

Állatorvostudományi Egyetem

Zoológiai Tanszék



**Molekuláris ivar-meghatározási módszer fejlesztése afrikai
ökörbékában (*Pyxicephalus adspersus*)**

**Developing a method for molecular sexing of the African bullfrog (*P.
adspersus*)**

Készítette: Nagy Máté

Biológus MSc szakos hallgató, 2. évfolyam

37. OTDK Biológia Szekció

Témavezető: Dr. Szabó Krisztián, tudományos munkatárs

Állatorvostudományi Egyetem, Zoológiai Tanszék

Társtémavezető: Balogh Emese, PhD hallgató

Állatorvostudományi Egyetem, Zoológiai Tanszék

Budapest

2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke:	3
Bevezetés:	4
Molekuláris szexálás	4
Ivardeterminációs rendszerek.....	5
Ivardeterminációs rendszerek kételtűekben	6
Vizsgált faj	9
A kutatás jelentősége.....	12
Célkitűzés.....	13
Anyag és módszer:.....	14
Mintagyűjtés.....	14
Markerfejlesztés	15
Diagnosztikus primerek tervezése.....	17
A markerek tesztelése.....	18
Eredmények:	19
Markerfejlesztés és -tesztelés	19
Diskusszió	28
Összefoglalás	30
Summary	31
Irodalomjegyzék	32
Köszönetnyilvánítás.....	35

Rövidítések jegyzéke:

DNS

Dezoxiribonukleinsav

PCR

Polimeráz láncreakció

IN/DEL

Inszerció / deléció mutáció

LCB

Lokálisan egyező blokk

Bevezetés:

Molekuláris szexálás

Bizonyos váltivarú élőlényeknél előfordulhat, hogy az egyedek ivara nem állapítható meg kizárólag morfológiai jellegek alapján, illetve egyes fajoknál csak az ivarérettség (vagy az átalakulást) követően alakul ki az ivarra következtetni engedő morfológiai bélyeg. A molekuláris szexálás viszont lehetővé teszi az élőlények genetikai ivarának megállapítását akár az egyedfejlődés korai stádiumaiban is. Az ilyen vizsgálatokra tervezett markerek ivarspecifikus régiókat amplifikálnak, amelyek lehetnek ivari kromoszómákon, de akár autoszómákon is. A genetikai ivardeterminációval rendelkező állatoknál, azaz azoknál az élőlényeknél, amelyek ivarának kialakításában csak és kizárólag a genetikai állományuknak van szerepe, a molekuláris szexálás megbízható módja az egyedek mind genotípusos, mind fenotípusos ivarának megállapítására [1].

A molekuláris szexálás alapjául az szolgál, hogy a különböző ivarú állatokban genetikai különbségek is felfedezhetőek. A legtöbb melegvérű állatban a heteromorf ivari kromoszómák közötti különbségeket használják ki a molekuláris szexálásra, emlősökben például azzal, hogy az Y kromoszómára terveznek markereket, így csak a hím egyedek adnak PCR terméket [2]. A fals pozitívak elkerülése érdekében ilyenkor egy autoszómán lévő gént is fel szoktak szaporítani [2]. A fals pozitívak kiszűrése érdekében további megoldás lehet úgynevezett gametológ szakaszokra molekuláris markert tervezni. Ezek olyan homológ szakaszok, amelyek szekvenciái ugyan hasonlóak a két ivarban, de nem teljesen megegyezők [3, 4]. Ilyen szekvenciák keresésére alkalmazható a RADseq (Restriktációs hely asszociált szekvenálás) [4], illetve GWAS (Teljesgenom-asszociációs vizsgálat) technológia [5], amennyiben az adott faj genomja még nem ismert. Amennyiben az adott faj genomja rendelkezésre áll, a RADseq vagy GWAS technológia elhagyható, és a kutatás a hasonló szekvenciák illesztésével kezdődik.

Molekuláris markerek tervezése során olyan szekvenciákat ideális keresni, amelyek gametológok, és van egy vagy több nagyobb méretű inszerció/deléción alapuló különbség közöttük. Ez azért fontos, mert így egy adott primerpár felszorzozhatja mindkét szekvenciát, amely a homokromatikus ivarban azonos hosszúságú PCR terméket eredményez, míg a két különböző ivari kromoszómával rendelkező ivarban két különböző PCR terméket ad. Az kapott PCR termékek közötti méretkülönbséget pedig gél elektroforézissel lehet vizualizálni [6].

Ha ilyen markerek nem tervezhetőek egy fajban, akkor kisebb, akár SNP szerű (1-2 nukleotid) különbségekre alapozva is lehet molekuláris szexálási módszert kifejleszteni. Ilyenkor viszont

bonyolultabb az analízis, ugyanis a gametológok között nincs méretbeli különbség. Több megoldás lehet ilyen esetben, például primer kötőhely tervezése pontosan a különböző részre, így csak az egyik ivar eredményez PCR terméket. Ilyen esetben viszont megnő a fals pozitív eredmények valószínűsége, ezért ez a megoldás nem ideális [7].

További megoldás viszont, primereket tervezni olyan módon, hogy az 1-2 nukleotidnyi szekvenciakülönbség a felsokszorozandó szakasznak nagyjából a közepén legyen megtalálható, majd egy restriktáz enzimet alkalmazni az egyik géntípus hasítására. Ennél a megoldásnál egy gélelektroforézis után hasonló képet kapunk az inszerciós/deléciós különbségeket tartalmazó markerhez [8].

Végül használható HRM analízis, azaz nagy felbontású olvadási görbe analízis, amely során az olvadáspontból lehet következtetni, hogy melyik változatát látjuk a szekvenciának. Ehhez az analízishez viszont qPCR szükséges [9].

Amennyiben nincs elkülönült ivari kromoszóma, a molekuláris szexálásra akkor is van lehetőség, ugyanis autoszómákon is lehetnek ivardetermináns régiók. Ezen ivardetermináns régiók a különböző ivarú állatok genetikai állományának összehasonlításával feltárhatóak [10]. Még gyakrabban előfordulhat, hogy vannak ivari kromoszómák, viszont ezek homomorfak. A molekuláris szexálás ilyen esetekben is lehetséges, a fent említett módszerekhez hasonlóan [11].

Ivardeterminációs rendszerek

A melegvérű (endotherm) gerincesek esetében az ivardetermináció genetikai alapú, és az ivardeterminációs rendszereket két nagy csoportba osztjuk az ivari kromoszómák morfológiája alapján: XY és ZW rendszereket különböztetünk meg. Fontos, hogy a hasonló morfológiájú ivari kromoszóma rendszerek ivardeterminációs mechanizmusa között is lehet különbség [12].

Az XY rendszerben a hímekben különböző (XY) míg a nőstényekben azonos (XX) morfológiájú ivari kromoszómák figyelhetők meg. Az XY ivari kromoszómák az emlősökre jellemzőek. Az ember esetében például az Y kromoszómán kódolt SRY gén felelős a hím fenotípus kialakításáért, így Y kromoszóma hiányában nőstény fenotípus fog kialakulni [13].

A ZW rendszer pont fordítva működik. Ebben a rendszerben az azonos morfológiájú (ZZ) ivari kromoszómák eredményeznek hím fenotípust, és a különbözőek (ZW) nőstényt. ZW ivari

kromoszómák tipikusan a madarakban, illetve poikilotherm gerincesekben megfigyelhetők [12, 14].

Az ivari kromoszómák kialakulása úgy történik, hogy egy homológ autoszóma pár valamelyikén egy random mutáció miatt megjelenik egy ivardetermináns gén, így kialakul egy homomorf proto-ivari kromoszóma. Ezen újonnan megjelent gén körül megjelenhetnek újabb ivardetermináns szerepű, vagy szexuálisan antagonisztikus gének, amelyek a homológ kromoszómák közötti rekombináció csökkenéséhez vezetnek [15, 16]. A rekombináció csökkenésének hátterében legvalószínűbben az újonnan kialakuló ivari kromoszómáknál megfigyelhető replikációs mintázat aszinkronitása, illetve egyéb epigenetikai kontroll állhat. Ez a rekombinációs gátlás, illetve az ez által felhalmozódó mutációk vezethetnek a kromoszómán lévő nem ivarhoz kötött gének degradációjához, és így alakulhat ki a méretbeli különbség a hím ivart determináló Y vagy a nőtény ivart eredményező W kromoszómán, amely különbség tovább erősíti a rekombinációs gátlást [15, 17]. A heteromorf ivari kromoszómák kialakulását eredményező változások lehetnek deléciók, transzlokációk, illetve pericentrikus inverzió is [18], továbbá felhalmozódhatnak ismétlődő elemek is a kromoszómán, amelyek akár (retro)transzpozon eredetűek is lehetnek. Mivel rekombinációs gátoltak az ivari kromoszómák, az újonnan kialakult ivardeterminációs rendszer nem tud egyszerűen megszűnni, ugyanis ezen kromoszómák sokkal kevésbé változékonyak.

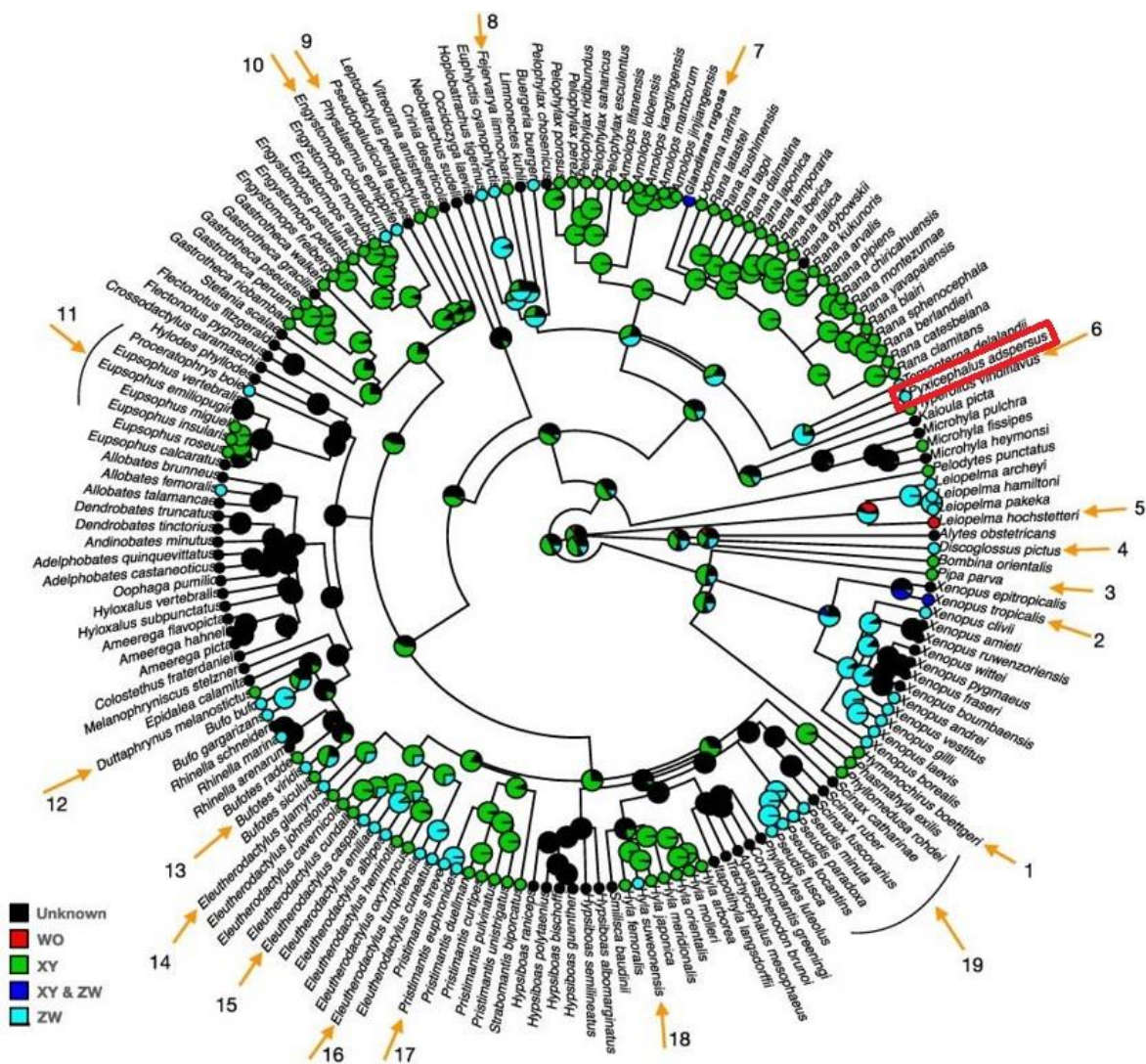
Az endotherm gerincesekben viszonylag egyszerű a molekuláris szexálás kifejlesztése, ugyanis mindig megfigyelhetők a fent említett ivari kromoszómák, így egyszerűen felfedezhetőek a szexáláshoz használható ivarspecifikus markerek.

Az ivardetermináció nem csak genetikai alapú lehet (GSD), mint az endotherm gerinceseknél, hanem lehet környezeti (ESD), illetve kevert rendszer is. A környezeti és a kevert ivardeterminációs rendszerek a poikilotherm (hidegvérű) gerincesekre jellemzőek, amely élőlényekben nincs agyi termoreguláció, illetve kültakarójuk még nem szigeteli el olyan mértékben a külső környezetet a belső környezettől, mint például az emlősöknél vagy a madaraknál [19–21].

Ivardeterminációs rendszerek kételtűekben

A poikilotherm gerincesekben (így a békákban is) az ivardetermináns régió nem olyan konzervált, mint az emlősökben vagy a madarakban. Ezeknél a fajoknál gyorsan változhat, hogy melyik lókuszt ivardetermináns, így közeli rokon fajok között is eltérhet az ivarmeghatározási rendszer [4].

Minden eddig vizsgált kétéltű fajnál kimutattak ivari kromoszómákat, vagy ivardetermináns régiót bizonyos autoszómákon, viszont ezeknél az állatoknál kevert ivardeterminációs rendszer is előfordulhat [20–22]. A kétéltűeknél megfigyelhetőek mind homomorf, mind heteromorf ivari kromoszómák, és az ivardeterminációs rendszer kifejezetten plasztikus, így szűkebb rendszertani kategóriákon belül is megfigyelhetőek különböző típusú ivardeterminációs rendszerek [14]. Egyes fajok esetében megfigyelték, hogy akár az adott faj két különböző populációjában eltérő (ZW és XY) ivari kromoszómarendszer is kialakulhatott (*Glandirana rugosa*, *Xenopus tropicalis*) (1. ábra) [14]. Az békák rendjére (Anura) jellemző a homomorf ivari kromoszómák jelenléte, ugyanis ez a taxon ~75%-ánál megfigyelhető. A homomorf ivari kromoszómák esetében a békáknál jellemzően XY rendszer megfigyelhető. A békák maradék ~25%-a rendelkezik csak heteromorf ivari kromoszómákkal, és ezen ~25%-ban nagyjából egyenlően oszlanak el a ZW és az XY rendszerek. A békák evolúciója során az eddigi kutatások szerint legalább 16-szor alakultak ki heteromorf ivari kromoszómák az ősinek tekintett homomorf állapotból. Ezen rendben megfigyelhető Y-autoszóma fúzió is, melynek során a az Y ivari kromoszóma egyesül egy autoszómával [14].



1.ábra: Az ábrán a különböző békafajok ivardeterminációs rendszerei megfigyelhetők. Pirossal jelöltük a kutatásunk alapjául szolgáló fajt [14].

A kevert ivardeterminációs rendszerekben általában van ivari kromoszóma, viszont valamilyen mechanizmus által a környezet is beleszólhat a fenotípusos ivar kialakításába [20, 21]. Ilyen kevert rendszerekben megfigyelhető ivarváltás is, ami a genotípusos és fenotípusos ivar eltérését jelenti [3]. A nem GSD állatokban az ivardeterminációt befolyásoló környezeti tényezők lehetnek a hőmérséklet (ezt a szakirodalomban sokszor TSD-nek rövidítik, mint “temperature-dependent sex determination”), szociális tényezők, vagy hormon- (illetve pszeudo hormon-) hatású vegyületek [23].

Vizsgált faj

Napjainkban a kétéltű-populációk egyedszámai több antropogén tényező hatására rohamosan csökkennek. Legfontosabb ilyen tényezők a városiasodásból eredő feldarabolódása az élőhelyeknek, a globális klímaváltozás, illetve az Ázsiából elterjedt kitridiomikózis fertőzés [24]. A kétéltűek jellegzetessége, hogy életük korai szakaszában, pete- és lárvállapotban vízben fejlődnek, majd az átalakulásukat követően szárazföldi életmódra térnek át. A farkatlan kétéltűek az extrém száraz sivatagokon és a sarkvidékeken kívül az egész világon megtalálhatóak, és mindenhol fontos elemei mind a vízi, mind a szárazföldi ökoszisztémáknak, fogyasztóként és prédaként egyaránt, így a fent említett tényezők nemcsak hazánkban jelentenek problémát, hanem a világ összes, kétéltűek által benépesített régiójában, így Dél-Afrikában is, ahonnan a hobbiállatként előszeretettel tartott afrikai ökörbéka (*Pyxicephalus adspersus*) is származik [25]. Ezen faj jelenleg az *International Union for Conservation of Nature (IUCN)* regionális listáján „Near Threatened (NT)”, azaz mérsékelten fenyegetett státuszban szerepel [46].

Az afrikai ökörbékát előszeretettel tartják többen hobbiállatként, ugyanis meghökkentő méretükkel sok ember érdeklődését felkeltik a világ egyik legnagyobb méretű békafajának hím egyedei, (2. ábra) [26]. A fajra jellemző ivari dimorfizmus a méretbeli különbség (Hímek: ~400-1000g, Nőstények: ~90-300g), illetve a hasi oldalon megfigyelhető színezetbeli különbség. A hímek jelentősen nagyobbra nőnek a nőstényeknél, és a színezetük a torok magasságában sárga, a nőstényekre jellemző krém szín helyett [27].



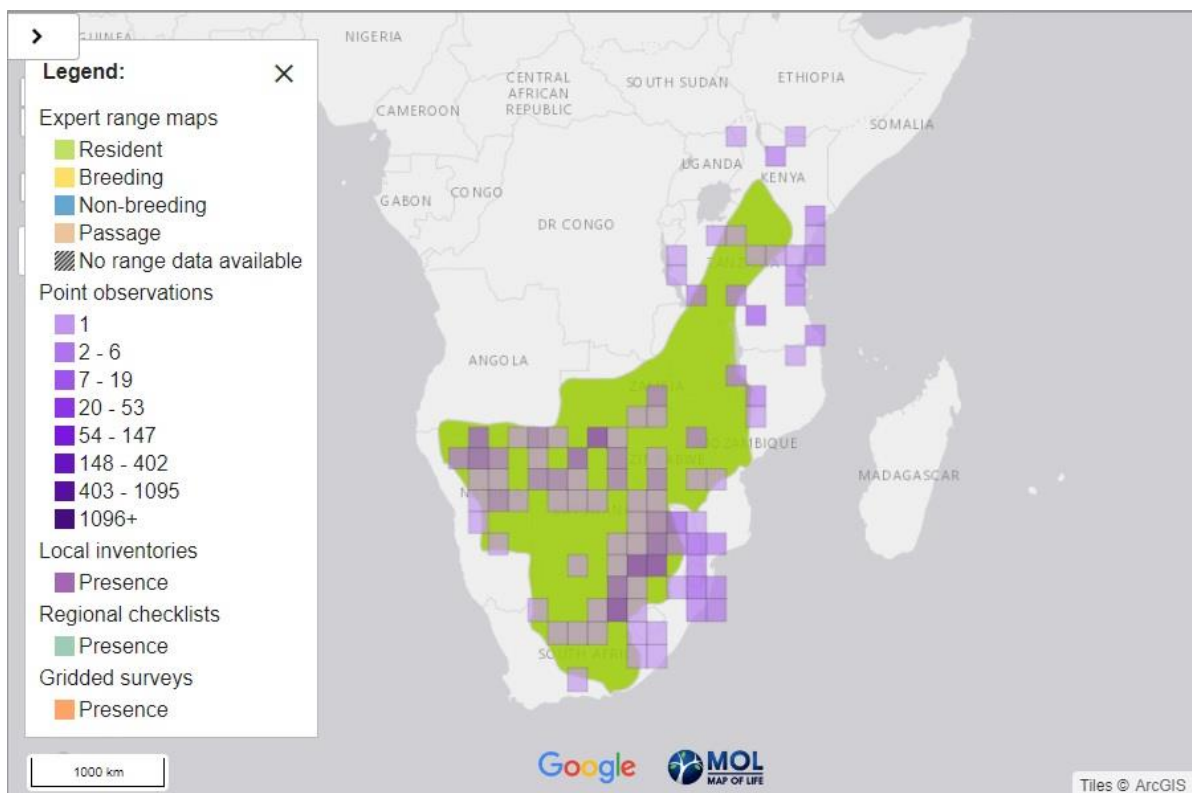
2.ábra: Az afrikai ökörbéka egy hím (jobbra) és egy nőstény (balra) egyede.

Az afrikai ökörbéka időszakos tavakban szaporodik, amelyek az esős évszakban vannak jelen, majd a száraz évszak alatt kiszáradnak. Az ebihalak a peterakás utáni pár hétben hatalmasat nőnek, és át is alakulnak juvenilis békákká. A békává alakulás több napos vagy akár egy-két hetes folyamat, aminek sebességét nagymértékben befolyásolja a víz hőmérséklete. Erre a gyorsaságra azért van szükség, mert az időszakos tavak gyorsan kiszáradnak. Ugyan az ebihalak túl tudnak élni egy közel kiszáradt pocsoltyában is azzal, hogy befúrják magukat a sárba, ilyen esetben a kezdetben lerakott peték nagyon kis százalékából lesz juvenilis béka [28, 29].

Szaporodási időszakon kívül a faj egyedei félszáraz régiókban megfigyelhetőek, és hosszú utakat tesznek meg a szaporodási helyek között. Leggyakrabban a homokos területeken

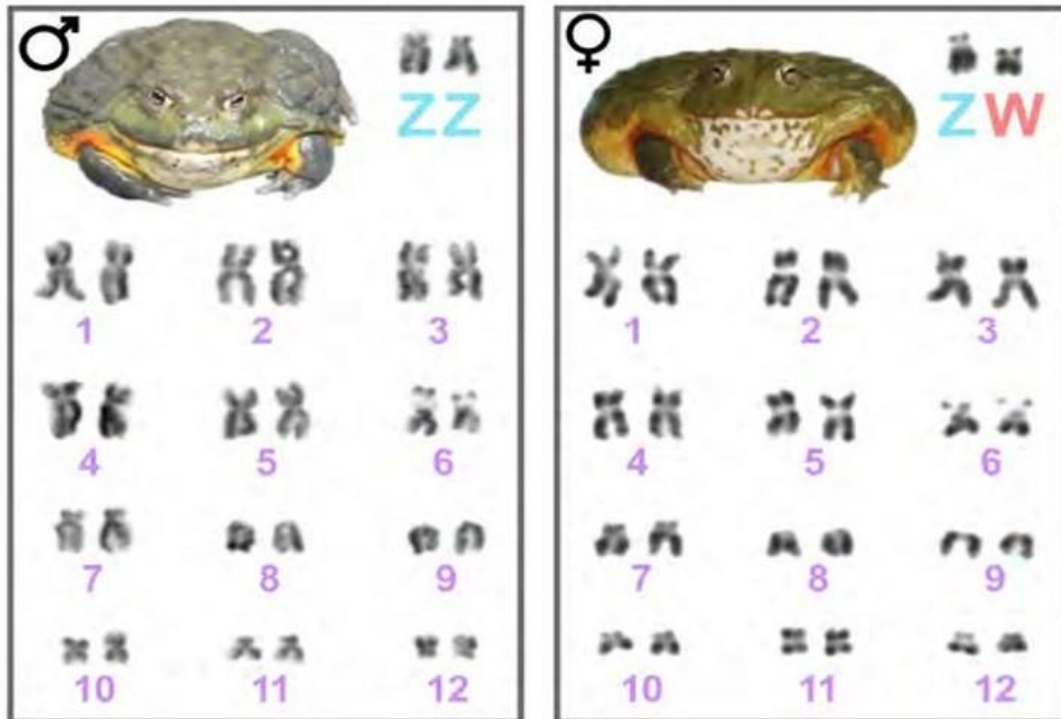
fedezhetőek fel, ugyanis itt tudják magukat könnyen beásni a föld alá a száraz évszak túlélése érdekében [30].

Ezen időszakos tavak, illetve félszáraz területek az urbanizáció hatására egyre kevésbé vannak jelen és amely élőhelyek meg is maradtak, azokban is jelentős a környezetszennyezés mértéke. Ezen felül a vizes élőhelyek nagyon fragmentáltakká váltak (3. ábra), ami a genetikai diverzitás csökkenéséhez vezet a faj természetes élőhelyein, például a dél-afrikai Guateng tartományban [27, 28]. A faj megőrzése érdekében kulcsfontosságú a szaporodási viselkedés megismerése, és a fajra jellemző ivardeterminációs mechanizmus megértése.



3. ábra: Az ábrán az afrikai ökörbéka elterjedési területe látszik (AmphibiaWeb)

Az afrikai ökörbéka heteromorf, ZZ/ZW rendszerű ivari kromoszómákkal rendelkezik, amelyek mérete jelentősen különbözik (Z:~19.5MB, W:~101.9MB) (4. ábra) de genetikai ivarmeghatározásra még nincs kifejlesztve egyszerű és olcsó eljárás, így arról sincs információ, hogy ennél a fajnál megfigyelhető-e ivarváltás.



4. ábra: Az ábrán az afrikai ökörbéka kromoszómái láthatóak [22]

A kutatás jelentősége

Az egyszerű genetikai alapú szexálás lehetővé teszi az ivarváltás kutatását, illetve egyéb konzervációbiológiai kutatásokban is hasznosnak bizonyulhat. A molekuláris ivarmarkerek fejlesztésére eddig kevés kétéltű faj esetében került sor, ugyanis mint ahogy már fent említésre került, ezekben a fajokban az ivardetermináció kifejezetten variábilis, így a molekuláris szexálást lehetővé tevő ivarmarkerek sok esetben csak egy adott génuszon, sőt esetleg csak adott fajon belül működnek, és minden vizsgálni kívánt fajra specifikus markert kell fejleszteni.

A hobbiállat-tenyésztők számára is felhasználható a genetikai marker ivarmeghatározásra. Ez utóbbi alkalmazás azért is lehet fontos, mert a vásárlók körében a hím egyedek, nagyobb méretük miatt, sokkal kelendőbbek a nőstényeknél, viszont az ivari dimorfizmus csak az állatok másfél, két éves korára, azaz az ivarérettséget követően alakul ki. A molekuláris markerekkel az egyedfejlődés korai szakaszában is megállapítható az állatok genetikai ivara, így elkerülhető, hogy a tenyésztők olyan egyedekbe is energiát fektessenek, amelyeket később potenciálisan képtelenek volnának értékesíteni.

Célkitűzés

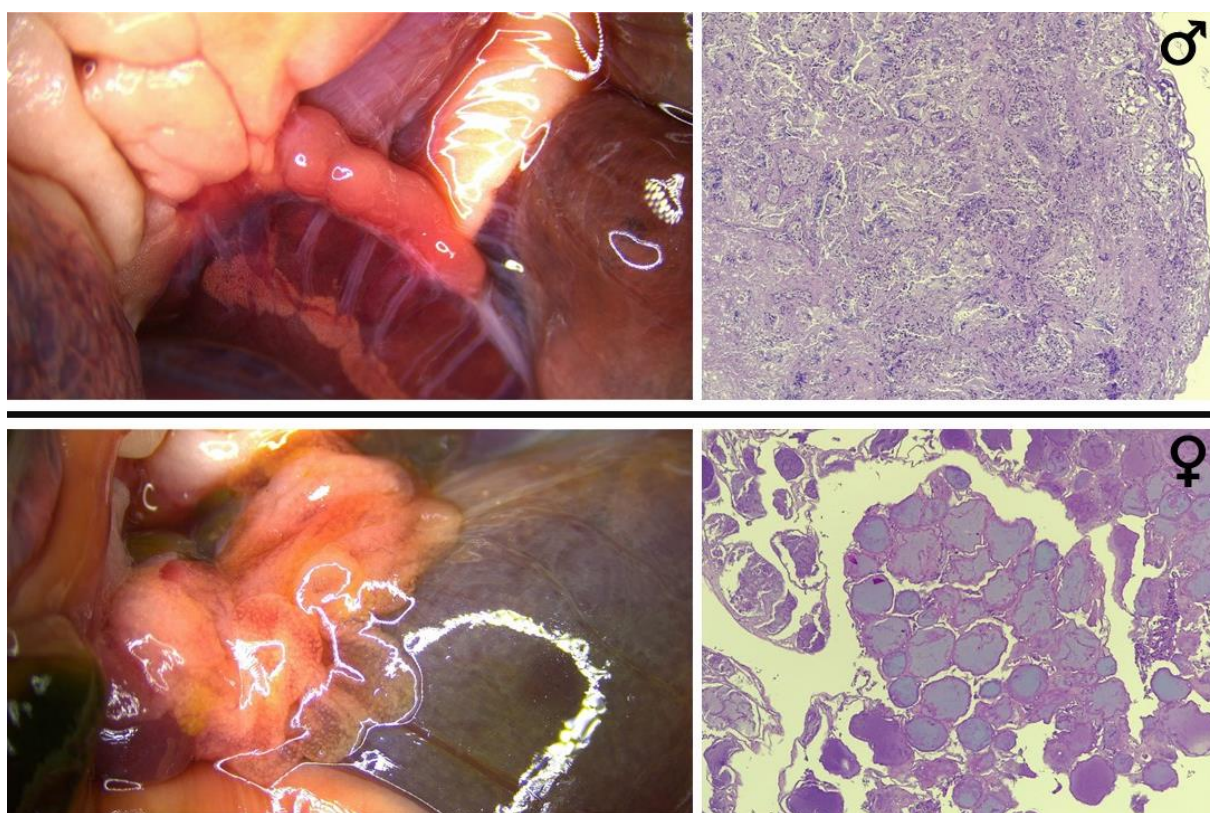
Kutatásunk során egy olcsó és egyszerűen használható PCR-alapú markerkészletet fejlesztettünk, azzal a céllal, hogy:

- Az afrikai ökörbékával foglalkozó hobbiállat-tartók és tenyésztők felhasználhassák a markerkészletet a fogságban tenyésztett állatok korai ivarmeghatározására.
- A markerek konzervációbiológiai, illetve egyéb alapkutatásokban használhatóak legyenek például ivararány és annak változásának vizsgálatára bizonyos populációkban.
- A fajban az ivarváltás kutatását segítsük a genetikai ivar biztos megállapításának lehetősége révén.

Anyag és módszer:

Mintagyűjtés

A markerfejlesztéshez az afrikai ökörbéka DNS mintákat, tenyésztőktől származó, 12 nőstény ivarú és 14 hím állatból izoláltuk, amelyeket az Állatorvostudományi Egyetem Egzotikusállat- és Vadegészségügyi tanszéke biztosított számunkra. Az izolálást 7 elhullott állat izomszövetéből, valamint 20 vérmintából végeztük. Minden mintát ivarérett álatokból vontunk ki, amelyek fenotípusos ivarát boncolással, illetve szövettani vizsgálat alapján állapítottuk meg (5. ábra). A DNS kivonáshoz használt szöveteket a felhasználásig 96%-os etanolban tároltuk.



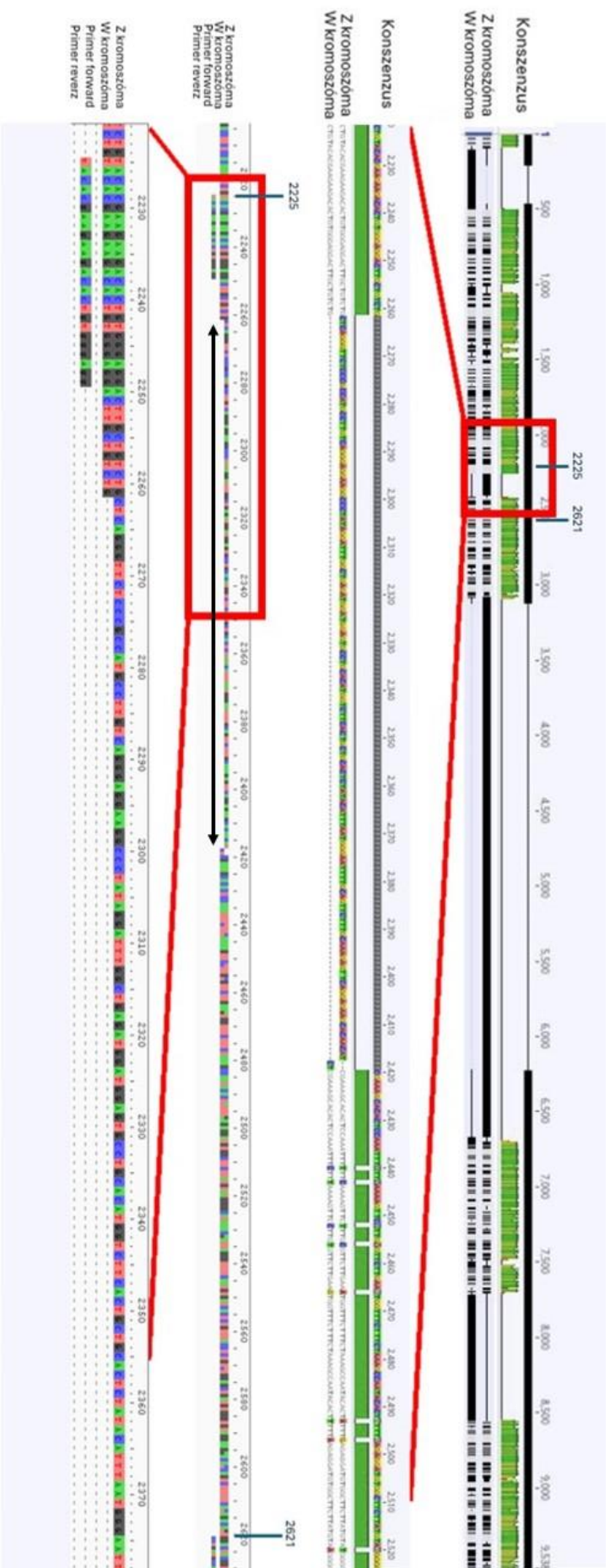
5. ábra: Szövettani metszetek és fotók a boncolásról, amelyek alapján az egyedek ivarát megállapítottuk. Az ivarokat piktogramokkal jelöltük.

A fent említett mintákon kívül noninvazív mintavételt is végeztünk. Ez azért is volt fontos, mert ezen módszer használatára több tenyésztő hajlandó, mint a kockázatos és bonyolult vérvételre. Így feltételezhető, hogy a kész markereket is többen fogják használni, illetve több mintán tudjuk tesztelni a fejlesztett markereket. A noninvazív mintavételhez száj- és kloákatamponokat használtunk, két hím és két nőstény ökörbékán. Ezeket a mintákat ivarérett, fenotípusosan szexált egyedektől vettük.

Markerfejlesztés

A markerfejlesztés alapjául az NCBI (*National Center for Biotechnological Information*) adatbázisba feltöltött GCA_004786255.1 azonosítójú *Pyxicephalus adspersus* genomot használtuk, amelyet Illumina HiSeq X platformon szekvenáltak 2019-ben, az University of Connecticut munkatársai. Ez a genom kromoszómára-szerelt, ami azt jelenti, hogy a teljes DNS állomány kromoszómákra van bontva, de a genomban található elemek, mint a gének, a szabályozó régiók, és egyéb strukturális elemek pozíciója még nincs, vagy csak kevésbé van feltérképezve [31]. Így külön fájlként megtalálhatóak és letölthetőek a kromoszómák szekvenciái. A 12 pár autoszóma 12 külön fájlként, míg a heteromorf ivari kromoszómák további 2 fájlként vannak feltöltve az adatbázisba. A fejlesztés első szakaszában csak a két ivari kromoszómát illesztettük össze, majd a primer tervezésnél használtuk a többi kromoszómát is.

Az ivari kromoszómák globális illesztéséhez a Geneious Prime (v24.0.5) program Mauve eszközt használtuk [32]. A globális illesztés lényege, hogy a szekvenciák teljes hosszában történik az illesztés. A Mauve eszköz rövidebb szakaszokra darabolja az illesztett kromoszómákat a lokálisan egyező blokkok (LCB) szerint, így összesen 168 mindkét ivarban megtalálható DNS szakaszt (*contig*) kaptunk, amelyekben a potenciális markereket kerestük. Az illesztett szakaszokon olyan 300-600 bázis hosszú szekvenciákat kerestünk, amelyekben megfigyelhetőek teljesen azonos szekvenciák is, viszont ezen egyező szakaszok közötti részen jelentős (~80-150 bázis hosszú) méretbeli (inszerció/delécio) különbségek is megfigyelhetőek (6. ábra). Így az egyező szakaszokhoz bekötő primerek különböző méretű PCR termékeket eredményeznek a két kromoszómán, amelyek egy egyszerű gélelektroforézissel is alkalmasak a genotípusos ivar megállapítására.



6. ábra: A felső két sorban a Geneious Prime program által illesztett Z és W szekvenciák figyelhetőek meg egy távoli (felső) és egy közeli (alsó) nagyításban. Az alsó két sorban az adott lokuszra tervezett primerek láthatóak a az illesztett Z és W kromoszóma- szakaszokkal, két különböző nagyításban, az AliView programmal megjelenítve. Fekete nyíllal jelöltük a kromoszómák közötti deléciók különbséget.

Diagnosztikus primerek tervezése

A primerek tervezését az *NCBI* primer tervező eszközének (Primer-BLAST) segítségével, illetve manuálisan végeztük. A primertervezés során a több szempontot vettünk figyelembe, mint a 18-25 bázis közötti méretet; 55°C és 65°C közötti olvadáspontot, de a primerpárok olvadáspontja között ne legyen több, mint 5°C eltérés; 40% és 60% közötti GC arányt; és hogy rövid szekvenciák ne ismétlődjenek sokszor a tervezett primerben (pl.: AAAAA, ATATAT)

Azokra a lókuszokra, ahol az agaróz gélen is jól detektálható méretű inszerciós/deléciós különbségeket találtunk, olyan primereket terveztünk, amelyek az Z és a W kromoszómák megegyező szakaszaihoz egyaránt kötődnek. A primertervezés fontos része ellenőrizni, hogy a primerek nem kötnek-e be a faj genomjában a tervezett helyen kívül más lókuszokra is. Ennek ellenőrzéséhez a Geneious programon belül egy BLAST algoritmust használtuk, amelynek célja, hogy lokálisan illesztené a primereket a testi kromoszómákra, amennyiben ezekben megtalálhatóak a primerek szekvenciái. Az ellenőrzés után 8 primerpárt találtunk alkalmasnak további tesztelésre.

A PCR-eket Life ECO TC-96/G/H(b)C (Bioer) gépen végeztük. A PCR-elegyeket 10µl végtérfogatban készítettük, amelyek 2µl FIREPol Master Mix (5x, Solis BioDyne) -et, 1-1µl primer-t és 3µl vizet és 3µl DNS kivonatost tartalmaztak. A primerek teszteléséhez gradiens PCR-t alkalmaztunk. A PCR hőprofilja egy 2 perces 94°C-os denaturációval kezdődött, majd 35 cikluson keresztül a denaturálási hőmérséklet minden mintánál 94°C-volt, majd az bekötési („annealing”) hőmérséklet egy gradiens mentén 55°C-tól 65°C-ig, 1°C-onként változva volt beállítva, majd a láncok meghosszabbítása alatti hőmérséklet univerzálisan 72°C volt, és a 35 ciklus lefutását követően is ezen a hőfokon tartottuk a mintákat további 5 percig.

A megfelelően működő primerpárok által felsokszorozított PCR-termékeket az agaróz gélből kitisztítottuk, majd Sanger-módszerrel szekvenáltuk, hogy ellenőrizzük a saját minták és az adatbázisba feltöltött szekvencia egyezését. A Sanger szekvenálást a BIOMI Biotechnológiai Szolgáltató Kft. (Gödöllő) végezte ABI 3500xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) automata DNS-szekvenátorral. A saját mintákból felszaporított és megszekvenált régiókat a Staden Package és a MEGA szoftver [33, 34] segítségével illesztettük a Mauve eszköz által talált ivari kromoszóma-régiókra. Erre azért volt szükség, mert az adatbázisból letöltött szekvenciák egy egyedből származtak, így ellenőriznünk kellett, hogy a faj más egyedeiben is működnek-e a tervezett markerek.

A markerek tesztelése

A fejlesztett markereket a fent említett, 14 hím és 12 nőstény egyeden teszteltük, amelyek genomi DNS-ének kivonását Omega E.Z.N.A. Tissue DNA Kit-el végeztük a gyártó utasításai szerint. A protokolltól csak az emésztési időben térünk el, ugyanis egész éjszaka hagytuk a mintákat emésztődni. A tisztított DNS feloldásához 100 μ l eluáló puffert használtunk.

A markerek teszteléséhez, az ideális bekötési hőmérséklet megállapítása után, a továbbiakban a bekötési hőmérsékletet 61°C-ra állítottuk. Így az összes marker esetében a használt PCR hőprofil egy 3 perces 95°C-os denaturációval kezdődött, majd 35 ciklus 30 másodperces denaturáció következett 95°C-on, majd 30 másodperc 61°C-os bekötési hőmérsékleten, és 40 másodperc elongáció 72°C-on, végül a 35 ciklust követően egy 10 perces elongációs szakasszal fejeztük be a reakciót 72°C-on.

A PCR termékeket 45 percig futtattuk 2%-os agaróz gélen, 1%-os TAE pufferben, 100V-on a méret szerinti elkülönítés érdekében. A használt FIREPol Master Mix előre tartalmazza a gélre töltéshez szükséges festékanyagokat, illetve a sűrűséget növelő anyagot, így a PCR után nem adtunk külön Loading Dye-t a mintákhoz.

A tesztek „vakon” is elvégeztük, azaz más ember választotta a tesztelendő mintákat, és más végezte a tesztet, így a PCR reakciót és a gél elektroforézist végző ember nem tudta a tesztelt mintákhoz tartozó állatok ivarát, így csak a tesztre hagyatkozott a genetikai ivar megállapításában.

A fejlesztett markereket a noninvazív mintavétellel gyűjtött mintákon is leteszteltük. A tesztelés során a tamponokból DNS-t vontunk ki, majd a mintákat a fent említett módon teszteltük a fejlesztett markerek segítségével.

Eredmények:

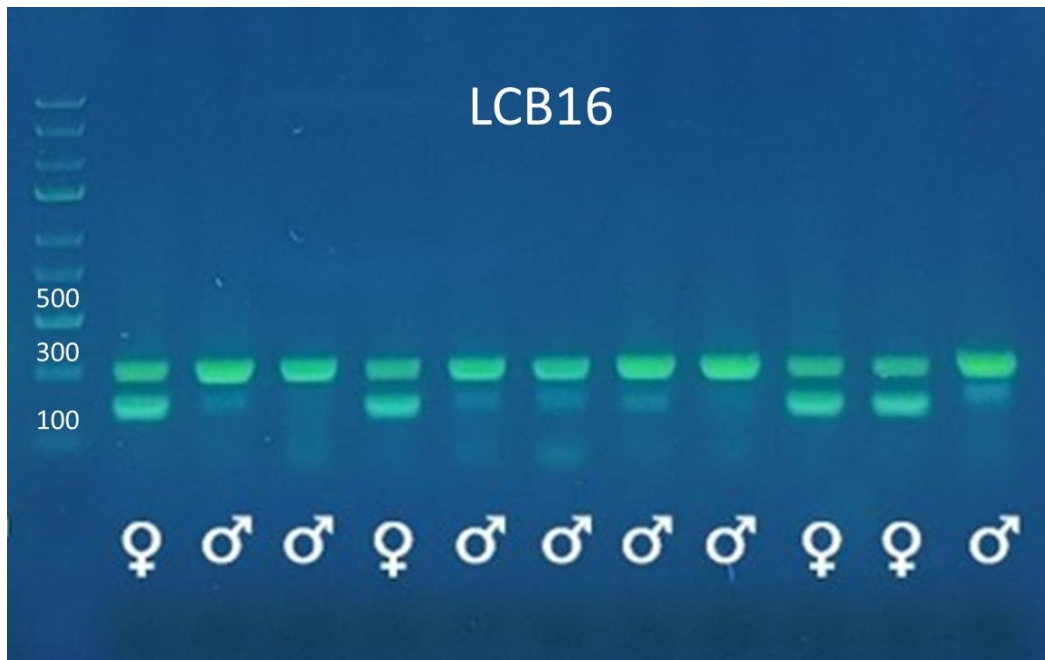
Markerfejlesztés és -tesztelés

A 168 gametológból négy markert találtunk ivar-meghatározásra alkalmasnak, amelyek a várt mérettartományba eső, méret alapján egyértelműen elkülöníthető terméket adnak. Ezeket LCB 16, LCB 59, LCB 78 és LCB 84 néven kódoltuk. A tervezett genetikai ivarmarkerek ~300-450 bázis hosszúságú DNS szekvenciákat szaporítanak fel, amelyekben az ivari kromoszómák közötti inszerciós/deléciós méretkülönbségek ~90-150 bázis hosszúságúak (1. táblázat)

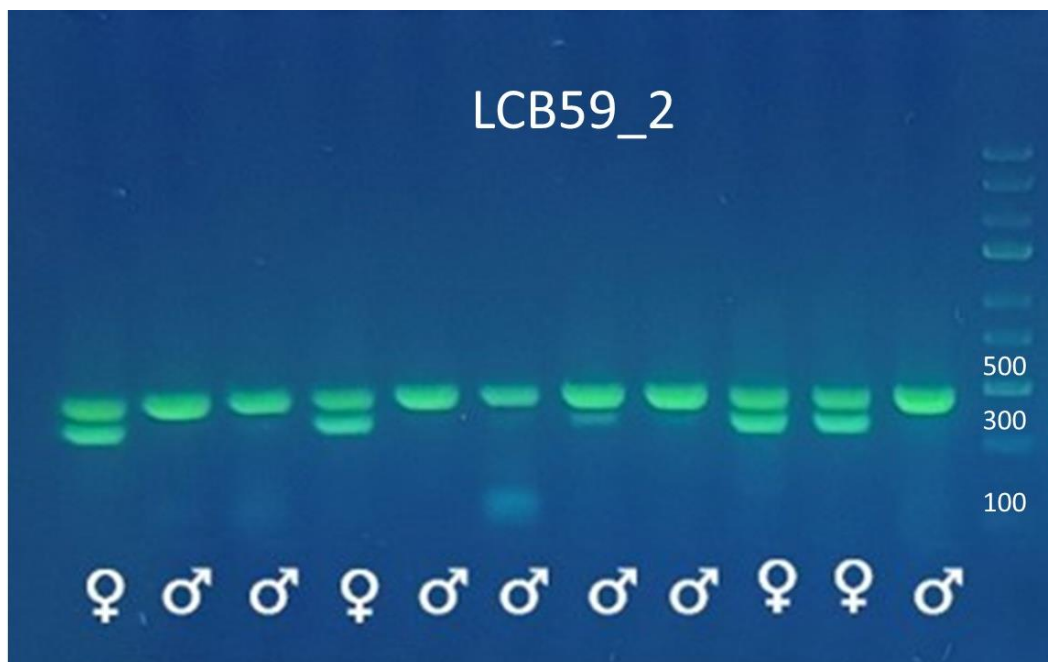
Contig	Primer	Primer szekvencia (5' -> 3')	Termék (bp)	IN/DEL (bp)	Tm (°C)	GC%	Self complementarity	3' self complementarity
LCB16	LCB16_F	cgtatgtggaggaacccaggtg	Z=312	116	63	59	nincs	nincs
	LCB16_R	agcattaccctacatctgcccc	W=195		60	52		nincs
LCB59	LCB59_2_F	gtgtcacagcgcggtacaaaagta	Z=445	100	69	50	nincs	nincs
	LCB59_2_R	atctgttgacagatgtggatgagtg	W=354		69	46		nincs
LCB78	LCB78_F	cagctgaaagtcaaacacagcagc	Z=435	89	69	50	nincs	nincs
	LCB78_R	gaattgtacaggtgagccttgca	W=346		67	48		nincs
LCB84	LCB84_F	tacacgaagaagacactgtgggagg	Z=419	156	69	52	nincs	nincs
	LCB84_R	gcgctagctacaagaaccgtagtc	W=265		69	56		nincs

1. táblázat: A négy ivarmeghatározásra alkalmasnak talált markerhez tervezett primerpár adatai.

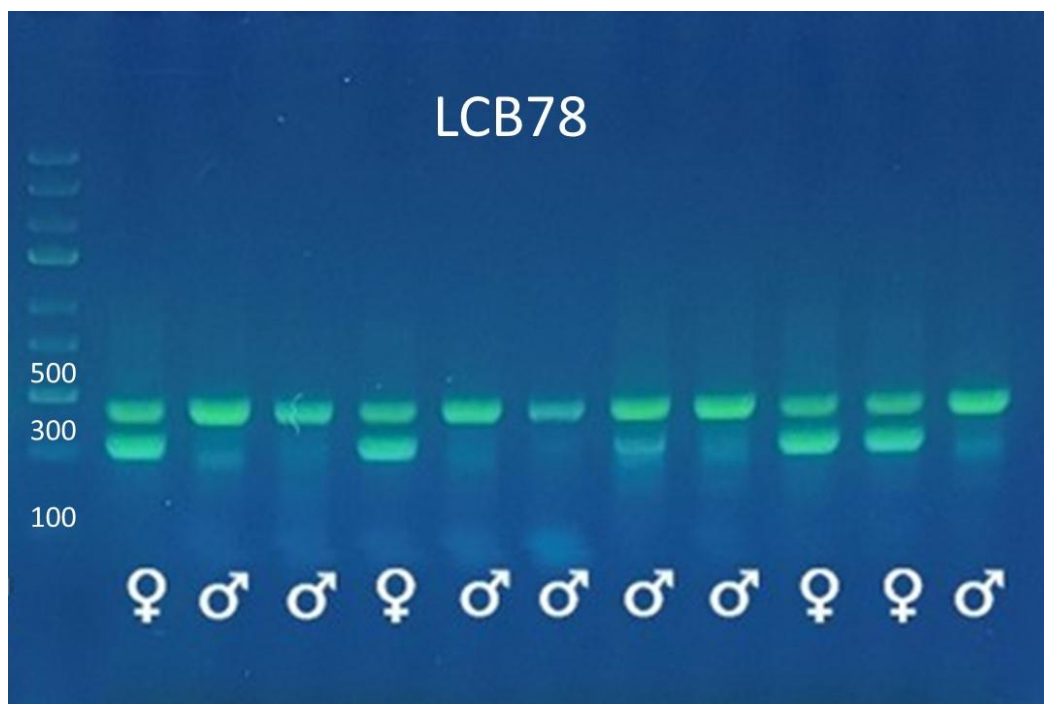
A PCR tesztek segítségével megállapított genetikai ivar mind a négy marker esetében megegyezett a korábban morfológia és szövettan alapján megállapított fenotípusos ivarral, így kijelenthetjük, hogy a fejlesztett markerek ivari kötődése 100%-os (7-10. ábra).



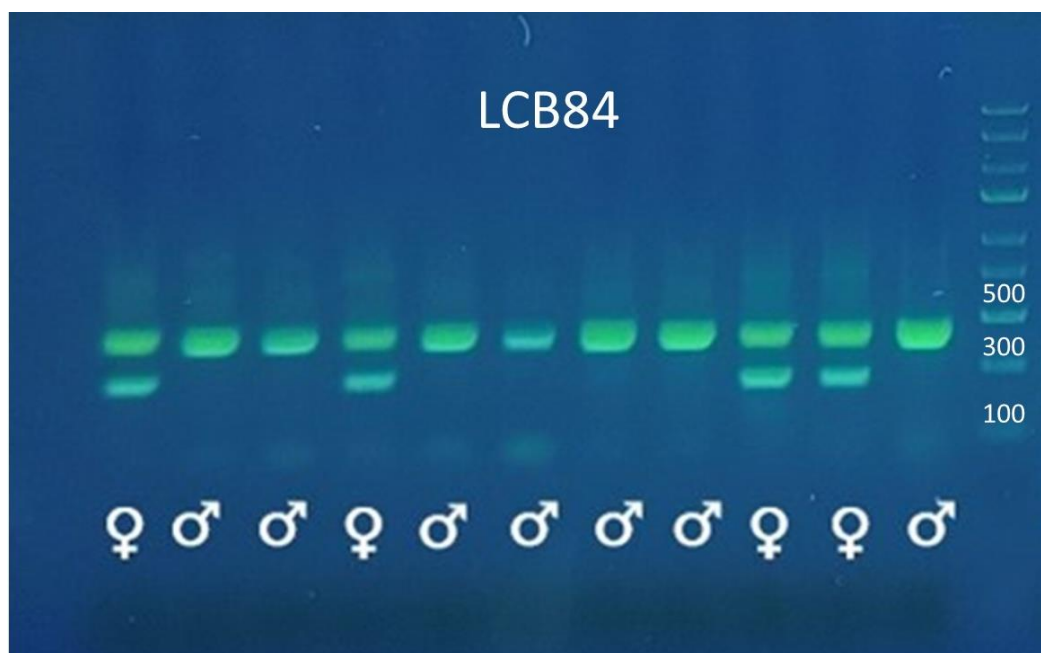
7 ábra: Az LCB16 marker futásai 2% agaróz gélen. Amennyiben két különböző csíkot látunk a gélen, az adott egyed két különböző ivari kromoszómával rendelkezik, azaz nőstény. Ha csak egy csík látható a gélen, akkor az adott egyed hím ivarú. A W kromoszómáról szaporított termék minden markerben rövidebb, mint a Z gametológ. Az ivarokat a megfelelő piktogrammal jelöltük a gélen futott PCR termékek alatt.



8 ábra: Az LCB59_2 marker futásai 2% agaróz gélen.



9 ábra: Az LCB78 marker futásai 2% agaróz gélen.



10 ábra: Az LCB84 marker futásai 2% agaróz gélen.

A gélből kivágott és megszekvenált amplikonok szekvenciáinak illesztése során nem találtunk eltérést az NCBI adatbázisból letöltött referenciagenomhoz képest egyik PCR termék esetében sem (11-14. ábra), így megbizonyosodhatunk arról, hogy a tervezett primerek a megfelelő szakaszokat sokszorozzák meg, és nem műterméket figyeltünk meg a gélen.

```

      I      *      20      *      40      *      60      *      80
primers      : CGTATGTGGAGGAACCCAGGTG----- : 22
CM016428_Z   : CGTATGTGGAGGAACCCAGGTGGAGACCATTGTATAGCCTGCTGGTAAGACCTTAGCTGTGGTCTTTGTTCTTATGGAGG : 80
07male_Z     : CGTATGTGGAGGAACCCAGGTGGAGACCATTGTATAGCCTGCTGGTAAGACCTTAGCTGTGGTCTTTGTTCTTATGGAGG : 80
CM016429_W   : CATATGTGGAGGAACCCAGGTGCAGACCATTGTATAGCCTGCTGGTAAACCTTAGCTTTGGTCTTTGTTCTTATGAAGG : 80
14female_W   : CGTATGTGGAGGAACCCAGGTGCAGACCATTGTATAGCCTGCTGGTAAACCTTAGCTTTGGTCTTTGTTCTTATGAAGG : 80

      *      100      *      120      *      140      *      160
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : CCACAGTTGGACTCAGTGCACCAAAATTTGGCCCAATAGTATGACTGGTGATTGGTTTAAACAACCATCAACTTCTTCTC : 160
07male_Z     : CCACAGTTGGACTCAGTGCACCAAAATTTGGCCCAATAGTATGACTGGTGATTGGTTTAAACAACCATCAACTTCTTCTC : 160
CM016429_W   : CCACAGAAAGAATCCATGCACCAAAATCTACCCAATAGTATGGCTGGTG----- : 130
14female_W   : CCACAGAAAGAATCCATGCACCAAAATCTACCCAATAGTATGGCTGGTG----- : 130

      *      180      *      200      *      220      *      240
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : CATCTTGGGACTTCTGTATACCTGGAAGTCTGCTTCCCAAGTCTGCTTACCATTGTAGAGTCTTCCATAATATGCAAAAAG : 240
07male_Z     : CATCTTGGGACTTCTGTATACCTGGAAGTCTGCTTCCCAAGTCTGCTTACCATTGTAGAGTCTTCCATAATATGCAAAAAG : 240
CM016429_W   : -----AAAAAG : 136
14female_W   : -----AAAAAG : 136

      *      260      *      280      *      300      *
primers      : -----GGGCAGATGTAGGGTAATGCT : 43
CM016428_Z   : CAGAAATGGAAGCAGAACTCCTATATCTGGCTTTTACAGTTGTCCAAGGGTAGGGCAGATGTAGGGTAATGCT : 312
07male_Z     : CAGAAATGGAAGCAGAACTCCTATATCTGGCTTTTACAGTTGTCCAAGGGTAGGGCAGATGTAGGGTAATGCT : 312
CM016429_W   : CAGCAATGG-AGCAGGACTCCTAGATCTGGCTTTT-GT-----GTAGGGCAGATGTAGGGCAATGCT : 196
14female_W   : CAGCAATGG-AGCAGGACTCCTAGATCTGGCTTTT-GT-----GTAGGGCAGATGTAGGGTAATGCT : 196

```

11. ábra: Az LCB16 marker illesztései a GeneDoc szoftverben megjelenítve [35]. A gélből kivágott és megszekvenált minták (07-es hím egyed Z kromoszómája és 14-es nőtény egyed W kromoszómája) és az adatbázisból letöltött referencia-kromoszómák, valamint a tervezett primerek láthatóak. Az IN/DEL szakaszokat sárga színnel emeltük ki.

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *
primers      : GTGTCACAGCGCGTACCAAAAGTA----- : 24
CM016428_Z   : GTGTCACAGCGCGTACCAAAAGTAATAATGGACAGTCACCAACAGTCAGACAGTCGCGGTCTCTGGGTGGCTGTTGCCTATTGGAAGATCT : 90
07_male_Z    : GTGTCACnnnnnGTACCAAAAGTAATAATGGACAGTCACCAACAGTCAGACAGTCGCGGTCTCTGGGTGGCTGTTGCCTATTGGAAGATCT : 90
CM016429_W   : GTGTCACAGCGCGTACCAAAAGTAATAATGGGCAATCGCCAACC-----TGTTCGAGTTTCTGGGTGGTTGTTGCACGTTGGAGGTTCT : 83
14_femal_W   : gTGTTCACAGCGCGTACCAAAAGTAATAATGGGCAATCGCCAACC-----TGTTCGAGTTTCTGGGTGGTTGTTGCACGTTGGAGGTTCT : 83

      100          *          120          *          140          *          160          *          180
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : TCAATGAAATGGCAAGTAAAGCTTACTGAGAGCAGTATATATGGAGCAACAAAACACAATACAGTGTAGTGGGCTTGAAACTGCATATC : 180
07_male_Z    : TCAATGAAATGGCAAGTAAAGCTTACTGAGAGCAGTATATATGGAGCAACAAAACACAATACAGTGTAGTGGGCTTGAAACTGCATATC : 180
CM016429_W   : TCAATGAGATG-----GAGAGCACATGACTACATTTC : 115
14_femal_W   : TCAATGAGATG-----GAGAGCACATGACTACATTTC : 115

      *          200          *          220          *          240          *          260          *
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : TAGCTCTCTAAAAATTGACACAGAGCTACAAATCACTCCTTCGTGATCCACAATTGGCTCCTGGACTAACTGATCCATGGGCTGTGGGT : 270
07_male_Z    : TAGCTCTCTAAAAATTGACACAGAGCTACAAATCACTCCTTCGTGATCCACAATTGGCTCCTGGACTAACTGATCCATGGGCTGTGGGT : 270
CM016429_W   : CAGTCTCTTAATAACTGACACCAGACTATAAATCACTCCTTTATCATCCGCAAGTTGCTGCTG-----AATTAAGTGTGGGT : 192
14_femal_W   : CAGTCTCTTAATAACTGACACCAGACTATAAATCACTCCTTTATCATCCGCAAGTTGCTGCTG-----AATTAAGTGTGGGT : 192

      280          *          300          *          320          *          340          *          360
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : GGAAGCCGTGGTGGCTGTGTGGCCTCCGGCTTCTCTGCTTTGTGCATGATCTCCCATCCTCAGACAGATGGAACCCCTTCTGACATGCG : 360
07_male_Z    : GGAAGCCGTGGTGGCTGTGTGGCCTCCGGCTTCTCTGCTTTGTGCATGATCTCCCATCCTCAGACAGATGGAACCCCTTCTGACATGCG : 360
CM016429_W   : GGAAGCTGTG-----TGGCCTCTGTCTTCTCCACTTTATCATGATCTCTCATCCTCAAACAGACAGAAACCCCTCTGAAACCCA : 273
14_femal_W   : GGAAGCTGTG-----TGGCCTCTGTCTTCTCCACTTTATCATGATCTCTCATCCTCAAACAGACAGAAACCCCTCTGAAACCCA : 273

      *          380          *          400          *          420          *          440
primers      : -----GCACTCATCCACATCTGTCAACAGAT : 50
CM016428_Z   : CAATGGAAGCTGCCAGCGGTGTTCAACATGTATGTGCACAGTGATGACTTCCTGTTGTGCACTCATCCACATCTGTCAACAGAT : 445
07_male_Z    : CAATGGAAGCTGCCAGCGGTGTTCAACATGTATGTGCACAGTGATGACTTCCTGTTGTGCACTCATCCACATCTGTCAACAGat : 445
CM016429_W   : CAATGGAAGCTGCCAGCAATGTTCAACAG-----TGTGCACAGTGATGGCTTACCGTTGTGCACTTATCTACATCTGTCAACAGAT : 354
14_femal_W   : CAATGGAAGCTGCCAGCAATGTTCAACAG-----TGTGCACAGTGATGGCTTACCGTTGTGCACTCATCCACATCTGTCAACAGat : 354

```

12. ábra: Az LCB59 marker illesztései a GeneDoc szoftverben megjelenítve [35]. A gélből kivágott és megszekvenált minták (07-es hím egyed Z kromoszómája és 14-es nőtény egyed W kromoszómája) és az adatbázisból letöltött referencia-kromoszómák, valamint a tervezett primerek láthatóak. Az IN/DEL szakaszokat sárga színnel emeltük ki.

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *
primers      : AGCTGAAAGTCAAAACACAGCAGC----- : 23
CM016428_Z   : AGCTGAAAGTCAAAACACAGCAGCCTTCTTGACAGCCCTTAGTTAAGCAAAGATATGGCTTATTTAGTAACTAATCTATGCAGTGCAGCA : 90
07male_Z     : AGnTGAAAGTCAAAACACAGCAGCCTTCTTGACAGCCCTTAGTTAAGCAAAGATATGGCTTATTTAGTAACTAATCTATGCAGTGCAGCA : 90
CM016429_W   : AGCTGAAAGTCAAAACACAGCAGCTGTATTGACAGCCATTATTTAAGCAAATATATGGTTTATTTAGTAAAGCTAGTGTATGCAGTGCAGCA : 90
14femal_W    : AGCTGAAAGTCAAAACACAGCAGCTGTATTGACAGCCATTATTTAAGCAAATATATGGTTTATTTAGTAAAGCTAGTGTATGCAGTGCAGCA : 90

      100          *          120          *          140          *          160          *          180
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : AGCTGTATCAACAAACC-----GTTTAATTCATTTTGTTCATTTTCAGTAATCTGCTTCCAACAACTAAAAATATGATTGGTTGCTTTGG : 174
07male_Z     : AGCTGTATCAACAAACC-----GTTTAATTCATTTTGTTCATTTTCAGTAATCTGCTTCCAACAACTAAAAATATGATTGGTTGCTTTGG : 174
CM016429_W   : AGCTGTATCAACAAATATTGTTAATTTAATTATTTTGTTAATAACAGTGAGCTGCTTCCACTTAACCTAAAAATCTAATTGGTTGCTTTGG : 180
14femal_W    : AGCTGTATCAACAAATATTGTTAATTTAATTATTTTGTTAATAACAGTGAGCTGCTTCCACTTAACCTAAAAATCTAATTGGTTGCTTTGG : 180

      *          200          *          220          *          240          *          260          *
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : -AACCCCCCATAAATCTGGTCACACACAGTTTGATTTTGTTCGATTTCACTTTTGTATTACCATTTTTTACAATGGTGTGATAGTTA : 263
07male_Z     : -AACCCCCCATAAATCTGGTCACACACAGTTTGATTTTGTTCGATTTCACTTTTGTATTACCATTTTTTACAATGGTGTGATAGTTA : 263
CM016429_W   : GATACCCCCATACATCTGGTCACACACAGCTTGATTTTGTTCAGATTTCA----- : 231
14femal_W    : GATACCCCCATACATCTGGTCACACACAGCTTGATTTTGTTCAGATTTCA----- : 231

      280          *          300          *          320          *          340          *          360
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : AAAAGAATACCTTTACAAATCCTAAATGATATCCAGAAAAGGCAGAGCCAAACACAGTACAGTTGGTGGTAAAAAGTTAAAAAAATGTT : 353
07male_Z     : AAAAGAATACCTTTACAAATCCTAAATGATATCCAGAAAAGGCAGAGCCAAACACAGTACAGTTGGTGGTAAAAAGTTAAAAAAATGTT : 353
CM016429_W   : ----- : -
14femal_W    : ----- : -

      *          380          *          400          *          420          *          440
primers      : -----TGCAAGGCTCACCTGTACAATTC : 46
CM016428_Z   : AAATTTGTGTGTCGAATGATCGACTTGTCAGATTACCATATTTTCCTAAAAATCATGTGCAAGGCTTACCTGTACAATTC : 434
07male_Z     : AAATTTGTGTGTCGAATGATCGACTTGTCAGATTACCATATTTTCCTAAAAATCATGTGCAAGGCTTACCTGTACAATTC : 434
CM016429_W   : -TCTTGTGTGTCAGCAATTGTCCTGTCAGATTACCATACTTTTATAAAATATTTGTGCAAGGCTCACCTGTACAATTC : 310
14femal_W    : -TCTTGTGTGTCAGCAATTGTCCTGTCAGATTACCATACTTTTATAAAATATTTGTGCAAGGCTCACCTGTACAATTC : 310

```

13. ábra: Az LCB78 marker illesztései a GeneDoc szoftverben megjelenítve [35]. A gélből kivágott és megszekvenált minták (07-es hím egyed Z kromoszómája és 14-es nőtény egyed W kromoszómája) és az adatbázisból letöltött referencia-kromoszómák, valamint a tervezett primerek láthatóak. Az IN/DEL szakaszokat sárga színnel emeltük ki.

```

|
primers      : TACACGAAGAAGACACTGTGGGAGG----- : 25
CM016428_Z   : TACACGAAGAAGACACTGTGGGAGGACTTGCTGTCTGCTCAGGGTTCTCCCGCCATGCCTTGTCAGGGAGGAAGGCCCTATAGGATTTGG : 90
07male_Z     : tTACACGAAGAAGACACTGTGGGAGGACTTGCTGTCTGCTCAGGGTTCTCCCGCCATGCCTTGTCAGGGAGGAAGGCCCTATAGGATTTGG : 90
CM016429_W   : TACACGAAGAAGACACTGTGGGAGGACTTGCTGTCTGCTC----- : 40
14female_W   : tTACACGAAGAAGACACTGTGGGAGGACTTGCTGTCTGCTC----- : 40

primers      : ----- : -
CM016428_Z   : CTGAGATGGATGGAGTGCCTGCACATGGTCTTCACTGCTGCACCTCTATACATTTAATGGGAATTTTGCAGTTCTTTGCAAAGAGTTCAGG : 180
07male_Z     : CTGAGATGGATGGAGTGCCTGCACATGGTCTTCACTGCTGCACCTCTATACATTTAATGGGAATTTTGCAGTTCTTTGCAAAGAGTTCAGG : 180
CM016429_W   : ----- : -
14female_W   : ----- : -

primers      : ----- : -
CM016428_Z   : AGAAGCACAACATCGAAAGCACACTCCAAATTTTTTCAAAGTTCTTTGCGTTCTTGAAATGGTTTCTTTCTAAAGCCAATACACTATTT : 270
07male_Z     : AGAAGCACAACATCGAAAGCCCCTCCAAATTTTTTCAAAGTTCTTTGCGTTCTTGAAATGGTTTCTTTCTAAAGCCAATACACTATTT : 270
CM016429_W   : -----GAAAGCACACTCCAAATTTCTTAAAGTTCTTGTGTTCTTGAAATGGTTTCTTTCTAAAGCCAATACACTATTT : 116
14female_W   : -----GAAAGCACACTCCAAATTTCTTAAAGTTCTTGTGTTCTTGAAATGGTTTCTTTCTAAAGCCAATACACTATTT : 116

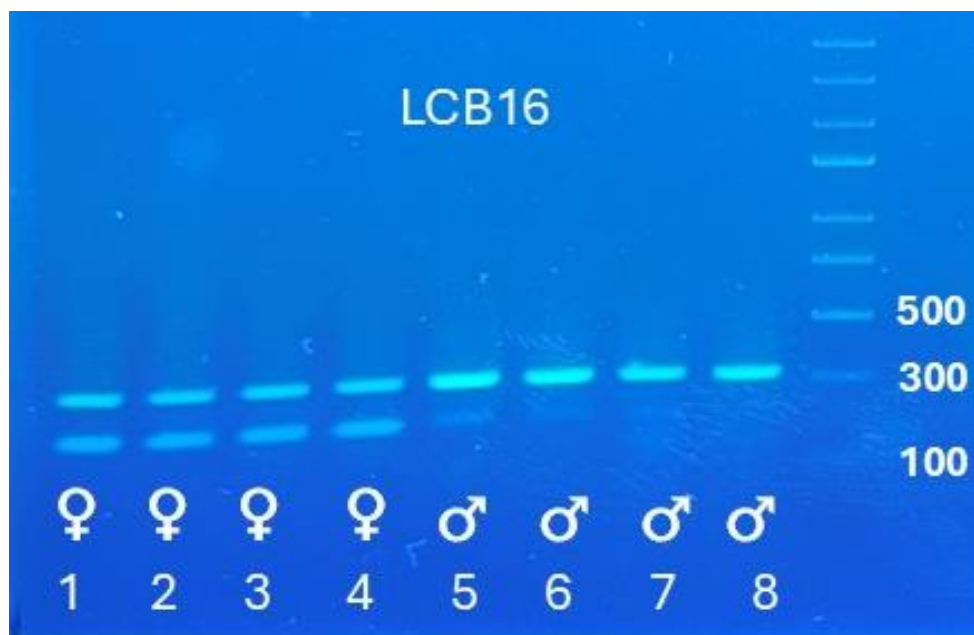
primers      : ----- : -
CM016428_Z   : GAGAGGATGTGGCTTCTTATGTATGGGGCATAAACAATTAGGGTTTTCAATGTGATCACTCTGTTTACCTCTGTTTGGAGCTGATGTGGG : 360
07male_Z     : GAGAGGATGTGGCTTCTTATGTATGGGGCATAAACAATTAGGGTTTTCAATGTGATCACTCTGTTTACCTCTGTTTGGAGCTGATGTGGG : 360
CM016429_W   : AAGAGGATGTGGCTTCTTATGTATGGGGCATAAACAATTAGGGTTTTCAATGTGATCACTCTGTTTACCTCTGTTTGGAGCTGATGTGGG : 206
14female_W   : AAGAGGATGTGGCTTCTTATGTATGGGGCATAAACAATTAGGGTTTTCAATGTGATCACTCTGTTTACCTCTGTTTGGAGCTGATGTGGG : 206

primers      : -----GGACTACGGTTCTTGTAGCTAGCGC : 50
CM016428_Z   : TGTAGGAAGAACACCACTCTTTTTCACAGACAGTGGACTACGGTTCTTGTAGCTAGCGC : 419
07male_Z     : TGTAGGAAGAACACCACTCTTTTTCACAGACAGTGGACTACGGTTCTTGTAGCTAGCGC : 419
CM016429_W   : TGTAGGAAGGACATCACTCTTTTTCATAGACATTGGACTACGGTTCTTGTAGCTAGCGC : 265
14female_W   : TGTAGGAAGGACATCACTCTTTTTCATAGACATTGGACTACGGTTCTTGTAGCTAGCGC : 265

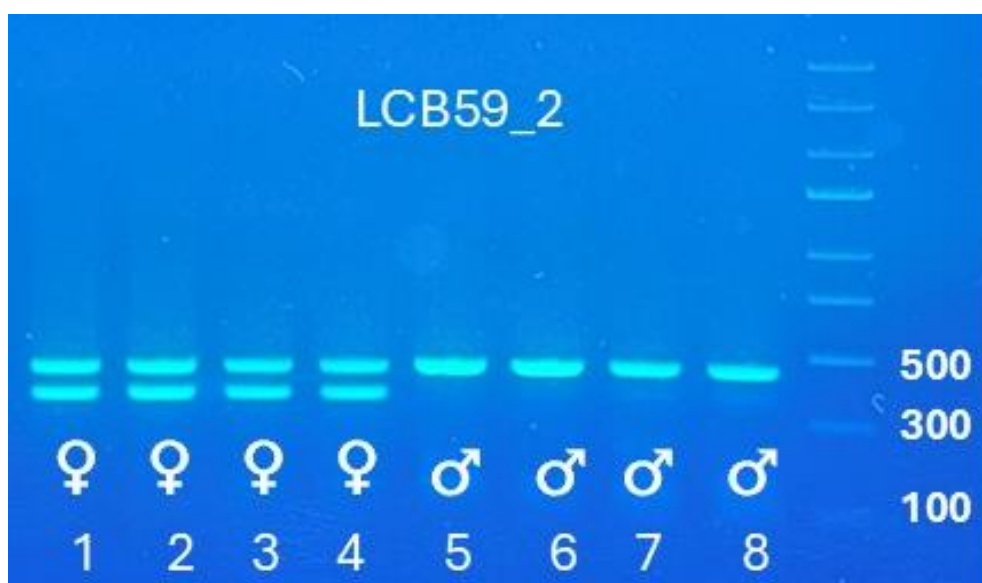
```

14. ábra: Az LCB84 marker illesztései a GeneDoc szoftverben megjelenítve [35]. A gélből kivágott és megszekvenált minták (07-es hím egyed Z kromoszómája és 14-es nőstény egyed W kromoszómája) és az adatbázisból letöltött referencia-kromoszómák, valamint a tervezett primerek láthatóak. Az IN/DEL szakaszokat sárga színnel emeltük ki.

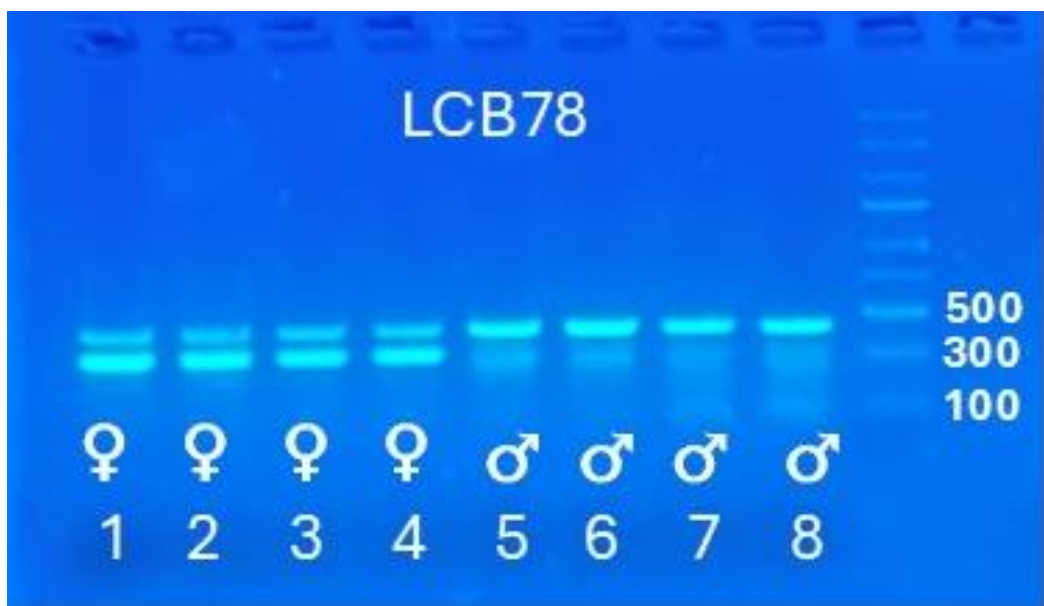
A noninvazív módon vett minták esetében a száj- és kloákatamponokra ráragadó hámsejtekből kivonható DNS mennyisége elegendőnek bizonyult a molekuláris szexáláshoz. Minden tamponmintánál kaptunk PCR-termékeket, és a szexálás eredménye minden markerrel megegyezett az ivarérett állatok fenotípusos ivarával (15.-18. ábra).



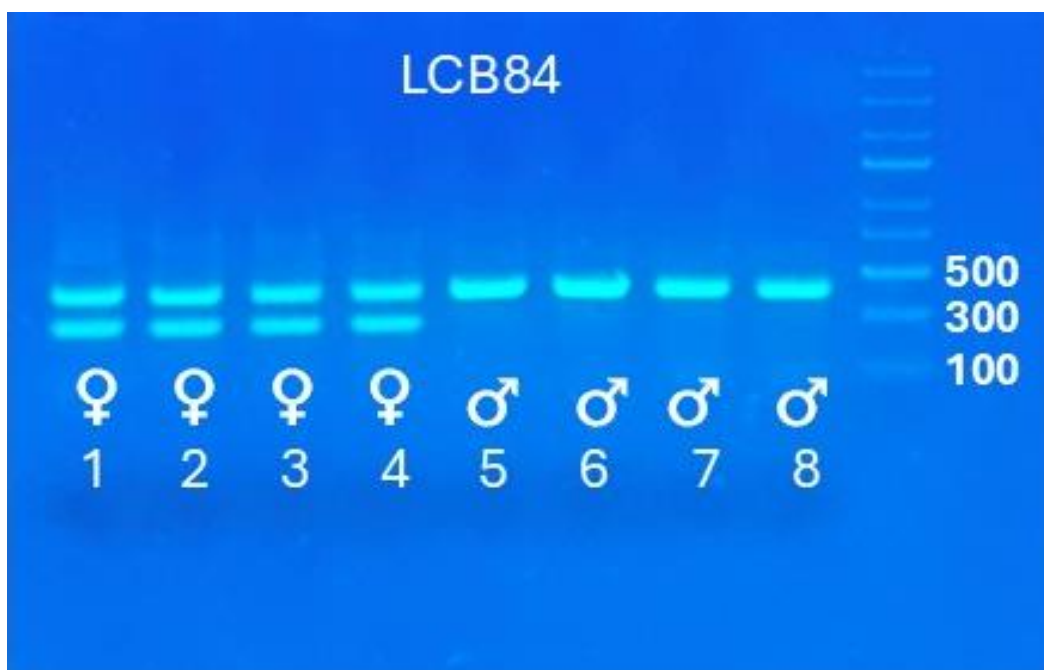
15. ábra: Az LCB16 marker futásai 2% agaróz gélen, a noninvazív módon vett mintákkal végzett PCR teszt után. Az 1-es, 2-es, 5-ös és 6-os mintákat szájtamponnal vettük, míg a 3-as, 4-es, 7-es és 8-as mintákat kloákatamponokból vontuk ki. Az egyedek ivarát piktogramokkal jelöltük.



16. ábra: Az LCB59_2 marker futásai 2% agaróz gélen, a noninvazív módon vett mintákkal végzett PCR teszt után.



17. ábra: Az LCB78 marker futásai 2% agaróz gélen, a noninvazív módon vett mintákkal végzett PCR teszt után.



18. ábra: Az LCB84 marker futásai 2% agaróz gélen, a noninvazív módon vett mintákkal végzett PCR teszt után.

Diszkusszió

Eddig csak kevés kétéltű fajban fejlesztettek ki egyszerű PCR alapú ivarmarkereket. A ma élő farkatlan kétéltű fajokból összesen öt faj molekuláris szexálásáról van publikált adat (*Rana clamitans*, *R. dalmatina*, *R. dybowskii*, *R. temporaria*, *Bufo bufo*), amely öt fajból az első négy XY ivari kromoszómákkal rendelkezik [3, 4, 36–38]. A ZW ivari kromoszómarendszerrel rendelkező farkos kétéltűek molekuláris szexálására a *Bufo bufo* kivételével még nincs kifejlesztve egyszerű módszer.

A kevés publikáció hátterében is az állhat, hogy a békák nagyjából háromnegyedénél az ivari kromoszómák homomorfak, így sokkal nehezebb inszerciós/deléciós különbségeket találni homológ régiók között. Ilyen esetekben viszont sokkal bonyolultabb, és költségesebb az ivarmarkerek fejlesztése, még akkor is, ha ismertek erre eljárások (RADSeq, GWAS) [3–5].

Ez a kutatás módszertani alapul is szolgálhat jövőbeli kutatásoknak, ugyanis bebizonyosodott, hogy az NCBI adatbázisba feltöltött, kromoszómára szerelt genomok segítségével is lehet *in silico* módon, működő ivarmarkereket tervezni, annak ellenére, hogy ezen genomok nagy része egy-egy egyedről származik. Jelenleg (2024.10.08) 62 farkatlan kétéltűfaj genomja elérhető az NCBI adatbázisban [39], így ezen fajokból azokra, amelyek mindkét különböző ivari kromoszómája meg van szekvenálva, a fent leírtak szerint lehetne *in silico* ivarmarkert tervezni, és nem szükséges RADSeq, GWAS vagy egy újabb teljes genom szekvenálása. Nem ez az első kutatás *in silico* ivarmarker fejlesztésre [40], de tudomásunk szerint kétéltű ivarmarker még nem volt *in silico* módon fejlesztve .

Az antropogén hatásoknak fokozottan kitett területeken a kétéltűek ivarváltása egyre gyakrabban megfigyelhető [28]. Egyes peszticidek, fogamzásgátlók, gyógyszerek illetve a hőmérséklet megváltozása okozhatnak ivarváltást is, feltételezések szerint az aromataz enzimek expresszióját megváltoztatva [23]. Ezen jelenségek az ivararány eltolódásához vezetnek, általában a nőstények maszkulinizációjával [23]. Az ivarváltás lényege, hogy a genotípusos ivar eltér a fenotípusos ivartól, így az ivarváltás tényének megállapításához kulcsfontosságú a genotípusos ivart megállapítani képes ivarmarkerek felhasználása [3]. Az általunk vizsgált fajban még nincs adat ivarváltásról, de a tervezett markerkészlet fényt deríthet erre a kérdésre.

Az ivarfüggő mortalitás hasonló ivararány-eltolódást eredményez, mint az ivarváltás, ámde a hátterében más jelenség áll: ebben az esetben az egyik ivarra nagyobb szelekciós nyomás hat

bizonyos környezeti tényezők (például rovarirtók), hatására, így a másik ivar aránya jelentősen megnövekszik az adott populációban [41].

Az ivarváltás, ivarfüggő mortalitás, illetve egyéb ivari különbségekre alapuló kutatásokban általában morfológiai bélyegeket használnak a fenotípusos ivar megállapítására [42], ami sokszor téves következtetéseket eredményez. Ezen jelenségek pontos elkülönítéséhez ugyanis elengedhetetlen a genetikai ivar pontos ismerete, ami molekuláris szexálás nélkül nem lehetséges. Továbbá a markerek felhasználhatóak egyéb ivarossággal foglalkozó kutatásokban is, mint például populáció dinamikai vizsgálatokban, vagy a különböző ivarok szaporodási sikerének vizsgálatában [43].

Az általunk fejlesztett markerek segíthetik a fajjal kapcsolatos evolúciobiológiai és konzervációbiológiai kutatásokat is. Már több kutatás kimutatta az afrikai ökörbéka populációk egyedszámainak csökkenését, aminek hátterében leginkább a szaporodási siker csökkenése áll, mégpedig a szaporodási terület megváltozása miatt [28, 30]. Érdemes volna vizsgálni az ivarok közötti különbségeket a növekvő környezeti stresszorok toleranciája szempontjából. A legnagyobb ilyen stressz, amely a vizsgált fajt éri, az időszakos tavak vagy pocsolyák kiszáradása, amelyben az ebihalak fejlődnek [44]. A kifejlesztett markerek használatát jelentősen megkönnyíti, hogy noninvazív mintavétellel is megbízhatóan működnek. Ez ugyanis a mintavételt is egyszerűbbé teszi, továbbá nem szükséges jó minőségű szövet a markerek használatához [45], ami tovább növeli a markerek alkalmazási lehetőségeit. A sokkal kisebb zavarással járó tamponos mintázás mind a tenyésztők számára, mind terepi kutatásokban egyszerűbben kivitelezhető, és az állatokat kevésbé terhelő eljárás, mint a vérvétel vagy a csonkolásos szövetminta-vétel.

Összefoglalva, az általunk tervezett ivarmarkerek megfelelő megbízhatósággal használhatóak az egyedek genetikai ivarának meghatározására. Saját minták megszekvenálásával megbizonyosodtunk róla, hogy az *in silico* fejlesztett markerek a megfelelő szakaszokat amplifikálják, és nem műterméket eredményeznek. A tervezett markerek felhasználhatóak további kutatásokban akár noninvazív mintavételezéssel is, illetve kutatásunk módszertana alapul szolgálhat a jövőben további *in silico* ivarmarkerek fejlesztéséhez.

Összefoglalás

Az afrikai ökörbéka (*Pyxicephalus adspersus*) ZZ/ZW ivari kromoszómarendszerrel rendelkezik, de molekuláris ivarmeghatározására még nincs kifejlesztve módszer. A faj hím egyedei jóval nagyobbra nőnek, mint a nőstények, de a fenotípusos ivar csak az ivaréret követően állapítható meg, viszont egy olcsó és egyszerűen használható genetikai marker segítségével akár már a juvenilis egyedek genetikai ivara is azonosítható volna. Ezen kívül a molekuláris szexálás segítheti az afrikai ökörbéka populációk védelme érdekében folytatott konzervációbiológiai kutatásokat, továbbá a hobbiállat-tenyésztők számára is felhasználható lehet a genetikai marker korai ivarmeghatározásra. A poikilotherm gerincesek ivardetermináns régiói kevésbé konzerváltak, mint a melegvérűeké, ezért ezeknél az állatoknál gyakran előfordulhat, hogy eltérő lókuszt felelős az ivardeterminációért, és még a közeli rokon fajok esetében is különbözhet az ivarmeghatározási rendszer. Emiatt a molekuláris szexálásra fejlesztett markerek csak egy-egy fajon vagy egyes esetekben csak egy génuson belül működnek. Kutatásunk célja olyan olcsó és egyszerűen használható PCR-alapú markerkészlet fejlesztése volt, amely lehetővé teszi az afrikai ökörbéka molekuláris ivarmeghatározását. A genetikai ivarmarkerek fejlesztéséhez az NCBI adatbázisba feltöltött afrikai ökörbéka genomot használtuk, amely egy nőstény egyedből származik, így mindkét heteromorf ivari kromoszómát tartalmazza. Az adatbázisból letöltött ivari kromoszómák illesztése során a Geneious Prime program Mauve eszközének segítségével 168 potenciálisan ivarhoz kötött szakaszt azonosítottunk, amelyek a markerek alapjául szolgáltak. A 168 szakaszból előzetesen 25 lókuszt terveztünk primerpárokat, amelyek tartalmaztak megfelelő méretű inszerciós/deléciós különbségeket, ezzel lehetővé téve az egyszerű méret szerinti elkülönítést az agaróz gélen. Ezek közül a tesztelés során négy markert ítéltünk ivarmeghatározásra alkalmasnak. A PCR-termékeket Sanger-féle módszerrel megszekvenáltuk az adatbázisba feltöltött szekvenciákkal való egyezés validálása érdekében. A markereket 26 ismert ivarú (14 hím, 12 nőstény) egyeden teszteltük le, izomszövetből és vérből kivont DNS minták felhasználásával. Az izomszöveteket juvenilis békákból nyertük, amelyek ivarát az ivarmirigyek morfológiája és szövettan alapján határoztuk meg, a vérmintákat pedig ivarérett egyedektől vettük, amelyek fenotípusos ivarát morfológiai bélyegek segítségével állapítottuk meg. A PCR-tesztek által meghatározott ivar mind a négy marker esetében egyezett a korábban megállapított fenotípusos ivarral, és a megszekvenált amplikonok illesztése során sem találtunk eltérést a referenciagenomhoz képest, így kijelenthetjük, hogy a fejlesztett markerek ivari kötődése 100%-os.

Summary

The African bullfrog (*Pyxicephalus adspersus*) has a ZZ/ZW sex chromosome system, however, a method for molecular sexing is yet to be developed. Males grow considerably larger than females, but phenotypic sex can only be determined following sexual maturation. However, with the aid of an affordable and easy-to-use genetic marker, the sex of even juveniles can be identified. In addition, molecular sexing could assist conservation biology research in the protection of African bullfrog populations. Additionally, it could also be used by breeders to identify the genetic sex of individuals at an early stage of ontogeny. In poikilothermic vertebrates, the sex-determining regions are less conserved than in warm-blooded animals, so different loci may often be responsible for sex-determination in these animals. Furthermore, in these taxa even closely related species may have different sex-determination systems. Consequently, markers developed for molecular sexing may only work within a single species or, in some cases, within a single genus. The aim of our research was to develop an inexpensive and easy-to-use PCR-based marker set that enables the molecular sexing of the African bullfrog. For the development of these genetic markers, we used the African bullfrog genome uploaded into the NCBI database, which was sequenced from a female bullfrog and thus contains both heteromorphic sex-chromosomes. The alignment of the sex-chromosomes, downloaded from the database, was performed using the Mauve tool in the software Geneious Prime. We identified 168 potentially sex-linked sequences which served as the basis for the markers. From the 168 sequences, we designed primer pairs for 25 loci that contained insertion/deletion differences of appropriate size, which allows for the easy differentiation of PCR products on the agarose gel by size. Out of the 25 designed markers, we deemed 4 to be suitable for identifying genetic sex during testing. The PCR products were sequenced using the Sanger method to confirm their alignment with sequences uploaded into the database. We tested the markers on 26 individuals of known sex (14 male, 12 female) using DNA samples extracted from muscle tissue and blood. The muscle tissues were obtained from juvenile frogs, whose sex was determined by morphology and histology of the gonads. Blood samples were collected from mature individuals, whose phenotypic sex was determined based on morphological traits. For all four markers, the genetic sex determined using the PCR tests matched the previously established phenotypic sex, and no differences were observed in the sequenced amplicons aligned to the reference genome. Therefore, we can conclude that the developed markers show 100% sex linkage.

Irodalomjegyzék

1. Holleley CE, Whiteley SL, Devloo-Delva F, Bachler A, Llinas J, Georges A (2023) 8 Molecular sex identification for applications in conservation, industry and veterinary medicine. *Applied Environmental Genomics*
2. Fernando P, Melnick DJ (2001) Molecular sexing eutherian mammals. *Molecular Ecology Notes* 1:350–353. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00112.x>
3. Nemesházi E, Gál Z, Ujhegyi N, Verebélyi V, Mikó Z, Üveges B, Lefler KK, Jeffries DL, Hoffmann OI, Bókony V (2020) Novel genetic sex markers reveal high frequency of sex reversal in wild populations of the agile frog (*Rana dalmatina*) associated with anthropogenic land use. *Molecular Ecology* 29:3607–3621. <https://doi.org/10.1111/mec.15596>
4. Nemesházi E, Sramkó G, Laczkó L, Balogh E, Szatmári L, Vili N, Ujhegyi N, Üveges B, Bókony V (2022) Novel genetic sex markers reveal unexpected lack of, and similar susceptibility to, sex reversal in free-living common toads in both natural and anthropogenic habitats. *Molecular Ecology* 31:2032–2043. <https://doi.org/10.1111/mec.16388>
5. Liu LY, Schaub MA, Sirota M, Butte AJ (2012) Sex differences in disease risk from reported genome-wide association study findings. *Hum Genet* 131:353–364. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1081-y>
6. Fridolfsson A-K, Ellegren H (1999) A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. *Journal of Avian Biology* 30:116–121. <https://doi.org/10.2307/3677252>
7. Chen J, Schedl T (2021) A simple one-step PCR assay for SNP detection. *microPublication Biology*. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000399>
8. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC (1998) *Plasmodium falciparum*: Detection of Polymorphisms in the *Dihydrofolate Reductase* and *Dihydropteroate Synthetase* Genes by PCR and Restriction Digestion. *Experimental Parasitology* 89:1–8. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4274>
9. Perez-Enriquez R (2020) A fast sex detection method for the Whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* by post-PCR high resolution melting (HRM). *Aquaculture* 520:734784. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734784>
10. Weber C, Capel B (2021) Sex determination without sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376:20200109. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0109>
11. Saunders PA, Ferre-Ortega C, Hill PL, Simakov O, Ezaz T, Burridge CP, Wapstra E (2024) Using a Handful of Transcriptomes to Detect Sex-Linked Markers and Develop Molecular Sexing Assays in a Species with Homomorphic Sex Chromosomes. *Genome Biology and Evolution* 16:evae060. <https://doi.org/10.1093/gbe/evae060>
12. Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F, Graves JAM (2006) Relationships between Vertebrate ZW and XY Sex Chromosome Systems. *Current Biology* 16:R736–R743. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.021>
13. Koopman P (1995) The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals. *Reprod Fertil Dev* 7:713–722. <https://doi.org/10.1071/rd9950713>
14. Ma W-J, Veltsos P (2021) The Diversity and Evolution of Sex Chromosomes in Frogs. *Genes (Basel)* 12:483. <https://doi.org/10.3390/genes12040483>
15. Charlesworth D (2017) Evolution of recombination rates between sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372:20160456. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0456>
16. Wright AE, Dean R, Zimmer F, Mank JE (2016) How to make a sex chromosome. *Nat Commun* 7:12087. <https://doi.org/10.1038/ncomms12087>

17. Petersen AJ (1964) DNA SYNTHESIS AND CHROMOSOMAL ASYNCHRONY : Induced Parasynchronous DNA Synthesis in Human Leucocyte Cultures and Chromosomal Asynchrony in the Early S Phase. *Journal of Cell Biology* 23:651–654. <https://doi.org/10.1083/jcb.23.3.651>
18. Miura I, Ohtani H, Hanada H, Ichikawa Y, Kashiwagi A, Nakamura M (1997) Evidence for two successive pericentric inversions in sex lampbrush chromosomes of *Rana rugosa* (Anura: Ranidae). *Chromosoma* 106:178–182. <https://doi.org/10.1007/s004120050237>
19. Ito M (2018) Sex Determination and Differentiation in Frogs. In: Kobayashi K, Kitano T, Iwao Y, Kondo M (eds). Springer Japan, Tokyo, pp 349–366
20. Nakamura M (2009) Sex determination in amphibians. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:271–282. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.10.003>
21. Nakamura M (2009) Sex determination in amphibians. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:271–282. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.10.003>
22. Denton RD, Kudra RS, Malcom JW, Preez LD, Malone JH (2018) The African Bullfrog (*Pyxicephalus adspersus*) genome unites the two ancestral ingredients for making vertebrate sex chromosomes. 329847
23. Flament S (2016) Sex Reversal in Amphibians. *Sex Dev* 10:267–278. <https://doi.org/10.1159/000448797>
24. Blaustein AR, Kiesecker JM (2002) Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5:597–608. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x>
25. Killips PE (2001) Patterns of Distribution of Amphibians. A Global Perspective. *Journal of Animal Ecology* 70:536–536. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2001.00515-1.x>
26. Mattison C (2011) *Frogs and Toads of the World*. Princeton University Press
27. Yetman CA (2012) Conservation biology of the giant bullfrog, *Pyxicephalus adspersus* (Tschudi, 1838)
28. Thomas RL, Owen-Smith L, Drake DC, Alexander GJ (2014) Restoring breeding habitat for Giant Bullfrogs (*Pyxicephalus adspersus*) in South Africa. *African Journal of Herpetology* 63:13–24. <https://doi.org/10.1080/21564574.2013.845858>
29. Van Wyk JCP (2010) GROWTH AND BEHAVIOUR OF TADPOLES AND JUVENILES OF THE AFRICAN BULLFROG PYXICEPHALUS ADSPERSUS TSCHUDI, 1838. *The Journal of the Herpetological Association of Africa* 40:. <https://doi.org/10.1080/04416651.1992.9650326>
30. Yetman CA, Ferguson JWH (2011) Conservation Implications of Spatial Habitat Use by Adult Giant Bullfrogs (*Pyxicephalus adspersus*). *hpet* 45:56–62. <https://doi.org/10.1670/09-186.1>
31. Jing X, Zhao H-Y, Zheng Y-N, Nie Y-M, Ma L-B, Huang Y (2024) A Chromosome-Level Genome Assembly and Annotation for the *Oecanthus rufescens* (Orthoptera: Oecanthidae). *Genome Biol Evol* 16:evae145. <https://doi.org/10.1093/gbe/evae145>
32. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT (2004) Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Res* 14:1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
33. Bonfield JK, Smith K f, Staden R (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res* 23:4992–4999. <https://doi.org/10.1093/nar/23.24.4992>
34. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
35. Nicholas KB (1997) Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments – ScienceOpen. <https://www.scienceopen.com/document?vid=c8a87cd1-255f-4129-802b-d2382bb0fb37>. Accessed 14 Oct 2024

36. Alho JS, Matsuba C, Merilä J (2010) Sex reversal and primary sex ratios in the common frog (*Rana temporaria*). *Mol Ecol* 19:1763–1773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04607.x>
37. Lambert MR, Tran T, Kilian A, Ezaz T, Skelly DK (2019) Molecular evidence for sex reversal in wild populations of green frogs (*Rana clamitans*). *PeerJ* 7:e6449. <https://doi.org/10.7717/peerj.6449>
38. XU Y, DU Z, LIU J, SU H, NING F, CUI S, WANG L, LIU J, REN C, DI S, BAI X (2022) Male heterogametic sex determination in *Rana dybowskii* based on sex-linked molecular markers. *Integr Zool* 17:105–114. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12577>
39. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, Connor R, Funk K, Kelly C, Kim S, Madej T, Marchler-Bauer A, Lanczycki C, Lathrop S, Lu Z, Thibaud-Nissen F, Murphy T, Phan L, Skripchenko Y, Tse T, Wang J, Williams R, Trawick BW, Pruitt KD, Sherry ST (2022) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* 50:D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
40. Dissanayake DSB, Streeting LM, Georges A, Bower DS (2022) A male-specific sex marker for the endangered western sawshelled turtle (*Myuchelys bellii*) using in silico whole-genome subtraction. *Conservation Genet Resour* 14:231–236. <https://doi.org/10.1007/s12686-022-01266-3>
41. Balogh E, Hócz S, Ujhegyi N, Kásler A, Holly D, Herczeg D, Ujszegi J, Gál Z, Hoffmann OI, Bókony V, Mikó Z (2024) Do pyrethroid insecticides influence sex ratios in agile frogs (*Rana dalmatina*)? 2024.09.21.614238
42. Lambert MR, Giller GSJ, Barber LB, Fitzgerald KC, Skelly DK (2015) Suburbanization, estrogen contamination, and sex ratio in wild amphibian populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:11881–11886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501065112>
43. Shikano T, Herczeg G, Merilä J (2011) Molecular sexing and population genetic inference using a sex-linked microsatellite marker in the nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*). *BMC Res Notes* 4:119. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-119>
44. Balinsky B (1954) On the breeding habits of the South African bullfrog *Pyxicephalus adspersus*. *South African Journal of Science*
45. Pidancier N, Miquel C, Miaud C (2003) Buccal swabs as a non destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetological Journal* 13:175–178
46. IUCN. 2024. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2024-1. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on [14 10 2024].

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni Balogh Emese és Dr. Szabó Krisztián témavezetőimnek a kutatás elvégzésében, és a dolgozat megírásában nyújtott segítségüket. Útmutatásuk, és tanácsaik hatására mind a labori munkám, mind előadási készségeim és a dolgozatírási készségeim is rengeteget fejlődtek az egy év alatt, ami óta együtt dolgozunk.

Hálával tartozom továbbá az oktatóimnak, akik megértéssel fordultak hozzám, és segítették a munkámat a dolgozat megírása alatti időszakban.

Továbbá szeretném megköszönni a családomnak a rólam való gondoskodást, hogy teljes erőbefektetéssel tudjak a dolgozat írásával foglalkozni.