

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

**Gímszarvas genetikai markerek fejlesztése új generációs genomszekvenálási
módszerekkel**

Készítette: Wilhelm Júlia
Évfolyam: I. évfolyam

Belső konzulens: Dr. Toldi Ottó
Beosztása: intézetigazgató

Külső konzulens: Dr. Stéger Viktor
Beosztása: tudományos munkatárs

Gödöllő
2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A gímszarvas általános jellemzése	6
2.2. A gímszarvas genetikája.....	7
2.3. Mikroszatellit markerek	8
2.4. Mitokondriális DNS, D-loop.....	8
2.5. Magyarországi gímszarvas kutatások.....	10
2.5.1. Szarvastenyésztés	10
2.5.2. Gímszarvas genetikai kutatások	11
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	12
3.1. Bioinformatikai markerfejlesztés	12
3.2. Gímszarvas minták.....	13
3.3. DNS izolálás.....	14
3.4. PCR vizsgálatok	14
3.4.1. XY kromoszómás primerek.....	14
3.4.2. Mitokondriális D-loop vizsgálatok.....	16
3.5. Adatok kiértékelése	17
4. EREDMÉNYEK	18
4.1. Kísérleti előzmények.....	18
4.2. Gímszarvas DNS izolálás.....	21
4.3. PCR vizsgálatok	21
4.4. Fragmentumhossz analízis eredményei.....	22
4.5. XY multiplex mikroszatellit markerszett (Ce_XY2_WJ) fejlesztése	23
4.6. Esettanulmány: Tehén-Bika-Borjú leszármazási vizsgálat	29
5. ÉRTÉKELES ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	31
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	33
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	34
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	35
9. MELLÉKLETEK	39

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

μM	micromole – mikromól
Bc	Backcross – visszakeresztezés
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair – bázispár
Ce	<i>Cervus elaphus</i>
db	darab
D-loop	Displacement-loop – mitokondriális kontroll régió
DNS	deoxiribonukleinsav
dNTP	deoxiribonukleotid-trifoszfát
EtBr	Ethidium-bromide – etídium bromid
GenAlEx	Genetic Analysis in Excel
HS	Hot Start
kb	kilo base pair – kilobázispár
mtDNS	mitokondriális DNS
ng	nanogram – nanogramm
NGS	New Generation Sequencing – új generációs szekvenálás
PCR	Polimerase Chain Reaction – polimeráz láncreakció
pmol	picomole – pikomól
QTL	Quantitative Trait Locus – kvantitatív tulajdonságok génhelye
SSR	Simple Sequence Repeat– rövid szekvencia ismétlődés
STR	Short Tandem Repeat – rövid tandem ismétlődés
TBE	Tris-Borate-EDTA - Tris-Bórsav-EDTA
u	unit – egység
UV	Ultra Violet – ultraibolya
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats – változó számú tandemismétlődések

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A gímszarvas, más néven rőt vad (*Cervus elaphus*) Magyarország legnagyobb testű vadfaja. Holarktikus elterjedésű, megtalálható Európában, Közép-Ázsiában, Afrika északi részén, Szibéria déli területein, valamint a Távols-Keleten. Gazdasági haszna miatt betelepítették Új-Zélandra, Chilébe, Argentínába, Ausztráliába és Írországra (FARAGÓ 2002, HORN 2004).

A szarvasról különböző mondák és regék születtek, mert ősidők óta bizonyos csodálat és tisztelet övezi, nem csak a magyarságra jellemzően, hanem minden népcsoport világában, ahol ez a vadfaj él. Már az ősemler idejében is megjelent barlangrajzok és vésetek motívumai között. A görög mitológiában Artemisnek, a vadászat istennőjének egy szarvasűnő az állandó kísérője. Különböző népek mondavilágában megjelenik a vezérlő szarvas legendája. Általános ismert a magyarok regéje, melyben a „csodaszarvas” kivezette őseinket az Etelközöl a Kárpát-medencébe (BÁLINT et al. 1985, GEIST 1998).

1984-2005-ös irodalmi adatok alapján a gímszarvas populációk összlétszáma Európában növekedést mutatott, annak ellenére, hogy jelentős antropogén hatások érték ezt a fajt, illetve a vadászati teríték, azaz az elejtett egyedek száma is növekedett. Például Ausztriában, Németországban, Franciaországban, Olaszországban és Magyarországon. Egyes országokban stagnál (például Írországr, Norvégia, Portugália), míg a délkeleti országokban – Görögország, Románia, Bulgária, Ukrajna, Fehéroroszország, Moldovai Köztársaság és a volt Jugoszláv államok – csökkenő tendenciát mutattak a faj állományai. Ezek az adatok valószínűleg annak tudhatóak be, hogy a kutatás ideje alatt ezek az országok (kivéve Görögország) jelentős politikai változásokon mentek keresztül és a vadászatok nem voltak túlzottan szabályozottak. További indokok a csökkenésre, hogy nem dokumentálták pontosan az eseményeket, illetve ezeken a területeken a nagyobb testű ragadozó fajok száma jelentősebb (BURBAITÉ & CSÁNYI 2009, 2010).

A gímszarvas mind eszmei, mind gazdasági szempontból Magyarország legfontosabb kérődző vadfaja. Nem csak húsa miatt, de Európa legkeresettebb tróféáit biztosítja a vadászati időszakok során. A gímszarvas sokféle gazdasági haszonnal bír és jelentős ökológiai értéke is van, jelenlétével a vegetáció összetételét és struktúráját befolyásolja (FARAGÓ 2002, MILNER et al. 2006).

Hazánkban találhatunk szabadon élő gímszarvas populációkat és zárt kerti állományokat is. Az egyik legnagyobb és legjelentősebb magyarországi szarvasfarm a Somogy megyei Bószénfán található (<http1>). A gímszarvas állományok megőrzése és

megfigyelése munkahelyeket teremt, vadgazdák és erdészek számára, illetve a turizmusban, élelmiszeriparban is jelentős szerepet játszik.

Az 1980-as években megkezdődött Magyarországon a gímszarvas tenyésztésbe vonása. Az 1990-es években Dr. Orosz László és Dr. Horn Péter akadémikusok megkezdtek a gímszarvas genetikai kutatásokat. A kutatásban közreműködő intézmények a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, a Kaposvári Egyetem, az Eötvös Loránd Tudományegyetem és a Szent István Egyetem (HORN 2004, [http2](#)).

Munkánk elsődleges célja X és Y kromoszómás markerek fejlesztése, melyek lehetővé tennék gímszarvas anyai ágak részletes feltérképezését, valamint apai vonalak meghatározását és nyomon követését. Ezen vizsgálatokat összevetnénk mitokondrium D-loop szekvencia adatokkal, így a populációk diverzitásának felmérését, illetve a leszármazási vonalak követését is pontosítanánk.

Célunk lenne az ország déli területein élő populációk X és Y kromoszómás diverzitásának felmérése és összevetése zártkertben tartott állományok diverzitásával, továbbá a tenyésztésbe vont állományokban az apai és anyai vonalak felmérése és követése. A DNS diagnosztikához a jelölt primereket multiplex PCR-reakcióhoz szeretnénk optimalizálni egy idő- és költséghatékony módszertan kidolgozásával.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A gímszarvas általános jellemzése

Az európai gímszarvas (*Cervus elaphus hippelaphus*) az emlősök (*Mammalia*) osztályába, a páros ujjú patások (*Artiodactyla*) rendjébe, a kérődzők (*Ruminantia*) alrendjébe, ezen belül az igazi szarvasok (*Cervidae*) családjába tartozó faj. A legújabb taxonómiai álláspont szerint három alcsalád sorolható ide: az újlégi szarvasfélék (*Capreolinae*), az óvilági szarvasfélék (*Cervinae*) és a vízi őzformák (*Hydropotinae*). A gímszarvas az óvilági szarvasfélék alcsaládjába sorolt faj (PÁLL 1985, PITRA et al. 2004, LOVARI et al. 2008, MYERS et al. 2013).

Magyarország legnagyobb testű kérődző vadfaja, melyre jellemző az ivari kétalakúság. A hím egyedeket bikának, a nőstényeket tehénnek, megtermékenyítés előtt ünőnek, juvenil alakját borjúnak (ünőborjú, bikaborjú) nevezzük. Az érett gímszarvas bika megjelenése impozáns, az erdő „koronás királyának” is nevezik. Ezt a címet agancsának köszönheti, mely egy olyan csontképződmény, amit az állat minden évben újranoveszt, majd elhullajtja (BÁLINT et al. 1985, FARAGÓ 2002, STÉGER et al. 2010).

A homlokcsap megjelenéséig a bika és a tehén között külsőre nincs különbség, nehéz megkülönböztetni őket. A borjak szőrzete a háti oldalon pettyes, 5 hetes kortól elhalványul, végül az őszi vedléssel elhagyják ezt a mintázatot. A felnőtt gímszarvasok színe nyáron rozsdabarna, télen szürke alaptónusú barnás. Két éves korig az egyedek kora fogváltás alapján becsülhető meg. A bika méretei jelentősen meghaladják a tehénét. A bika 5-6 évesen, a tehén 2-3 évesen éri el a végleges nagyságát. A bika testhossza 170-240 cm, marmagassága 115-150 cm, testtömege 130-170 kg, nyaka erőteljesebb, a feje szélesebb, mint a tehén szarvasok esetén. A tehén testhossza 150-200 cm, marmagassága 130-150 cm, testtömege 50-100 kg. A populációk sűrűségének növekedése, valamint a rosszabb minőségű, kevesebb élelemforrás hatására (élőhelyi hatás) az egyedek mérete csökken. SZEMETHY et al. (2005)

A faj kedvelt élőhelyei a tisztásokkal tagolt lombhullató vagy tűlevelű erdők és a folyó menti ligetek. Növényevő, kérődző, táplálékának jelentős részét lágyszárú növények teszik ki, de tavasszal cserjék, fás szárú növények rügyeit, kérgét, leveleit is előszeretettel rágcsálja, mellyel jelentős károkat okozhat erdészetekben, gyümölcsösökben. Társas lény, természetes körülmények között csapatokban, úgynevezett rudlikban él. A csoport legrátermettebb bikája háremet tart, azaz nem jut minden hím nőstényhez, hogy pározhasson vele. A kapitális bika megvédi háremét, bár küzdelemre ritkán kerül sor, így általában a domináns egyedek genetikai állománya adódik tovább. A bögési (szaporodási) időszakon kívül ezek az állatok

vagy nőstényekből és borjakból, vagy csak hímekből álló csapatot alkotnak. Ezen poligin életmód miatt a tehenek helyhez kötöttek, míg a bikák hajlamosabbak a vándorlásra. Minél idősebb egy bika, annál messzebb hajlandó vándorolni a nőstényekért. Ezzel a magatartásformával lehetővé válik genetikai állományának terjesztése, a populációk közötti genetikai áramlás (BÁLINT et al. 1985, SZEMETHY et al. 2005, SKOG et al. 2009).



1. ábra: A gímszarvas – *Cervus elaphus* (forrás: http3)

2.2. A gímszarvas genetikája

A gímszarvas kromoszóma száma $2n=68$, mely megegyezik a Dávid-atya szarvasával (*Elaphurus davidianus*) és a kariotípusuk is hasonló, bár a megjelenésük és biológiájuk jelentősen eltérő (WANG 1988, SLATE et al. 2002). E két faj hibridjét használják F_2 backcross (Bc) populációk létrehozásához, melyek géntérképezésben játszanak szerepet. A Haldane fajhibridekre vonatkozó szabállyal ellentétben az F_2 Bc hím egyedek fertilisek, mely jelentősen segíti a mesterséges megtermékenyítést.

A párosujjú patások géntérképezésére QTL gének, azaz termeléssel kapcsolatos mennyiségi jellegeket meghatározó gének állnak rendelkezésre. Ehhez két fő markertípus tartozik, az I-es és II-es típusú markerek. Az I-es típusú markerek fajok közötti polimorfizmust mutatnak ki, ezek evolúciósan konzervált lókuszok. A II-es típusú markerek a fajon belüli változékonyságot szemléltetik. Összehasonlító géntérképezést tesznek lehetővé, melyek az evolúciós genom szerveződési aspektusokat is feltárhatják. A géntérképezést segíti

egy másik faj már ismert genetikai térképe. Sikeres gímszarvas géntérképezést I-es típusú markerek tesznek lehetővé kapcsoltsági csoportok azonosításával (linkage group). További térképpontok szarvasmarha (*Bos taurus*) és birka (*Ovis aries*) mikroszatellitek meghatározásával lehetségesek, melyek a II-es típusú markerek. Eddig 33 autoszomális kapcsoltsági csoportot sikerült megállapítani, valamint a nemi kromoszómákat (TATE et al. 1995, SLATE et al. 2002).

Gímszarvas esetén az eddigi genomtérkép rövid, melynek oka lehet az interspecifikus hibridek alacsony rekombinációs rátája, illetve a térképmarkerek sűrűsége nem elég nagy. A gímszarvas interspecifikus géntérképezése lehetővé tenné haszonállatok összehasonlító elemzését, melyekkel gazdaságilag fontos génekre lehetne következtetni. A gímszarvas teljes genom szekvenciáját Új-Zélandon már megállapították, de az adatok nem publikusak. SEABURY et al. (2011)

2.3. Mikroszatellit markerek

A genomban előforduló 2-6 bp hosszúságú szekvencia motívum ismétlődéseket, mikrosatelliteknek, VNTR-nek (Variable Number of Tandem Repeats), SSR-nek (Simple Sequence Repeats) vagy STR-nek (Short Tandem Repeats) nevezik. HAJÓSNÉ (1999) Minden eukariótában megtalálhatóak és szórtan helyezkednek el a genomban. TAUTZ & RENZ (1984) Az ismétlődések számának változása miatt polimorfak, és jellemző rájuk, hogy variábilisak, konzervatívak, és kodominánsan öröklődnek (SAGHAI et al. 1994, RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK 2004). Az ismétlődéseket határoló specifikus szekvenciákra tervezett primerekkel a lókuszok polimeráz láncreakcióban (PCR – Polimerase Chain Reaction) felszaporíthatók, így vizsgálhatóvá válnak.

A PCR termékek szétválasztása történhet agaróz- vagy poliakrilamid-, illetve kapilláris gélelektroforézissel. WENZ et al. (1998) Megkülönböztetünk mono-, di-, tri-, tetra-, penta- és hexanukleotidokat. A mono egy bázispáros ismétlődő szekvencia, a di kettő, a tri három, a tetra négy, a penta öt és a hexa hat. A tetranukleotid ismétlődések számítanak a legkedveltebbnek a méretkülönbségek detektálásának viszonylagos egyszerűsége miatt. HAJÓSNÉ (1999)

2.4. Mitokondriális DNS, D-loop

A mitokondrium az eukarióta sejtekben előforduló, a citoplazma jelentős részét elfoglaló képlet. Az eukarióta sejtek életében alapfeltétel a mitokondrium jelenléte. A

sejtlégzésben és az energiatermelésben játszik szerepet. Már a tizenkilencedik században felfedezték jelenlétüket, elég nagyok ahhoz, hogy fénymikroszkópban láthatóak legyenek. ALBERTS et al. (2002)

Napjainkban feltételezik, hogy a sejtmag, a mitokondrium és a kloroplasztisz evolúciója összefügg. A mitokondriumok azért jelentős molekuláris biológiai eszközök, mert a sejtmag mellett bennük is található örökítő anyag és nagyobb kópiaszámban vannak jelen a sejtben. A mitokondrium kettős szálú cirkuláris DNS-t tartalmaz, melynek mérete körülbelül 12.000 bp (12 kb). Az emlősök mitokondriális DNS-e nem tartalmaz intronokat, és a bázisoknak több, mint 90%-a valamilyen kódoló szekvenciához tartozik (VENETIANER 1998, PASSARGE 2012).

A sejtmagi DNS-től függetlenül replikálódik, és tízszer magasabb a mutációs rátája, így a mutációk felhalmozódhatnak. A pontmutációk felhalmozódásának oka, hogy nem működik az excíziós reparációs rendszer, amely kijavítaná az amplifikáció során keletkezett hibákat, valamint nincsenek jelen hisztonfehérjék, amelyek szerepet játszanak a DNS szálak védelmében. Születéskor a mitokondriumok DNS-e egyforma (homoplazmia). Ha a replikáció során maradandó mutáció lép fel, amely megmarad a DNS szekvenciájában, tovább öröklődhet és a mitokondriális populáció DNS állománya már nem lesz egyforma (heteroplazmia) (SHADEL & CLAYTON 1997, PASSARGE 2012).

A mtDNS anyai ágon öröklődik, az oocitákban több százezer mitokondrium van jelen, a spermatozoákban néhány száz. A megtermékenyítés során csak a feji része jut be a spermiumnak, ami mitokondriummentes. Ha az apai eredetű mitokondrium be is jut a zigótába (a spermium nyaki részével) egy ubiquitin-függő mechanizmus elpusztítja a spermiumból származó mitokondrium képleteket. Így a mtDNS az anyától származik, amely evolúciós kapcsoltsági vizsgálatok alapjául szolgálhat (SUTOVSKY & SCHATTEN 2000, PASSARGE 2012).

A mtDNS a kódoló régiókon kívül, egy bizonyos nem kódoló, D-loop (Displacement-loop) szekvenciát tartalmaz, amely egy szabályozó régió. Körülbelül 900 bp hosszú, szekvenciája változatos a különböző fajokban és egyedekben. A D-loop szekvenciával polimorfizmus figyelhető meg, a benne bekövetkező mutációk gyorsan rögzülnek, ezért alkalmas eszköz a populációgenetikai vizsgálatokhoz (HOWELL et al. 1992, MARINCS et al. 2013).

2.5. Magyarországi gímszarvas kutatások

2.5.1. Szarvastenyésztés

Európában már évszázadok óta foglalkoztak nagyvadak hosszútávú fenntartásával. Az 1960-as években megkezdődött a gímszarvas tervszerű házasítása Skóciában és Új-Zélandon. Az utóbbiról elmondható, hogy sikertörténété vált és a magyarországi gímszarvas tenyésztés is az új-zélandihoz kapcsolódik. Új-Zélandra az 1850-es években kezdtek el különböző angliai és skóciai gímszarvas törzseket betelepíteni. A cél tehetősebb európai telepesek számára vadásztelepek kialakítása volt, melyek gyorsan létrejöttek, köszönhetően a dús vegetációnak, a természetes ragadozók hiányának és a kiváló életfeltételeknek. 1968-ban megbízták a Lincoln Egyetemet, hogy dolgozzanak ki egy tervszerű gímszarvas farmtartási technológiát. Magánbefektetők jelentős alapokat fektettek be kutatásokra, pár évvel később kutatási program indult. 1973-ban gímszarvas tenyésztési központot hoztak létre az Állattenyésztési Kutató Központban. Szerinte a szigetországokban gyorsan nőtt a gímszarvas farmok száma köszönhetően a tőkeáramlásnak és a nagy barkás-agancs keresletnek. A gímszarvasok gyorsan alkalmazkodtak az új körülményekhez és tartásuk jövedelmezőbbnek bizonyult a juh- vagy húsmarhatartáshoz képest. Napjainkban több, mint két millió szarvast tartanak Új-Zélandon, 5000 farmból 1900 csak gímszarvas tenyésztéssel foglalkozik. A többi úgynevezett vegyes tartású tenyésztés, gímszarvas mellett juhot és húsmarhát is tartanak. Az új-zélandi vadon élő állományt 250.000-re becsülik. HORN (2004)

A Kárpát-medence kiváló élőhelyül szolgál a gímszarvas állományoknak megfelelő természeti adottságai miatt. Elsősorban ennek köszönhető a magyarországi gímszarvasok népszerűsége. Az 1960-as évek 30.000-es gímszarvas létszáma az 1980-as évek végére 120.000 körülire nötte ki magát. SUGÁR (2003) 1991-ben megalapították a Somogy megyei Bőszénfán Magyarország mára már legnagyobb és legjelentősebb vadaskertjét. A Kaposvári Egyetem EC Vadgazdálkodási Tájközpontjának ad otthont a zselici dombok között elhelyezkedő falu. Ennek az ágazatnak létrehozója Dr. Horn Péter, az MTA rendes tagja, a Kaposvári Egyetem rector emeritusa. A vadaskert kutatási programként indult, mára sikerült Közép-Európa egyik legjelentősebb zárttéri állományává kinőnie magát. Az 1300 hektáron elhelyezkedő birtok több, mint 1500 gímszarvasnak és egyéb vad fajnak, továbbá háziállatoknak is élőhelye. A vadaskert számos tevékenysége mellett kiemelendő a Kaposvári Egyetemmel való együttműködése, melynek keretein belül különböző kutatási programokon dolgoznak és az egyetem hallgatóinak oktatása, mely hozzájárul a tanulók gyakorlatának és tapasztalatainak megszerzéséhez. További tevékenységeik közé tartozik a turizmus,

különböző látogatótúrák szervezése, erdő- és vadgazdálkodás, takarmánytermesztés, vadászati lehetőségek biztosítása és vadhúsfeldolgozás (HORN 2004, [http1](#)).

2.5.2. Gímszarvas genetikai kutatások

Az 1990-es években Dr. Orosz László és Dr. Horn Péter akadémikusok vezetésével Magyarországon elsőként megkezdődött a gímszarvas genetikai kutatása. A kutatásban közreműködő intézmények a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, a Kaposvári Egyetem, az Eötvös Loránd Tudományegyetem és a Szent István Egyetem. A program jelenlegi célja, hogy a teljes gímszarvas genom-szekvenciát meghatározzák. A genomikai kutatások lehetőséget biztosítanak az állatok tenyésztértékének becslésére ([http2](#)).

Az egyedek genotípusai alapján prediktálhatóvá válnak a különböző gazdaságilag fontos tulajdonságok (pl: betegségekre való hajlam, jobb hús- kihozatal és minőség, jobb trófea minőség). Ez pedig segítséget jelent egy tervszerűbb farmgazdálkodás kidolgozásában, mellyel a beltenyészet túlzott kialakulása és hátrányai megelőzhetőek lennének. A program alapját az új generációs genom szekvenálási módszerek biztosítják (NGS – New Generation Sequencing). A munkálatokhoz fontos a megfelelő bioinformatikai ismeret, melyeket Dr. Barta Endre a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet Mezőgazdasági Genomikai és Bioinformatikai Csoport vezetője végez ([http2](#)).



2. ábra: Gímszarvas bikák a bőszenfai szarvasfarmon (forrás: [http1](#))

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Bioinformatikai markerfejlesztés

A gímszarvas genomprogram csoport munkájának további fontos része a mikroszatellit markerek fejlesztése. A markerek tervezését Frank Krisztián doktorandusz hallgató végezte QDD szoftvercsomag segítségével. Ez egy ingyenes, Perl programozási nyelven íródott programok gyűjteményét tartalmazó szoftver, amely Linux és Windows operációs rendszereken egyaránt működik. MEGLÉCZ et al. (2010)

A genomprogram keretein belül megszekvenált bőszenfai kapitális gímszarvas bikából rendelkezésre álltak szekvencia adatok. Ebből a nagy adatmennyiségből történt az ismétlődő motívumok (mikroszatellitek) szűrése QDD programcsomag segítségével. Frank Krisztián a kiszűrt régiók szekvenciájára Primer3 program segítségével primereket tervezett. ROZEN & SKALETSKY (2000) A primer tervezéshez használt beállítások a következők voltak:

Minimum PCR termék	90 bp
Maximum PCR termék	300 bp
PCR termék intervallum	50 bp
Primer minimum nagyság	18 bp
Primer maximum nagyság	27 bp
Primer optimális nagyság	20 bp
Primer optimális hőmérséklete	60,0 °C
Primer minimum hőmérséklete	57,0 °C
Primer maximum hőmérséklete	63,0 °C

Ezután a szekvenciákat szarvasmarha referencia genomra illesztette és szűrte az X illetve Y kromoszómán térképeződő szekvenciákat és az általuk hordozott mikroszatelliteket (BLAST analízis).

Munkánk során ezekből a különböző mérettartományú nemi kromoszómás mikroszatellita lókuszok közül választottunk primereket. A kiválasztás fontos szempontja volt, hogy a primerek különböző méretű termékeket adjanak, melyek lehetővé teszik multiplex PCR-ek kifejlesztését és optimalizálását. A kiválasztott primereket további szoftverekkel ellenőriztük, hogy megfelelő terméket amplifikálnak-e. Az egyik program a Primer Express® v3.0.1 (Applied Biosystem, USA) volt és az UCSC In-Silico PCR, amellyel megvizsgáltuk, hogy szarvasmarha szekvencia genomra kapunk-e termékeket. RHEAD et al. (2009) A megfelelő eredményeket adó szekvenciákból fluoreszcensen jelölt primereket rendeltünk (Applied Biosystem, USA).

3.2. Gímszarvas minták

A tanulmányban felhasznált szövetminták Magyarország déli térségeiből származnak: Bószénfáról (Somogy-megye), Lábodról (Somogy-megye) és Vajszlóról (Baranya-megye) (3. ábra). A minták száma összesen 45, ebből 36 darab szabadból származik, míg a maradék bószénfai tartásból (3. táblázat).

A vizsgált szabadtéri populációkból 1 db tehén és 35 db bika, míg a zárt kerti szarvasok között 2 db tehén és 7 db bika szerepel (1. melléklet). A tanulmányunk során felhasznált állati szövetek izomból, szőrből, csontból és vérből származnak, felhasználásig -20 °C-on tároltuk őket. A szövetminták adatait az általunk vezetett biobankban rögzítettük.



3. ábra: A tanulmányban felhasznált gímszarvas minták származási helyei, zöld – Lábod, sárga – Bószénfa, piros – Vajszló (http4)

1. táblázat: A tanulmányban felhasznált minták száma

Tartásforma	Származás	Nem	Darabszám
szabadon élő	Lábod (Somogy-megye)	♀	1
		♂	20
	Vajszló (Baranya-megye)	♂	15
zárt kerti	Bószénfa (Somogy-megye)	♀	2
		♂	7

3.3. DNS izolálás

Gímszarvas szőr, izom-, csont- és vérszövetekből vontunk ki DNS-t. Az izomhoz, vérhez, hagymával rendelkező szőrhöz Genomic DNA Mini Kit-et (Geneaid, Taiwan), a csonthoz QIAamp DNA Investigator Kit-et (Qiagen, Németország) használtunk és a gyártó utasításait követtük. A kivont DNS mennyiségét, minőségét és tisztaságát NanoDrop (Thermo Scientific, USA) készülékkel és 2%-os, etídium-bromiddal (EtBr) megfestett TBE agaróz gélen ellenőriztük, hogy megfelelőek-e PCR vizsgálatokhoz. A további vizsgálatokhoz alkalmas minták tisztasága 260/280 abszorbancián minimum 1,7 értéket kellett, hogy mutasson. Amennyiben a DNS kivonás sikertelennek bizonyult, az izolálási kísérletet megismételtük. PCR reakció összeméréséhez a nyers DNS mintákat koncentrációjuktól függően 15 ng/μl-re hígítottuk ki desztillált vízzel. A kapott mennyiségeket az általunk vezetett DNS banki táblázatokban rögzítettük.

3.4. PCR vizsgálatok

3.4.1. XY kromoszómás primerek

A megrendelt X és Y kromoszómás primereket először a megszekvenált kapitális gímszarvas bika, majd egy bőszenfai tehén DNS-én ellenőriztük. Minden primerrel legalább négyszer elvégeztük a PCR reakciókat és vizsgáltuk, hogy kapunk-e termékeket. Amennyiben megfelelőnek találtuk a primerek működését, Multiplex PCR-hez optimalizáltuk őket eltérő mérettartomány alapján. A primerek 5' forward végét az Applied Biosystem féle Standard Festék szettel (Applied Biosystem Standard Dye Sets for Genotyping Applications, USA) jelöltük. Munkám során a tervezett X és Y primerek közül kiválasztottam nyolcat (2. táblázat), melyeket megfelelőnek találtam multiplex PCR összeállításához és a továbbiakban ezt a plexet próbáltam optimalizálni.

PCR reakciókhoz a QIAGEN Multiplex PCR Kit-et (Qiagen, Németország) használtunk. Az optimalizált reakció 15μl végtérfogatban történt (3. táblázat). Az összemért reakciókat PTC-200 (Bio-Rad, USA) típusú PCR készülékben amplifikáltuk. A PCR program ciklusait a 4. táblázatban összesítettük.

2. táblázat: Ce_XY_WJ plex, multiplex PCR reakcióhoz tervezett primerek

Primer neve	Kromoszóma	Várt mérettartomány (bp)	Fluoreszcens jelölés
Ce_01_X_WJ	X	100	PET TM
Ce_02_X_WJ	X	115	6FAM TM
Ce_03_X_WJ	X	133	VIC TM
Ce_04_X_WJ	X	151	NED TM
Ce_05_X_WJ	X	210	PET TM
Ce_06_Y_WJ	Y	290	PET TM
Ce_07_Y_WJ	Y	370	VIC TM
Ce_08_Y_WJ	Y	457	6FAM TM

A kész PCR termékeket 2,4%-os etídium-bromiddal megfestett TBE agaróz gélen futtattuk meg (1 h, 20 V/cm) és UV fényben tettük láthatóvá őket (Chemi DocTM MP Imaging System, Bio-Rad, USA). A megfelelőnek talált PCR termékeket fragmentumhossz analízisre küldtük a Biomi Kft-hez (Gödöllő), ahol a pontos fragmentumméreteket ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 50 (Applied Biosystems, USA) készülék segítségével állapították meg.

3. táblázat: A tanulmányban alkalmazott multiplex PCR mix

Reagens	Koncentráció	1 reakcióra (µl)
Templát DNS	15 ng/µl	2
Multiplex PCR Master Mix	2x	7,5
Ce_04_X_WJ primer mix	10 µM	0,12
Ce_03_X_WJ primer mix	10 µM	0,13
Ce_01_X_WJ primer mix	10 µM	0,15
Ce_05_X_WJ primer mix	10 µM	0,24
Ce_08_Y_WJ primer mix	10 µM	0,36
Ce_07_Y_WJ primer mix	10 µM	0,43
Ce_02_X_WJ primer mix	10 µM	0,5
Ce_06_Y_WJ primer mix	10 µM	0,6
Desztillált víz	-	2,97
Végtérfogat:		15

4. táblázat: A tanulmányban alkalmazott multiplex PCR program fázisai

Folyamat	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklus
Iniciáció	95	15:00	x 1
Denaturáció	98	00:30	x 29
Primerek kötődése	60	01:30	
DNS amplifikáció	72	02:00	
Végső extenzió	60	60:00	x 1

3.4.2. Mitokondriális D-loop vizsgálatok

A mitokondrium D-loop kontroll régióra szakirodalomból (SKOG et al. 2009) választottunk primereket, amelyek segítségével PCR vizsgálatokat végeztünk. A PCR reakció receptje az 5. táblázatban látható, a PCR program pedig a 6. táblázatban.

5. táblázat: Tanulmányunkban alkalmazott mitokondriális PCR mix

Reagens	Koncentráció	1 reakcióra (µl)
Templát DNS	15 ng/µl	4
F primer	10 µM	0,5
R primer	10 µM	0,5
Phusion HS puffer	5 x	5
Phusion HS II. enzim	1 u/µl	0,2
dNTP	2,5 µM	2
Desztillált víz	-	12,8
Végtérfogat:		25

6. táblázat: A tanulmányban alkalmazott mitokondriális PCR program fázisai

Folyamat	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklus
Iniciáció	98	0:30	x 1
Denaturáció	98	00:10	x 35
Primerek kötődése	62,5	00:10	
DNS amplifikáció	72	02:00	
Végső extenzió	72	5:00	x 1

A PCR termékek tisztítása után elküldtük a Binomi Kft-hez (Gödöllő), ahol az ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 50 (Applied Biosystems, USA) típusú készülékkel megszekvenálták őket. A mitokondriális haplotípusok vizsgálatát 3 db mintán végeztük el (1148 ♂, 1528 ♂, C7006 ♀), melyek a bőszenfai zárt kerti populációból származnak. A mitokondriális haplotípus eredményeinket az esettanulmányunk során fogom részletezni.

3.5. Adatok kiértékelése

A fragmentumhossz analízis eredményeket fsa formátumú fájlban kaptuk meg a Biomi Kft-től, melyeket PeakScanner™ v1.0 (Applied Biosystem, 2006) szoftver segítségével értékeltünk ki. Az így kapott kromatogramok eredményeit Excel (Microsoft Office, 2013) táblázatban rögzítettük, és a további értékelésekhez ezeket az eredményeket használtuk.

A táblázatokból kiszűrtük, hogy a primerek milyen allélváltozatokat amplifikáltak az egyes lókuszok esetén. A GenAlEx v.6.5 (Genetic Analysis in Excel) programmal statisztikai számításokat végeztünk (PEAKALL és SMOUSE 2006, 2012). Nei-féle koefficiens alapján haplotípus diverzitási értékeket, genetikai távolságokat és hasonlóságokat számoltunk, valamint kiszámoltuk a Shannon-indexet. NEI (1978) A PAST v2.17c program segítségével főkoordináta-analízist és dendogramot is készítettünk. HAMMER et al. (2001)

A főkoordináta-analízis ábrázolásához a beállítások a következők voltak:

Hasonlósági index: Jaccard

Transzformációs kitevő: $c=2$

A törzsfa ábrázoláshoz az alkalmazott beállítások pedig:

MinY: 0,2365

Algoritmus: Párosított csoport

Hasonlósági index: Jaccard

4. EREDMÉNYEK

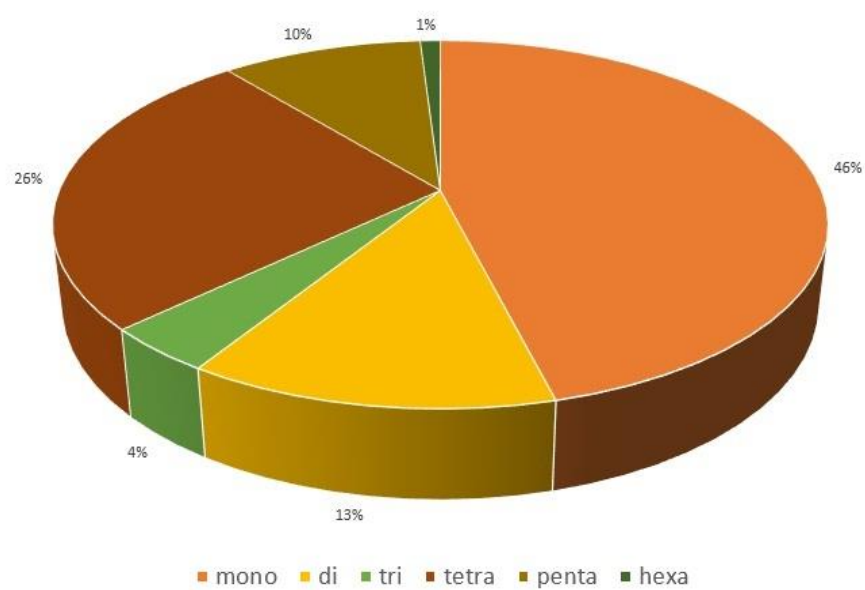
4.1. Kísérleti előzmények

A magyarországi gímszarvas genomprogram során megszekvenált bőszenfai kapitális bikából több mint 223 milliárd bázist sikerült meghatározni. A gímszarvas 100 bp-os szekvenciákat (readeket) *de novo* szekvencia illesztéssel kontigokba rendezték. A kontigok egybefüggő DNS szekvenciák, amelyek összeállíthatóak a nyers szekvenciák segítségével. A keletkezett kontigok száma 437.412 volt, átlagos méretük 7,5 kilobázis. A kontigokat nagyobb egységekbe fűzték, úgynevezett scaffoldokba. A scaffoldok láncszerűen lineárisan elrendezett nem összeérő kontigok sorai. A scaffoldok száma 34.724 lett, átlagos méretük gap-ek nélkül 265 kb, gap-ekkel együtt 430 kb.

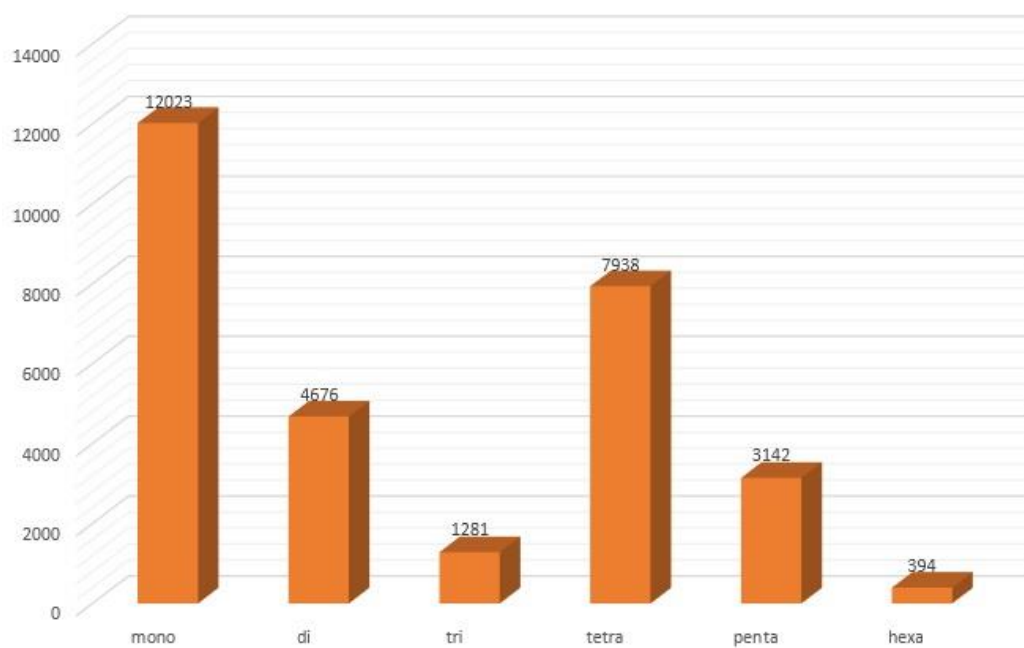
Irodalmi adatok alapján 33 gímszarvas autoszómás kapcsoltsági csoporton végighaladva kigyűjtötték a gímszarvas rekombinációs géntérkép 621 markerpontjának szekvenciáját. Ezen szekvenciák szarvasmarha ortológ génjeit is megvizsgálták. A 33 testi kromoszómához több, mint 3.400 nagyobb egységekbe rendezett scaffold párosítható. A szarvasmarha gének közül 17.000-nél többet is sikerült felhelyezni a gímszarvas kapcsoltsági csoportokra. A markerpontok és a gének gímszarvas szekvenciáinak ismerete lehetővé teszi a gímszarvas referencia genom elkészítését (Bana Nóra doktorandusz hallgató szóbeli közlése).

Primertervezés

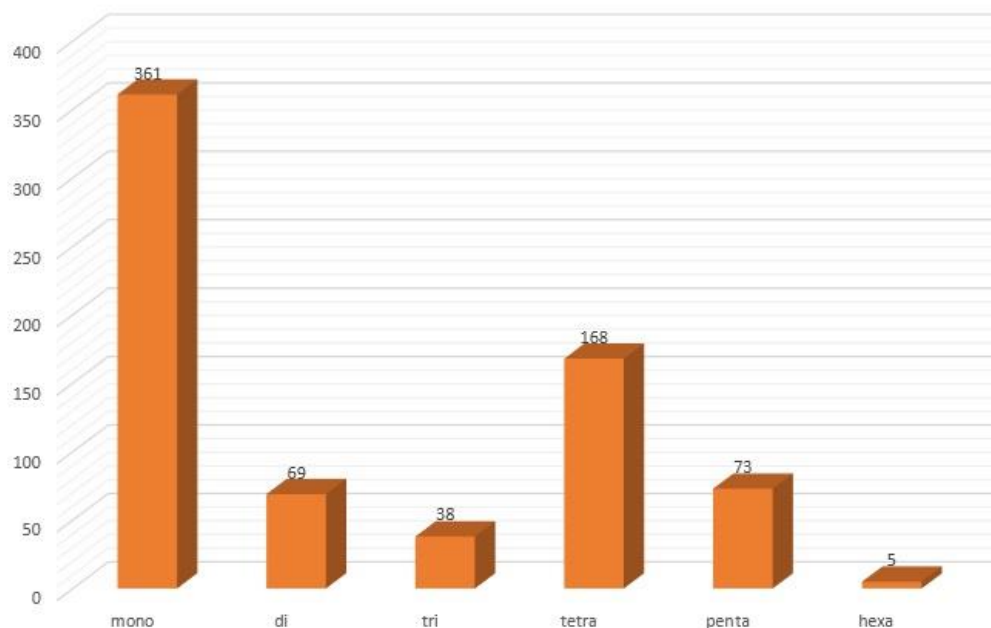
Frank Krisztián doktorandusz hallgató a QDD programcsomag segítségével 771.401 szekvencia darabon összesen 978.010 db ismétlődő motívumot szűrt ki. Ezek közül 446.436 mono-, 126.158 di-, 36.612 tri-, 254.889 tetra- 100.295 penta- és 12.917 hexanukleotid ismétlődés volt (4. ábra). A Primer3 program összesen 73.870 szekvenciára tervezett primert, melyek közül 29.454 az X és 714 mikroszatellit pedig az Y kromoszómára esett (5. és 6. ábra) (Frank Krisztián doktorandusz hallgató szóbeli közlése).



4. ábra: Mikroszatellit találatok a teljes genomra



5. ábra: Mikroszatellitek X kromoszómán



6. ábra: Mikroszatellitek Y kromoszómán

A kiszűrt mikroszatellita adatok alapján 18 primer párt válogattunk ki a további vizsgálatokhoz. A primerek UCSC In-Silico PCR programmal szarvasmarha referencia genom X, illetve Y kromoszómáján adtak találatot, és a fragmentumméretek is a várt értékeket mutatták. A megrendelt primereket liofilizáltan kaptuk, melyeket 10 pmol koncentrációra hígítottunk, majd a primer párokat előteszteltük PCR segítségével. A primer párok közül 3 nem adott értékelhető terméket, ezért azokat a további vizsgálatokból kihagytuk.

Az elővizsgálatokat követően működőképesnek bizonyuló 15 primer pár közül kiválasztottam 8-at, melyeket multiplex PCR összeméréséhez optimálisnak találtam. A többi primer párral Kálmán Zsófia Bsc hallgató dolgozott tovább. A munkámhoz kiválogatott primerekből az UCSC In-Silico PCR 5 X kromoszómás találatot adott, Y kromoszómára pedig 3-at. Primerek multiplexbe való szétválogatásánál fontos szempont volt, hogy változó mérettartományú fragmentumokat adjanak és a fluoreszcens jelölésük is eltérő legyen az egymáshoz méretben közelebb álló primerek között (7. táblázat).

7. táblázat: Munkám során (Ce_XY_WJ) és Kálmán Zsófia (Ce_XY_KZS) által használt primerek

	Primer neve	Kromoszóma	Várt méret (bp)	Fluoreszcens jelölés
Ce_XY_WJ plex	Ce_01_X_WJ	X	100	PET™
	Ce_02_X_WJ	X	115	6FAM™
	Ce_03_X_WJ	X	133	VIC™
	Ce_04_X_WJ	X	151	NED™
	Ce_05_X_WJ	X	210	PET™
	Ce_06_Y_WJ	Y	290	PET™
	Ce_07_Y_WJ	Y	370	VIC™
	Ce_08_Y_WJ	Y	457	6FAM™
Ce_XY_KZS plex	Ce_X001_KZ	X	160	NED™
	Ce_X002_KZ	X	102	6FAM™
	Ce_X003_KZ	X	126	VIC™
	Ce_X006_KZ	X	142	NED™
	Ce_X008_KZ	X	302	PET™
	Ce_X007_KZ	X	230	VIC™
	Ce_Y004_KZ	Y	457	6FAM™
	Ce_Y005_KZ	Y	410	NED™

4.2. Gímsszarvas DNS izolálás

Eddigi munkám során 45 gímsszarvas mintából izolált DNS-t használtam fel, amelyet Kálmán Zsófia hallgatótársammal közösen izoláltunk. Gímsszarvas izom- (34 egyed), szőr- (7 egyed), vér- (2 egyed) és csontszövetből (2 egyed) vontunk ki DNS-t. A csont hidrogén-peroxiddal történő előzetes kezelése miatt a szövetek, sejtek és a benne lévő örökítőanyag károsodott, ezért abból nehéz volt megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t izolálni. A DNS izolálás eredményei a 2-es számú mellékletben találhatóak.

4.3. PCR vizsgálatok

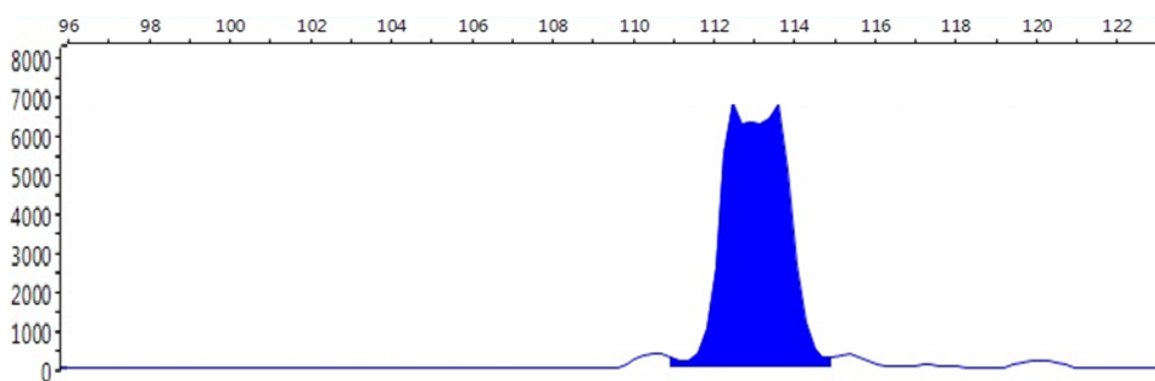
Az összemért multiplex PCR termékei már az első vizsgálatok során megfelelő DNS fragment hosszakat mutattak az agaróz gélen elválasztva. Némelyik primer túlzottan erős

PCR terméket adott, vagy ellenkezőleg, alig detektálható volt. Ezért megpróbáltam a gélelektroforézis mintázata és az elektroferogram adatok alapján megbecsülni, hogy csökkentsem vagy növeljem a primerek mennyiségét.

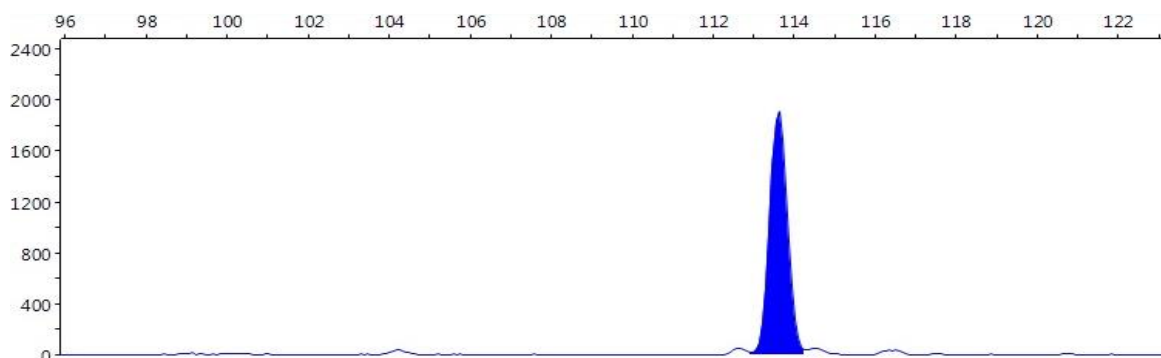
4.4. Fragmentumhossz-analízis eredményei

A fragmentumhossz-analízis eredményeinek kiértékelése során információt kaptam a primerek által amplifikált termékek méretéről. Erről a kromatogramok, azaz a diagramokon megjelenő csúcsok alapján tudtam tájékozódni a fluoreszcens festéknek megfelelő színtartományban. A minták egy része látható és szép csúcsokat adott (8. ábra) míg voltak ugyan kiértékelhető, de nem elkülöníthető képletek, a kromatogram „dadogott” (7. ábra).

A nem megfelelő kromatogramok esetén a PCR reakciót megismételtem, melynek során változtattam az összemért primerek mennyiségén. Amennyiben a csúcsok túl magasnak bizonyultak, esetleg a dadogás kiértékelhetetlenné torzította az eredményt, csökkentettem a bemért primerek mennyiségén. Ha az eredmény túl alacsony vagy nem megjelenő csúcsokat mutatott, a primerek mennyiségét növeltem.



7. ábra: Nem megfelelő kromatogram csúcs a Ce_02_X_WJ primer esetén, 6FAMTM fluoreszcens jelölés (PeakScannerTM v1.0)



8. ábra: Megfelelő kromatogram csúcs a Ce_02_X_WJ primer esetén, 6FAMTM fluoreszcens jelölés (PeakScannerTM v1.0)

4.5. XY multiplex mikroszatellit markerszett (Ce_XY2_WJ) fejlesztése

A 8. táblázatban látható a munkám során detektált allélok száma (N_A) és hogy hány egyed (n) esetén amplifikált termékeket az adott primer.

8. táblázat: Munkánk során detektált allélok száma (N_A)

STR primerek	Kromoszóma	n	N_A
Ce_01_X_WJ	X	45	2
Ce_02_X_WJ	X	45	1
Ce_03_X_WJ	X	45	2
Ce_04_X_WJ	X	45	2
Ce_05_X_WJ	X	45	2
Ce_06_Y_WJ	Y	42	3
Ce_07_Y_WJ	Y	42	2
Ce_08_Y_WJ	Y	43	1

A 9. táblázatban összehasonlítottam a Primer3 program által jóslott, valamint a kutatásom során ténylegesen detektált allélméreteket. A Ce_06_Y_WJ és a Ce_08_Y_WJ primerek esetében megkaptam a várt nagyságú termékeket, a többi primerrel nem pontosan a várt terméknagyságokat kaptam. A Ce_01_X_WJ, Ce_02_X_WJ, Ce_03_X_WJ és Ce_08_Y_WJ primerek esetén egy allélméretet sikerült amplifikálnom, ezen lókuszok monomorfok voltak. Polimorfizmust a Ce_04_X_WJ, Ce_05_X_WJ, Ce_06_X_WJ és Ce_07_X_WJ primerek esetén figyeltem meg.

9. táblázat: Várt és munkánk során detektált allélméretek

STR primerek	Genomszekvenált bika		Vizsgált egyedek allélméretei (bp)
	<i>In silico</i> allélméretek (bp)	Tényleges allélméretek (bp)	
Ce_01_X_WJ	100	98	98
Ce_02_X_WJ	115	113	113
Ce_03_X_WJ	133	132	132
Ce_04_X_WJ	151	152	152, 154
Ce_05_X_WJ	201	212	209, 212
Ce_06_Y_WJ	290	288	288, 290, 292, 296
Ce_07_Y_WJ	370	375	373, 375
Ce_08_Y_WJ	457	457	457

A 10. és 11. táblázatban bemutatom a primerek által detektált X és Y kromoszómavonalakat, valamint az egyes vonalakhoz tartozó egyedek számát (n). X kromoszóma esetén 3 (X1, X2, X3), Y kromoszóma esetén 5 (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5) haplotípust különítettem el.

10. táblázat: X kromoszóma vonalak

	Ce_01_X_	Ce_02_X_	Ce_03_X_	Ce_04_X_	Ce_05_X_	n
	WJ	WJ	WJ	WJ	WJ	
X1	98	113	132	152	209	1
X2	98	113	132	152	212	33
X3	98	113	132	154	212	9

11. táblázat: Y kromoszóma vonalak

	Ce_06_Y_WJ	Ce_07_Y_WJ	Ce_08_Y_WJ	n
Y1	288	373	457	2
Y2	288	375	457	36
Y3	290	373	457	2
Y4	292	373	457	1
Y5	296	373	457	2

A 12. és 13. táblázatokban feltüntettem az X és Y kromoszóma haplotípusok előfordulását populációsztintre lebontva, ahol n az adott haplotípusba eső egyedek számát jelöli. Az X1 és Y1 haplotípusok csak a szabadon élő vajszlói populáció esetén fordultak elő. Az X1 haplotípus 1 egyed, míg az Y1 haplotípus 2 egyed esetén fordult csak elő. A leggyakoribb haplotípusok az X2 és Y2 vonalak voltak.

12. táblázat: X kromoszóma vonalak populációnként

	n	X1	X2	X3
Lábod	21	-	16	5
Vajszló	15	1	13	1
Bószénfa	7	-	5	2
Szabad	36	1	29	6
Kert	7	-	5	2

13. táblázat: Y kromoszóma vonalak populációnként

	n	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
Lábod	21	-	18	1	-	2
Vajszló	15	2	12	-	1	-
Bőszénfa	7	-	-	1	-	6
Szabad	36	2	30	1	1	2
Kert	7	-	-	1	-	6

A haplotípusok gyakorisága alapján számolt Nei-féle diverzitási adatokat a 14. és 15. táblázatban összegeztem populációsztire lebontva külön X és Y vonalak esetén. A D értékek jelölik a haplotipikus diverzitási értékeket. Minél magasabb a D érték, annál nagyobb a diverzitás.

14. táblázat: Haplotípus diverzitás X kromoszóma vonalak esetén

	n	X1	X2	X3	D
Lábod	21	-	0,762	0,238	0,3810
Vajszló	15	0,067	0,867	0,067	0,2571
Bőszénfa	7	-	0,714	0,286	0,4762
Szabad	36	0,028	0,806	0,167	0,3317
Kert	7	-	0,714	0,286	0,4762

15. táblázat: Haplotípus diverzitás Y kromoszóma vonalak esetén

	n	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	D
Lábod	21	-	0,857	0,048	-	0,095	0,2762
Vajszló	15	0,133	0,800	-	0,067	-	0,3667
Bőszénfa	7	-	-	0,143	-	0,857	1,1429
Szabad	36	0,056	0,833	0,028	0,028	0,056	0,3103
Kert	7	-	-	0,143	-	0,857	1,1429

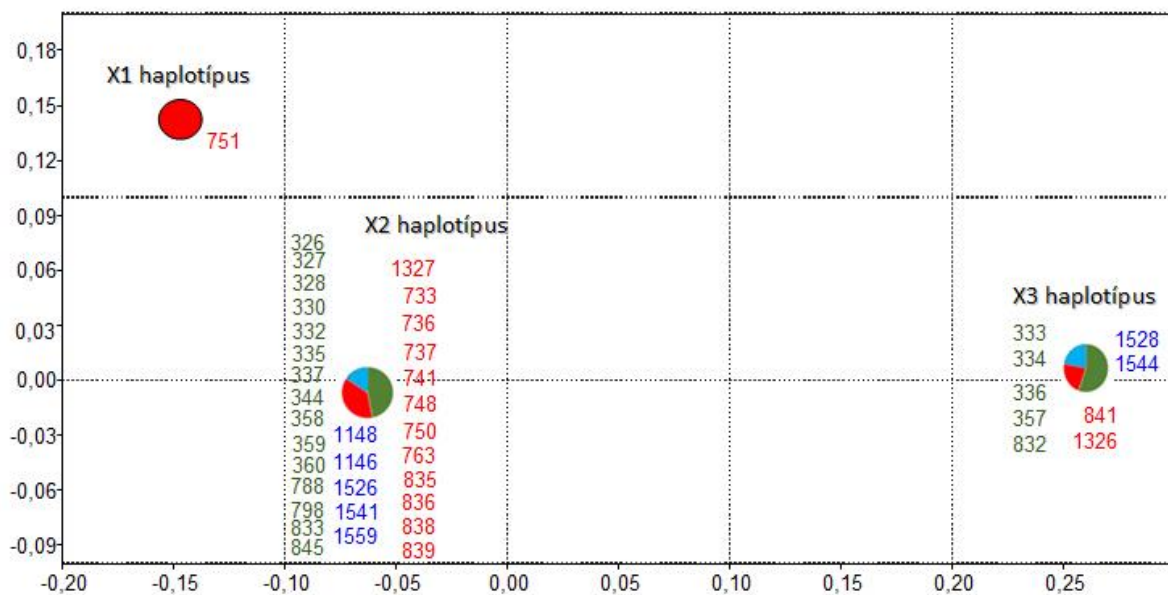
A haplotípus diverzitás értékeket összevettem az allélgyakoriságok alapján számolt Shannon-féle diverzitás index (sHa) értékeivel is, amit a korábban fejlesztett 10 autoszómás marker (SZABOLCSI et al. 2014) valamint az általam vizsgált X és Y kromoszómás markerekre is meghatároztam a GenAlEx program segítségével (16. táblázat).

16. táblázat: Haplotípus diverzitási értékek (D) összevetése Shannon-féle diverzitási index-szel (H)

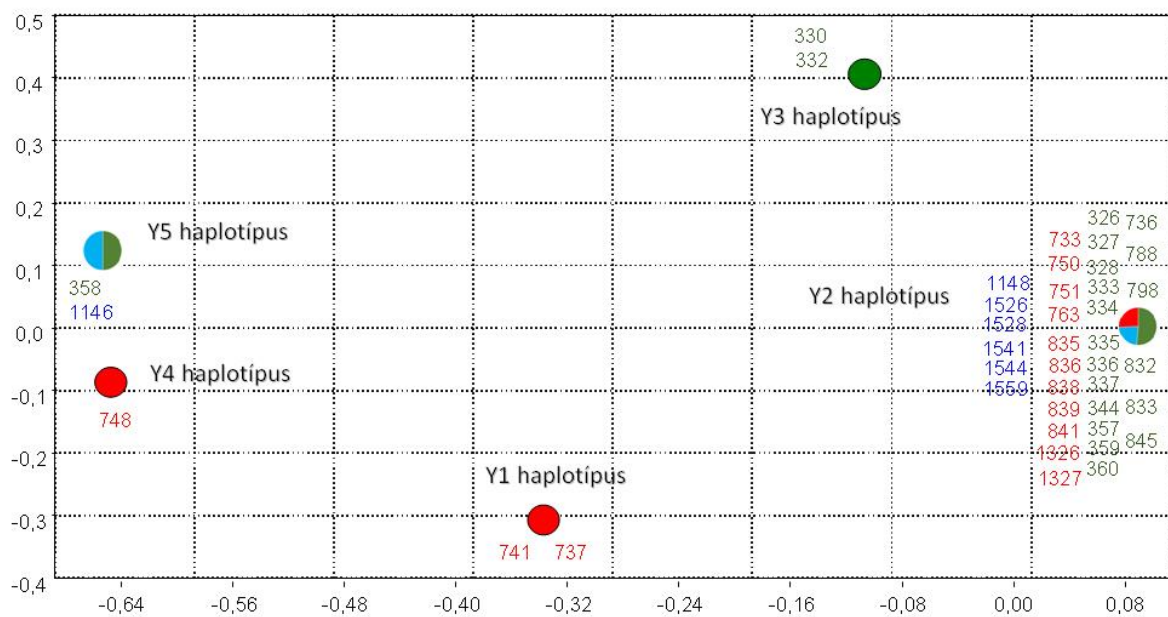
Populáció	n	Autoszómás	X markerek		Y markerek	
		H	H	D	H	D
Lábod	21	1,911	0,110	0,381	0,304	0,276
Vajszló	15	1,961	0,128	0,257	0,248	0,367
Bőszénfa	7	1,601	0,120	0,476	0,273	1,143
Szabad	36	2,054	0,124	0,332	0,305	0,310
Zárt	7	1,601	0,120	0,476	0,273	1,143

A PAST program segítségével főkoordináta-analízist és cluster-analízist készítettem (9., 10. és 11. ábra). Az X és Y kromoszómás mikroszatellita markerekkel készült főkoordináta-analízis jól szemlélteti, hogy a különböző haplotípus csoportok kategóriájuknak megfelelően elkülönültek (9. és 10. ábra). Az X kromoszómás markerek három haplotípust adtak, az Y kromoszómás markerek pedig ötöt.

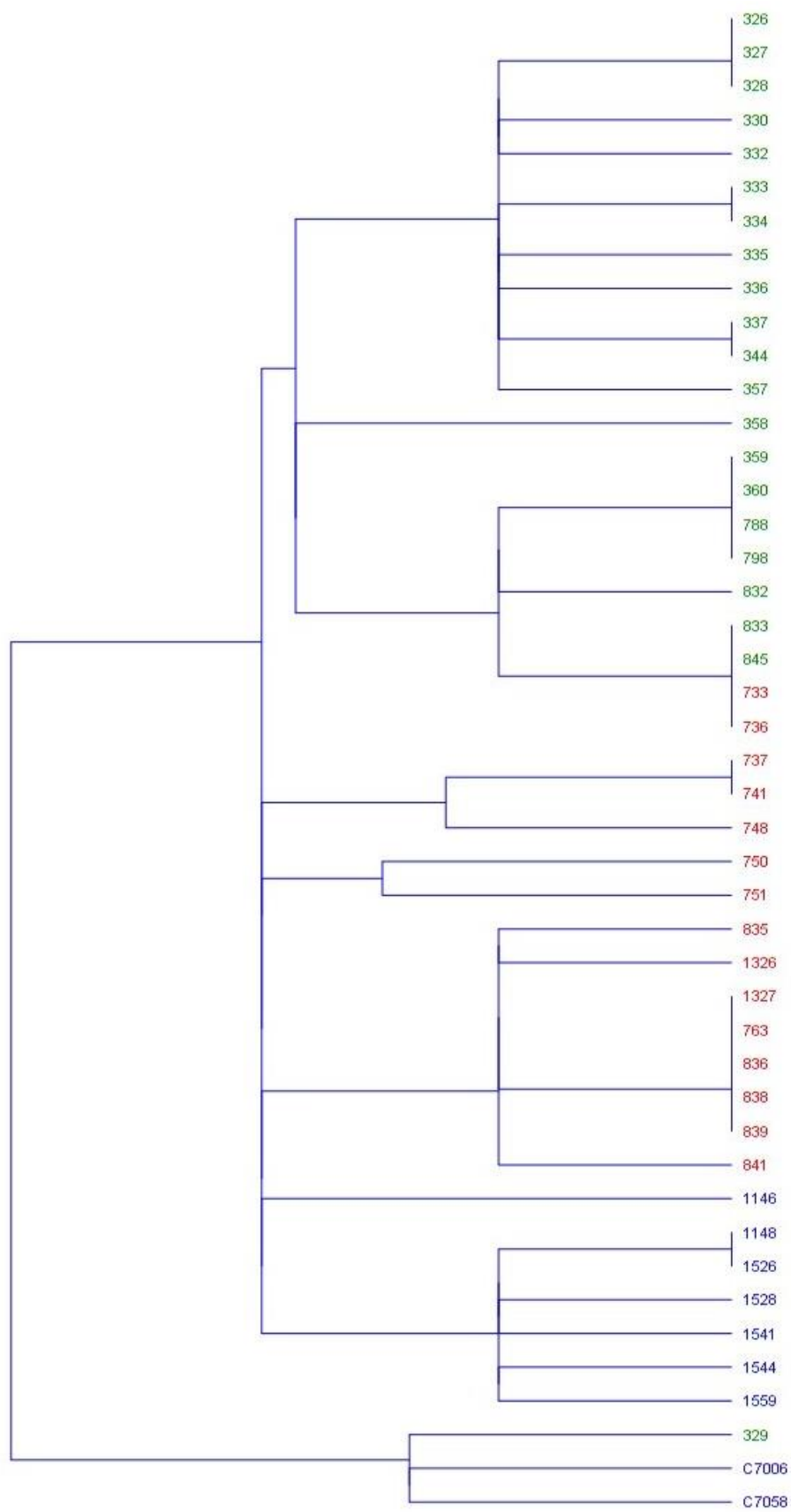
A cluster-analízis eredményeként kapott dendogramon két nagy főágat figyelhetünk meg. Az egyik ágon csak a gímszarvas tehenek fordulnak elő, jól elkülönülve a bikáktól. A másik főágon további csoportosulásokat figyelhetünk meg a bikák között. A Bőszénfáról, Vajszlóról és Lábodról származó populációk viszonylag elkülönülnek egymástól, bár két vajszló egyed keveredést mutat a lábodi populációval.



9. ábra: Főkoordináta-analízis gímszarvas bika egyedek esetén, X kromoszómás markerekkel: kék - Bőszénfa, piros - Vajszló, zöld – Lábod (PAST v2.17c)



10. ábra: Főkoordináta-analízis gímszarvas bika egyedek esetén, Y kromoszómás markerekkel: kék - Bőszénfa, piros - Vajszló, zöld – Lábod (PAST v2.17c)



11. ábra: Dendrogram: kék - Bőszénfa, piros - Vajszló, zöld – Lábod (PAST v2.17c)

4.6. Esettanulmány: Tehén-Bika-Borjú leszármazási vizsgálat

Kutatásunk során megfigyeltük három bőszenfai gímszarvas 'anya x apa → borjú' kapcsolatát az X és Y kromoszómás tervezett primereinkkel. Ezzel a tanulmánnyal ellenőrizni szeretnénk volna, hogy az utódok nyomon követése mennyire valósulhat meg primereinkkel, illetve milyen az X és az Y kromoszómák öröklődése, illetve próbáltuk ellenőrizni, hogy a tervezett primereinkkel a későbbiekben anyai és apai leszármazási vonalakat fel tudunk-e térképezni.

Szabolcsi Zoltán és munkatársai kifejlesztettek két multiplex PCR-hez használható mikroszatellita szettet, melyek gímszarvas egyedazonosításhoz alkalmazhatóak (DeerPlex1, DeerPlex2). Mindkét plex öt-öt darab, autoszómás kromoszómákra tervezett primer párt tartalmaz. Tanulmányunkhoz ezt a tíz primer párt használtuk fel, hogy egy bőszenfai szarvasfarmon nevelt gímszarvas bikaborjú (biobanki azonosító: 1528) apját és anyját meghatározzuk (17. táblázat). A DeerPlex1 és DeerPlex2 segítségével megállapítottuk, hogy az anyatehén a C7006-os, az apabika az 1148-as biobanki azonosítójú szülő. A táblázatunkban jól látszik, hogy a bikaborjú mely autoszómás kromoszóma lókuszokat örökölte a szülőktől. SZABOLCSI et al. (2014)

A PCR vizsgálatokat elvégeztük a tanulmányunkban fejlesztett X és Y kromoszómás primerekkel is. Azt szeretnénk volna ellenőrizni, hogy az általunk tervezett primerek alkalmasak-e gímszarvas utódok nyomon követésére, illetve milyen az X és Y kromoszómák öröklődése. Próbáltuk megfigyelni azt is, hogy a primerek a továbbiakban alkalmasak lehetnek-e leszármazási vonalak feltérképezéséhez.

Biológiai előismereteinkből, tudjuk, hogy a hím utód az X kromoszómáját az anyától, az Y kromoszómáját pedig az apától örököli. A 17. táblázatunkban feltüntettük, az X és Y kromoszómás primerekkel detektált allélméreteket, mind a bikaborjú, és mind a szülők esetében. Jól látszik, hogy a bikaborjú X kromoszómás primerekkel kapott allélméretei megegyeznek az anyatehénével, illetve az Y kromoszómás primerek esetén megkaptuk az apabika Y kromoszómás allélméreteit.

További kísérletekben elvégeztük az anyatehén, az apabika és a bikaborjú mitokondriális D-loop szekvenciáira tervezett primerrel a PCR reakciókat. A D-loop szekvencia megszekvenálása után azt az eredményt kaptuk, hogy az mtDNS anyai ágon öröklődik.

17. táblázat: Utódok nyomon követése a Ce_XY_WJ plexel

	STR primerek	Kromoszóma	Allélméretek (bp)		
			apabika (1148) ♂	bika borjú (1528) ♂	anyatehén (C7006) ♀
DeerPlex1	C229	21	111	107	107
			111	111	111
	T26	14	159	176	180
			176	184	184
	T193	13	132	132	141
			162	141	141
	T108	20	121	121	129
			150	129	159
	T123	10	125	117	117
			129	125	129
DeerPlex2	T501	23	139	139	145
			139	145	167
	T172	28	112	116	116
			136	136	140
	T156	29	149	140	132
			173	149	140
	C01	14	230	209	209
			230	230	209
	T507	9	191	187	187
			195	191	199
Ce_XY_WJ Plex	Ce_01_X_WJ	X	98	-	94
			-	98	98
	Ce_02_X_WJ	X	114	-	114
			-	114	114
	Ce_03_X_WJ	X	132	-	132
			-	132	132
	Ce_04_X_WJ	X	152	-	152
			-	154	154
	Ce_05_X_WJ	X	212	-	212
			-	212	212
	Ce_06_Y_WJ	Y	288	288	-
			-	-	-
	Ce_07_Y_WJ	Y	375	375	-
			-	-	-
	Ce_08_Y_WJ	Y	457	457	-
			-	-	-

5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A bioinformatikai szűrések során összesen 73.870 ismétlődő motívumot határoló szekvenciára lehetett primert tervezni, amelyek közül 29.454 az X és 714 mikroszatellit pedig az Y kromoszómára esett. A kiszűrt mikroszatellit primerek közül kiválasztottunk 18 primer párt, melyeket megrendeltünk és teszteltünk gímszarvas DNS mintákon PCR-rel. A 18 db primer párból 3 db nem működött így a további vizsgálatokhoz 15 db-ot találtunk alkalmasnak. A QDD programcsomaggal és a Primer3 programmal a szűrések működtek, tehát ezek a bioinformatikai szoftvercsomagok primer tervezésre alkalmasak.

Ebből a 15 markerből 8 vizsgálatát végeztem el, hogy a továbbiakban multiplex PCR-hez optimalizálhassam. A kiválasztás fontos szempontja volt az eltérő allélméret és az egymáshoz közel álló primerek fluoreszcens jelölésében való különbség. Az elvégzett kísérletek után megállapítható, hogy a tervezett primerek működnek és multiplex PCR-ben használhatóak, nem zavarják egymás amplifikációját. A multiplex PCR egy gyors, költséghatékony és könnyen alkalmazható módszer, mely kevesebb munkaigénnyel jár, mint külön-külön reakcióban összemérni a primereket.

A multiplex PCR-t 45 gímszarvas mintán végeztem el, melyek Magyarország déli területeiről – Lábod, Vajszló, Böszénfa – származnak. A minták közül 9 egyed zárt kertből és 36 szabad élőhelyről származott. A legmagasabb detektált allélszám (N_A) 3 volt a Ce_06_Y_WJ primer esetén, a Ce_02_X_WJ és Ce_08_Y_WJ mikroszatellitek pedig monomorfnek bizonyultak. Három X kromoszóma haplotípust és 5 Y kromoszóma haplotípust sikerült elkülönítenem. A legtöbb egyed (n) az X2 (33 db) és Y2 (36 db) vonalba tartozott, míg a legkevesebb az X1 (1 db) és Y4 (1db) vonalba. A kapott allélszámok és a polimorf lókuszok száma kevés, de ennek oka lehet a rendelkezésemre álló alacsony mintaszám.

Összehasonlítva a Primer3 program által prediktált és a tanulmányunkban PCR után detektált allélméreteket megfigyelhető, hogy kis eltérések vannak a mérettartományok között, de a várt mérettartomány közelébe eső méreteket kaptuk, tehát a bioinformatikai primer tervezés használható eredményeket adott.

Populációkra lebontva az eredményeket a megfigyelt X haplotípusok a következőként alakultak: a lábodi populációt 2 (X2 és X3), a vajszlói populációt 3 (X1, X2, X3) és a böszénfai populációt 2 (X2, X3) haplotípusba tudtuk sorolni, azaz a vajszlói populációban találtunk egy unikális, csak adott populációra jellemző X kromoszómás vonalat. Az Y haplotípus esetén: Lábod 3 (Y2, Y3, Y5), Vajszló 3 (Y1, Y2, Y4) és Böszénfa 2 (Y3, Y5)

haplotípusra különült el. Ebben az esetben is a vajszlói populációban található egy unikális haplotípus, tehát ez a populáció különül el leginkább a többtől. A szabadon élő gímszarvas populációknál mind a három X és mind az öt Y haplotípus előfordult. A zárt kerti populációnál csak kettő X (X2, X3) és kettő Y (Y3, Y5) vonal található meg, ami arra utal, hogy a tenyészkerti populációnál magasabb a beltenyésztettség, bár a vizsgált minták száma ebben az esetben még elég alacsony.

A Nei-féle haplotípus diverzitás és a Shannon-index értékei elég alacsonyak, azaz kis genetikai variabilitásra utalnak. Érdekes megfigyelni, hogy a zárt kerti bőszenfai populáció diverzebb X kromoszómára, mint a szabadon élő populációk. Ez abból adódhat, hogy az indexek értékei korrigálva vannak a mintaszámmal, ezért az alacsony mintaszám felfelé torzítja az értéküket, így a felhasznált minták száma nem elég ahhoz, hogy pontos populációgenetikai következtetéseket vonhassunk le.

A PAST program segítségével ábrázolt törzsfaj jól mutatja, hogy az egyes populációk nem különülnek el egymástól tökéletesen, közöttük kismértékű átfedés látható. Ennek oka lehet, hogy ezek a populációk térben viszonylag közel esnek egymáshoz, ezért a populációk között bizonyos keveredés van. A bőszenfai zárt kerti állomány az eredetileg a területen élő gímszarvasok bekerítésével lett kialakítva, és a létrehozás óta többször frissítették az állományt a környékről származó állatokkal, ezért kevert állományról van szó.

Az általam fejlesztett X és Y kromoszómás mikroszatellit markerek fragmenthossz méreteiből főkoordináta-analízist készítettem a PAST program segítségével. Ahol egyértelműen megkaptam a három X és öt Y haplotípus csoportokat. A későbbiekben további X-Y mikroszatellit marker panellel (Ce_XY_KZS), valamint autoszómás mikroszatellit markerekkel (SZABOLCSI et al. 2014) együtt vizsgáljuk az északi zempléni populációt és a déldunántúli gímszarvas populációkat.

Tehén-Bika-Borjú leszármazási vizsgálat

Esettanulmányunk megerősíti az X kromoszóma anyai ágon történő öröklődését, bár a mikroszatellitek alacsony polimorfizmusa miatt sok közös allél figyelhető meg az apabika és az anyatehén között. A Ce_04_X_WJ primer az, amely szemlélteti, hogy az X kromoszómát az anyától örökölte a borjú. Y kromoszóma esetén pedig az apával való rokonság látszik. A mitokondriális vizsgálatunkban megszekvenált D-loop szekvenciák összehasonlítása is azt mutatja, hogy a mitokondrium anyai ágon öröklődik, mivel a borjú mtDNS szekvenciája megegyezik az anyaállat szekvenciájával, és eltér az apaállat szekvenciájától.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az európai gímszarvas (*Cervus elaphus*) Magyarország faunájának egyik legjelentősebb nagyvadja. Sokféle gazdasági haszonnal bír, jelentős ökológiai értéke van, más állatok számára élelemforrás, valamint a vegetáció összetételét és struktúráját is befolyásolja. Dr. Orosz László akadémikus vezetésével Magyarországon elsőként elkezdődött a gímszarvas genomprogram, amely az európai gímszarvas teljes genomjának azonosítását tűzte ki célul.

A gímszarvas genom ismeretében a QDD programcsomag segítségével a teljes genomra több, mint 950.000 mikroszatellit markert azonosítottunk, majd a mikroszatellitek határoló régióira 73.800 genomi lókuszra sikerült primert terveznünk a Primer3 program segítségével. A genom szekvenálásból származó szekvenciákat szarvasmarha (*Bos taurus*) referencia X és Y kromoszómára illesztve az új markerek közül nemi kromoszómás markereket válogattunk, melyekkel az anyai és apai leszármazási sorokat szerettük volna nyomon követni.

A DNS diagnosztikához a fluoreszcens jelölt primereket multiplex PCR reakcióhoz optimalizáltam, majd a biobanki gímszarvas mintákon elkezdtem meghatározni az allél gyakoriságokat az egyes egyedeken és populációkon, valamint megvizsgáltam a zárt kerti és a szabadon élő gímszarvas populációk közötti kapcsolatot.

A korábbi európai felmérés Magyarországról három haplotípust írt le a mitokondriális kontroll régió szekvenciák alapján. SKOG et al. (2009) Az eddig rendelkezésünkre álló szekvencia adatok alapján ennél több haplotípust tudtunk leírni a dunántúli populációban.

Az elvégzett X és Y kromoszóma genotipizálás eredményeként a tesztelt 18 marker közül az általam vizsgált 5 X kromoszómás mikroszatellita esetében lókuszonként átlagosan 1,8 allélt, a 3 Y kromoszómás markernél pedig átlagosan 2 allélt találtam. A mikroszatellitek közül eddig 6 mutatott polimorfizmust, azaz ezeknél legalább kettő allélt figyeltem meg. Ezen markerek segítségével eddig 3 különböző X kromoszómás és 5 különböző Y kromoszómás vonalat tudtam azonosítani. A számolt diverzitás-indexek alacsony értékeket adnak a vizsgált populációkban, de az alacsony mintaszám torzítja a valós diverzitás értékeket.

A dolgozatban leírt markerek lehetővé teszik az X, illetve Y kromoszómák leszármazásának egyértelmű követését, és a mitokondriális haplotípusoknál nagyobb felbontást mutatnak.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ főigazgatójának, Dr. Jenes Barnabásnak, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak, és Dr. Bősze Zsuzsannának, valamint a Mezőgazdasági Genomikai és Bioinformatikai Csoport vezetőjének, Dr. Barta Endrének, hogy lehetővé tették számomra a jelen dolgozat elkészítéséhez szükséges kísérleti munka elvégzését.

Köszönettel tartozom Dr. Toldi Ottó belső témavezetőmnek, Dr Stéger Viktor külső témavezetőmnek a munkám, valamint dolgozatom elkészülésében nyújtott segítségükért, hogy szakmai tapasztalataikkal irányították annak elkészülését.

Köszönöm Frank Krisztiánnak a munkában nyújtott sok segítséget, rengeteg türelmet és kitartást.

Köszönet illeti munkatársaimat, Kálmán Zsófiát, Bana Ágnes Nórát, Németh Andreát, Gergely Anitát és Kanizsai Barbarát.

Végül szeretném megköszönni családomnak, hogy a nehéz egyetemi pillanatokban mindig mellettem voltak és a munkámban rengeteget támogattak.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (2002) Molecular Biology of the Cell, 4th edition. Garland Science, New York, p. 769-771.
- BÁLINT T., FATALIN GY., PÁLL E., SUGÁR L. (1985) A gímszarvas és vadászata. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- BURBAITÉ L., CSÁNYI S. (2009) Roe deer population and harvest changes in Europe. Estonian Journal of Ecology, 58(4): 169-180.
- BURBAITÉ L., CSÁNYI S. (2010) Red deer population and harvest changes in Europe. Acta Zoologica Lituanica, 20(4): 179-188.
- FARAGÓ S. (2002) Vadászati állattan. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 394-411.
- GEIST V. (1998) Deer of the World Their Evolution, Behavior, and Ecology. Stackpole Books, Mechanicsburg, p. 170-223.
- HAJÓSNÉ NOVÁK M. (1999) Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- HAMMER Ř., HARPER DAT., RYAN PD. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4(1): 9.
- HORN P. (2004) A gímszarvastenyésztés mint új állattenyésztési ágazat – az első háziasított nagytestű emlős faj ötezer év óta. Magyar Tudomány, Budapest, 110(50): 453-460.
- HOWELL N, HALVORSON S, KUBACKA I, MCCULLOUGH DA, BINDOFF LA, TURNBULL DM. (1992) Mitochondrial gene segregation in mammals: is the bottleneck always narrow?. Human Genetics, 90:117-20.
- LOVARI S., HERRERO J., CONRO, J., MARAN T., GIANNATOS G., STUBBE M., AULAGNIER SJ., DEIDI T., MASSETI M. NADER I., DE SMET K., CUZIN F. (2008) *Cervus elaphus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org> Letöltve: 2014.10.15.
- MARINCS F., MOLNÁR J., TÓTH G., STÉGER V., BARTA E. (2013) Introgression and isolation contributed to the development of Hungarian Mangalica pigs from a particular European ancient bloodline. Genetics Selection Evolution, 45: 22.

- MEGLÉCZ E., COSTEDOAT C., DUBUT V., GILLES A., MALAUSA T., PECH N., MARTIN J-F. (2010) QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26(3): 403-404.
- MILNER JM., BONENFANT C., MYSTERUD A., GAILLARD JM., CSÁNYI S., STENSETH NC. (2006) Temporal and spatial development of red deer harvesting in Europe: biological and cultural factors. *Journal of Applied Ecology*, 43(4): 721-734.
- MYERS P., ESPINOSA R., PARR CS., JONES T., HAMMOND GS., DEWEY TA. (2013) The Animal Diversity Web (online). <www.animaldiversity.org> Letöltve: 2014.10.15.
- NEI M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- PÁLL E. (1985) A gímszarvas és vadászata. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- PASSARGE E. (2012) Color Atlas of Genetics. Thieme, Stuttgart, p. 128-129.
- 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.
- PITRA C., FICKEL J., MEIJAARD E., GROVES PC. (2004) Evolution and phylogeny of old world deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 880-895.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA M., BOLIBOK H. (2004) Characteristics and comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular & Molecular Letters*, 9: 221-238.
- RHEAD B., KAROLCHIK D., KUHN RM., HINRICHS AS., ZWEIG AS., FUJITA PA., DIEKHANS M., SMITH KE., ROSENBLOOM KR., RANEY BJ., POHL A., PHEASANT M., MEYER LR., LEARNED K., HSU F., HILLMAN-JACKSON J., HARTE RA., GIARDINE B., DRESZER TR., CLAWSON H., GALT P., BARBER GP., DAVID HAUSSLER D., KENT WJ. (2009) The UCSC genome browser database: update 2010. *Nucleic Acids Research*. Publikálva online: 2009. november 9. p.1-7 <www.genome.ucsc.edu> Letöltve: 2014.10.16.
- ROZEN S., SKALETSKY H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Molecular Biology*, 132: 365-386.

- SAGHAI MMA, BIYASHEV RM., YANG GP., ZHANG Q., ALLARD RW. (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91(12): 5466-5470.
- SEABURY CM., BHATTARAI EK., TAYLOR JF., VISWANATHAN GG., COOPER SM., DAVIS DS., DOWD SE., LOCKWOOD ML., SEABURY PM. (2011) Genome-wide polymorphism and comparative analyses in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): a model for conservation genomics. *PLoS ONE*, 6(1): e15811. doi:10.1371/journal.pone.0015811.
- SHADEL GS, CLAYTON DA. (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Reviews Biochemistry*, 66: 409-35.
- SKOG A., ZACHOS FM., RUENESS EK., FEULER PGD., MYSTREUD A., LANGVATN R., LORENZINI R., HMWE SS., LEHOCZKY I., HARTL GB., STENSETH NC., JAKOBSEN KS. (2009) Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Journal of Biogeography*, 36(1): 66-77.
- SLATE J., VAN STIJN TC., ANDERSON RM., MCEWAN KM., MAQBOOL NJ., MATHIAS HC., BIXLEY MJ., STEVENS DR., MOLENAAR AJ., BEEVER JE., GALLOWAY SM., TATE ML. (2002): A deer (subfamily *Cervinae*) genetic linkage map and the evolution of ruminant genomes. *Genetics*, 160: 1587-1597.
- STÉGER V., MOLNÁR A., BORSY A., GYURJÁN I., SZABOLCSI Z., DANCS G., MOLNÁR J., PAPP P., NAGY J., PUSKÁS L., BARTA E., ZOMBORSZKY Z., HORN P., PODANI J., SEMSEY SZ., LAKATOS P., OROSZ L. (2010): Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: expression dynamics for regulatory and effector genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(4): 273-87.
- SUGÁR L. (2003) A gímszarvas állomány csökkentés mértéke, üteme és módja. A vadgazdálkodás időszerű kérdései. 1. Gímszarvas. Országos Magyar Vadászkamara, p. 42-47.
- SUTOVSKY P, SCHATTEN G. (2000) Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *International Review of Cytology*, 195:1-65.

- SZABOLCSI Z., EGYED B., ZENKE P., PADAR ZS., BORSY A., STEGER V., PASZTOR E., CSANYI S., BUZAS ZS., OROSZ L. (2014) Constructing STR Multiplexes for Individual Identification of Hungarian Red Deer. *Forensic Sciences*, 59(4): 1090-1099.
- SZEMETHY L., BÍRÓ ZS., HELTAI M. (2005) Vadászati állattan és etológia. Emlősök. Egyetemi jegyzet. Szent István Egyetem, Vadgazda Mérnök Szak – Vadbiológiai és Vadgazdálkodási Tanszék, Gödöllő, 103: 5-9.
- TATE ML., MATHIAS HC., FENNESSY PF., DODDS KG., PENTY JM., HILL DF. (1995): A new gene mapping resource: interspecies hybrid between Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus elaphus*). *Genetics*, 139: 1383-1391.
- TAUTZ D., RENZ M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10): 4127-4138.
- VENETIANER P. (1998) Az emberi mitokondriumok genetikája. *Természet Világa*. 12(11): 486-488.
- WANG Z. (1988): Karyotypes of deer. New scientific, Peking, Kína.
- WENZ HM., ROBERTSON JM., MENCHEN S., OAKS F., DEMOREST DM., SCHEIBLER D., ROSENBLUM BB., WIKE C., GILBERT DA., EFCAVITCH JW. (1998) High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Research*, 3: 69-80.

http1: www.szarvasfarm.ke.hu

http2: www.mta.hu/tudomany_hirei/az-agancsfejlodes-genetikaja-72141/

http3: www.nimrodhunting.com

http4: www.mapseengine.google.com

9. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Tanulmányunkban felhasznált minták pontos adatai

Biobanki azonosító	Származás (Dél-Dunántúl)	Tartásforma	Nem
329	Lábod	szabad	♀
326	Lábod	szabad	♂
327	Lábod	szabad	♂
328	Lábod	szabad	♂
330	Lábod	szabad	♂
332	Lábod	szabad	♂
333	Lábod	szabad	♂
334	Lábod	szabad	♂
335	Lábod	szabad	♂
336	Lábod	szabad	♂
337	Lábod	szabad	♂
344	Lábod	szabad	♂
357	Lábod	szabad	♂
358	Lábod	szabad	♂
359	Lábod	szabad	♂
360	Lábod	szabad	♂
788	Lábod	szabad	♂
798	Lábod	szabad	♂
832	Lábod	szabad	♂
833	Lábod	szabad	♂
845	Lábod	szabad	♂
733	Vajszló	szabad	♂
736	Vajszló	szabad	♂
737	Vajszló	szabad	♂
741	Vajszló	szabad	♂
748	Vajszló	szabad	♂
750	Vajszló	szabad	♂
751	Vajszló	szabad	♂
835	Vajszló	szabad	♂
1326	Vajszló	szabad	♂
1328	Vajszló	szabad	♂
C7006	Bőszénfa	zártkert	♀
C7058	Bőszénfa	zártkert	♀
1146	Bőszénfa	zártkert	♂
1148	Bőszénfa	zártkert	♂
1526	Bőszénfa	zártkert	♂
1528	Bőszénfa	zártkert	♂
1541	Bőszénfa	zártkert	♂
1544	Bőszénfa	zártkert	♂
1559	Bőszénfa	zártkert	♂

2. melléklet: Gímszarvas mintákból kivont DNS koncentrációja és tisztasági adatai

	ng/ul	260/280	260/230
329	53,29	2,02	0,82
326	137,25	1,61	1,09
327	135,05	1,57	0,87
328	301,05	1,56	0,5
330	61,3	2,05	1,37
332	26,21	2,11	1,5
333	223,53	1,62	0,49
334	261,64	1,94	2,23
335	37,47	1,84	1,45
336	16,88	1,77	1,22
337	47,73	1,97	0,65
344	70,85	1,68	1,41
357	136,85	1,84	2,03
358	162,51	1,9	2,09
359	50,93	1,78	1,41
360	163,18	1,74	1,2
788	85,74	1,95	1,91
798	215,27	1,99	2,05
832	130,65	1,9	1,7
833	128,18	2,02	2,13
845	105,07	1,97	2,06
733	177,98	2	2,16
736	13,49	1,65	0,6
737	63,04	1,99	1,94
741	33,41	1,68	0,97
748	73,91	1,95	1,84
750	37,26	1,58	0,67
751	103,46	1,89	1,45
835	86,38	1,98	1,81
1326	38,88	1,96	0,2
1327	72,08	1,99	0,36
C7006	57,27	1,73	1,2
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
1528	88,11	1,54	0,63
1541	8,21	1,95	0,46
1544	10,1	2,03	0,83
1559	13,06	2,19	1,14
763	87,57	1,68	1,02
836	134,83	1,94	1,71
838	150,03	1,94	2,21
839	12,88	1,33	0,47
841	55,62	1,95	1,88