

**Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet
és
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszipari Tanszék**

DNS MARKER FEJLESZTÉSE GÍMSZARVAS POPULÁCIÓ GENETIKAI VIZSGÁLATOKHOZ

TDK dolgozat

Kálmán Zsófia
III. évf. Biomérnök BSc

Témavezetők: **Dr. Stéger Viktor**
Dr. Habil. Nguyen Duc Quang

**Gödöllő
2014**

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	4
2	Irodalmi áttekintés.....	5
2.1	A gímszarvas általános jellemzése, jelentősége	5
2.2	Gímszarvas genomprogramjai	6
2.3	Az új generációs szekvenálás.....	7
2.4	Mitokondrium, D-loop régió	8
2.5	DNS markerek, mikroszatelliták	10
3	A munka célja	11
4	Anyag és módszer	12
4.1	A vizsgált gímszarvas minták	12
4.2	DNS izolálás.....	13
4.3	Primer tervezés	13
4.4	Gímszarvas nemi kromoszómás multiplex mikroszatellita PCR	14
4.5	Mitokondriális D-loop PCR	15
4.6	PCR termékek detektálása	16
4.6.1	Gél elektroforézis	16
4.6.2	Fragment analízis	17
4.6.3	Mitokondriális szekvenciák kiértékelése	17
4.7	Populáció genetikai vizsgálatok.....	17
5	Kísérleti eredmények és értékelésük	18
5.1	DNS izolálás.....	18
5.2	Primer tervezés	18
5.3	A gímszarvas XY mikroszatellita (Ce_XY3_KZS) multiplex PCR reakció optimalizálása.....	19
5.4	Ce_XY3_KZS eredményei	23
5.4.1	Mikroszatellita polimorfizmusok	23
5.4.2	Populáció genetika: X és Y kromoszómás vonalak	25
5.4.3	Mikroszatellita marker közelébe eső QTL régiók	32
5.5	Koponya és agancs megfeleltetés.....	33
6	Összefoglalás	36
7	Köszönetnyilvánítás	38
8	Irodalomjegyzék	39

Rövidítések

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – Base pair / Bázis pár

Ce – *Cervus elaphus* / Gímszarvas

ddATP – Didedoxi-adenosine-triphosphate / Didedoxi-adenozin-trifoszfát

ddCTP – Didedoxi-cytesine-triphosphate / Didedoxi-citozin-trifoszfát

ddGTP – Didedoxi-guanosine-triphosphate / Didedoxi-guanozin-trifoszfát

ddTTP – Didedoxi-thymidine-triphosphate / Didedoxi- timidin-trifoszfát

DNS – Deoxyribonucleic acid / Deoxiribonukleinsav

dNTP – Deoxyribonucleoside Triphosphate /Deoxiribonukleozid-trifoszfátot

D-loop – Displacement loop / Mitokondriális kontroll régió

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid/Etiléndiamin-tetraecetsav

GenAlEx – Genetic Analysis in Excel

HVR – Hiper Variable Region / Hipervariábilis régió

kb – Kilobase pair / Kilobázis pár

Mb – Megabase pair / Megabázis pár

mtDNS – Mitochondrial DNA / Mitokondriális DNS

NGS – Next Generation Sequencing / Új generációs szekvenálás

PCoA – Principal Coordinate Analysis / Főkoordináta analízis

PCR – Polymerase Chain Reaction / Polimeráz láncreakció

QTL – Quantitative Trait Locus / Mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókus

RNS – Ribonucleic acid / Ribonukleinsav

SNP – Single Nucleotide Polymorphism / Egy-pontos nukleotid polimorfizmus

ssDNS – Single strand DNS / Egy szálú DNS

SSR – Short Sequence Repeats / Rövid szekvencia ismétlődések

STR – Short Tandem Repeats/ Rövid szekvencia ismétlődések

TBE – Tris-Borate-EDTA / Tris-bórsav-EDTA puffer

tRNS – Transfer Ribonucleic Acid / Transzfer ribonukleinsav

UV – Ultra violet / Ultra ibolya

VIS –Visible / Látható fény tartománya

1 Bevezetés

A gímszarvas (*Cervus elaphus*) Közép-Ázsiából származó, mára Európa szerte elterjedt nagyvad. Az Ibériai-félszigettől a Balti-tengerig megtalálható, a leggyakrabban előforduló szarvasfélék egyike. A kontinensen jellemző a dinamikus egyedszám növekedés, manapság már 1,7 millió példányra tehető a számuk, míg húsz évvel ezelőtt csak 1,1 millióan éltek ezen a területen. Ez az elszaporodás független az ökológiai kondícióktól, a szocio-kulturális háttértől és a vadászati rendszertől is (Burbaité & Csányi, 2010).

A hazai populáció mérete becslések szerint 100 000 egyed fölé tehető (Csányi, 2014), amely az utóbbi pár évtizedben indult jelentős növekedésnek. Ez a magas példányszám indokoltá teszi az állomány csökkentését, hiszen élőhelyük területe is szűkült, emellett az általuk okozott vadkár mértéke egyre inkább nő. A magyarországi állatok trófea minősége viszont az egyik legkiemelkedőbb a világon, számos hazánkban kilőtt állat szerepel előkelő helyen a nemzetközi ranglistákon (www.naturhun.hu/magyar/gimszarvas.html).

A gímszarvas gazdasági, kulturális és ökológiai fontossága is növekszik, ezért a gímszarvas kutatási programok elengedhetetlenek a faj fenntartható hasznosításához (Burbaité & Csányi, 2010).

Hazánkban is szükség van egy olyan átfogó program létrehozására, ami lehetővé teszi az állomány ésszerű csökkentését, anélkül, hogy maradandó károsodást okoznánk a hazai ökoszisztémában és a Kárpát-medencében élő gímszarvas állomány minőségében.

Magyarországon a gímszarvas kutatások több évtizedes múltra tekintenek vissza, amelyekbe több intézmény is bekapcsolódott (az Eötvös Loránd Tudományegyetem, a Kaposvári Egyetem, a Szent István Egyetem és a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont). Az említett intézmények keretein belül évek óta foglalkoznak a faj ökológiai és genetikai vizsgálatával és a hozzá kötődő humán orvosi kutatásokkal. Ezek folytatásába kapcsolódik be a mi tevékenységünk is, amely reményeink szerint képes lesz új szempontból bővíteni a hazai gímszarvas populációk genetikai struktúrájáról alkotott képet.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A gímszarvas általános jellemzése, jelentősége

A gímszarvas (1. ábra) modern rendszertani besorolása szerint a Cetartiodactyla főrenden belül a Párosujjú patások (Artiodactyla) rendjébe, szűkebben pedig a szarvasfélék (Cervidae) családjába tartozik (Gilbert et al., 2006, Agnarsson & May-Collado, 2008, Szabolcsi, 2013). Általában testük 165-250 cm hosszú, marmagassága 100 és 150 cm között mozog, tömege eléri a 100-350 kg-ot is (Molnár, 2008). Az agancsának súlya pedig akár a 10-15 kg-ot is meghaladhatja (Stéger, 2011). Élőhelye igen változatos, lombhullató és örökzöld erdőkben gyakran előfordul, de nyílt élőhelyen is megtalálható (Skog et al., 2009).



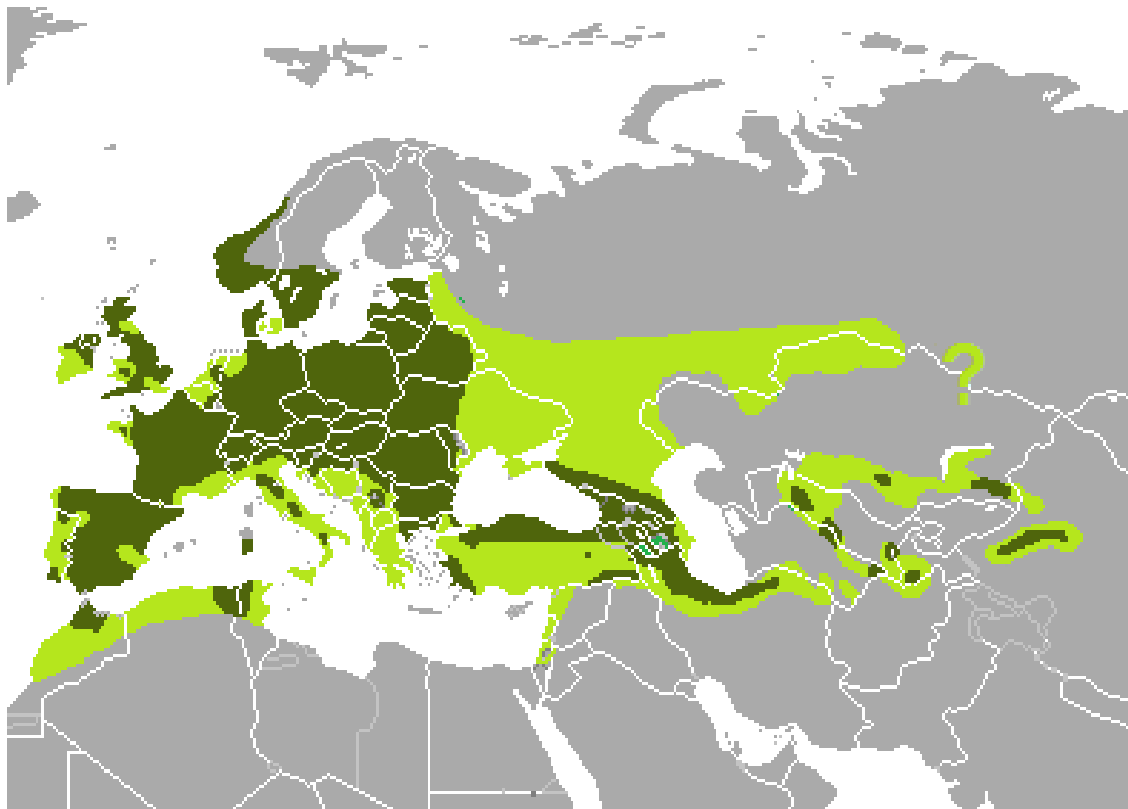
1.ábra A gímszarvas

(Forrás: <http://www.wildaboutbritain.co.uk/forums/mammal-forums/17903-tatton-park-deer-rut.html>)

A gímszarvas Euráziában őshonos, de Afrika északi részén is megtalálható, valamint betelepítették Észak- és Dél-Amerika, valamint Óceánia néhány területére is (Horn, 2004). Oroszország európai vidékein és Skandinávia egyes részein kívül benépesíti a kontinent (2.ábra), beleértve Szicíliát és a Brit-szigeteket is (Burbaité & Csányi, 2010). Az itt élő állományok ősei a jégkorszak alatt elszigetelődtek egymástól. Öt fő menedékhelyük volt: Ibéria, Olaszország, a Kaszpi régió, a balkáni területek és a Kárpátok. Ezekhez a különböző élőhelyekhez való alkalmazkodás okozza a gímszarvas genetikai állományának sokszínűségét (Skog et al., 2009).

A gímszarvas komoly gazdasági, kulturális és ökológiai fontossággal és előnnyel bír. Az állathoz kapcsolódó sport-tevékenység (vadászat) és menedzsment segíti a helyi közösségeket

munkahelyteremtéssel. Turisztikai eszközként is tekinthetünk a vadállományra, ami szintén hasznot hoz az ott élők számára, valamint a vadhúsfogyasztás is egyre népszerűbb. Ökológiai fontossága, hogy táplálékul szolgál más nagyvadak számára, emellett táplálkozási szokásainak köszönhetően befolyással bír a növényzet összetételére és szerkezetére. Számos előnye mellett sajnos hátrányos tulajdonságokkal is rendelkezik: komoly kárt okozhat mezőgazdasági területekben és erdőkben, mocsarakban is, közúton pedig gyakori szereplője közlekedési baleseteknek, valamint betegségek terjesztője is lehet (Burbaité & Csányi, 2010).



2.ábra A gímszarvas elterjedése Euráziában

(Forrás: http://en.wikipedia.org/wiki/Red_deer

(Világos zöld egykori elterjedés, sötétzöld jelenlegi elterjedés)

2.2 Gímszarvas genomprogramjai

Új-Zélandon a 2000-es években kezdődött egy kutatás az ott élő szarvas populációk szülői vonalainak, diverzitásának és fajösszetételének vizsgálatára. Ehhez létrehoztak egy 768 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) vizsgálatára alkalmas chipet (Golden Gate Illumina) (Bixley et al., 2009). Az SNP egyetlen nukleotidnyi változást jelent a DNS szekvenciában. Ez a változás lehet bázis kicserélődés (purin-purin, pirimidin-pirimidin vagy purin-pirimidin), bázis kiesés vagy betoldódás. Ezeknek a változásoknak a következményei képesek rögzülni a

genomban. Ha több SNP-t vizsgálunk együtt, akkor haplotípusokba sorolhatjuk az egyes egyedeket, ezért az SNP-k vizsgálata alkalmas populációk elemzésére. (Vignal et al., 2002) Az új-zélandi chip-hez 207 Mb-nyi SNP-t tartalmazó genomot szekvenáltak. Ezt három fajta szarvason végezték, a keleti, a nyugati gímszarvason és a vapitin. Minden fajtából 25-25 állatot választottak ki. A létrejött chip és eredmények alapul szolgálnak további kutatásokhoz és a gímszarvas gazdálkodás fejlődéséhez (Bixley et al., 2009). A szekvenálási adatok az alábbi linken érhetőek el: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX337866\[accn\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX337866[accn])

Magyarországon az első *de novo* (előzetes információ nélküli bázissorrend meghatározás) genom programot Dr. Orosz László és Dr. Horn Péter akadémikusok indították el az 1990-es évek elején (http://mta.hu/tudomany_hirei/az-agancsfejlodes-genetikaja-72141/), amely a korábbi ilyen irányú próbálkozásokhoz képest sokkal eredményesebben zajlott. Míg az új-zélandi szekvenálás során a kapott genom lefedettsége csupán egyszeres volt, addig a bőszenfai kapitális bika szekevenálása után kapott genom lefedettsége hetvennégyeszeres. A 223 milliárd bázisból Dr. Barta Endre 437 412 darab contigot (nyers szekvenciákból összeállítható egybefüggő DNS szekvenciák) hozott létre. Ezeket pedig scaffoldokba (nem összeérő láncba rendezett contigok sora) rendezte, amelyből 34 724 darab lett (Bana 2014, Frank 2014).

Ez által azonosíthatóvá váltak többek között az agancs ciklus metabolizmusának génjei (amelyeknek a humán rákkutatásban, illetve a csonttritkulás – osteoporózis – kutatásban van jelentőségük) és az állattenyésztési szempontokból fontos QTL régiók is (Bana 2014, Frank 2014).

Ezen szekvenálási eredmények segítségével végeztük mi is a nemi kromoszómás marker fejlesztésünket.

2.3 Az új generációs szekvenálás

Szekvenciák meghatározására korábban két módszer létezett, a Maxam-Gilbert-féle (kémiai) módszer és a Sanger módszer. Ezek közül az utóbbi, a Sanger-féle nyújtott lehetőséget fejlesztésre és a szekvenálás automatizálására, amelyen az új generációs szekvenálás (NGS – Next-Generation Sequencing) alapul (Szeberényi, 2004).

A Sanger láncterminációs eljárás alapja egy olyan DNS szintetizáló rendszer, amely magában foglal radioaktív módon jelölt, szintetikus előállított primer molekulákat, négy féle dezoxiribonukleozid-trifoszfátot (dNTP) és DNS polimeráz (I) enzimet. Miután a DNS

templát szálához hozzákötődött a primer, a reakció elegyet négy részre osztják és mindegyikhez különböző didezoxiribonukleozid-trifoszfátot adnak (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Mind a négy reakció elegyben DNS szintetizálódik, amelyet a didezoxi molekulák random beépülése állít meg. Az így keletkezett eltérő hosszúságú láncokat gélben futtatják meg. A band-ek (sávok) alapján pedig le lehet olvasni a bázissorrendet (Szeberényi, 2004).

Az NGS technológiák gyorsabb, egyszerűbb és jobban használható megoldást jelentenek a genomika területén. Emellett az új módszerekkel lehetőség nyílik korábban kivitelezhetetlen vagy túl bonyolult eljárások végrehajtására is. A leggyakoribb NGS technikák a Roche, Applied Biosystem, Helicos és Illumina (Metzker, 2009).

Részletesebben csak az Illumináról szeretnék írni, mivel mintáink szekvenálása ezzel a módszerrel történt.

A szekvenálni kívánt ssDNS-t apró darabokra hasítják, úgy, hogy „ragadós” végek keletkezzenek. Ezekhez adapter ligálódik. A mintát egy szekvenáló lemezre viszik fel, ahol az adapterrel komplementer oligonukleotidok (primerek) vannak kikötve. Ezután híd amplifikációs módszerrel sokszorozítják fel a DNS-t: a DNS még nem kötődött vége is hozzákapcsolódik egy oligonukleotidhoz, majd mellette új szál szintetizálódik. A két DNS szál ezután elválik egymástól, az egyik végük szabadabbá válik és hozzákötődik egy másik primerhez. Így növekszik tovább a közel 8 millió képződött cluster. A beépülő nukleotidokat fluoreszcens festékekkel jelölik. Az általuk emittált fényt képes egy speciális kamera rögzíteni (Metzker, 2009).

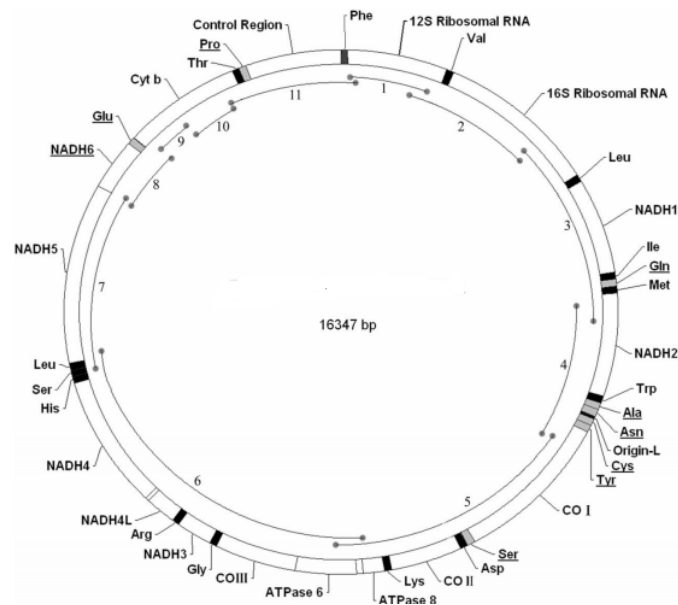
2.4 Mitokondrium, D-loop régió

Eukarióta sejtekben nukleáris genomjuk mellett megtalálhatóak extracelluláris DNS-ek is, amilyen a mitokondrium és – növényeknél – a kloroplasztisz. Emlősökben a mitokondrium kisméretű sejtszervecske, amely 10^3 - 10^4 számban fordul elő sejtenként (Szeberényi, 2004). Saját, körülbelül 16 kb hosszúságú cirkuláris, kettős szálú DNS-sel rendelkeznek, ezért képesek függetlenül öröklődni a sejtmagi DNS-től (Shao et al., 2014).

A mitokondriális DNS-t (mtDNS) gyakran alkalmazzák populációgenetikai vizsgálatokhoz. Hibajavító rendszere nem működik olyan hatékonyan, mert hiányzik belőle a kivágási javítás (excision repair) rendszer, amely a pont mutációk kijavításáért felelős. Ezért mutációs rátája egy nagyságrenddel nagyobb a sejtmagi DNS-énél. A mtDNS szekvencia mutációkkal együtt megmutatja az adott egyed haplotípusát. Ha két egyed azonos ponton azonos polimorfizmust

mutat, akkor azok egy haplotípusba tartoznak. Már egyetlen egyedben megjelent mutáció is rögzülhet egy populációban (Priskin, 2010). A mtDNS-ben nincs rekombináció, ezért feltételezhető, hogy az azonos típust mutató egyedek közös felmenőtől származnak. Szinte teljesen anyai ágon öröklődik, ezért egészen eltérő variabilitást mutat a sejtmagi DNS-től. (Weaver & Headrick, 2000).

A gímszarvas mitokondriális DNS-ének hossza körülbelül 16 350 bp, 22 transzfer RNS gént, 2 riboszómális RNS gént, 13 fehérje kódoló gént és egy nem kódoló szakaszt, a D-loop vagy más néven szabályozó régiót tartalmaz (3. ábra). A szabályozó régió mérete 900 bp körül mozog, a tRNS^{Phe} és a tRNS^{Pro} gén határolja (Shao et al., 2014). A replikációhoz és a transzkripcióhoz szükséges szabályozó szekvenciákat hordozza magában. (Fernández-Silva et al., 2003).



3.ábra A szarvasfélék mitokondriális DNS-e benne a D-loop (kontroll) régióval

(Forrás: Pang et. al, 2008)

A D-loop régiónak kiemelt fontossága van: a mtDNS-en belül a leginkább változatos szekvenciában és hosszban a különböző fajok és egyedek között (Fernández-Silva et al., 2003). Nagyfokú polimorfizmus figyelhető meg benne, ezért hipervariábilis régió (HVR: Hiper Variable Region) is nevezzük (Priskin, 2010), eme tulajdonságai miatt használható populációgenetikai vizsgálatokhoz.

2.5 DNS markerek, mikroszatelliták

A genetikai markerek olyan genom szakaszok, amelyek jellemzőit DNS, fehérje vagy fenotípus szinten vizsgáljuk. A genetikai markerek alkalmasak változatosság, eltérés keresésére és jellemzésére. Elméletben a genom minden pontját használhatnánk markerként, gyakorlatban azonban vannak megkötések, például a könnyű kimutatás és követhetőség. Ideálisnak akkor nevezhetünk egy DNS markert, ha nagyfokú változatosság (polimorfizmus) jellemzi, öröklődése kodomináns, gyakori és egyenletes eloszlást mutat a genomban (Hajósné, 1999).

A mikroszatelliták (STR: Short Tandem Repeats) 2-6 bázispárból álló egymás után elhelyezkedő szekvencia motívumok (Zalapa et al., 2012). Prokarióták és eukarióták örökítő anyagának kódoló és nem kódoló régióiban is megtalálhatóak (Zalapa et al., 2012, Yu et al., 2011). Több változatuk létezik attól függően, hogy hány bázis ismétlődik bennük, így elkülönítünk mono-, di-, tri- és tertranukleotidos mikroszatellitákat valamint penta- és hexanukleotidosakat (Jeong-Nam et al., 2011, Szabolcsi, 2013).

Számos populációgenetikai szempontból fontos pozitív tulajdonsággal rendelkezik: nagy számban fordulnak elő, lefedik a genom egészét, multiallélusak, kodomináns módon öröklődnek (Guohong et al., 2013), nagy polimorfizmust mutatnak hosszukban, könnyen genotipizálhatóak (Cavagnaro et al., 2010). Ezeknek az előnyöknek köszönhetően előszeretettel használják őket rokonsági, családi és demográfiai struktúrák vizsgálatára, továbbá lokális genetikai diverzitások megfigyelésére, valamint populációk közötti kapcsolat tanulmányozására (Cavagnaro et al., 2010, Guohong et al., 2013, Janowski et al., 2014, Szabolcsi et al., 2014).

Nagy előnyük továbbá, hogy primerpárok és polimeráz láncreakciós (PCR) eljárás segítségével könnyen detektálható hosszkülönbséget adnak (Thiel et al., 2003, Gilbert et al., 2006)

Az új generációs szekvenálási technikák által generált adatmennyiség és a számítástechnikai lehetőségek új alapot jelentenek a mikroszatellita markerek fejlesztésében (Jeong-Nam et al., 2011, Castoe et al., 2012 Zalapa et al., 2012, Guohong et al., 2013, Janowski et al., 2014)

3 A munka célja

A kutató csoport céljai:

Kutatásunk célja a gímszarvas populációk genetikai diverzitásának megismerése és felmérése - elsősorban Dél-Magyarországról származó minták segítségével - a mitokondriális DNS D-loop régió, valamint genomikai adatok alapján fejlesztett nemi kromoszómás (X-Y) mikroszatellita markerek felhasználásával.

A teljes gímszarvas genom szekvenálásának (2012 -2013) adatait felhasználva új, elsősorban XY kromoszómás mikroszatellita markereket fejlesztünk és multiplex PCR reakcióhoz optimalizáljuk őket. Ezek segítségével az XY kromoszómákat a gímszarvas leszármazási sorokban követni tudjuk.

Az autoszómás mikroszatellit (2010-2013) markerekkel a populációk diverzitását is felmérjük, és összehasonlítjuk az XY kromoszómás markerek eredményeivel.

A kutatáson belül az én feladatom:

Gímszarvas nemi kromoszómás multiplex PCR rendszer optimalizálása (Ce_XY3_KZS), és ennek a segítségével a dél-dunántúli gímszarvas minták vizsgálata.

- QDD programcsomag primereinek ellenőrzése
- Multiplex primerek kiválasztása
- DNS izolálás
- Multiplex PCR optimalizálás
- Dél-dunántúli gímszarvasok vizsgálata

4 Anyag és módszer

4.1 A vizsgált gímszarvas minták

A mintáink egyelőre Dél-Magyarországról származnak (4. ábra), amelyeket vadászok gyűjtöttek a munkánkhoz. Erre a célra speciális mintavételi csomagot készítettünk, amely egy kérdőívet tartalmazott az állatra vonatkozó kérdésekkel (nem, kor, becsült tömeg, becsült agancs méret, agancs minőség), valamint egy abszolút etanol tartalmazó Eppendorf-csövet. Ezekben körülbelül borsószem nagyságú hús vagy máj mintát kértünk, amelyek így hűtés nélkül is megőrzik a kísérlethez szükséges minőségüket.

Ezen kívül a bőszenfai vadaskert küldött számunkra mintákat az ott élő gímszarvas állományból. Bikákból vérmintákat, valamint tehenekből és borjakból származó szőrmintákat kaptunk.

Gemencről pedig hullott agancsot és kifőzött koponyát kaptunk egyedazonosítás céljából.

Az egyes területekről származó minták számát az 1. táblázat mutatja.



4. ábra A mintáink származási helye
(lilával jelölt)

1. táblázat A vizsgált állatok száma és származási helyük

Származási hely	Vizsgált állatok száma
Bőszénfa	7
Lábod	13
Vajszló	21
Gemenc	2

4.2 DNS izolálás

A szövetből, a vérből történő izolálást a Genomic DNA Mini Kittel (Genaid) végeztük a gyártó utasításai szerint.

A szőrmintáknál igyekeztünk hagymás szálakat választani és azokból végrehajtani az izolálást Genomic DNA Mini Kittel (Genaid) szintén a gyártó utasításai szerint.

A csontmintákból alacsony fordulatszámú fúrógéppel csontport készítettünk, amelyet folyékony nitrogénben tovább homogenizáltuk, majd a DNS izolálást a QIAamp DNA Investigator Kit-tel (Qiagen) végeztük, a gyártó utasításai szerint.

A DNS izolálás végeredményeként kapott DNS oldat koncentrációját Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg. A műszer UV/VIS tartományban működő spektrofotométer. Előnye, hogy 2 mikroliteres térfogat mennyiségből is képes abszorbanciát mérni, valamint már nagyon kis koncentrációt is képes meghatározni.

Azokat a mintákat tekintettük használhatónak, amelynek koncentrációja legalább 15 ng/μl és tisztasága (A260/280) 1,7 fölé esett. Ezen mintákat 15 ng/μl-re hígítottuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

4.3 Primer tervezés

A gímszarvas *de novo* genom szekvenálás eredményeként kapott contigokon és scaffoldokon Frank Krisztián doktorandusz a QDD program segítségével szűrte a primertervezéshez megfelelő mikroszatellita markereket. A contigok szekvenciájának ismerete segítségével kiválasztotta azokat, amelyek megfelelő hosszúságúak, nem tartalmazznak SNP-t, valamint a

termék mérete is megfelelő. Az így kapott mikroszatellita markerekkel repeat maskerrel ellenőrizte (<http://www.repeatmasker.org/>), szarvasmarha genomra BLAST-olta, majd a megfelelőkre primert tervezett a Primer 3 segítségével.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=O_GP_9913_10708 és <http://www.primer3.ut.ee/>)

A Frank Krisztián által tervezett primerek közül a Ce_XY3_KZS multiplex PCR reakcióhoz kiválasztottakat manuálisan ellenőriztem a Primer3 programban. Az oldalon beállított paraméterek a következők voltak: a PCR termék mérete 90 és 300 bp közé essen, a primer mérete 18 és 27 bp közé essen, de a legoptimálisabb, ha 20 bp hosszú. A primer optimális olvadási hőmérséklete 60°C-ra essen, de legalább 57°C, legfeljebb pedig 63°C legyen. Így manuálisan ellenőrizve is megkaptam a tervezett 8 primer párt a megfelelő értékekkel.

UCSC in silico PCR segítségével ellenőriztem, hogy a primerek szarvasmarha referencia genomon X, illetve Y kromoszómás találatot adjanak (<http://genome.ucsc.edu/>). Az in silico PCR lényege, hogy számítógépes eljárás segítségével képes modellezni egy PCR reakció kimenetelét. Ennek köszönhetően optimalizálja a primer tervezés két célját: a szelektivitást és a hatékonyságot.

4.4 Gímszarvas nemi kromoszómás multiplex mikroszatellita PCR

A polimeráz láncreakció működési elve, hogy a DNS egy meghatározott részéről a DNS polimeráz enzimmal másolat készül. A DNS két szálát hővel szeparálják és a tervezett primerek segítségével kiválasztják a felszaporítani kívánt egységeket. A kiválasztott részen mindkét szálról másolat készül. Ezt követően újra összeállnak az elválasztott részek a bázispárosodásnak megfelelően, a következő duplikációhoz ismét hővel kell kezelni a molekulát. Minden ciklus befejezése után megduplázódik a kiválasztott szakasz, így a kívánt szakaszt további vizsgálatokhoz szükséges koncentrációra tudjuk feldúsítani (Weaver & Hedrick, 2000).

A PCR összeméréséhez QIA Multiplex PCR Kit-et (Qiagen) használtunk, amit kifejezetten multiplex PCR-hez fejlesztettek, tartalmazza a reakcióhoz szükséges DNS polimerázt, puffert és dNTP-t is. További nagy előnye, hogy hot starttal működik, így szoba hőmérsékleten nem keletkeznek a detektálást nehezítő elemek.

A PCR reakciókhoz előzetesen összemértük az egy mikroszatellitához tartozó reverse és forward primereket, majd a felhasználni kívánt primerekből egy elegyet készítettünk, ami

nagyban meggyorsította a munkánkat. A PCR reakcióban az 2. táblázatban található receptet használtam.

2. táblázat A mikroszatellita PCR reakciókhoz használt recept

Reagens	Koncentráció	1 reakcióra (μl)
Templát	15 ng/ μl	2,00
Multiplex PCR Master Mix	2x	7,50
Ce_X008_KZ	10 μM	0,60
Ce_Y005_KZ	10 μM	0,60
Ce_Y004_KZ	10 μM	0,36
Ce_X002_KZ	10 μM	0,31
Ce_X007_KZ	10 μM	0,20
Ce_X006_KZ	10 μM	0,15
Ce_X001_KZ	10 μM	0,13
Ce_X003_KZ	10 μM	0,12
DV		3,01
Összesen		15,00

Az általunk használt PCR program protokollja a következő volt:

```

95°C 15:00    1x
94°C 0:30    }
60°C 1:30    } 29x
72°C 1:00    }
60°C 60:00    1x
  
```

4.5 Mitokondriális D-loop PCR

A mitokondrium D-loop régiójának vizsgálatához szakirodalomból vett primert (Skog et al., 2009) használtunk, az általuk összeállított recept és protokoll alapján, amely a 3. táblázatban látható.

3. táblázat A mitokondrium D-loop PCR reakciókhoz használt recept

Reagens	1 reakcióra (μl)
Templát	4,0
Multiplex PCR Master Mix	12,5
279F	0,5
279R	0,5
DV	7,5
Összesen	25,0

Az általunk használt PCR program protokollja a következő volt:

98°C 0:30	1x
98°C 0:10	} 35x
62,5°C 0:10	
72°C 2:00	
72°C 5:00	1x

4.6 PCR termékek detektálása

4.6.1 Gél elektroforézis

A kisméretű DNS molekulák mérete gél elektroforézissel elég jól becsülhető. Alapja, hogy a DNS negatív töltésű, a benne lévő foszfát gerinc miatt, ezért megfelelő közegben a pozitív töltés felé mozog. Polimer gélben a DNS molekulák méretüknek megfelelően mozdulnak el az elektromos erőternek köszönhetően. Megfelelő ideig végzett futtatás után a DNS-ek méretük szerint elrendeződnek a gélben. Ha fluoreszcens festékkel jelöljük meg a DNS-t, ultraibolya fény alatt láthatóvá válnak a DNS fragmentek (Weaver & Headrick, 2000).

A gél elektroforézishez használt 2%-os gél elkészítéséhez 1,8 g agarózt (Lonza) és 90 ml TBE-t (Duchefa Biochemie), valamint 90 μl etídium bromidot használtam.

Az etídium bromid be tud kötni a DNS két szála közé és fluoreszcens tulajdonsága miatt képes láthatóvá tenni azt, ha UV fénnel gerjesztjük.

A PCR termékből 5 μl-t adtunk 5 μl desztillált vízhez és 2 μl 6 x festékhez, majd felvittük a gélbe. Viszonyításként GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) molekula markersúlyt használtunk.

A gél képeket Chemi Doc™ MP Imaging System (Bio RAD) segítségével fényképeztük.

4.6.2 Fragment-analízis

A mikroszatellita markereinket fragment-analízis segítségével értékeltük ki, amelyet a Biomi Kft. készített el számunkra ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystem) segítségével.

A fluoreszcensen jelölt (pl. 6FAM, HEX) primerekkel végzett PCR-ek termékeit a gél elektroforézishez hasonlóan futtatják. Ennél az eljárásnál gél helyett kapillárist használnak. A mintán lézerfény halad át, ennek következtében a festék fluoreszkálni fog. Így a gyorsabban mozgó kisebb fragmenteket és a lassabban mozgó nagyobb fragmenteket egy (CCD) kamera érzékelni képes. A fluoreszcens információt elektronikus jellé alakítják, amiből további átalakításokkal elektroferogramot hoznak létre.

A kapott elektroferogramokat Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystem) segítségével értékeltük ki. Az elektroferogram csúcsának jellemzői közül a csúcs elhelyezkedése mutatja meg allél hosszúságát. Az allélhosszakat excel táblázatban rögzítettem, és a további elemzésekhez ezt a fájlt használtam.

4.6.3 Mitokondriális szekvenciák kiértékelése

Egy sejtben több mitokondrium is van, így nagyobb kópiaszámban található meg, mint a sejtmagi DNS, ezért rosszabb minőségű, régi vagy kezelt mintákból is könnyebb kinyerni. A mitokondriális DNS vizsgálatához szakirodalomból vett (Skog et al., 2009) primert használtunk, valamint PCR technikával szaporítottuk fel a számunkra szükséges D-loop régiót. Az így kapott 1014 bp hosszúságú terméket Sanger láncterminációs módszerrel szekvenáltattuk meg a Biomi Kft.-nél. A fragmentek szekvenciáit forward és reverse irányból is meghatározták. Eredményként nyers ab1 fájlokat kaptunk, amelyet a DNA Star 7.1-es programcsomag SeqMan programjával értékeltünk ki.

4.7 Populáció genetikai vizsgálatok

A mikroszatellita allél nagyságokat egyedenként rögzítettem, ez alapján populációnként allélgyakoriságokat számoltam. Az allélgyakoriságok alapján Shannon-diverzitást, a kromoszómás vonalak alapján haplotipikus diverzitást (Nei, 1978) számoltam. A diverzitásszámításokhoz GenAlEx v.6.5. programot használtam (Peakall & Samuse 2006, 2012). Továbbá az allélnagyságok alapján meghatározott egyedi genotípusokat főkoordináta analízissel és cluster analízissel értékelttem. A többváltozós módszerekhez PAST v2.17c programot használtam (Hammer et.al., 2001).

5 Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1 DNS izolálás

A DNS izolálás a szövet, szőr és vér esetén sikeres volt. A csontszövetből vett minták izolálása viszont nehézségekbe ütközött. A különböző kezeléseknek köszönhetően (hidrogén peroxid) a szövetben megtalálható DNS minősége romlott, a DNS nagyon széttöredezett, ennek következtében pedig nehezebben volt PCR-ezhető.

Néhány DNS nanodrop eredménye az alábbi táblázatban látható:

5. táblázat Az izolált gímszarvas DNS-ek koncentrációja és minősége

	ng/μl	260/280	260/230
1326	38,88	1,96	0,20
1327	72,08	1,99	0,36
C7006	57,27	1,73	1,20
C7058	147,03	1,88	1,48
1146	52,33	1,87	1,63
1148	60,06	1,78	0,59
1526	13,06	1,63	0,51
1544	10,10	2,03	0,83

A DNS izolálások eredményeként tiszta (260/280-as érték, ami 1,5 fölött megfelelőnek tekinthető), kellő koncentrációjú (15 ng/μl felett megfelelő) és alacsony só tartalmú mintákat kaptunk, amelyek alkalmasak voltak a további vizsgálatok elvégzéséhez.

5.2 Primer tervezés

A primer tervezés és informatikai tesztelés és válogatás végeredményeként tizennyolc primer párt kaptunk. A primereket fragment hosszúságuk szerint sorba rendeztük, majd két multiplex PCR reakcióba osztottuk őket. Ezek a Ce_XY2_WJ, amellyel szakdolgozó társam Wilhelm Júlia végezte kísérleteit, valamint a Ce_XY3_KZS amivel én dolgoztam tovább és ami jelen dolgozatom tárgyát képezi. Az elosztás végeredményeként nyolc primer került a Ce_XY3_KZS mutiplexbe.

A nyolc primerre az után különböző színeket terveztünk figyelembe véve, hogy azok a fragment-analízis során ne akadályozzák egymás detektálhatóságát. A használt jelölések: sárga (NED), kék (6-FAM), piros (PET) és zöld (VIC) volt. A primereket az Applied Biosystemtől rendeltük meg.

A beérkezett liofilizált primereket először desztillált vízben feloldottam, majd hígítottam és több, bika és tehén gímszarvas mintán teszteltük őket egyesével.

A 6. táblázatban látható a tizennyolc tervezett primer, a bázishosszúságukkal és a jelölésükkel együtt. A primerek szekvenciája még publikálás alatt áll, ezért én nem közöltem. A primerek neve végén látható monogram jelzi, hogy melyik multiplex plate-hez tartoznak.

6. táblázat A gímszarvas X, Y mikroszatellita primerek

STR	Chr	Jelölés	Szín	product size	Primer
Ce_X001_KZ	X	NED	sárga	160 bp	Ce_X001_KZ_NED_160 bp
Ce_X002_KZ	X	6-FAM	kék	102 bp	Ce_X002_KZ_6-FAM_102 bp
Ce_X001_WJ	X	PET	piros	210 bp	Ce_X001_WJ_PET_210 bp
Ce_X003_KZ	X	VIC	zöld	126 bp	Ce_X003_KZ_VIC_126 bp
Ce_X002_WJ	X	6-FAM	kék	115 bp	Ce_X002_WJ_6-FAM_115 bp
Ce_X003_WJ	X	NED	sárga	151 bp	Ce_X003_WJ_NED_151 bp
Ce_X004_WJ	X	PET	piros	201 bp	Ce_X004_WJ_PET_201 bp
Ce_X005_WJ	X	VIC	zöld	133 bp	Ce_X005_WJ_VIC_133 bp
Ce_X006_WJ	X	6-FAM	kék	223 bp	Ce_X006_WJ_6-FAM_223 bp
Ce_X006_KZ	X	NED	sárga	142 bp	Ce_X006_KZ_NED_142 bp
Ce_X007_WJ	X	PET	piros	100 bp	Ce_X007_WJ_PET_100 bp
Ce_X008_KZ	X	PET	piros	302 bp	Ce_X008_KZ_PET_302 bp
Ce_X007_KZ	X	VIC	zöld	230 bp	Ce_X007_KZ_VIC_230 bp
Ce_Y004_KZ	Y	6-FAM	kék	452 bp	Ce_Y004_KZ_6-FAM_452 bp
Ce_Y005_KZ	Y	NED	sárga	410 bp	Ce_Y005_KZ_NED_410 bp
Ce_Y008_WJ	Y	PET	piros	290 bp	Ce_Y008_WJ_PET_290 bp
Ce_Y009_WJ	Y	VIC	zöld	370 bp	Ce_Y009_WJ_VIC_370 bp

A KZ végződésűek az általam használt multiplexben lévő primerek

5.3 A gímszarvas XY mikroszatellita (Ce_XY3_KZS) multiplex PCR reakció optimalizálása

A primereket ezután multiplex PCR reakciókban is összemértem, vizsgálva ezzel, hogy zavarják-e egymást ilyen körülmények között. Már az első pár PCR eredménye is sikeresnek volt tekinthető, a primereim multiplex reakcióban összemérve is adtak terméket. Agaróz

gélben jól látható erős DNS fragmenteket kaptam, valamint a fragment analízis során is megkaptam a megfelelő csúcsokat.

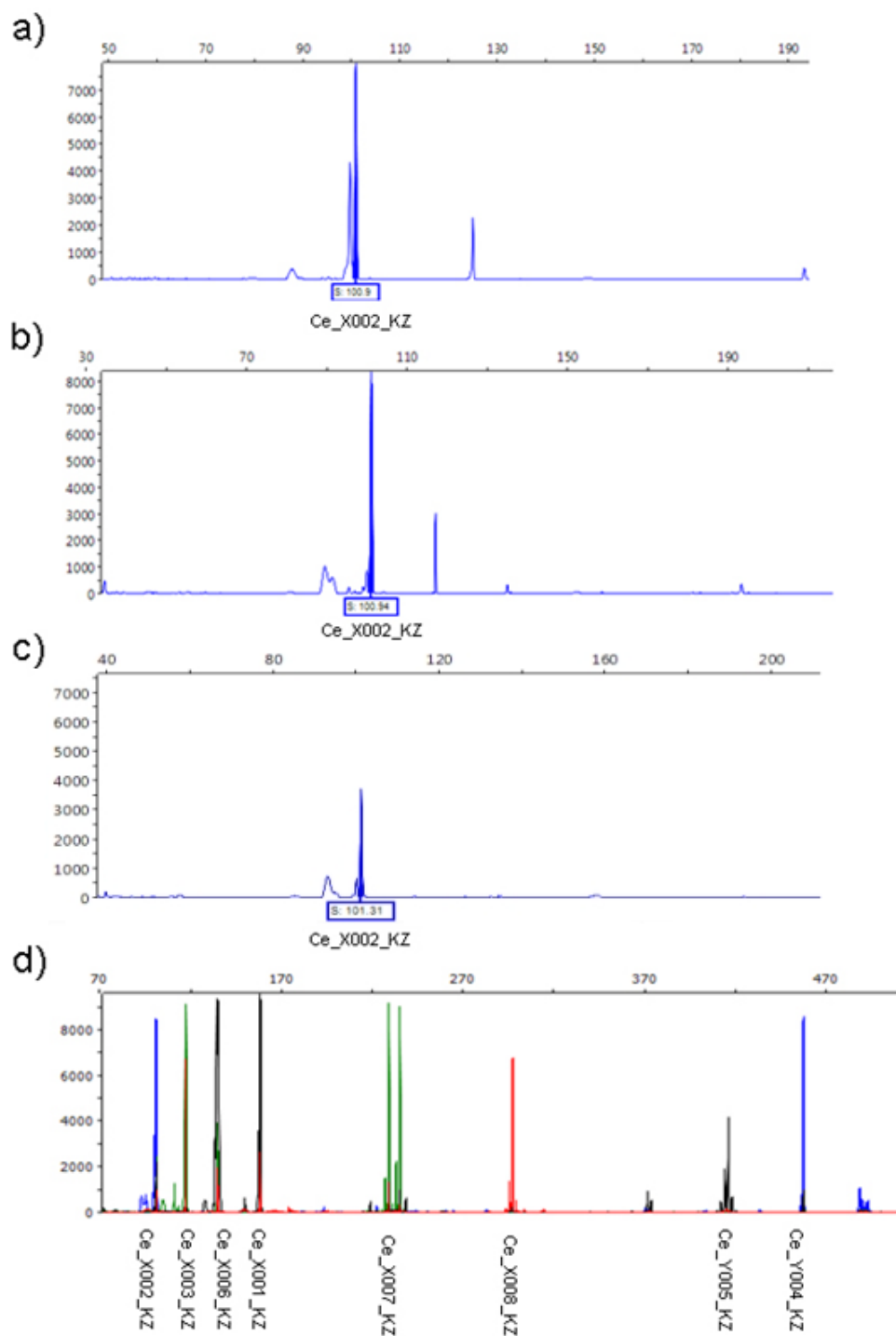
A csoport korábban is végzett PCR-es kísérleteket és az akkor szerzett tapasztalatokból kiindulva első lépésként az eredeti protokollban szereplő mennyiségeket a konzulensem tanácsára a felére csökkentettem - a végtérfogat és az enzim mennyiség szempontjából- (Qiagen- Kick start protocol: 25 µl Multiplex Master mix enzim, 10x primer mix 5 µl, végtérfogat 50 µl).

Ezután a kiértékelés megkönnyítésének érdekében elkezdtem változtatni a primer mennyiségeken (6. táblázat).

A primerek mennyiségének változtatását gél képek és elektroferogramok segítségével végeztem (7. táblázat). A túl magas csúcsokat csökkenteni akartam, a túl alacsonyakat pedig a zajtól való jobb megkülönböztethetőség érdekében közepes méretűre növelni.

7. táblázat A kísérlet során használt primer mennyiségek változása

Primer	Eredeti mennyiség (µl)	1. változtatás (µl)	2. változtatás (µl)	3. változtatás (µl)
Ce_X001_KZ	0,5	0,36	0,19	0,13
Ce_X002_KZ	0,5	0,42	0,31	0,31
Ce_X003_KZ	0,5	0,25	0,13	0,12
Ce_Y004_KZ	0,5	0,50	0,50	0,36
Ce_Y005_KZ	0,5	0,50	0,60	0,60
Ce_X006_KZ	0,5	0,60	0,20	0,15
Ce_X007_KZ	0,5	0,50	0,22	0,20
Ce_X008_KZ	0,5	0,25	0,55	0,60



5. ábra Különböző mennyiségű primerekkel végzett PCR eredményeként kapott elektroferogramok

a) Az eredeti mennyiségű primerek (0,5 µl); b) Első változtatás (0,42 µl); c) Második változtatás (0,31 µl); d) Teljes multiplex elektroferogram képe

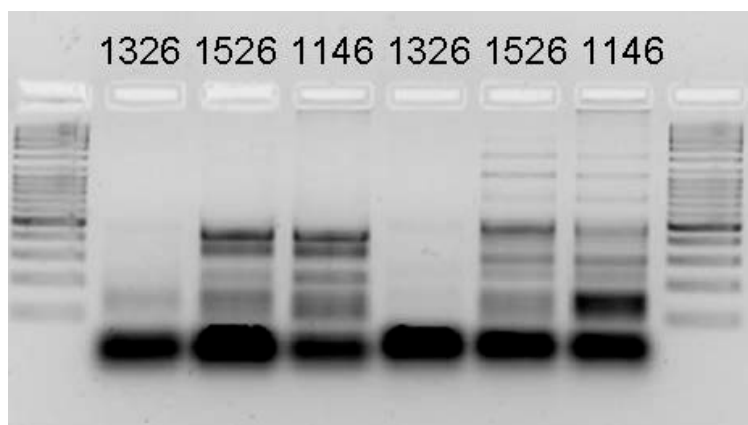
A 5. ábrán látható a Ce_X002_KZ primer optimalizálási folyamata (a-b-c kép), valamint az összes primer optimalizálásának végeredménye egy elektroferogramon. Bár a ferogramon van néhány zavaró csúcs, mégis a detektálni kívánt jelek jól megkülönböztethetőek a zajtól.

További lépésként a multiplex master mix mennyiségét tovább csökkentettem 7,5 µl-re. A PCR reakció végtérfogata így 15 µl lett, amelyet jelenlegi tudásunk szerint nem lehet tovább csökkenteni.

Az optimalizálási reakciót három mintán végeztem. Ebből kettő nagyon rossz minőségű (1326-os minta: c=38,88 ng/µl, 1526-os minta: c=13,06 ng/µl), egy viszont PCR reakcióhoz kiválóan használható volt (1146-os minta c=52,33 ng/µl). A munkámat tovább nehezítette, hogy a rossz minőségű mintákból viszonylag kis mennyiség állt rendelkezésemre. A reakció során a rossz minőségű DNS-ből készülő PCR-ek templát mennyiségét megnőveltem, a desztillált vizet pedig elhagytam a reakcióból. A megfelelő minőségű (koncentráció nagyobb, mint 15 ng/µl) mintákhoz. Az 5.4. fejezetben olvasható PCR protokoll-t használtam.

A PCR reakcióban létrejött termékeket agaróz gélben futtattam és még a legrosszabb minőségű és kevés mennyiségű DNS-ben is értékelhető jeleket kaptam, viszont a fragment analízis eredményei nem voltak megfelelően kiértékelhetőek.

A jó minőségű DNS agaróz gélben jól látszódott és az elektroferogramja is kiértékelhető volt (6.ábra).



**6.ábra Multiplex PCR reakciók optimalizálása
céljából végzett agaróz gélelektroforézis**

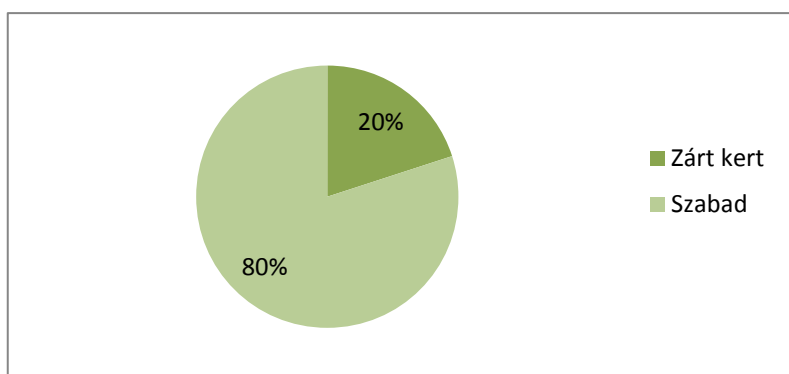
Az így módosított protokollt használtuk azután a legtöbb mintán, mivel azok koncentrációja 15 ng/μl fölött volt és így 7,5 μl-nyi enzimmel is detektálhatóak voltak.

Ezzel az enzim mennyiséget 70%-kal csökkentettük, ami azt jelenti, hogy egy 100 reakcióra méretezett multiplex kittel 300 reakciót tudunk összemérni.

5.4 Ce_XY3_KZS eredményei

5.4.1 Mikroszatellita polimorfizmusok

A Ce_XY3_KZS nemi kromoszómás mikroszatellita multiplex-szel 45 állatot vizsgáltam meg. A vizsgált állatok közül kettő tehén, negyvenhárom pedig bika volt. Tenyésztő kertből származó és vadon élő állatok mintái is szerepeltek a minta szettben, ezek százalékos megoszlását az alábbi ábra mutatja:



7.ábra A gímszarvas minták származási helyének százalékos megoszlása

A zártkerti minták között csupán néhány bika, valamint limitált számú tehén található meg. A minták alacsony száma hatással lehet a genetikai diverzitás mértékének becslésére, valamint ennél a populációnál a beltenyésztettség jelenléte is befolyásolhatja a kísérleti eredményeinket.

A mikroszatelliták vizsgálatát az egyes lókuszokon megtalálható allélek összeszámolásával kezdtem. A lókusz a DNS egy adott pontja; mikroszatelliták esetében az egyes lókuszok különbségeit a hosszkülönbségek jelentik, amelyek a tandem ismétlődések számának eltéréséből erednek. A mikroszatelliták kodominánsan öröklődnek, ezért alkalmasak populációgenetikai vizsgálatok végzésére, a populációkban megfigyelhető polimorfizmus pedig a különböző hosszúságú allélek jelenlétét jelenti.

Összehasonlítottam a Primer3 által tervezett PCR termékek méretét a ténylegesen detektált mérettel (8. táblázat). Ezek eltérései abból származhatnak, hogy a genom összerakás során az

ismétlődő motívumok problémát okozhatnak, emiatt a keletkező termék hosszmeghatározása kissé pontatlan.

8. táblázat A tervezett és detektált fragment hosszak

Primer név	Primer3 által prediktált allél méretek	Genom szekvenált állat allél méretei	Detektált allél méretek
Ce_X001_KZ	160 bp	158 bp	150,152,158, 160 bp
Ce_X002_KZ	102 bp	101 bp	101 bp
Ce_X003_KZ	126 bp	125 bp	115,117,121, 125,127 bp
Ce_Y004_KZ	457 bp	457 bp	457 bp
Ce_Y005_KZ	410 bp	416 bp	416, 418 bp
Ce_X006_KZ	142 bp	136 bp	132,134,136 bp
Ce_X007_KZ	230 bp	231 bp	225,229, 231, 233, 235 bp
Ce_X008_KZ	302 bp	295 bp	295,297,299 bp

9. táblázat A detektált allélek száma

PRM	Chr	n	N _A
Ce_X001_KZ	X	45	4
Ce_X002_KZ	X	45	1
Ce_X003_KZ	X	45	5
Ce_Y004_KZ	Y	43	1
Ce_Y005_KZ	Y	43	2
Ce_X006_KZ	X	45	3
Ce_X007_KZ	X	45	5
Ce_X008_KZ	X	45	3

A PCR termékek méretét mutató elektroferogramok kiértékelése során egy táblázatban vezettem a kapott allélek nagyságát. Ez alapján számoltam azután össze az egyes

primerpárokhoz tartozó allél variációkat. Ezt összesítve a 9. táblázatot kaptam, ahol a PRM a primer nevét jelenti, a Chr a kromoszóma lokalizációt, n a levizsgált egyedek számát, az N_A pedig a detektált allélek számát jelenti. Az allélek száma alapján sikerült viszonylag polimorf mikroszatellitákat kiválogatni a multiplex reakcióhoz, ezek populációgenetikai vizsgálatokhoz, leszármazási vonalak azonosításához megfelelőnek tűnnek.

5.4.2 Populáció genetika: X és Y kromoszómás vonalak

Mivel a nemi kromoszómák nagy része nem rekombinálódik, ezért az arra a szakaszra eső szekvenciákat változatlanul adják át a szülők az utódoknak. Ezért a mikroszatellita allélek alapján az állatokat X kromoszómás vonalakhoz tudtam rendelni. Akkor tartozik két állat egy kromoszómás vonalhoz, ha minden mikroszatellita lókuszon ugyanolyan hosszúságú allélt hordoz. Ha pedig legalább egy lókuszon különböző hosszúságú allélek vannak, akkor különböző vonalakhoz tartoznak.

Az X kromoszómás markerekkel 27 vonalat sikerült elkülönítenem, amelyek közül sok az unikális (egy egyed tartalmazó) vonal. Ez a kis minta számnak is tulajdonítható, de már így is magas diverzitást jelent (10. táblázat). Az Y kromoszómás mikroszatellita markerek eredményét nem dolgoztam fel, mivel csak egy polimorf mikroszatellitát találtam ezen is csak két különböző allél volt megtalálható, ami nem tesz lehetővé megfelelő felbontást.

10. táblázat A mikroszatellita allélek alapján létrehozott X kromoszómás vonalak

	Ce_X002_KZ	Ce_X003_KZ	Ce_X006_KZ	Ce_X001_KZ	Ce_X007_KZ	Ce_X008_KZ	n
Ce_chrX_01	101	115	136	158	229	299	1
Ce_chrX_02	101	117	134	150	229	297	1
Ce_chrX_03	101	117	134	158	229	295	1
Ce_chrX_04	101	117	134	158	229	297	2
Ce_chrX_05	101	117	134	158	231	295	3
Ce_chrX_06	101	117	134	158	231	297	3
Ce_chrX_07	101	117	134	158	233	297	1
Ce_chrX_08	101	117	134	158	235	297	3
Ce_chrX_09	101	117	136	158	231	297	1
Ce_chrX_10	101	117	136	158	231	299	1
Ce_chrX_11	101	117	136	158	235	297	2
Ce_chrX_12	101	121	134	158	231	297	2
Ce_chrX_13	101	121	136	158	235	295	1
Ce_chrX_14	101	125	134	150	231	297	2
Ce_chrX_15	101	125	134	158	225	297	1
Ce_chrX_16	101	125	134	158	225	299	1
Ce_chrX_17	101	125	134	158	229	295	1
Ce_chrX_18	101	125	134	158	229	297	1
Ce_chrX_19	101	125	134	158	231	295	4
Ce_chrX_20	101	125	134	158	231	297	3
Ce_chrX_21	101	125	134	158	231	299	1
Ce_chrX_22	101	125	134	158	233	297	1
Ce_chrX_23	101	125	134	160	229	295	1
Ce_chrX_24	101	125	136	158	231	297	1
Ce_chrX_25	101	125	136	158	233	297	1
Ce_chrX_26	101	127	134	158	229	295	1
Ce_chrX_27	101		132	152	231	297	1

n: a haplotípusba sorolt egyedek számát jelenti

A leggyakoribb haplotípus a Ce_chrX_19 volt, amelybe négy egyed tartozik, emellett a Ce_chrX_20, a Ce_chrX_5, Ce_chrX_6, Ce_chrX_8 amikbe 3-3 egyedet soroltam.

Populációnként összeválogatva az X kromoszómás vonalakat, a haplotípus gyakoriságokat az a 11. táblázatban rögzítettem.

A táblázatban az egyes területekről származó minták haplotípusai láthatóak. Az n oszlop megmutatja, hogy az adott területről vagy élőhelyről hány állat található meg a minta szettemben. Az egyes haplotípusok alatt számmal jelöltem, hogy az adott terület hány egyede esik abba az X kromoszómás vonalba.

11. táblázat Az egyes haplotípusokba tartozó egyedek száma populációnként

	Lábod	Vajszló	Gemenc	Bószénfa	Szabad	Zárt
N	21	13	2	7	36	7
Ce_chrX_01		1			1	
Ce_chrX_02		1			1	
Ce_chrX_03				1		1
Ce_chrX_04	2				2	
Ce_chrX_05	3				3	
Ce_chrX_06	3				3	
Ce_chrX_07		1			1	
Ce_chrX_08		1		2	1	2
Ce_chrX_09			1	1		1
Ce_chrX_10	1				1	
Ce_chrX_11		2			2	
Ce_chrX_12		1			2	
Ce_chrX_13		1			1	
Ce_chrX_14	2		1		2	
Ce_chrX_15	1				1	
Ce_chrX_16		1			1	
Ce_chrX_17		1			1	
Ce_chrX_18	1				1	
Ce_chrX_19	2			1	3	1
Ce_chrX_20	2			1	2	1
Ce_chrX_21	1				1	
Ce_chrX_22	1				1	
Ce_chrX_23	1				1	
Ce_chrX_24		1			1	
Ce_chrX_25		1			1	
Ce_chrX_26	1				1	
Ce_chrX_27				1		1

A legtöbb haplotípus esetén csak egy populáció egyedei tartoznak adott vonalba, azonban van öt olyan haplotípus is, amely több populációban fordul elő. Az unikális (csak egy populációban előforduló) haplotípusok magas diverzitásra utalnak. Valamint a leszármazási vonalak követésénél is jó elválasztást tesznek lehetővé.

Az egyes haplotípusokba tartozó egyedek alapján haplotípus gyakoriságokat számoltam a populációkra. A gyakoriságokból Nei féle haplotipikus diverzitást (Nei, 1978) számoltam az alábbi képlettel:

$$D = \frac{n}{(n-1)(1 - \sum p_i^2)}$$

Ahol n az egyed szám, p_i az i -edik haplotípus frekvenciája, a D pedig a diverzitást jelenti.

A képlet figyelembe veszi, ha az egyes populációkban különböző a minta szám, ami nyilvánvalóan befolyásolja a diverzitásra kapott értékeket. Így a kis mintaszámok felfelé torzítják a diverzitás indexet.

A számolt haplotípus gyakoriságokat a 12. táblázatban rögzítettem, ahol az n az egyed számot, a D pedig az egyedek számával történő korrigált diverzitást jelenti. A kapott diverzitás értékek alapján következtetni tudtam az egyes populációk genetikai változatosságára. Ezek alapján a leginkább diverz populáció a vajszlói volt, a gemenci populáció pedig az alacsony mintaszám miatt nem volt kiértékelhető. Emellett az is látszik, hogy a szabad állatok diverzitása nagyobb, mint a zártaké, ám nem túl nagymértékben. Ennek oka a kis minta szám, ami felfelé torzítja a diverzitás indexet, de a tenyésztés miatt a populációban nő a beltenyésztettség, amelynek hatását nagyobb mintaszám esetén ki tudnánk mutatni.

12. táblázat Haplotípus gyakoriságok és diverzitások populációnként

	Lábod	Vajszló	Gemenc	Bószénfa	Szabad	Zárt
N	21	13	2	7	36	7
Ce_chrX_01		0,077			0,028	
Ce_chrX_02		0,077			0,028	
Ce_chrX_03				0,143		0,143
Ce_chrX_04	0,095				0,056	
Ce_chrX_05	0,143				0,083	
Ce_chrX_06	0,143				0,083	
Ce_chrX_07		0,077			0,028	
Ce_chrX_08		0,077		0,286	0,028	0,286
Ce_chrX_09			0,5	0,143		0,143
Ce_chrX_10	0,048				0,028	
Ce_chrX_11		0,154			0,056	
Ce_chrX_12		0,077			0,056	
Ce_chrX_13		0,077			0,028	
Ce_chrX_14	0,095		0,5		0,056	
Ce_chrX_15	0,048				0,028	
Ce_chrX_16		0,077			0,028	
Ce_chrX_17		0,077			0,028	
Ce_chrX_18	0,048				0,028	
Ce_chrX_19	0,095			0,143	0,083	0,143
Ce_chrX_20	0,095			0,143	0,056	0,143
Ce_chrX_21	0,048				0,028	
Ce_chrX_22	0,048				0,028	
Ce_chrX_23	0,048				0,028	
Ce_chrX_24		0,077			0,028	
Ce_chrX_25		0,077			0,028	
Ce_chrX_26	0,048				0,028	
Ce_chrX_27				0,143		0,143
D	0,9619	1,0064	-	0,9762	0,9833	0,9762

Shannon-féle diverzitási indexet az alábbi egyenlettel lehet számolni:

$$H = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} p_i \log_e p_i$$

ahol a p_i az i -dik allél gyakoriságát jelenti, a H pedig a diverzitást.

Ugyanezzel az index-szel Frank Krisztián doktorandusz számolta Szabolcsi Zoltán által fejlesztetett autoszómás mikroszatellita markerek (Szabolcsi, 2013) diverzitás értékeit ezen egyedeken. Ennek eredményeit az alábbi táblázat mutatja:

13. táblázat Az X kromoszómás és autoszómás markerek Shannon-féle diverzitás értékei

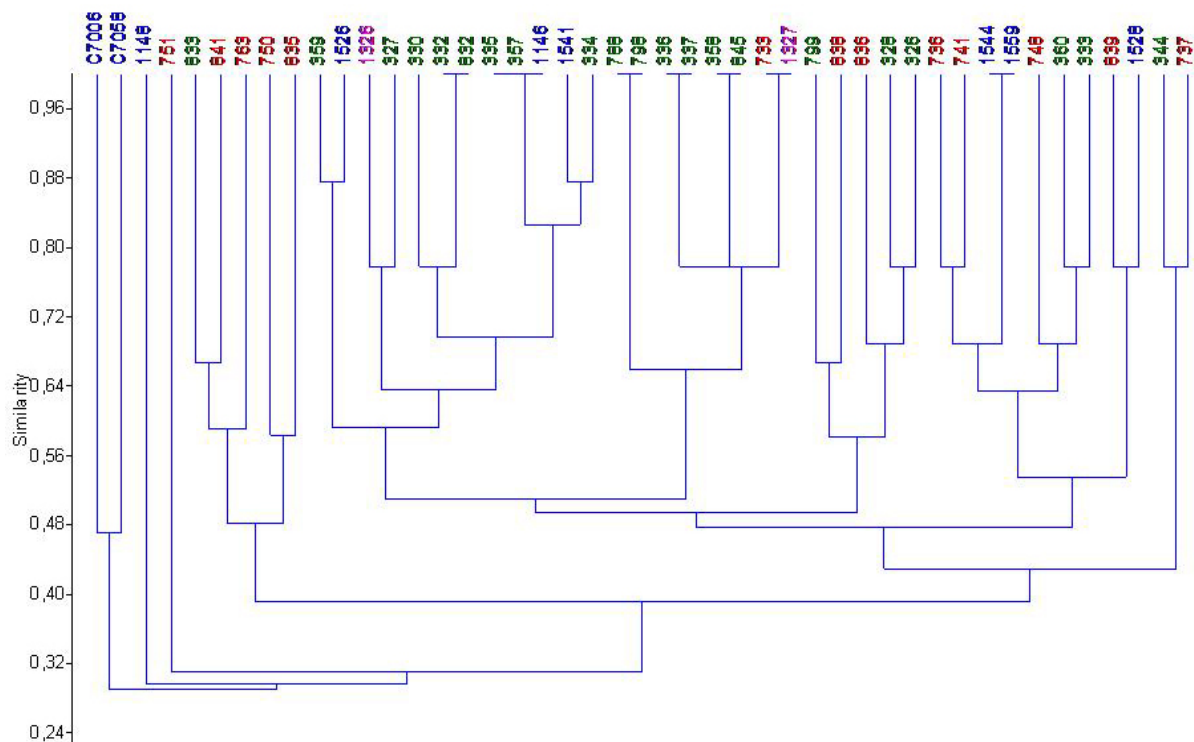
Származási hely	X kromoszómás markerek H értéke	Autoszómás markerek H értéke
Lábod	0,528	1,911
Vajszló	0,757	1,960
Bőszénfa	0,566	1,601
Gemenc	a	a
Szabad	0,709	2,054
Zárt	0,566	1,601

a: alacsony mintaszám miatt nem számolt

Az autoszómás markerek a nemi kromoszómás eredményekhez hasonló eredményt adnak. Ennél a vizsgálatnál markánsabban látszik a szabad és a zárt populációk közötti diverzitás különbség, amelynek oka lehet a tenyésztett populáció magasabb beltenyésztettsége. Az autoszómás markerek alapján is a vajszlói populáció bizonyult a leginkább diverznek, de a lábodi populáció csak kis mértékben marad el ettől. A bőszénfai állatok diverzitása mind autoszómás, mind nemi kromoszómás markerekkel alacsonynak mutatkozik, amelynek oka lehet a beltenyésztettség is.

A cluster analízis egy többváltozós statisztikai módszer, lényege, hogy az egyes vizsgált objektumokat (gímszarvas egyedeket) valamilyen módon osztályozni tudjuk – mi itt a haplotípusok, allél gyakoriságok alapján tettük. A hierarchikus klaszterezés során először minden egyedet külön klaszternek (csoportnak) tekintünk, majd lépésenként vonjuk őket össze az egymáshoz legközelebb állókkal kezdve. Ezen összevonások grafikai megjelenítése a dendrogram.

A 8. ábrán látható a cluster analízis eredményeként kapott dendrogram, amelyen zöld színnel vannak jelölve a lábodi állatok, pirossal a vajszlóiak, késsel a bőszénfaiak és lilával a gemenciek.

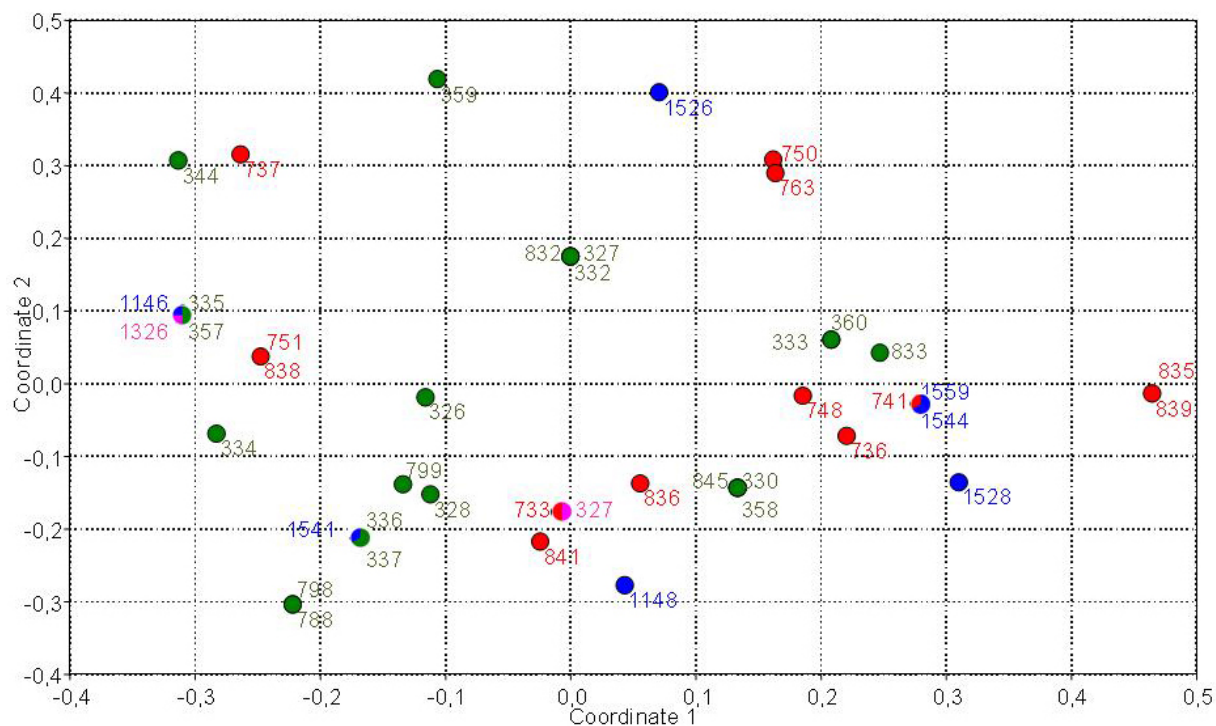


8. ábra. Dendrogram a nemi kromoszómás markerek alapján

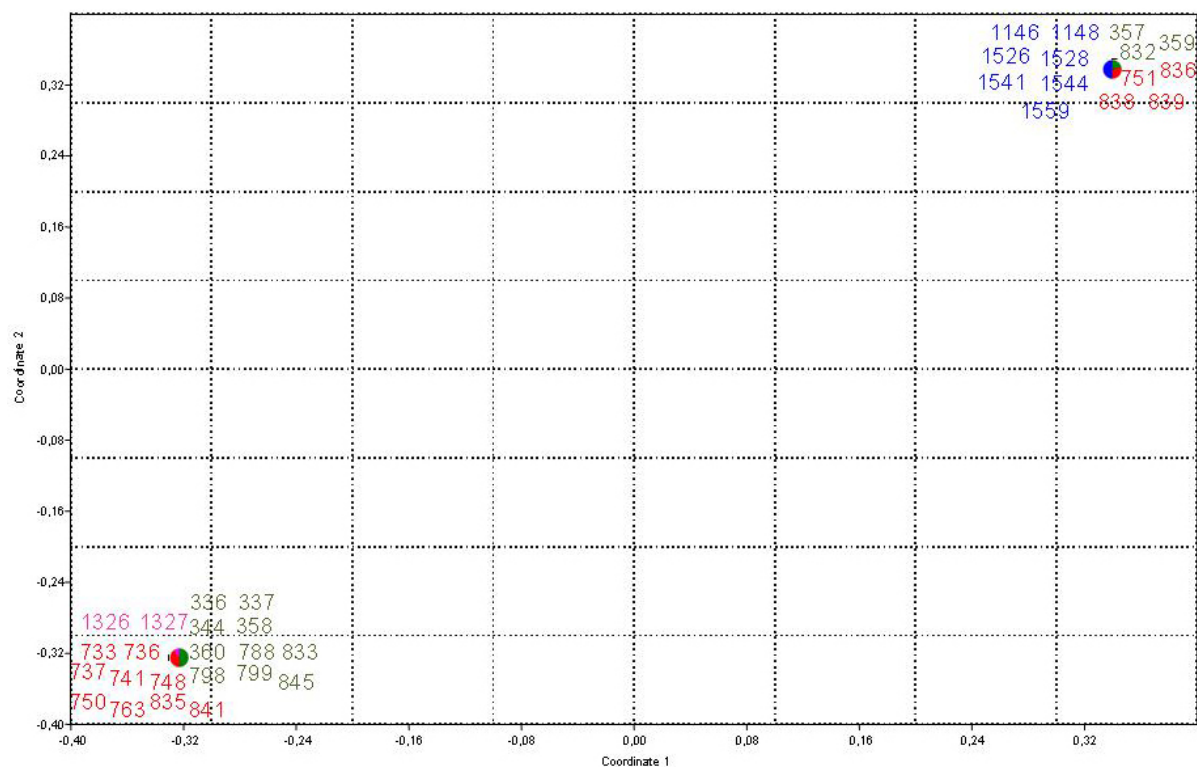
A dendrogramon nem válnak el jól az egyes populációk, amelynek oka a sok unikális haplotípus lehet. A két tehén jól elkülönül a bikáktól, amelynek oka az eltérő kromoszóma készletük.

A főkoordináta analízis szintén többváltozós statisztikai módszer, lényege, hogy rész információkat igyekszünk összegezni, úgyhogy, a lehető legkisebb legyen az információvesztés. A mi esetünkben az egyes egyedekre jellemző allélek alapján próbálja a program csoportokba rendezni az egyedeket. A módszer segítségével megállapítható, hogy egyes populációk az allélek jellemzői alapján mennyire különülnek el egymástól.

A főkomponens analízist külön végeztem az X kromoszómás, valamint az Y kromoszómás markerekre. Ennek vizuális megjelenítése látható a 9. és 10. ábrán, amelyeken zöld színnel vannak jelölve a lábodi állatok, pirossal a vajszlóiak, késsel a bőszenfaiak és lilával a gemenciek.



9. ábra Főkoordináta analízis (PCoA) az X kromoszómás mikroszatelliták alapján



10. ábra Főkoordináta analízis (PCoA) az Y kromoszómás mikroszatelliták alapján

A főkoordináta analízis eredményeként is megkaptuk a 27 X kromoszómás, valamint a 2 Y kromoszómás vonalat. Sem az X kromoszómás, sem az Y kromoszómás markerek alapján nem különülnek el egymástól a populációk. Ennek oka X kromoszóma esetén az unikális haplotípusok magas száma lehet, ami miatt sok egyedet dob szét a program. Az Y kromoszómás markerek esetén csak két haplotípust sikerült elkülöníteni, a markerek alacsony polimorfizmusa miatt. Érdekes, hogy a bőszenfai egyedek mind egy haplotípusba esnek.

5.4.3 Mikroszatellita marker közelébe eső QTL régiók

A QTL-ek (Quantitative Trait Locus) olyan régiók a genomban, amelyek valamilyen mennyiségi jellegű tulajdonság kialakításában vesznek részt. Ilyen kvantitatív jelleg lehet például a testmagasság, testtömeg, alak (Weaver & Headrick, 2000).

A szarvasmarha genom nyilvánosan elérhető QTL adatbázisában kerestem meg a primerek kromoszóma lokalizációját (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/browse>). A szarvasmarha X kromoszómán 37 QTL régió található meg, ebből a Ce_X003_KZ két QTL régióba is beleesik. Az egyik kromoszóma lokációja Chr. X 5276122-44087629 bp, QTL megnevezése „Zinc content”, a másik pedig Chr. X 7042383-44087629 bp, „Longissimus musle area”. Mind a két régió élelmiszeripari szempontokból fontos lehet, mivel a vad húsokat (köztük a gímszarvas húsát is) egyre nagyobb előszeretettel fogyasztják (nemrég a közétkeztetésbe is bevezették). A cink fontos ásványi anyag, amely különböző húsokban eleve magas koncentrációban van jelen, emellett a felszívódási arányuk is egészen jó. A „Longissimus musle area” a karajt (széles hátizmot) jelenti, ami a szarvasmarhán egy közkedvelt és sokszor fogyasztott rész (11. ábra 2-es számmal jelölt rész).



11. ábra A gímszarvas húsrészei

(1: lapocka, 2: karaj, 3: comb, 4: has, 5: nyak)

(Forrás: <http://www.internationalstyles.net/recipes/meat-cutting/deer-cutting.htm>)

Ha élelmiszeriparban akarjuk alkalmazni a QTL régiók ismeretét, akkor lehetőség nyílik olyan egyed szintű genetikai vizsgálatokra, amely fényt derít az egyes egyedek pozitív tulajdonságaira (például magas tejhozam), amely után megfelelő szaporítási eljárásokkal a tulajdonság tovább öröközhető.

5.5 Koponya és agancs megfeleltetés

Munkám során lehetőség adódott általunk nem ismert mintán a mitokondrium D-loop primer tesztelésére. A labor megbízást kapott egy Gemencről származó gímszarvas koponya és agancsok vizsgálatára, hogy megállapítsuk, egy egyedtől származnak-e. Ha ez nem igaz, az esetben az egyedek állnak-e bármilyen rokoni kapcsolatban. Emellett a kérdés az volt, hogy úgy vegyünk mintát, hogy az agancs és a koponya összeillesztése után látható sérülés ne maradjon rajtuk.

A koponyát hidrogén peroxidos kifőzés után kaptuk meg, ezért egy hátsó őrlő fog belsejéből vettünk mintát, valamint az agancs rózsát is megfűrtük. Emellett mindkét agancs koponyához csatlakozó végéből vettünk mintákat. Mindezt steril, alacsony fordulatszámú fúróval végeztük.

A mintát analitikai mérlegen mértük meg, majd folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban finom csontporrá őröltük. A veszteség meghatározása érdekében a mintát a nitrogén elpárolgása után újra megmértük.

A DNS izolálást QIAamp DNA Investigator Kit-tel (Qiagen) végeztük a gyártó utasításai alapján.

Az egyed azonosítást Szabolcsi Zoltán által fejlesztett autoszómás mikroszatellita markerekkel végeztük (Szabolcsi et al., 2014). A „DeerPlex” tévesztési valószínűsége $2,67 \cdot 10^{-15}$, ezért az ezzel elvégzett PCR eredménye alapján biztosan állítható, hogy a koponya és az agancsok nem egy egyedtől származnak, viszont az agancs egy párt alkot. A mikroszatellita allélnagyságokat 14. táblázatban összegeztem. A táblázatban jól látszik, hogy a két agancsszár allél nagyságai pontosan megegyeznek, míg az agancs esetében eltérő nagyságú alléleket is detektáltunk.

14. táblázat Detektált mikroszatellita allél méretek gemenci koponya és agancs mintákon „DeerPlex” (Szabolcsi et al., 2014) segítségével

	C229	T26	T193	T108	T123	T501	T172	T156	C01	T507
koponya	111 111	164 180	150 166	129 129	125 121	168 168	128 124	145 128	209 209	195 220
jobb agancs	107 111	146 180	141 182	129 133	113 121	153 156	128 136	121 128	207 211	197 201
bal agancs	107 111	146 180	141 182	129 133	113 121	153 156	128 136	121 128	207 211	197 201

Ezek után a minták mitokondriális D-loop régióját vizsgáltuk, abból a célból, hogy két egyed anyai rokonsági kapcsolatban áll-e. Ehhez a 5.4. fejezetben leírt receptet és protokollt használtam. A szekvenciák között jelentős eltérés volt tapasztalható, amely az alábbi ábrán szemléltetett:

Species/Abbrv	Gr	*	***	**	***	*	*	*	*	*	*	*
1. Ce_koponya		C	A	C	C	A	C	A	A	A	A	T
2. Cejobb agancs		G	C	C	A	T	T	A	A	C	T	A
3. Ce_bal agancs		G	C	C	A	T	T	A	A	C	T	A

12.ábra A koponya (felső sor) és az agancsok (jobb-középső sor, bal-alsó sor) D-loop szekvencia részletei az eltérések bemutatására

A koponya egy Skog és munkatársai (2009) által már leírt haplotípusba, a CA5 nevű mitokondriális haplotípusba tartozik, míg az agancsok egy eddig ismeretlenbe. Ez azt támasztja alá, hogy az egyedek anyai ágon nem álltak rokoni kapcsolatban.

A mintákat a Ce_XY3_KZS multiplex-szel is megvizsgáltam, hogy az X kromoszómás markerek is hasonló eredményt adnak-e, valamint, hogy Y kromoszómán adódik-e köztük különbség. Az eredmény, ami a 15. táblázatban látható, alátámasztotta a korábbi vizsgálatot, miszerint a koponya és az agancs nem egy anyai vonalhoz tartoznak. Viszont az Y kromoszómás markerek esetében ugyanazokat az alléleket hordozták az állatok, ami alapján egy apai ághoz tartoznának, de a markerek kis száma és alacsony polimorfizmusa miatt nem jelenthető ki biztosan.

15. táblázat A gemenci koponya és agancsok vizsgálatánál Ce_XY3_KZS multiplex-szel kapott mikroszatellita allélek

	Ce_X001_KZ	Ce_X002_KZ	Ce_X003_KZ	Ce_Y004_KZ	Ce_Y005_KZ	Ce_X006_KZ	Ce_X007_KZ	Ce_X008_KZ
koponya	158	101	125	457	418	134	231	295
jobb agancs	158	101	121	457	418	134	231	297
bal agancs	158	101	121	457	418	134	231	297

6 Összefoglalás

A gímszarvas genetikai és genomikai kutatások lehetővé teszik a gímszarvas élettani és populációgenetikai megismerését. A genom ismerete számos humán orvosi (csontfejlődés, osteoporózis) és mezőgazdaságilag fontos populációgenetikai vizsgálat alapját képezi.

A gímszarvas genom szekvenciák lehetővé tették, hogy genomi szinten tudtunk mikroszatellita markereket azonosítani. Jelen dolgozat célját sikerült megvalósítani, olyan nemi kromoszómás mikroszatellita markereket tudtunk fejleszteni, amelyek a későbbiekben lehetővé teszik a magyar gímszarvas állomány genetikai diverzitásának felmérését.

A marker fejlesztés első lépéseként genom adatokból szűrt mikroszatellita markereket ellenőriztük, majd a kiválasztott lokuszokra primereket terveztünk. A tervezett 18 primert két multiplex PCR reakcióra osztottuk, úgy hogy szakdolgozó társam markerszettjébe (Ce_XY2_WJ) és az általam fejlesztett multiplexbe (Ce_XY3_KZS) is 8-8 primer pár került. A Ce_XY3_KZS primerekre eltérő jelöléseket terveztem, hogy azok a multiplex reakció során ne zavarják egymás detektálhatóságát.

Ezzel párhuzamosan vérből, szövetből, szőrből és csontból izoláltam DNS-t, a PCR vizsgálatokhoz. Ezek eredményei sikeresnek tekinthetők, mind koncentráció mind tisztaság szempontjából megfelelőek voltak a további felhasználáshoz.

A multiplex reakciókban optimalizáltam a primer és a felhasznált enzim mennyiségét; a primerek optimalizálását elektroferogramok és gél képek segítségével végeztem. A cél a csúcsok zajtól történő jó elkülöníthetősége, valamint a könnyen értékelhető elektroferogramok elérése volt. Az enzim mennyiséget három lépésben sikerült optimalizálni, a 2× multiplex master mix mennyiségét először 25 µl-ről, 15-re, majd 7,5-re csökkentettem. Ennek eredményeként egységnyi mennyiségű enzimmel háromszor több reakciót tudunk elvégezni. A multiplex reakciók optimalizálásának eredményeként egy egyszerű, költséghatékony vizsgálati módszert sikerült létrehoznom.

Az általam fejlesztett Ce_XY_KZS X és Y kromoszómás mikroszatellita markerszett segítségével ez idáig 45 állatot vizsgáltam meg az ország dél-dunántúli területeiről. Ennek eredményeként 27 X kromoszómás anyai vonalat sikerült elkülönítenem, amely segítségével az egyes populációkat (Böszénfa, Lábod, Vajszló, Gemenc) diverzitásuk szempontjából értékelni tudtam. Az Y kromoszómás mikroszatellita lokuszok alacsony száma és polimorfizmusa miatt csak két Y kromoszómás vonal elkülönítésére adtak lehetőséget, de

további mikroszatellitákkal bővítve a markerszettet jobb felbontás érhető el. A populációk diverzitását Nei- és Shannon-indexekkel határoztam meg. A diverzitási eredmények alapján a leginkább sokszínű állománynak a vajlszlói bizonyult. A Shannon-diverzitást megvizsgáltuk autoszómás markerek esetén is, amely eredmények nagyrészt megfeleltek a nemi kromoszómás markerek eredményeink. Főkoordináta és klaszter analízist végeztem, amely alátámasztotta a 27 X kromoszómás és a 2 Y kromoszómás vonal meglétét, de még nem alkalmas populációk teljes elkülönítésére. Nagyobb markerszettel egy nagyobb számú mintán végzett vizsgálat esetén reményeink szerint erre is alkalmas lehet.

A gímszarvas mikroszatellitek szarvasmarha ortológjainak vizsgálatakor találtam olyan markert (Ce_X003_KZ), amely a nyilvánosan elérhető szarvasmarha QTL adatbázis alapján két gazdaságilag és élelmiszeripari szempontból fontos régióba is beleesett. Egyik a karaj méretéért, másik a hús cink tartalmáért felelős régió volt.

Lehetőségem adódott a markereim gyakorlati felhasználására is, amikor egy gímszarvas koponya és hullott agancsszárak egyedazonosítása, illetve rokoni kapcsolatának megállapítása volt a cél. Az egyedazonosításhoz autoszómás és nemi kromoszómás markereket is használtam, az anyai ág vizsgálatához pedig Skog és munkatársai által leírt mitokondriális primereket. A vizsgálatok során bebizonyítottam, hogy az agancsszárak egy párt alkotnak, a koponya viszont más egyedtől származik. A koponya és az agancs között anyai rokonság nincs, viszont eddigi ismereteink alapján feltételezhetően egy apai vonalhoz tartoznak.

További célként a hazai gímszarvas állomány genetikai diverzitását szeretnénk felmérni, különös tekintettel a zempléni és gemenci gímszarvas populációkra, autoszómás illetve nemi kromoszómás mikroszatellita markerekkel. Vizsgálatainkat tovább folytatjuk Zemplénből (Észak-Magyarország) származó gímszarvas minták bevonásával, valamint a déli minták (Gemenc) bővítésével. Emellett mitokondriális D-loop szekvencia vizsgálatokat is végzünk, hogy haplotípusokba tudjuk sorolni az állatokat. A kapott haplotípusokat azután további alcsoportokra bontanánk a mikroszatellita markereinkkel a jobb elkülöníthetőség érdekében.

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a Nemzeti Agrárkutatási Innovációs Központ főigazgatójának, Dr. Jenes Barnabásnak, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet igazgatójának Dr. Bősze Zsuzsannának, valamint Dr. Barta Endrének, a Mezőgazdasági Genomikai és Bioinformatikai csoport vezetőjének, hogy lehetőséget teremtettek munkám végzéséhez.

Külön köszönettel tartozom Dr. Orosz Lászlónak, valamint Dr. Buzás Zsuzsannának, hogy segítettek a kutatási téma kiválasztásában.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Stéger Viktor külső témavezetőmnek, hogy lehetőséget teremtett tanuláshoz, szakmai fejlődésemhez és hogy időt és energiát nem kímélve támogatta munkám elvégzését.

Szintén köszönetet mondanék Dr. Nguyen Duc Quang tanár úrnak, hogy vállalta a konzulensi feladatokat, bátorított a munkám során, valamint hogy észrevételeivel és tanácsaival segítette dolgozatom megírását.

Hálával tartozom még Frank Krisztián doktorandusznak a mindennapi munkában és a dolgozat összeállításában nyújtott fáradhatatlan segítségéért.

Köszöneti illeti még munkatársaimat, Wilhelm Júliát, Németh Andreát, Bana Nórárt, Gergely Anitát és Kanizsai Barbarát.

Végül pedig szeretném megköszönni a családomnak, akik végig támogattak és segítséget nyújtottak.

8 Irodalomjegyzék

Agnarsson I., May-Collado LJ. (2008): The phylogeny of Cetartiodactyla: The importance of dense taxon sampling, missing data, and the remarkable promise of cytochrome b to provide reliable species-level phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(4): 964-985.

Bana N. (2014): A gímszarvas genom első szekvenciája és annotálása. MTA Állatnemesítési-, Tenyésztési-, Takarmányozási és Gyepgazdálkodási Bizottság ülése, Bőszénfa, 2014. szeptember 25.

Bixley MJ (2009): Building a deer SNP chip. *Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 300:3.

Burbaitė L., Csányi S. (2010): Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zoologica Lituanica*, 20.(4): 179-188.

Guohong C., Leadbetter C.W., Muehlbauer M.F., Molnar T.J., Hillman B.I. (2013): Genome-Wide Microsatellite Identification in the Fungus *Anisogramma anomala* Using Illumina Sequencing and Genome Assembly. *PloS One*, 8.(11): e82408.

Castoe T., Streicher J., Meik J., Ingrassi M., Poole A., de Koning J., Campbell J., Parkinson C., Smith E., Pollock D. (2012): Thousands of microsatellite loci from the venomous coral snake *Micrurus fulvius* and variability of select loci across populations and related species. *Molecular Ecology Resources*, 12(6): 1105-1113.

Cavagnaro, P.F., Senalik D.A., Yang L., Simon P.W., Harkins T.T., D Kodira C., Huang S., Weng Y. (2010): Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *BMC Genomics*, 11.(1): 569.

Csányi S. (2014) Vadgazdálkodási Adattár – 2013/2014. vadászati év. Országos Vadgazdálkodási Adattár, Gödöllő

Fernández-Silva P., Enriquez J.A., Montoya J. (2003): Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology*, 88.(1):41-56.

Frank K. (2014) Egyedek, populációk, haplotípusok, leszármazások azonosítása a mtDNS és az X, Y, autoszómás DNS diagnosztikai profilok alapján. MTA Állatnemesítési-, Tenyésztési-, Takarmányozási és Gyepgazdálkodási Bizottság ülése, Bőszenfa, 2014. szeptember 25.

Gilbert C., Ropiquet A., Hassanin A. (2006): Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae. (Mammalia, Ruminantia): systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40.(1): 101-117.

Hajósné Novák M. (1999): Genetikai variabilitás a növény-nemesítésben. Budapest: Mezőgazda Kiadó 142. – www.tankonyvtar.hu

Hammer Ř., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 9.

Horn P. (2004): A gímszarvas tenyésztés, mint új állattenyésztési ágazat – az első házasított nagytestű emlős faj ötezer év óta. *Magyar Tudomány*, 110(50):453-460.

Janowski S., Grohme M.A., Frohme M., Wink M. (2014): Development of New Microsatellite (STR) Markers for Montagu's Harrier (*Circus pygargus*) via 454 Shot-Gun Pyrosequencing. *Open Ornithology Journal*, 7: 11-18.

Metzker M.L. (2009): Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11.(1): 31-46.

Molnár, A. (2008): A gímszarvas agancsfejlődésben szerepet játszó gének expressziójának vizsgálata. doktori (PhD) értekezés

Nei M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.

Pang H., Liu W., Chen Y., Fang L., Zhang X., Cao X. (2008): Identification of complete mitochondrial genome of the tufted deer. *Mitochondrial DNA*, 19.(4): 411-417.

Peakall R., Smouse P.E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

Peakall R., Smouse P.E. (2012): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.

Priskin K. (2010): A Kárpát-medence avar és honfoglalás kori lóállományának archeogenetikai elemzése doktori (PhD) értekezés

Shao Y., Xing X., Zha D., Yang F. (2014): Complete mitochondrial genome sequence of tarim red deer (*Cervus elaphus yarkandensis*). *Mitochondrial DNA*, 0: 1-2.

Skog, A., Zachos F.E., Rueness E.K., Feulner P.G.D., Mysterud A., Langvatn R., Hmwe S.S., Lehocky I., Hartl G.B., Stenseth N.C., Jakobsen K.S. (2009): Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Journal of Biogeography*, 36.(1): 66-77.

Stéger V. (2010): A gímszarvas csontsűrűség változásért felelős gének azonosítása az agancsciklus alatt. doktori (PhD) értekezés

Szabolcsi Z. (2013): Gímszarvasok egyedazonosítása és populációgenetikai vizsgálata autoszómás tetranukleotid mikroszatellita markerekkel. doktori (PhD) értekezés

Szabolcsi Z., Egyed B., Zenke P., Padar Zs., Borsy A., Steger V., Pasztor E., Csányi S., Buzas Zs., Orosz L. (2014): Constructing STR Multiplexes for Individual Identification of Hungarian Red Deer. *Journal of forensic sciences*, 59(4): 1090-1099.

Szeberényi J. (2004): Molekuláris sejtbiológia, Dialóg Campus, Budapest-Pécs

Thiel T., Michalek W., Varhney R.K., Graner A. (2003): Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theoretical and Applied Genetics, 106(3) : 411-422.

Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genetics Selection Evolution, 34.(3): 275-306.

Weaver R.F., Hedrick P.W. (2000): Genetika. Panem Kiadó, Bp

Jeong-Nam Y., Won C., Jun J., Kwak M. (2011): Fast and Cost-Effective Mining of Microsatellite Markers Using NGS Technology: An Example of a Korean Water Deer *Hypodropotes inermis argyropus*. PLoS ONE, 6(11):e26933.doi:10.1371/journal.pone.0026933

Zalapa J.E., Cuevas H., Zhu H., Steffan S., Senalik D., Zeldin E., McCown B., Harbut R., Simon P. (2012): Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. American Journal of Botany, 99.(2): 193-208.

Internetes hivatkozások

<http://naturhun.hu/magyar/gimszarvas.html> - 2014. október

http://en.wikipedia.org/wiki/Red_deer - 2014. október

<http://www.wildaboutbritain.co.uk/forums/mammal-forums/17903-tatton-park-deer-rut.html> - 2014. október

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX337866\[accn\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX337866[accn]) - 2014. október

<http://www.internationalstyles.net/recipes/meat-cutting/deer-cutting.htm> - 2014.
október

<http://genome.ucsc.edu/> - 2014. október

<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/browse> - 2014. október

http://mta.hu/tudomany_hirei/az-agancsfejlodes-genetikaja-72141/ - 2014. október

<http://www.repeatmasker.org/> - 2014. október

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=OGP_9913_10708 - 2014. október

<http://primer3.ut.ee/> - 2014. október