykes N (2016) Both introduced and extinct: The fallow deer of Roman Mallorca. *Journal of Archaeological Science: Reports* 9:168–177. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.06.038>
16. Madgwick R, Sykes N, Miller H, Symmons R, Morris J, Lamb A (2013) Fallow deer (*Dama dama dama*) management in Roman South-East Britain. *Archaeol Anthropol Sci* 5:111–122. <https://doi.org/10.1007/s12520-013-0120-0>

17. 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. *Environmental Archaeology* 23:47–55. <https://doi.org/10.1080/14614103.2017.1349027>
18. Kusza S, Ashrafzadeh M, Tóth B, Jávora A (2018) Maternal genetic variation in the northeastern Hungarian fallow deer (*Dama dama*) population. *Mammalian Biology* 93:21–28. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.08.005>
19. Faragó S (2006) Magyar Vadász Enciklopédia. Totem Kiadó, Magyarország, pp 232–233
20. Csányi S, Márton M, Böti Sz, Schally G (2022) Vadgazdálkodási Adattár - 2021/2022.vadászati év. In: OVA http://www.ova.info.hu/vg_stat/VA-2021-2022.pdf Accessed 26 Mar 2023
21. (1996) (1996/LV.) A vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról.
22. Elek B (2019) The criminalization of poaching in Hungary. *Zbornik radova Pravnog fakulteta, Novi Sad* 53:639–648. <https://doi.org/10.5937/zrpfns53-20330>
23. 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>
24. Faragó S, Köller J, Zoltán A (2009) Természeti-vadászati örökségünk. A legkiválóbb vadásztrófeák. Nimród Vadászújság, Magyarország
25. Linacre A, Gusmão L, Hecht W, Hellmann AP, Mayr WR, Parson W, Prinz M, Schneider PM, Morling N (2011) ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Science International: Genetics* 5:501–505. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.017>
26. Jones KC, Levine KF, Banks JD (2000) DNA-based genetic markers in black-tailed nad mule deer for forensic applications. *California Fish and Game* 86:115–126 https://www.researchgate.net/publication/292315308_DNA-based_genetic_markers_in_black-tailed_nad_mule_deer_for_forensic_applications Accessed 26 Mar 2023
27. Morf NV, Koppas AM, Nater A, Lendvay B, Vasiljevic N, Webster LMI, Fautley RG, Ogden R, Kratzer A (2021) STRoe deer: A validated forensic STR profiling system for the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Forensic Science International: Animals and Environments* 1:100023. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100023>
28. Jones K, Levine K, Banks J (2002) Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus Elaphus Canadensis*). *Molecular Ecology Notes* 2:425–427. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00264.x>
29. Meredith EP, Rodzen JA, Levine KF, Banks JD (2005) Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conserv Genet* 6:151–153. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7735-8>
30. Wu H, Wan Q-H, Fang S-G, Zhang S-Y (2005) Application of mitochondrial DNA sequence analysis in the forensic identification of Chinese sika deer subspecies. *Forensic Science International* 148:101–105. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.072>
31. Wilson-Wilde L (2010) Wildlife crime: a global problem. *Forensic Sci Med Pathol* 6:221–222. <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9167-8>
32. Ferreras P, Aldama JJ, Beltrán JF, Delibes M (1992) Rates and causes of mortality in a fragmented population of Iberian lynx *Felis pardina* Temminck, 1824. *Biological Conservation* 61:197–202. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91116-A](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91116-A)
33. 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>
34. 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>
35. Dajana D, Uroš G, Nesic K, Davitkov D, Vucicevic M, Nesic V, Stanimirovic Z (2017) Improved DNA-Based Identification of *Cervidae* Species in Forensic Investigations. *Acta Veterinaria* 67:449–458. <https://doi.org/10.1515/acve-2017-0037>
36. 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>
37. Parkanyi V, Ondruska L, Vasicek D, Slamecka J (2013) Multilevel D-loop PCR identification of hunting game. *Appl Transl Genom* 3:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2013.03.001>

38. Gilson A, Syvanen M, Levine K, Banks J (1998) Deer gender determination by polymerase chain reaction: Validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *California Fish and Game* 84:159–169. ISSN/ISBN: 0008-1078
39. Douzery E, Randi E (1997) The mitochondrial control region of *Cervidae*: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution* 14:1154–1166. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025725>
40. Polziehn RO, Strobeck C (1998) Phylogeny of Wapiti, Red Deer, Sika Deer, and Other North American Cervids as Determined from Mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10:249–258. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0527>
41. Polziehn RO, Strobeck C (2002) A Phylogenetic Comparison of Red Deer and Wapiti Using Mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22:342–356. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1065>
42. Randi E, Pierpaoli M, Danilkin A (1998) Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*). *Heredity* 80:429–437. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00318.x>
43. Markov G, Kuznetsova M, Alexey D, Kholodova M, Sugár L, Heltai M (2015) Genetic Diversity of the Red Deer (*Cervus elphus L.*) in Hungary Revealed by Cytochrome b Gene. *Acta Zoologica Bulgarica* 67:11–17
44. Kunkel TA, Loeb LA (1981) Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* 213:765–767. <https://doi.org/10.1126/science.6454965>
45. Aquadro CF, Greenberg BD (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103:287–312. <https://doi.org/10.1093/genetics/103.2.287>
46. Saccone C, Pesole G, Sbisá E (1991) The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J Mol Evol* 33:83–91. <https://doi.org/10.1007/BF02100199>
47. Cook CE, Wang Y, Sensabaugh G (1999) A Mitochondrial Control Region and Cytochrome b Phylogeny of Sika Deer (*Cervus nippon*) and Report of Tandem Repeats in the Control Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12:47–56. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0593>
48. Purdue JR, Oleksyk TK, Smith MH (2006) Independent Occurrences of Multiple Repeats in the Control Region of Mitochondrial DNA of White-Tailed Deer. *Journal of Heredity* 97:235–243. <https://doi.org/10.1093/jhered/esj032>
49. Alacs EA, Georges A, FitzSimmons NN, Robertson J (2010) DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Sci Med Pathol* 6:180–194. <https://doi.org/10.1007/s12024-009-9131-7>
50. McCord B, Opel KL, Funes M, Zoppis S, Jantz L (2011) An investigation of the effect of DNA degradation and inhibition on PCR amplification of single source and mixed forensic samples <https://www.ojp.gov/ncjrs/virtual-library/abstracts/investigation-effect-dndegradation-and-inhibition-pcr-amplification> Accessed 26 Mar 2023
51. 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>
52. Anderson JD, Honeycutt RL, Gonzales RA, Gee KL, Skow LC, Gallagher RL, Honeycutt DA, DeYoung RW (2002) Development of Microsatellite DNA Markers for the Automated Genetic Characterization of White-Tailed Deer Populations. *The Journal of Wildlife Management* 66:67–74. <https://doi.org/10.2307/3802872>
53. Haanes H, Røed K, Mysterud A, Langvatn R, Rosef O (2010) Consequences for genetic diversity and population performance of introducing continental red deer into the northern distribution range. *Conservation Genetics* 11:1653–1665. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0048-1>
54. DeYoung RW, Demarais S, Honeycutt RL, Gonzales RA, Gee KL, Anderson JD (2003) Evaluation of a DNA Microsatellite Panel Useful for Genetic Exclusion Studies in White-Tailed Deer. *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)* 31:220–232 <https://www.jstor.org/stable/3784377> Accessed 26 Mar 2023
55. Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 20:2587–2595. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2587>
56. Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, Smith FP (1998) A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 92:75–88. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00010-3)
57. Zianni M, Tessanne K, Merighi M, Laguna R, Tabita FR (2006) Identification of the DNA Bases of a DNase I Footprint by the Use of Dye Primer Sequencing on an Automated Capillary DNA Analysis Instrument. *J Biomol Tech* 17:103–113. PMID: PMC2291779

58. Blacket M, Robin C, Good R, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular ecology resources* 12:456–63. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x>
59. Moore M, Baker B, Bauman T, Curtis M, Espinoza E, Ferrell C, Frankham G, Frazier K, Giles J, Hawk D, Rovie-Ryan J, Johnson R, Knott T, Kornfield I, Lindquist C, Lord W, Morgan K, O'Brien R, Ogden R, Webster L (2021) The Society for Wildlife Forensic Science standards and guidelines. *Forensic Science International: Animals and Environments* 1:100015. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100015>
60. GenAIEx Tutorials. <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Tutorials.html>. Accessed 26 Mar 2023
61. Sim Z, Monderman L, Hildebrand D, Packer T, Jobin RM (2021) Development and implementation of a STR based forensic typing system for moose (*Alces alces*). *Forensic Science International: Genetics* 53:102536. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102536>
62. 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. *Veterinary Research* 49:33. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0528-8>
63. 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>
64. Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (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>
65. Hartl GB, Schlegel A, Slowak M (1986) Genetic variability in fallow deer, *Dama dama* L. *Anim Genet* 17:335–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1986.tb00726.x>
66. 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 Theriologica Supplement* 43:163-169. <https://rcin.org.pl/ibs/dlibra/publication/28735/edition/12815> Accessed 26 Mar 2023
67. 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>
68. Bentley A (1998) An introduction to the deer of Australia, with special reference to Victoria, Bunyip ed. Australian Deer Research Foundation, Melbourne
69. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511808999>
70. Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. <https://doi.org/10.7312/nei-92038>
71. LabXchange. https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:05cd9910-1ea6-49ef-9360-f6d9fd6523f0/items/lx-pb:05cd9910-1ea6-49ef-9360-f6d9fd6523f0:lx_simulation:b503b618. Accessed 26 Mar 2023
72. Roche Applied Science (2006) *GS Guide to Amplicon Sequencing*
73. Hill E (2021) *Forensic and Population Genetic Analysis of Introduced and Endangered Hog Deer (Axis porcinus)*. Thesis, La Trobe. <https://doi.org/10.26181/6035a4b7f118f>
74. Caparroz R, Mantellatto AMB, Bertoli 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>
75. Brinkman TJ, Person DK, Schwartz MK, Pilgrim KL, Colson KE, Hundertmark KJ (2010) Individual identification of Sitka black-tailed deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets. *Conservation Genet Resour* 2:115–118. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9176-7>
76. Yang W, Zheng J, Jia B, Wei H, Wang G, Yang F (2018) Isolation of novel microsatellite markers and their application for genetic diversity and parentage analyses in sika deer. *Gene* 643:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.007>
77. Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol Ecol* 10:249–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x>
78. Ritland K (1996) Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetics Research* 67:175–185. <https://doi.org/10.1017/S0016672300033620>
79. Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen*, pp 323–354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
80. Goudet J (2003) FSTAT (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. <https://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Accessed 26 Mar 2023


81. Lachance J (2016) Hardy–Weinberg Equilibrium and Random Mating. In: Kliman RM (ed) Encyclopedia of Evolutionary Biology. Academic Press, Oxford, pp 208–211
82. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHEKCR: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4:535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
83. Rico C, Cuesta JA, Drake P, Macpherson E, Bernatchez L, Marie AD (2017) Null alleles are ubiquitous at microsatellite loci in the Wedge Clam (*Donax trunculus*). PeerJ 5:3188. <https://doi.org/10.7717/peerj.3188>
84. Chung DT, Drábek J, Opel KL, Butler JM, McCord BR (2004) A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR Miniplex primer sets. J Forensic Sci 49:733–740. PMID: 15317187
85. 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](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00035-5)
86. Takayama T, Takada N, Suzuki R, Nagaoka S, Watanabe Y (2007) Identification of a rare mutation in a TH01 primer binding site. Leg Med (Tokyo) 9:289–292. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2007.04.003>
87. Tolle F, Wilke J, Wengel J, Mayer G (2014) By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX. PLoS One 9:114693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114693>
88. Edwards MC, Gibbs RA (1994) Multiplex PCR: advantages, development, and applications. Genome Res 3:65–75. <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.s65>
89. Missiaggia A, Grattapaglia D (2006) Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. Genet Mol Res 5:72–78. PMID: 16755499
90. Luttmann 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>
91. Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Jansen van Vuuren B, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A (2012) Pattern and timing of diversification of *Cetartiodactyla* (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. Comptes Rendus Biologies 335:32–50. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.11.002>
92. National Research Council (1996) The Evaluation of Forensic DNA Evidence. DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/5141>

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szakkolgozatom megvalósításához nyújtott segítségével köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Zenke Petrának, és társtémavezetőmnek, Zorkóczy Orsolyának, akik szakmai útmutatásukkal lehetővé tették a kutatás létrejöttét.

Alulírott Dr. Zenke Petra igazolom, hogy Turi Orsolya (a hallgató neve) „Magyarországi dámszarvas populációk genetikai diverzitásának felmérése igazságügyi célú vizsgálatokhoz” című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védeésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2023.04.28.



.....Dr. Zenke Petra.....

a témavezető neve és aláírása

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-
tudományi Intézet

.....

tanszék