

36. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

Mikroszatellita markerkészlet igazságügyi célú fejlesztése a
Magyarországon élő dámszarvasok egyedi szintű azonosítására

Készítette:

Turi Orsolya

III. évfolyam biológia BSc hallgató

Állatorvostudományi Egyetem

Témavezetők:

Dr. Zenke Petra

Zorkóczy Orsolya

Budapest

2022

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
1.1. Az európai dāmavad (<i>Dama dama</i>) általános leírása.....	3
1.2. A magyarországi dāmszarvas-gazdálkodás jellemzői.....	4
1.3. Igazságügyi célú állatgenetika vizsgálatok a <i>Cervidae</i> családban.....	5
1.3.1 Mikroszatellita alapú genetikai vizsgálatok.....	7
1.4. Dāmszarvassal kapcsolatos genetikai kutatások.....	10
2. Célkitűzések.....	12
3. Anyagok és módszerek.....	13
3.1. Mintagyűjtés és feldolgozás.....	13
3.2. Markerek kiválasztása (tetranukleotid mikroszatelliták).....	13
3.3. A három tesztelt marker csoport.....	15
3.4. Markerek monoplex tesztelése és PCR optimalizálása.....	16
3.5. Primerek fluoreszcens jelölése „farkas” technikával.....	18
3.6. Multiplex PCR vizsgálati rendszerek összeállítása.....	18
3.7. Markerek polimorfizmusának detektálása kapilláris elektroforézissel.....	18
4. Eredmények.....	20
4.1. Monoplex tesztelés.....	20
4.1.1. A. marker csoport.....	20
4.1.2. B. marker csoport.....	21
4.1.3. C. marker csoport.....	22
4.2. Multiplex tesztelés.....	22
4.3. A markerek polimorfizmusának felmérése kapilláris elektroforézissel.....	23
5. Összefoglalás.....	25
5.1. Monoplex PCR tesztelés.....	25
5.2. Multiplex fejlesztés és a „farkas” fluoreszcens jelölési technika alkalmazhatósága.....	26

5.3. Multiplex PCR vizsgálati rendszerek összeállítása	27
6. Köszönetnyilvánítás	30
7. Irodalomjegyzék.....	30

1. BEVEZETÉS

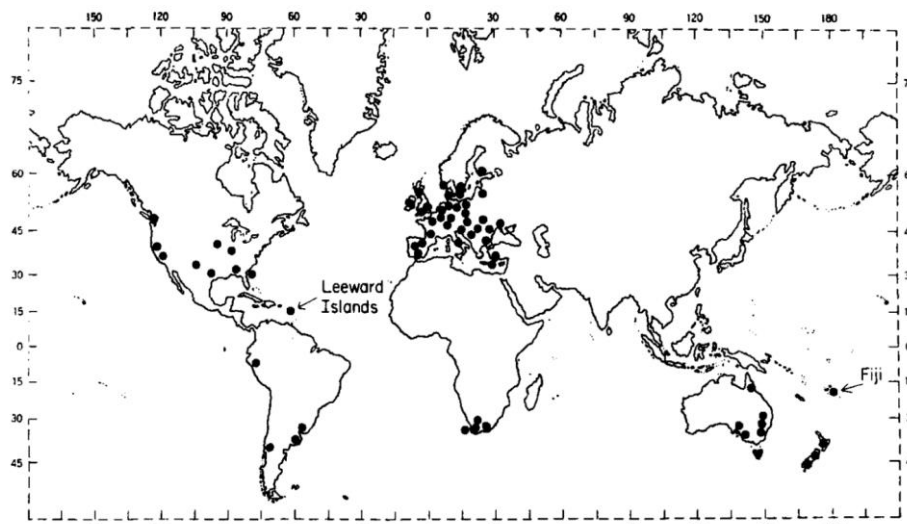
1.1. Az európai dámvad (*Dama dama*) általános leírása

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

Az európai dámszarvas nevével ellentétben eurázsiai eredetű, több kutatás is megerősítette, hogy a mai Törökország (Kis-Ázsia) területén élő dámvadak alkotják az utolsó őshonos populációt [8, 9]. A faj mára kozmopolita elterjedésűvé vált (1.ábra) [5], melyet elsősorban nem természetes folyamatok, hanem ember általi betelepítések eredményeztek, amik már a római civilizáció kora előtt megkezdődtek [9]. Erre azért volt szükség, mert korábban, még a Pleisztocén (jégkorszakok) idején, a faj szinte teljesen kipusztult Európából, ami akkor a fő elterjedési területe volt [10]. A klimatikus hatásokat a legújabb kutatások szerint csak Szicíliában, a Balkánon és Kis-Ázsia területén élte túl a dámszarvas [9]. A megmaradt kis populációk valószínűleg nem rendelkeztek a szükséges alkalmazkodó képességgel és genetikai diverzitással, hogy maguktól visszahódítsák területeiket, ezért ez csak emberi beavatkozással volt lehetséges [11].

A Pleisztocént követően a korai Neolitikum idején kezdődött meg a dámszarvas telepítése [9, 12]. Elsőként az Égei-tenger egyes szigeteire (Rodosz [12], Kréta [9]), majd a Bronzkorban több mediterrán területre is betelepítették nyugati irányban [12]. Később az egyik legnagyobb hatást a faj elterjedésére a Római Birodalom gyakorolta, hiszen a rómaiak terjesztették el Közép-és Észak-Európában [13]. Így egészen Portugáliáig [14] és a spanyol szigetvilágig (Mallorca [15]) elterjedt, sőt Britanniába is a rómaiak vitték be a dámszarvast [16]. A késő középkorban a Brit-szigeteken, és más Észak-európai régiókban újabb telepítési hullám következett, ami valószínűleg nagyban meghatározta a mai populációkat [13]. Ezt követően a

18-20. században zajlott nagyobb mértékű transzlokációja a dámszarvasnak, így az 1900-as évektől az Antarktist és Ázsiát leszámítva (kivéve Kis-Ázsia), valamennyi kontinensen jelen van, egészen a Karib-tenger térségétől Új-Zéland és Ausztrália szigetvilágáig (1.ábra) [5, 17].



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

1.2. A magyarországi dámszarvas-gazdálkodás jellemzői

A magyar dámszarvas populációról a 17. századból származnak az első írásos feljegyzések Gyulaj (Tolna megye) környékéről. A betelepülés körülményei, illetve az alapító egyedek eredete jelenleg még ismeretlen [18].

Manapság a Magyarországon élő nagyvadak közül a dāmavad rendelkezik a harmadik legnagyobb állománnyal, az európai őz (*Capreolus capreolus*) és gímszarvas (*Cervus elaphus*) után [19]. A legfrissebb adatok szerint több mint 40 000-re nőtt az egyedszáma [19]. A legjelentősebb populációk Pest és Tolna megyében találhatók (kb. 5000 egyed), ezek a populációk egyébként már az 1980-as években is meghatározóak voltak [5, 19]. A legkevesebb dámszarvas Jász-Nagykun-Szolnok és Borsod-Abaúj-Zemplén megyékben van (kb. 200-200 egyed) [19].

A fajnak jelentős vadgazdálkodási értéke van az országban, egyrészt a vadhús, másrészt az agancs trófeák miatt. Ezt bizonyítja az is, hogy a 2021-es évben az egyedek 42,5%-a kilövésre került (közel 17 000 dāmavad), melyből 421 970 kg vadhús és 1492 érmes trófea származott. Az utóbbiak közül 628 a legrangosabb arany minősítést kapta [19]. Az érmes trófeák önmagukban is nagy értéket képviselnek, illetve az értékesített vadhús is, de a dámszarvas (és egyéb vad) vadászata köré épült szolgáltatások további bevételt nyújtanak az egyes vállalkozásoknak és az államnak [19]. A 2020/2021-es vadászati évben a vadgazdálkodásból származó bevétel 30,889

millió Ft volt, tehát a faj gazdasági értéke nemcsak a belőle származó termékekből, hanem a vadászati engedélyekből és szolgáltatásokból is áll [19].

Magyarország számára így egyértelműen egy gazdaságilag értékes fajról van szó, ami természetvédelmi és kulturális értékekkel is rendelkezik [20]. Ezeket figyelembe véve vették bele a dámszarvast is az 1996.évi LV.-ös törvénybe, mely a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadászatról szól [20]. A törvény alapján csak a meghatározott területeken, megfelelő módszerekkel, vadászati idény idején és vadászati engedéllyel rendelkezve lehet elejteni a dāmvdad. Amennyiben bármelyik feltétel nem teljesül a kilövés során, akkor illegális vadászatról van szó.

Sajnálatos módon több kutatás is kimutatta Magyarországon az orvvadászat növekvő tendenciáját, de pontos számokat nehéz mondani [21, 22]. A dámszarvasok különösen csábító zsákmányt jelenthetnek ezeknek a vadászoknak, hiszen az országból kerülnek ki az egyik legjobb minőségű trófeák. Különösen Gyulaj környékén találhatóak a legértékesebb példányok, innen már több, a Nemzetközi Vadászati és Vadvédelmi Tanács (CIC) világranglistáján szereplő agancs is származik [23].

Az orvvadászatot azonban nehéz felfedezni és bizonyítani. Bár sokszor még a vadásznál van az illegálisan elejtett vad, de annak minden kétséget kizáró bizonyítása, hogy az adott egyedet ténylegesen nem megfelelő körülmények között lőtte ki, sokszor lehetetlen. A törvénszéki alkalmazottak munkáját tovább nehezíti a tény, hogy egyelőre nem áll rendelkezésre a hazai dāmokat egyedi szinten azonosítani képes genetikai módszer, amellyel a kilövés helyszínén és az elkövetőnél talált dámszarvastól származó biológiai anyagmaradványokat össze lehetne hasonlítani, és a vadászt az elkövetés helyszínéhez vagy az elejtett állathoz kötni [24, 25].

A dāmok védelme érdekében tehát szükség lenne egy, a jogkövetkezményekkel járó esetekben is használható, egyedi azonosításra alkalmas genetikai markerszett létrehozására, mely alkalmas lenne a fent említett ügyek megoldására. A kutatásunk célja tehát egy ilyen markerkészlet kifejlesztése. Ilyen kutatásokkal az igazságügyi állatgenetika tudománya foglalkozik.

1.3. Igazságügyi célú állatgenetika vizsgálatok a *Cervidae* családban

Az igazságügyi genetika célja a bűnesetekkel kapcsolatos biológiai bizonyítékok vizsgálata a bűntény megoldásának érdekében. A 2000-es évektől már nemcsak embereken elkövetett bűncselekmények esetében alkalmaznak genetikai vizsgálatokat, hanem megkezdődtek a vadvilág védelme érdekében végzett kutatások is [22, 26, 27, 28, 29, 30]. A vadon élő állatok

ellen, mint amilyen az általunk kutatott dámszarvas is, elsősorban az orvvadászat és illegális kereskedelem a leggyakrabban elkövetett bűncselekmény [31]. Emellett az állati eredetű biológiai nyomok genetikai vizsgálatát igényelhetik az esetleges vadgázolások [32], illetve azok az esetek is, mikor a hústermékeket nem a címkézésnek megfelelő állatfajból állítják elő [33, 34]. Az említett ügyek megoldásához sokféle genetikai markert alkalmaznak a kutatók, melyek a fajok elkülönítésére [33, 34, 35, 36, 37], az ivar meghatározására [38] vagy akár egyedi azonosításra [22, 26, 27, 28, 29] alkalmasak.

A vadvilág ellen elkövetett vagy vele kapcsolatos törvényszéki ügyek gyakori áldozatai a *Cervidae* családba tartozó fajok, mint amilyen a dámszarvas is [22, 26, 27]. Ezek a taxonok ugyanis jó minőségű vadhússal és értékes agancs trófeával rendelkeznek, ami kiváló célponttá teszi őket az orvvadászok számára. Mivel több idetartozó faj világszinten elterjedt [5, 39], ezért ez a probléma nemcsak regionálisan fordul elő [25, 26, 27]. Az ellenük elkövetett bűncselekmények felderítése érdekében több, a szarvasfélék családjába tartozó fajra igazságügyi használatra megfelelő módszert dolgoztak ki, melyek segítséget nyújthatnak a magyar dāmadvad populációra tervezni kívánt markerszettünk fejlesztésében [22, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 36, 37, 38]. A felsorolt fajok esetében már megvalósultak hasonló kutatások: gímszarvas [22], brit kolumbiai öszvérszarvas (*Odocoileus hemionus columbianus*) [26], öszvérszarvas (*Odocoileus hemionus hemionus*) [26], európai őz [27], és vapiti (*Cervus canadensis*) [28, 29].

Az alábbiakban említett módszerek nem mindegyike rendelkezik még validálással, így nem, vagy csak korlátozott mértékben felelnek meg a törvényszéki alkalmazás által előírt követelményeknek [24, 40]. A validálási folyamat részeként egyrészt fel kell tüntetni a fejlesztéshez használt releváns referencia cikkeket, a vizsgált faj pontos adatait (pl. taxonómiai besorolás), a minták feldolgozásához használt módszereket (pl. DNS (dezoxiribonukleinsav) kinyerés módja), illetve a primerek információit (lokusz, szekvencia) [40]. A markerkészlethez meg kell továbbá állapítani a megegyezési valószínűséget (MP: match probability) és a valószínűségi rátát (LR: likelihood ratio) [27]. Az MP annak a valószínűsége, hogy adott populációból random kiválasztott egyed DNS profilja megegyezik a populáció egy másik egyedének genetikai profiljával [27]. Az LR pedig megmutatja, hogy mennyire valószínű egy bizonyos állapot egy alternatíva teljesülése esetén [27]. Mindkét esetben az alacsony értékek kedvezőek a validáláshoz [27].

További fontos szempontok az érzékenység, stabilitás, faj-specifititás, ismételhetőség és robusztusság [24, 27, 40]. Érzékenység alatt tulajdonképpen a módszer limitáló tényezőit

értjük, vagyis milyen körülmények között nem alkalmazható már a módszer (pl. DNS mennyiség, PCR (polimeráz-láncreakció) beállítás) [40]. Stabilitásnál azt vizsgálják, hogy milyen mértékű DNS degradáció mellett működik még a markerkészlet [27]. Faj-specifitásban a rokon fajokra kell kereszttesztelni a markereket, és megállapítani, hogy náluk milyen mértékben működik a készlet [24, 27]. A megismételhetőségnél azt kell vizsgálni, hogy a markerek ugyanannak a DNS mintának az ismételt vizsgálata során hányszor produkálják ugyanazt az eredményt [27, 40]. A robusztusság is ehhez hasonló, de itt a körülmények, eltérő típusú berendezések, illetve elemzési módszerek változatossága mellett kell ugyanazt az eredményt kapni [27].

Ezeket a validálási lépéseket eddig kevés vadonélő fajra fejlesztett markerkészlet tudta teljesíteni [27]. Azonban a nem validált azonosítási módszerek eredményei és tapasztalatai így is értékes információt adhatnak a dámszarvasok egyedi azonosítását megcélzó módszerfejlesztés szempontjából, mely a kutatásunk célja.

Az első, szarvasokat érintő kriminalisztikai célú kutatás 1998-ban volt az Amerikai Egyesült Államokban [38]. A különböző szarvasféléktől származó minták ivari azonosítása volt a cél, ezt az Y kromoszómán található SRY gén (ivart meghatározó Y kromoszómás gén) PCR módszerrel történő sokszorozásával és kimutatásával végezték.

Alapvetően az ehhez hasonló, csupán az ivar azonosítását célzó módszerek kevésbé terjedtek el a forenzikus világban, hiszen ezek csak bizonyos esetekben nyújthatnak segítséget a bűntények megoldásában, mint egyébként a faji elkülönítést célzó módszerek is [41]. A faji elkülönítés egyik lehetséges felhasználása például a hústermékek hamis felcímkezésének vizsgálata [33, 34, 35]. Ebben az esetben ugyanis a termék faji összetétele a kérdés, tehát több fajspecifikus genetikai marker alkalmazásával pontosan kideríthető, hogy miből készült az áru.

1.3.1 Mikroszatellita alapú genetikai vizsgálatok

Sokszor azonban egyedi szintű azonosítás szükséges a vadvilági bűnesetek megoldásához [22, 26, 27, 28, 29]. Ehhez legtöbb esetben mikroszatellitákat használtak, melyeket STR-eknek (rövid tandem ismétlődések) is hívnak. Ezek a DNS részek 1-7 bázispár hosszúságú egységekből állnak (pl. ATCATC), melyek egymás után többször ismétlődnek a szekvenciában. A mikroszatelliták mutációs rátája igen magas [42], így nagy mértékű polimorfizmust mutatnak. A variabilitás a bázismotívum ismétlődésének számában mutatkozik meg, tehát hosszpolimorfizmusról van szó [26]. Adott lokuszon minden eltérő számú ismétlődést tartalmazó mikroszatellita egy-egy allélt jelent. Egy taxon adott populációján belül

több allél fordulhat elő egy lokuszon, de egy egyeden belül maximum két különböző lehet (egy apai és egy anyai). Mivel a komplexebb élőlényekben nagy számú mikroszatellita található a genomjában, melyeknek egyenként is sok allélja lehet populációs szinten, így ezeknek a markereknek a kombinálásával egyedi szintű genetikai „mintázatot” (genotípus) kapunk, amely kimutatása fontos része a forenzikus célú vizsgálatoknak is [26]. Emellett mikroszatellitákat alkalmaznak például populáció struktúra [43, 44] és genetikai diverzitás kutatásához is [45].

A mikroszatelliták további előnye, hogy primerkötő helyeik konzerváltak annyira, hogy adott lokuszon található marker távolabbi rokonágban álló taxonoknál is meglegyen [46]. Tehát, az egyik fajnál a mikroszatellita lokusz PCR sokszorosításához használt primer előfordulhat, hogy egy közeli rokon fajnál is működni fog [22, 27].

Forenzikus vizsgálatoknál a mikroszatellitákon belül a tetranukleotidokat szokták leggyakrabban alkalmazni, vagyis azokat a markereket, melyekben négy bázispárból áll az ismétlődő motívum (pl. TAGA) [22, 26, 27, 28, 29]. Ennek több oka is van. Az ennél hosszabb penta- és hexamer mikroszatelliták ugyanis nem annyira gyakoriak az élőlényekben, és rendszerint kevés alléllal rendelkeznek ahhoz, hogy egyedi azonosításra használhassák őket [26]. A rövidebb di- és trimer mikroszatelliták pedig a PCR során sokszor áterméket adnak, vagyis kevesebb vagy több ismétlődést tartalmaz a termék, mint a kiindulási DNS [22, 26]. Ez az ún. „dadogás” jelensége, ami abból adódik, hogy hurok képződik a DNS-en a PCR során, ami miatt megszakad a DNS szálát szintetizáló enzim (DNS polimeráz) működése [47]. A szintetizálás újra indulásakor a hurkolódott rész kimarad, tehát rövidebb lesz a termék, vagy duplán szintetizálódik, vagyis hosszabb lesz a termék. Mivel a forenzikus vizsgálatoknál kifejezetten fontos az eredeti mikroszatellita ismétlődés számának megállapítása, különösen például kevert minták esetében, így ezek a markerek sem ajánlottak a kriminalisztikában.

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

A PCR amplifikáció során sokszorosított DNS fragmenteket (mikroszatellita allélokat) ki is kell mutatni a reakciót követően, erre legszélesebb körben használt módszer a kapilláris elektroforézis, amely akár egy bázispár különbséget érzékelni képes precíz technika [48]. Ehhez fluoreszcens jelöléssel kell ellátni a PCR során keletkező termékeket, mivel így lehetségessé

válí a fluorofór lézeres gerjesztésén alapuló detektálás. Ennek leggyakrabban alkalmazott módja a forward primerek fluoreszcens jellel való ellátása, ami így a keletkező termékekre is rákerül [49]. Az egyes primerek fluoreszcens jelölése azonban meglehetősen költségigényes, szemben a három primeres „farkas” technikával. Ez ugyanis egy univerzális primerhez (másnéven fark szekvencia vagy adapter) kapcsolt fluoreszcens jelet használ, a hagyományos reverz és fark szekvenciával ellátott forward primer mellett. Így amikor a PCR kezdeti ciklusában az adapter szekvenciával ellátott forward primer termékeket képez, ezekhez már a jelölt univerzális primer is kapcsolódni tud, és jelölt termékeket hoz létre [50].

A markerkészlet fejlesztése során fontos szempont az is, hogy hány mikroszatellita alkalmazásával érhető el az egyedi szintű azonosítás, ami fajonként és régióként változhat [22, 26, 27, 28, 29]. Az öszvérszarvas és brit kolumbiai öszvérszarvas esetében az USA-ban elég volt nyolc marker [26], ugyanitt a vapitinél több, mint tíz kellett [28, 29]. Magyarországon a gímszarvas azonosításához tíz mikroszatellita szintén elégnek bizonyult a vizsgált populációknál [22], míg Svájcban az európai őznél 13 markert alkalmaztak [27]. A fajok és területek közötti különbséget az okozza, hogy a mikroszatelliták eltérő számú allélokkal rendelkezhetnek és eltérő allél-gyakorisággal az egyes régiókban/fajokban. Így adott területen adott fajra kifejlesztett markerszett legtöbbször csak változtatásokkal alkalmazható máshol, és főleg más fajra [26].

Sok esetben a markerkészleteket nemcsak a célfajra tesztelik, hanem a rokonfajokra is, a szett faj-specifitását vizsgálata érdekében [22, 24, 27]. Ez más fejlesztéseknek is hasznos, mert ezek a keresztesztelések kimutatják, hogy egyes markerek adnak-e terméket a rokon fajokban is. Amennyiben igen, akkor ezek a mikroszatelliták belevehetők a rokon fajra fejleszteni kívánt markerkészlet tesztelésébe [22, 27]. Például a gímszarvas és európai őz markerkészletének tesztelésekor egyes mikroszatelliták specifikus terméket eredményeztek dámszarvasok esetében is [22, 27].

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

1.4. Dámszarvassal kapcsolatos genetikai kutatások

A dámszarvas kozmopolita faj [5], így több országban is érdekelte a kutatókat a populációk genetikai összetétele (pl. Írország [3], Ausztrália [51] stb.). Számos területen végeztek már kutatást a fajjal kapcsolatban, legyen az egészségügyi [52], evolúciobiológiai [53] vagy éppen populációstruktúrára vonatkozó vizsgálat [13].

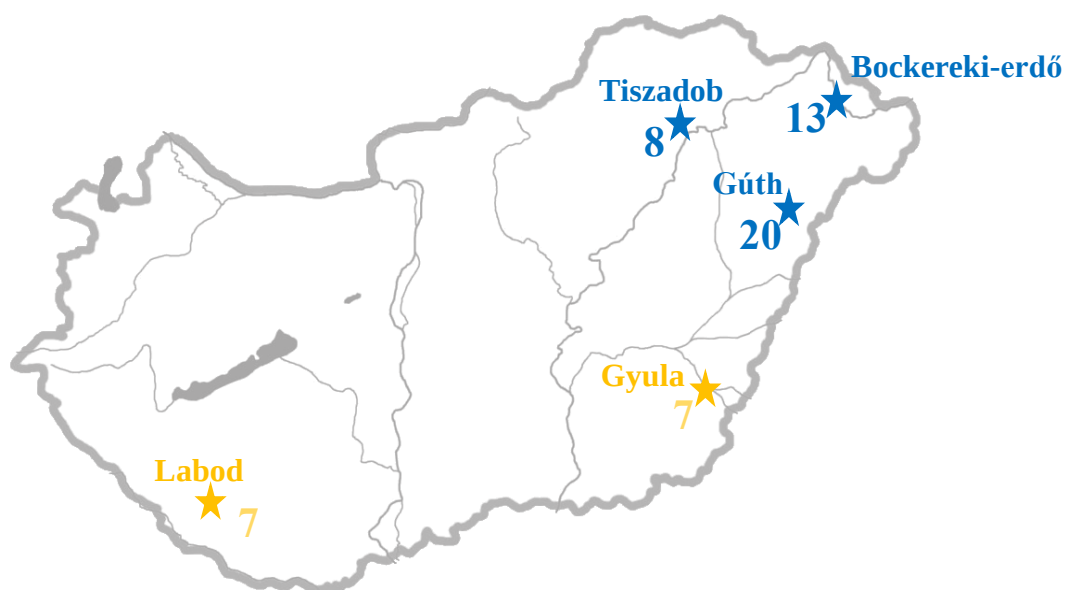
Az eddigi kutatások egyöntetűen a dámszarvas populációk alacsony genetikai diverzitását mutatták ki regionálisan, többféle genetikai marker vizsgálatával is [3, 13, 18, 51, 52, 54, 55, 56, 57]. Ilyen nukleáris DNS marker volt a PRNP gén (prion protein gén), aminek egyes alléljai növelik a CWD (krónikus sorvadásos betegség) megjelenésének esélyét a szarvas egyedekben, ezért vizsgálták meg a spanyol populáció dámszarvas egyedein [52]. A gén teljesen monomorf volt valamennyi vizsgált dāmivad mintán. Ugyanilyen monomorfnak bizonyult több vérből és szövetből származó enzim és protein is, egyedül a peroxidáz [57] és kataláz [55, 57] rendelkezett két-két alléllal, ami szintén alacsony variabilitásnak számít. Érdekes módon a mikroszatelliták sem mutattak sokkal jelentősebb polimorfizmust a fajon belül, pedig közel 40 dinukleotid markert teszteltek ír és tasmán populációkban is [3, 51]. Itt maximum öt alléllal rendelkezett egy marker, de legtöbbször csak két-három allél volt [51], pedig rokon fajokban ugyanezek a dinukleotid mikroszatelliták magas polimorfizmust mutattak [58].

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

Ezzel szemben a regionálisan alacsony genetikai diverzitást ennél jóval több hatás okozhatta. Egyrészt a palacknyak hatás, mivel nagy mértékben lecsökkent a dámszarvasok egyedszáma (ilyen esemény például a Pleisztocénban a jégkorszakok miatt történt kihalás volt) [10, 13]. Az ezt követő ember általi transzlokációk szintén tovább rontották a faj genetikai diverzitását, hiszen ezek a betelepítések legtöbbször kis egyedszámmal történtek (pl. tasmán populációnál mindössze 12 egyeddel [59]) [13, 51]. Ennek veszélye, hogy érvényesül az alapítóhatás, illetve genetikai sodródás következhet be, mindkettő jelenség diverzitáscsökkentő hatású [3, 13, 51]. Emellett egyes kutatások kimutatták a dāmivad populációkon belüli beltenyészettséget is [3,

18]. A dámszarvasok szaporodási rendszere sem támogatja kellőképpen a genetikai diverzitás növekedését, a fajra jellemző poligínia miatt ugyanis a domináns hímeknek nagyobb a szaporodási sikere [3]. Ez azt vonja maga után, hogy a domináns egyedek alléljai terjednek el nagy mértékben a populáción belül, míg a nem domináns hímek alléljai rendkívül ritkák lesznek, így az effektív populációméret a tényleges populációméretnél kisebb.

Ami kifejezetten a magyar dámszarvas populációt illeti, eddig két genetikai kutatást közöltek vele kapcsolatban [13, 18]. Az egyik a már említett legátfogóbb kutatás, melyben 14 darab hazai mintát is elemeztek [13], míg a másik kifejezetten az északkelet-magyarországi dámszarvas populációt vizsgálta 41 mintával [18] (2.ábra). A két kutatás összesen öt haplotípust talált a mintavételezett területeken az mtDNS vizsgálatával, ebből az egyik haplotípus mindössze egy egyedben volt jelen. Ez a többi országhoz képest viszonylag magas diverzitást jelent [13, 28], de a más fajokban kimutatott haplotípus változatossághoz képest ez is alacsonynak tekinthető, tehát Magyarországon is érvényesül a regionális alacsony genetikai diverzitás.



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

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk egy olyan polimorf mikroszatellita markerkészlet kifejlesztése, mely alkalmas a magyar dámvadak egyedi szintű azonosítására, figyelembe véve annak későbbi, jogkövetkezményekkel járó esetekben (pl. orvvadászat) történő alkalmazhatóságát is.

Ennek eléréséhez az alábbi lépéseket terveztük véghez vinni:

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

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Mintagyűjtés és feldolgozás

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



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

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

3.2. Markerek kiválasztása (tetranukleotid mikroszatelliták)

Az egyedi azonosításra alkalmas markerkészlet fejlesztéséhez nukleáris, tetranukleotid egységekkel rendelkező mikroszatellita markereket kerestünk a dámszarvashoz közel álló *Cervidae*-be tartozó rokonfajokban. A markereket és a vizsgálatukra alkalmas primer szekvenciákat (amennyiben ezek elérhetőek voltak) korábbi közleményekből, illetve a

GenBank-ból (NCBI: *National Center for Biotechnology Information*) kerestük ki, és végül 100 potenciális STR markert választottunk ki tesztelésre (1.táblázat).

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

Marker-csoport	Vizsgált faj	Mikroszatellita marker	Publikáció
A	európai őz (<i>Capreolus capreolus</i>) – STRoe	Capcap2, Capcap10, Capcap15, Capcap25, Capcap29, Capcap31, Capcap36, Capcap37	[27]
	gímszarvas (<i>Cervus elaphus</i>) – DeerPlex	C01, C229, T26, T108, T123, T156, T172, T193, T501, T507	[22]
	őszvérszarvas (<i>Odocoileus hemionus</i>) – Ohe	OheA, OheB, OheC, OheD, OheE, OheF, OheG, OheH, OheI, OheJ, OheK, OheL, OheM, OheN, OheO, OheP, OheQ, OheR, OheS, OheT, OheV	[26]
B	disznószarvas (<i>Axis porcinus</i>) – ApoV	ApoV17, ApoV19, ApoV43, ApoV47, ApoV49, ApoV53, ApoV54, ApoV56, ApoV75, ApoV79, ApoV81, ApoV94, ApoV101, ApoV118, ApoV127, ApoV133, ApoV135, ApoV144, ApoV145, ApoV146	[60]
		ApoV85	KX269170
C	disznószarvas (<i>Axis porcinus</i>)	ApoV61	[60]
	Guazauvirá-szarvas (<i>Mazama gouazoupira</i>)	Mgoua16, Mgoua19, Mgoua20, Mgoua21	[61]
	szitka szarvas (<i>Odocoileus hemionus sitkensis</i>)	SBTD01, SBTD02, SBTD03, SBTD04, SBTD05, SBTD06, SBTD07	[62]
		WY37, WY62, WY68, WY69, WY82	[63]
	szikaszarvas (<i>Cervus nippon</i>)	SD03, SD04, SD05, SD06, SD07, SD08, SD09, SD10, SD11, SD12	JN643715-22, JN563734-35
		C89, T56	[26]
	vapiti (<i>Cervus canadensis</i>)	C02, C32, C36, C105, C276, T40, T107, T115, T267 T268, T530	[28]

Huszonhat marker esetében nem volt publikált primerszekvencia, ezeknél mi terveztük a primerpárokat a Primer Designer 4 (<http://www.scied.com>) programmal (2. táblázat). Az alábbi szempontokat vettük figyelembe a tervezésnél: a forward és reverz primerek olvadási hőmérsékletének közelsége, a megfelelő guanin-citozin arány (40-60%), a megfelelő primerhossz (kb. 18-25 bázispár), lehetőleg 200 bázispár alatti PCR termékek képződése, a forward és reverz primer szekvenciájának különbözősége és a homo-dimerizáció („hairpin”) elkerülése érdekében a primeren belüli komplementer részek hiánya [64].

2. táblázat: A saját tervezésű primerpárok az adott mikroszatellitára (lokusz), a forward (F) és reverz (R) primerek szekvenciája

Lokusz	Primer szekvencia (5'-3')	Lokusz	Primer szekvencia (5'-3')
OheA	F: GTTCACTAGGGAGGCACTGT R: CCCTCCCACATTGGATCTCA	SBTD01	F: TCACTCACCCACTCATCT R: TGGATGGTTGGATATGTAG
OheB	F: GTCTGCTCATCCACCATCTA R: CTCTGTCTGCCTTCTCAAGT	SBTD02	F: CTCTGCTGACCTGTTATCTC R: ATGGAAGAAAGGATGTCTG
OheC	F: TTCCATCCACTCATCATTCT R: ACATATTGGAGGCATGTAGG	SBTD03	F: GCCACCTCTTCTTAATATC R: ATGGTAGGGACCTAACAG
OheE	F: AGACAGGGTTCCAATGAGAC R: CAGCCTTCCTGGACTAGAGA	SD03	F: GAGCCTGGCCAACATGGTA R: CTGCCACCACAACCAGCTAA
OheF	F: CAGGCGATCAAGAAATGTGG R: GTGGCTTCTGGATGGAGAAC	SD04	F: TTCTCCACCACTCCTTCT R: AGTAATAGATGTGCGGTCTC
OheG	F: AGAGTTAAGTGCAGCCTAAG R: CTGTGTTTCATGGACCACACT	SD05	F: GGTGACAGTGCAAGACTC R: CGTTTTCCAGCACTATTC
OheH	F: CTTGCTGCCATTGCCAGATA R: TCCCAGAGGGCAGATGTCTAT	SD06	F: TCCTGGTGTGAGCCACAGT R: CTGAGACATGCCACTGCACT
OheI	F: ACATGGTGGGCATTTCAGTAG R: CATCAGGGTTCTCTGAAGAC	SD07	F: GGCAACATAGCGAGAACT R: CCATGGAGGTAAGACTCTTC
OheJ	F: ATCACAGTTGCCAAGACGAC R: CGGATGGATGAGTAGGTTGA	SD08	F: CACCGCCCCTGGCCTTTT R: GAGGTTGCAGTCAGCCGAGATTG
OheL	F: GGCACATGCTCATAAGTGAA R: CCCTGTGGTCTAGCAAATTC	SD09	F: GCTGCTCAAGAAAGTTACC R: GTAATTGTAGGGCCAGTT
OheS	F: AACCTGGCAAGTTACAGTCC R: TCAGGCATGTGGAGCAACAA	SD10	F: GTGGCCTCTGGCTTCATT R: GCCTGGCAACATAACAAGAC
OheT	F: CACAAGTCAGCAGCCTCTAA R: GCCCAATCAGATGTTGTAGA	SD11	F: GTTCAACAGAGGAAGCTGTA R: TCTAGGCAACAGAGTGAGAC
OheV	F: TCAGGCAGGTAGTAAGTGTC R: GAGCACAGGACCTGATACTT	SD12	F: GCCAAGCTCTTCTTCATCCT R: GCTGCGGTGGAGCTATTAT

A kutatásunkhoz a korábbi publikációkból kiválasztott, illetve tervezett primereink forward (F) szekvenciáit univerzális primerekkel ellátva rendeltük meg [50]. Ezek az adapterek lehetővé teszik a „farkas” fluoreszcens jelölés alkalmazását a további vizsgálatok során. A megfelelő adapterek kiválasztásánál figyelembe vettük a későbbi multiplexek kialakításának lehetőségét.

3.3. A három tesztelt markercsoport

A kutatás során három csoportba osztottuk a tesztelni kívánt markereket, a hozzájuk tartozó, rendelkezésre álló információk alapján.

A. markercsoport: három publikáció mikroszatellitáit (összesen 39 db) vizsgáltuk először, melyek az STRoe [27], DeerPlex [22] és Ohe [26] neveket kapták. Azért kerültek egy csoportba, mivel valamennyi markerre multiplex PCR-t is fejlesztettek az eredetileg vizsgált fajnál. Az STRoe multiplexben a PCR beállítás az összes 13 primerpár együttes tesztelésére

volt kialakítva, de mi öt markert nem teszteltünk, mivel ezek bizonyítottan nem eredményeznek terméket dámszarvasban [27]. Így az eredetileg igen hosszú PCR programot grádiens PCR alkalmazásával próbáltuk a kiválasztott nyolc markerre optimalizálni és lerövidíteni.

B. marker csoport: a 2021-ben megjelent, Hill által leírt ApoV mikroszatellitákat (21 db) tartalmazza [60], melyekre szintén fejlesztettek multiplexeket.

C. marker csoport: azok a markerek (összesen 40 db) kerültek ebbe a csoportba, melyek nem lettek multiplexekben tesztelve [60, 61, 63] vagy pedig kevés számú markerrel voltak multiplexeik fejlesztve [62].

3.4. Markerek monoplex tesztelése és PCR optimalizálása

A kiválasztott mikroszatellitákat két-két dámszarvas mintán első körben monoplex PCR-ben teszteltük, tehát egy dámszarvas mintából mindössze egy marker termékét sokszorozítottuk fel a reakcióban. A legtöbb marker esetében volt már publikált PCR protokoll, így először ezeket a beállításokat használtuk. Az amplifikálási reakciók eredményét agarózgél elektroforézissel ellenőriztük, hogy milyen minőségű (mennyire specifikus) és mennyiségű termék keletkezett, illetve 100 bázispáros létra használatával a termékek hosszát is becsültük.

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

Amennyiben többféle PCR beállítás mellett sem adott terméket egy marker, vagy nem megfelelő minőségűt és/vagy mennyiségűt, akkor grádiens PCR segítségével próbáltuk optimalizálni a reakciót. Ennek lényege, hogy ugyanazt a marker-monoplexet több anellációs hőmérsékleti beállításon egyszerre amplifikáltuk, és megnéztük, hogy melyik hőmérsékleti beállítás eredményezi a legjobb minőségű és mennyiségű terméket [65]. Ezekkel a lépésekkel hét saját PCR programot fejlesztettünk ki (3. táblázat).

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

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

3.5. Primerek fluoreszcens jelölése „farkas” technikával

A „farkas” technika egy alternatív fluoreszcens jelölési módszer kapilláris elektroforézises detektáláshoz, melynek során mindössze négy fluoreszcensen jelölt szekvenciadarabot kell használnunk (univerzális primerek). Ezek ráadásul a forward primerekhez kapcsolt megegyező adapter szekvenciákkal szabadon kombinálhatók, így költséghatékonyan használhatók multiplex fejlesztéshez is (4. táblázat).

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

Univerzális primer	Farok szekvencia (5'-3')	Fluorofór	Hossz (bázispár)	Oladási hőmérséklet (T _m)	Publikáció
Tail A	GCCTCCCTCGCGCCA	FAM	15	63 °C	[66]
Tail B	GCCTTGCCAGCCCGC	VIC	15	57 °C	[66]
Tail C	CAGGACCAGGCTACCGTG	NED	18	59 °C	[50]
Tail D	CGGAGAGCCGAGAGGTG	PET	17	59 °C	[50]

3.6. Multiplex PCR vizsgálati rendszerek összeállítása

A monoplex reakciók eredménye alapján a jól működő primerpárokat multiplexekbe rendeztük a költséghatékony és gyorsabb tesztelés érdekében, ügyelve arra, hogy az egy multiplexbe kerülő markerek más színű fluoreszcens jelöléssel rendelkezzenek a hasonló vagy átfedő hosszúságú PCR termékek esetében (5. táblázat).

Az összeállított multiplex PCR rendszereket kezdetben két-két dámszarvas mintán teszteltük. Az eredményeket agarózgél elektroforézissel ellenőriztük az alábbi szempontok alapján: jött-e az összes termék, megfelelő hosszúságúak voltak-e, volt-e melléktermék, a különböző markerek termékei kiegyensúlyozottan jöttek-e. Amennyiben ezek valamelyike nem teljesült, a primerarányok vagy a PCR hőmérsékleti, esetleg időparaméterein módosítva próbáltunk javítani az eredményeken. A multiplex reakciókban nem sokszorosítható markereket monoplex reakciókban teszteltük tovább (5. táblázat).

3.7. Markerek polimorfizmusának detektálása kapilláris elektroforézissel

Markertől függően különböző populációkból származó, különböző számú (5-20 db) dámszarvas DNS-mintán teszteltük a specifikusnak látszó mikroszatelliták polimorfizmusát. A fluoreszcens jelöléssel ellátott primerekkel végzett monoplex, illetve multiplex PCR eredményeként létrejött fragmensek méret szerinti elválasztásához és detektálásához kapilláris elektroforézist alkalmaztunk. Az elektroforetikus elválasztás ABI Prism3500 GeneticAnalyzer készüléken (AppliedBiosystems), GeneScan™-500 LIZ™ méret

standarddal és a GeneScanAnalysis v3.1 software segítségével történt (Biomi Kft, Gödöllő). A kapott eredményeket a Peak Scanner™, illetve OSIRIS programmal elemeztük.

5. táblázat: A működő markerek forward primereinek univerzális primer jelölése, valamint a markereknél használt PCR program (a referenciák, illetve a 4.táblázatban feltüntetett beállításokkal). A multiplexekben együttesen sokszorosítható markerek bekeretezve láthatók.

Lokusz	Univerzális primer	PCR program
C01	Tail B	[27]
T156	Tail B	
T172	Tail C	
T501	Tail A	
T507	Tail D	
C229	Tail A	[27]
T108	Tail B	
T123	Tail D	
T193	Tail C	
OheB	Tail A	[31]
OheC	Tail D	
OheF	Tail B	
OheN	Tail A	
OheO	Tail C	
OheE	Tail C	[31]
OheG	Tail B	
OheI	Tail A	
OheJ	Tail A	
OheK	Tail D	
OheR	Tail C	
OheH	Tail B	[31]
OheM	Tail A	
OheP	Tail C	
OheQ	Tail D	
OheV	Tail C	
CapCap2	Tail A	[32]
CapCap29	Tail C	
CapCap36	Tail A	
CapCap37	Tail C	
CapCap10	Tail A	[32]
CapCap15	Tail C	
CapCap25	Tail B	
CapCap31	Tail B	
ApoV17	Tail A	1.
ApoV49	Tail B	
ApoV127	Tail D	

Lokusz	Univerzális primer	PCR program
ApoV19	Tail A	2.
ApoV135	Tail B	
ApoV146	Tail D	
ApoV43	Tail A	2.
ApoV94	Tail D	
ApoV145	Tail D	
ApoV47	Tail A	3.
ApoV56	Tail B	
ApoV79	Tail B	2.
ApoV118	Tail D	
ApoV144	Tail A	
C02	Tail C	4.
C32	Tail A	5.
C105	Tail C	5.
C276	Tail A	7.
T40	Tail A	7.
T56	Tail B	5.
T107	Tail D	4.
T115	Tail A	7.
T267	Tail D	6.
T268	Tail B	4.
SBT02	Tail C	6.
SBT04	Tail A	5.
SBT06	Tail B	4.
Mgou16	Tail C	4.
Mgou19	Tail A	4.
Mgou20	Tail B	4.
Mgou21	Tail C	4.
SD03	Tail D	5.
SD04	Tail A	7.
WY37	Tail B	4.
WY62	Tail A	7.
WY68	Tail D	6.
WY69	Tail C	5.
WY82	Tail D	6.
ApoV61	Tail D	7.

4. EREDMÉNYEK

A kutatáshoz 48 dāmivad szövetsmintát gyűjtöttünk öt, eddig nem vizsgált hazai területről (Vértes, Lajosmizse, Isaszeg, Pilis, Szekszárd), valamennyi használható állapotú volt a DNS kinyerést követő agarózgél elektroforézis és Qubit kvantálás (1-50 ng/μl) alapján.

Korábbi publikációk és a GenBank adatbázisa segítségével 100 potenciális mikroszatellita markert sikerült kiválogatnunk, melyek más szarvasfajokban polimorfak és tetramer ismétlődéseket tartalmaznak. Ezek közül 26 nem rendelkezett publikált primer szekvenciával, így ezek tervezését mi végeztük el (2. táblázat). A primertervezés során kiderült, hogy a 100 markerből hét darab eltérő névvel, duplán szerepel a közleményekben, melyek közül a leírt szempontrendszerünk alapján az egyiket kiválasztva folytattuk a tesztelést.

4.1. Monoplex tesztelés

A kutatás során tesztelt 100 mikroszatellita marker dámszarvasban való PCR amplifikációjának eredményeit a 6. táblázat foglalja össze (összesen 72 marker bizonyult működőképesnek). Hét mikroszatellita különböző nevekkal szerepelt a különböző kutatásokban (eltérő primerekkel vizsgálták), de azonos lokuszt jelentenek a szekvenciáik összehasonlítása alapján, a PCR tesztelés során mindkét primerpárt kipróbáltuk, hogy melyik ad a specifikitást, termék hossz és jelerősség szempontjából megfelelőbb terméket.

4.1.1. A. marker csoport

A legtöbb Ohe primerpár esetében a leírt módszertan jónak bizonyult, egyedül az OheA és OheD nem adott semmilyen terméket a PCR program többszöri változtatása ellenére sem, így ezeket a markereket nem használtuk tovább. További három primerpárt (OheL, OheT, OheS) szintén elvetettünk a monoplex tesztelésnél, mivel ezek duplumként szerepeltek más néven. A többi 16 Ohe marker specifikus terméket adott az eredeti PCR programjukon, így ezeket tovább alkalmaztuk a PCR beállításukkal együtt [26].

A tíz DeerPlex markerből a T26 kivételével minden primerpár specifikus terméket eredményezett. A T26 egyáltalán nem adott terméket, így ezt nem alkalmaztuk tovább, míg a többi markert a saját protokolljukkal teszteltük tovább [22]. A nyolc STRoe markernél az eredeti PCR beállításnál valamennyi mikroszatellita működött, de a program lerövidítése érdekében az összes markert gradiens PCR-en is amplifikáltuk. Azonban az eredményeink azt mutatták, hogy az eredeti protokoll jobban működik [27].

6.táblázat: A kutatás során tesztelt 100 mikroszatellita marker dámszarvas mintákon való PCR sokszorozásának eredményei. Az azonos színnel jelölt markerek ugyanannak a mikroszatellitának különböző elnevezései, más-más primerpárral vizsgálva. Dőlt betűvel kiemelt lokuszok: saját tervezésű primerek. A vízszintes vonallal áthúzott markerek nem működtek dámszarvasban (28 db). A vizsgált faj mellett szereplő vastagon kiemelt elnevezések (STRoe, DeerPlex, Ohe és ApoV) a markereket vizsgáló multiplexek közös elnevezése, ahogy hivatkozunk rájuk a szövegben.

Marker-csoport	Vizsgált faj	Mikroszatellita marker	Publikáció
A	európai őz (<i>Capreolus capreolus</i>) – STRoe	Capcap2, Capcap10, Capcap15, Capcap25, Capcap29, Capcap31, Capcap36, Capcap37	[27]
	gímszarvas (<i>Cervus elaphus</i>) - DeerPlex	C01 , C229 , T26 , T108, T123, T156, T172, T193, T501, T507	[22]
	őszvérszarvas (<i>Odocoileus hemionus</i>) - Ohe	OheA , OheB, OheC, OheD , OheE, OheF, OheG, OheH, OheI, OheJ, OheK, OheL , OheM, OheN, OheO, OheP , OheQ, OheR, OheS , OheT , OheV	[26]
B	disznószarvas (<i>Axis porcinus</i>) - ApoV	ApoV17, ApoV19, ApoV43, ApoV47, ApoV49, ApoV53 , ApoV54 , ApoV56, ApoV75 , ApoV79, ApoV81 , ApoV94, ApoV101 , ApoV118, ApoV127, ApoV133 , ApoV135, ApoV144, ApoV145, ApoV146	[60]
		ApoV85	KX269170
C	disznószarvas (<i>Axis porcinus</i>)	ApoV61	[60]
	Guazauvirá-szarvas (<i>Mazama gouazoupira</i>)	Mgoua16, Mgoua19, Mgoua20, Mgoua21	[61]
	szitka szarvas (<i>Odocoileus hemionus sitkensis</i>)	SBTD01 , SBTD02, SBTD03 , SBTD04, SBTD05 , SBTD06, SBTD07	[62]
		WY37, WY62, WY68, WY69, WY82	[63]
	szikaszarvas (<i>Cervus nippon</i>)	SD03 , SD04 , SD05 , SD06 , SD07 , SD08 , SD09 , SD10 , SD11 , SD12	JN643715-22, JN563734-35
		C89 , T56	[26]
	vapiti (<i>Cervus canadensis</i>)	C02 , C32, C36 , C105, C276, T40, T107, T115, T267	
		T268 , T530	[28]

4.1.2. B. markercsoport

A 21 darab ApoV marker publikált PCR beállítások szerint zajlott monoplex tesztelése öt esetben (ApoV75, ApoV81, ApoV85, ApoV101 és ApoV133) egyáltalán nem eredményezett terméket, így ezeket a markereket nem használtuk tovább. A többi mikroszatellita legtöbbje a specifikus termék mellett mellékterméket is produkált, ami zavarta volna később az eredmények kiértékelését, így ezeket grádiens PCR programmal is megvizsgáltuk, hogy megállapítsuk a primerpárok működési optimumát. Az ApoV53 és ApoV54 esetében gyenge terméket kaptunk minden beállításnál, így ezeket nem alkalmaztuk tovább. A többi marker esetén a grádiens vizsgálatnak köszönhetően három

PCR protokollt sikerült kialakítanunk (az anellációs hőmérsékletek, és egyes időparaméterek térnek el az eredetitől), így specifikus termékeket kaptunk (1., 2., 3. PCR program, 3.táblázat). A három új beállítás előnye, hogy így minden primerpár a lehető legközelebb áll a működési (hőmérsékleti) optimumához.

4.1.3. C. markercsoport

A harmadik markercsoport mikroszatellitái az eredeti PCR beállításokon amplifikálva nem adtak specifikus termékeket, mellékterméket eredményeztek vagy nagyon gyenge terméket hoztak létre, ezért két új PCR protokollt (4-5. program, 3. táblázat) dolgoztunk ki. Mindkét protokoll alapja a STRoe PCR beállítása volt [27], mivel ezen a programon több, különböző igényű primerpár volt képes egyszerre lefutni, és itt is ezt szerettük volna elérni. A programok során tehát mindig először egy magasabb, majd egy alacsonyabb anellációs hőmérsékleten végeztük a ciklusokat.

Tíz marker egyik PCR beállítás mellett sem eredményezett terméket, ezért ezeket nem teszteltük tovább: SBTD01, SBTD03, SD05, SD06, SD07, SD08, SD09, SD10, SD11 és SD12. A C36 és C02, illetve a T530 a T268 primerpár ugyanazt a két markert amplifikálta hasonló specificitással, viszont mivel C02 és T268 rövidebb terméket adott, így ezeket vizsgáltuk tovább. Tizenhárom marker egyik PCR beállítással sem adott megfelelő terméket (pl. mellékterméket képeztek), így ezeket grádiens PCR-en is megvizsgáltuk. A C89, SBTD05 és SBTD07 markerek esetében a grádiens tartomány egyik hőmérsékletén sem sikerült erős, melléktermék nélküli és specifikus terméket előállítani, így ezeket nem alkalmaztuk tovább. A C276, T40, T115, T267, WY62, WY68, WY82, SBTD02, SD04 és ApoV61-nél viszont sikeresen megállapítottuk a megfelelő anellációs hőmérsékletekkel a működési optimumot (6. és 7. PCR program, 3.táblázat). Így összességében ebből a markercsoportból 15-öt nem teszteltünk tovább, 25 pedig specifikus terméket eredményezett, így tovább folyt velük a vizsgálat.

4.2. Multiplex tesztelés

A multiplex tesztelés már csak a monoplex futtatások során működő 72 marker bevonásával zajlott. Az eredeti publikációkban leírt multiplexek tesztelése során a DeerPlex, Ohe, STRoe és ApoV markerek esetében sikerült bizonyos változtatásokkal működő multiplexeket létrehozni az univerzális adapterrel és fluoreszcens jellel ellátott primereinkkel (5.táblázat).

A DeerPlex markerek esetében annyi változás történt, hogy a T26 kikerült az egyik multiplexből, mivel ez már a monoplex teszteleseknél sem eredményezett terméket. A többi beállítás (PCR protokoll, marker összeállítás) az eredeti publikáció szerint működött [22].

Az Ohe markereknél a leírt PCR protokollt alkalmaztuk [26], de a markerek multiplexbe rendezését mi magunk végeztük.

Az STRoe markereknél két multiplexbe szedtük szét az eredetileg együtt működő primerpárokat, mivel a tesztelesek során csak így eredményeztek jó minőségű terméket. A használt PCR protokoll a korábban publikált maradt [27].

Az ApoV markerek esetében több változtatást kellett elvégeznünk. Egyrészt a monoplex tesztelésnél kifejlesztett három új PCR protokollt (1-3., 3. táblázat) alkalmaztuk, illetve a multiplexek összetételét is átalakítottuk az 5. táblázatban feltüntetett módon.

A többi publikált multiplex nem megfelelően működött [62], illetve a saját multiplex fejlesztések során sem adtak megbízhatóan működő marker-együtteseket. Több lehetséges multiplex összeállítást is leteszteltünk, de sok esetben kiestek markerek, melléktermék keletkezett, vagy éppen gyenge termékek jöttek létre, így egyiket sem alkalmaztuk a további teszteléshez.

Összesen tehát 12 multiplex rendszert sikerült kialakítanunk a „farkas” primerjelöléssel, melyekben a 72 működő marker közül 47 szerepel. A 25 darab multiplexbe nem sorolt mikroszatellita markert monoplex reakcióban sokszorosítottuk (5.táblázat).

4.3.A markerek polimorfizmusának felmérése kapilláris elektroforézissel

Az **A. markercsoport**ban 33 mikroszatellita adott specifikus PCR terméket, így ezeken végeztünk polimorfizmus felmérést nagyobb mintaszámon mind az öt mintavételezési hely legalább egy szövetmintáján (mintaelemszámok: 7.táblázat). Hat marker bizonyult polimorfnak (2-5 allél) és 27 marker monomorfnak a vizsgált dámszarvasminták alapján. A **B. markercsoport**ban 14 volt működőképes, melyekből a nagyobb mintaszámon elvégzett elemzések alapján öt mikroszatellita volt polimorf (2-3 allél), a többi marker közül nyolc monomorfnak bizonyult, míg az ApoV43 esetében nem volt pontosan eldönthető a kis mintaelemszám miatt, így további vizsgálat szükséges (7.táblázat). A **C. markercsoport** 25 működő markeréből öt bizonyult polimorfnak (2-4 allél), 13 marker monomorf volt, hét mikroszatellitánál pedig nem volt egyértelműen eldönthető (7. táblázat).

Összességében 16 marker bizonyult polimorfnak (2-5 allél), 48 mikroszatellita volt monomorf (1 allél), míg nyolc esetben nem volt egyértelműen eldönthető az eredmény a vizsgált dámszarvasminták alapján (7.táblázat).

7. táblázat: A kapilláris elektroforézis vizsgálat eredményei a markerek polimorfizmusának felméréséhez. A markerek neve mellett szerepel a dámszarvas minták száma (db), amin tesztelve lett a mikroszatellita, és a megfigyelt allélok száma. A "további vizsgálat" kategóriába sorolt markerek esetében nem volt egyértelmű az eredmény. A polimorf markerek vastag zöld betűvel kiemelték.

Lokusz	Vizsgált minta (db)	Allélszám	Lokusz	Vizsgált minta (db)	Allélszám
C01	20	1	ApoV47	10	3
C229	20	2	ApoV49	10	2
T108	20	1	ApoV56	10	1
T123	20	1	ApoV79	10	1
T156	20	2	ApoV94	10	1
T172	20	1	ApoV118	10	1
T193	20	1	ApoV127	10	1
T501	20	1	ApoV135	10	2
T507	20	1	ApoV144	10	2
OheB	20	1	ApoV145	10	1
OheC	20	1	ApoV146	10	2
OheE	20	1	C02	10	1
OheF	20	2	C32	10	további vizsgálat
OheG	20	1	C105	10	további vizsgálat
OheH	20	1	C276	10	2
OheI	20	1	T40	10	1
OheJ	20	1	T56	10	további vizsgálat
OheK	20	1	T107	10	4
OheM	20	1	T115	10	1
OheN	20	1	T267	10	1
OheO	20	1	T268	10	3
OheP	20	1	SBT02	10	1
OheQ	20	2	SBT04	10	további vizsgálat
OheR	20	1	SBT06	10	1
OheV	20	1	Mgou16	10	1
CapCap2	16	1	Mgou19	10	1
CapCap10	16	1	Mgou20	10	2
CapCap15	16	1	Mgou21	10	1
CapCap25	16	1	SD03	10	további vizsgálat
CapCap29	16	2	SD04	10	további vizsgálat
CapCap31	16	1	WY37	10	1
CapCap36	16	5	WY62	10	2
CapCap37	16	1	WY68	10	1
ApoV17	10	1	WY69	10	1
ApoV19	10	1	WY82	10	további vizsgálat
ApoV43	10	további vizsgálat	ApoV61	10	1

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásunk célja a dámszarvasok egyedi szintű azonosításának megvalósításához szükséges potenciális genetikai markerkészlet összeállítása volt, melyet polimorf mikroszatelliták segítségével kívántunk elérni.

Bár a dinukleotid egységekből álló mikroszatelliták feltehetően nagyobb polimorfizmussal rendelkeznek, ezért nagyobb számban vizsgáltak és elérhetőek szarvasfélékben (és más állatfajokban) [67, 68], de nem annyira megbízhatóak. Szerkezetükből kifolyólag ugyanis sokkal inkább ki vannak téve a pontatlan analízisnek, ennek következményeként pedig az eredmények nehezen és sokszor megbízhatatlan módon értékelhetők ki [22, 26]. A kutatásunk során ezért tetranukleotid mikroszatellitákat kerestünk, és valamennyi hozzáférhető, a *Cervidae* családban korábban leírt és tesztelt tetramer STR-t megvizsgáltuk (100 primerpár, 93 lokusz). Egyedül az STRoe markerek közül hagytunk ki öt darabot a tesztelésből (az eredeti 13-ból), mivel ezek a korábbi vizsgálatok alapján nem hoztak terméket dámszarvas mintákon, így az újbóli tesztelésüket szükségtelennek ítéltük meg [27].

A markerek csoportokban történő (**A-C. markercsoport**) tesztelésének több praktikus oka volt. Az **A. csoportba** olyan markerek kerültek, melyek rendelkeztek publikált multiplexekkel a rokon szarvasfélékben [22, 26, 27], így itt állt rendelkezésünkre a legtöbb információ vizsgálataink megkezdéséhez. A **B. csoportba** tartozó ApoV markerekkel folytattuk a kutatást, melyek szintén multiplexekbe voltak rendezve, azonban csak a közelmúltban (2021-ben) publikálták le őket [60], mikor már zajlott az **A. csoport** tesztelése. A **C. csoport** mikroszatellitái nem, vagy csak kevés markerrel voltak multiplexekben tesztelve az eredeti kutatásokban [60, 61, 62, 63]. A kiválasztott markerek csoportokban való vizsgálatának további oka a könnyebb kezelhetőség volt, szemben azzal, mintha egyszerre kezdtünk volna hozzá a 100 primerpár vizsgálatához.

5.1. Monoplex PCR tesztelés

Egy adott fajra optimalizált primerpárok és PCR beállítások egy másik faj esetében eltérően működhetnek, illetve a sokszorosított termékek mérete és száma (aspecifikus termékek) is különböző lehet. Mivel a tesztelt markereink vizsgálati módszerei eredetileg nem dámszarvasokra lettek optimalizálva, első körben monoplex PCR reakciókban néztük a markerek fajspecifitását. Az általunk alkalmazott hosszabb, univerzális szekvenciákkal kiegészített primerek (amelyek szükségesek voltak, hogy később, a megfelelően működőkre

a fluorofórt rákapcsolhassuk) szintén eltértek az eredeti publikációkban alkalmazott primer jelölésektől, így módosították az optimális anellációs hőmérsékletet.

A letesztelt 100 primerpár közül végül 72 működött dámszarvasokban, a maradék 28 kikerült a fejlesztésből. Ezek közül öt primerpár azért került ki, mert egy másik primerpárral azonos markert amplifikált, és a melléktermék nélküli, erősebb terméket adó, illetve rövidebb terméket eredményező primerpárt használtuk a további vizsgálatokhoz. A rövidebb PCR termékek előnye, hogy kis mennyiségű, degradálódott (pl. töredezett) DNS-ből nagyobb valószínűséggel kimutathatók, illetve a preferenciális amplifikálódás miatt a hosszabb markerek sokszor kiesnek a multiplexekből [69]. Tizennyolc mikroszatellita esetében több PCR beállítás mellett sem keletkezett termék, ennek oka feltehetően a primerköti régióban bekövetkezett pontmutációk lehetnek, amik miatt nem tudott végbe menni a reakció [70, 71]. Másrészt előfordulhat, hogy primer hibridizáció (összekapcsolódás) történt, ami rövid duplaszálú melléktermékeket eredményez [72]. Ez azt jelenti, hogy a primerpárok áttervezésével ezek a mikroszatelliták is potenciálisan eredményezhetnek specifikus terméket dámszarvasban, de ehhez a mikroszatellita szekvenciájának ismerete szükséges a fajban [70]. Öt STR marker esetén valamennyi kipróbált PCR beállítás mellékterméket eredményezett, melynek oka a primerpárok nem megfelelő specificitása volt, bekapcsolódva így nem csak a célzott, de komplementer DNS szakaszokhoz is [71].

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

Mivel kutatásunkban jelentős mennyiségű primerpárt terveztünk a monoplex reakciók után multiplex rendszerben vizsgálni, így egy alacsonyabb költségű, alternatív fluoreszcens jelölést alkalmaztunk („farkas” technika). Végző soron 12 multiplex bizonyult elég megbízhatónak, hogy ezek termékeit kapilláris elektroforézissel elkülönítsük és detektáljuk, így multiplexekben összesen 47 mikroszatellitát amplifikáltunk.

Egyes markerek esetében voltak már kipróbált és publikált multiplex beállítások, így elsőként ezeket teszteltük le, majd a többi markert is bevontuk a fejlesztésbe. Ha valamelyik lokusz terméke láthatóan gyengébb volt a multiplexünkben a többihez képest, akkor növeltük a primereinek arányát a mixben [74]. Melléktermékek képződése esetén az anellációs idő csökkentése vagy a hőmérséklet növelése volt eredményre vezető. Előfordult, hogy a primerek gátolták egymás működését, ennek oka első sorban a primerek dimerizálódása volt [74] és az összetapadás miatt akadályozták a PCR reakciót, melyet a multiplex rendszer szétszedésével és újra tervezésével oldottunk meg. A másik probléma

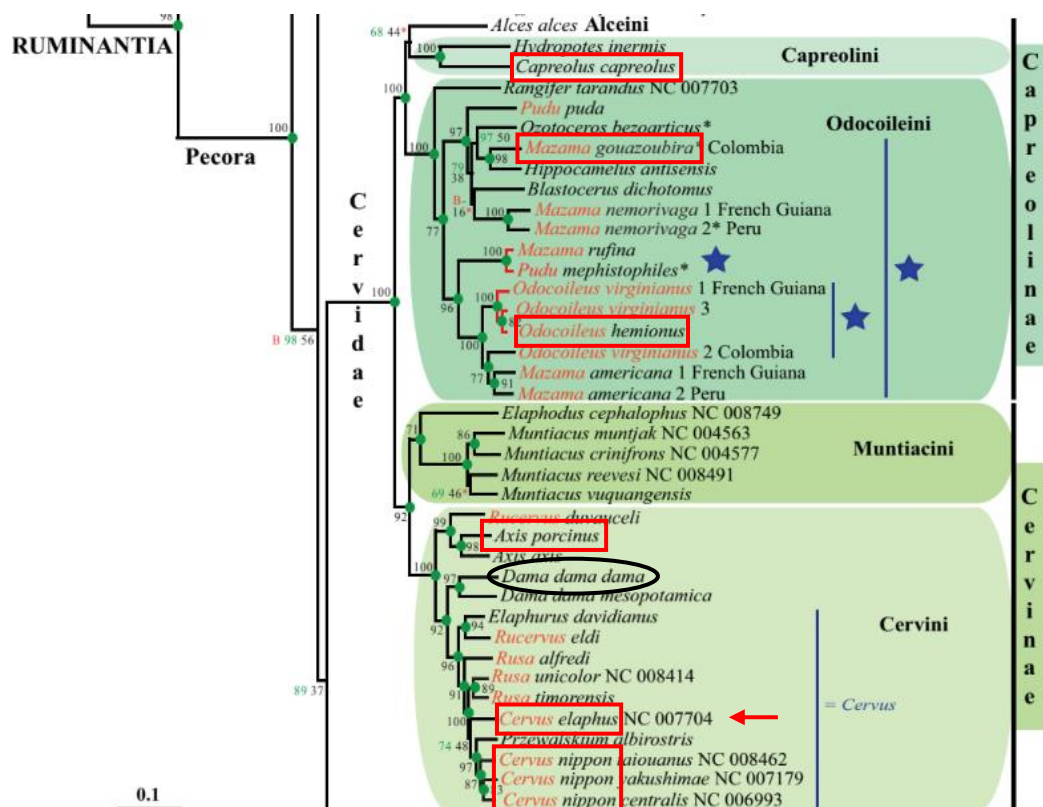
forrás az alternatív fluoreszcens jelölés használata volt. A kutatás során ugyanis azt vettük észre, hogy a fluoreszcens jel hozzáadása nélkül specifikus terméket adtak a „farokkal” ellátott primerek, ellenben azzal, amikor a fluoreszcens jellel ellátott univerzális primert is hozzáadtuk a reakcióhoz. A jelölt univerzális primer tehát bizonyos mértékben megváltoztatta a primerpárok működési optimumait, így az eredetileg hasonló körülmények között működő primerek, amik egy multiplexbe kerültek, többet nem voltak képesek ugyanazon a PCR beállításon együtt működni. Korábbi publikációk nem számoltak be hasonló tapasztalatokról az univerzális primerekkel kapcsolatban [pl. 50, 75], ugyanakkor azt említették, hogy az univerzális primerek használata primer dimerizációt okozhat, ami miatt nem keletkezik megfelelő minőségű és mennyiségű termék [76]. Így a „farkas” technika saját tapasztalataink alapján is megnehezítette a multiplexek tesztelését és fejlesztését (25 markert kizárólag monoplex reakcióban sikerült sokszoroznunk), ezért a jövőben a polimorf markereket hagyományos fluoreszcens jelöléssel tervezzük multiplex reakciókban összeállítani.

5.3. Multiplex PCR vizsgálati rendszerek összeállítása

A 72 mikroszatellita közül 16 bizonyult polimorfnak, ezek közül kettő eredetileg gímszarvasra lett fejlesztve, kettő öszvérszarvasra, kettő európai őzre, öt disznószarvasra, három vapitire, egy Guazauvirá-szarvasra és egy szikaszarvasra. A felmért hazai dámszarvasokon egyedül a szitka szarvasra leírt markerek között nem találtunk eddig megfelelően működőt, illetve olyat, ami több alléllal is rendelkezik. Ha megvizsgáljuk ezeknek a *Cervidae* családba tartozó fajoknak a rokonsági viszonyát (4. ábra) [77], megfigyelhető, hogy a rokonság mértékének nem volt köze ahhoz, hogy melyik fajból kiválasztott marker működött megfelelően, illetve mutatott polimorfizmust. A dámszarvastól távolabb elhelyezkedő európai őzre és a közeli rokonságban álló gímszarvasra fejlesztett mikroszatelliták közül (a gímszarvas T26-os markere kivételével) mindegyik működőképes volt dámokban és két-két darab polimorfizmust is mutatott.

A 16 polimorf mikroszatellitának több esetben csak két allélja volt a felmért hazai dámszarvasokban. Ez az eredmény, hasonlóan a korábbi nemzetközi publikációkhoz [3, 11, 13, 18, 51, 52, 54, 55, 56, 57], a dámszarvas regionális szintű alacsony genetikai diverzitását mutatja. Ennek oka ismeretlen, mivel nincsenek pontos adatok a magyar populáció eredetéről és az esetleges betelepítés vagy bevándorlás körülményeiről [13, 18]. Más kutatások az alapító hatást [3, 13, 51], genetikai sodródást [3, 13, 51], beltenyészettség [3, 57], palacknyak hatást [13, 57] és a dámszarvasok szaporodási rendszerét [3] azonosították,

mint lehetséges okokat, így feltételezhető, hogy a magyar populáció esetében is ezek okozhatják a csökkent polimorfizmust. Ugyanakkor az is kijelenthető, hogy más régiókban ennél alacsonyabb polimorfizmust tapasztaltak, de ezeknek a kutatásoknak az összehasonlítása egzakt módon nem lehetséges, hiszen más mintaelemszámmal és markerekkel dolgoztak. Egyelőre tehát kevés dámszarvas mintán vizsgáltuk a mikroszatelliták polimorfizmusát, illetve a minták nem fedik le Magyarország teljes területét, ezért messzemenő következtetéseket nem lehet levonni a hazai állomány diverzitására vonatkozóan. Ezen okokból statisztikai számításokat sem végeztünk a markerkészlet azonosítási képességével kapcsolatban.



4. ábra: A Cervidae család törzsfája [77], amin piros keretben szerepelnek a dámszarvasra vizsgált markerek eredeti fajai (fentről lefelé): európai őz, Guazauvirá-szarvas, őszvérszarvas, disznószarvas, gímszarvas, szikaszarvas. A vapi ti nem szerepel a törzsfán, így hozzávetőleges helye piros nyílval jelölt, míg a vizsgált dámszarvas fekete keretben szerepel.

További kutatásunkban szeretnénk nagyobb mintaszámon megvizsgálni a 16 polimorfizmust mutató mikroszatellitát és felmérni, hogy együttes alkalmazásuk mennyiben éri el az egyedi szintű azonosításhoz szükséges értéket. Amennyiben szükséges, bővíteni fogjuk a markerkészletet a többi, specifikus terméket adó marker vizsgálatával, illetve a fejlesztésből kivett primerpárok (28 db) újra tervezésével, hogy ezek is specifikus terméket adjanak. Ezekkel a lépésekkel újabb polimorf markereket találhatunk, illetve lehetőség szerint teljes genom analízis alapján is keresnénk új mikroszatellitákat [27]. Ehhez egy referencia genomra van szükség, melyből szoftverek segítségével saját szempontrendszer szerint lehet

markereket válogatni, a szempontok: tetranukleotid legyen a marker, 60-400 bázispár hosszú, ne legyen megszakítva az STR motívum, és csak egy féle bázispár ismétlődés szerepeljen benne [27].

Összességében a jelenlegi markerkészlet még nem alkalmas egyedi szintű azonosításra a dámszarvas állományon belül, de a további tervezett fejlesztéssel a jövőben az lehet. Többek között az értékes vadhús miatt [78] növekvő mértékű orvvadászat miatt fontos lenne a markerkészlet mielőbbi kifejlesztése, hiszen ez a faj hatékonyabb védelmét segítené elő. A kifejlesztett markerszett egyébként más országokban is alkalmazható lehet a helyi állományokon való előzetes tesztelése után. Illetve az országos állomány genetikai felmérésére szintén használható, ami információt szolgáltat a populáció hatékonyabb szabályozásához/fenntartásához is. Látható, hogy ez a markerkészlet nemcsak forenzikus célokra lenne alkalmazható, hanem vadgazdálkodási tanácsadásra, populáció struktúra vizsgálatára és a magyar állomány eredetének kutatására is.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Di Stefano G (1995) Identification of fallow deer remains on the basis of its skeletal features. Taxonomical considerations. Boll Soc Paleontol Ital 34:323–331. https://www.researchgate.net/publication/293152444_Identification_of_fallow_deer_remains_on_the_basis_of_its_skeletal_features_Taxonomical_considerations Accessed 16 Oct 2022
2. Apollonio M, Focardi S, Toso S, Nacci L (1998) Habitat selection and group formation pattern of fallow deer *Dama dama* in a submediterranean environment. Ecography 21:225–234. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1998.tb00560.x>
3. Say L, Naulty F, Hayden TJ (2003) Genetic and behavioural estimates of reproductive skew in male fallow deer. Mol Ecol 12:2793–2800. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01945.x>
4. Thirgood SJ (1995) The effects of sex, season and habitat availability on patterns of habitat use by fallow deer (*Dama dama*). Journal of Zoology 235:645–659. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1995.tb01775.x>
5. Chapman N, CHAPMAN D (2008) The distribution of fallow deer: A worldwide review. Mammal Review 10:61–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1980.tb00234.x>
6. Ghassemi-Khademi T (2014) A review of the biological status of Persian fallow deer (*Dama mesopotamica*), a precious and endangered animal species in Iran. Journal of Middle East Applied Science and Technology. https://www.researchgate.net/publication/318815709_A_review_of_the_biological_status_of_Persian_fallow_deer_Dama_mesopotamica_a_precious_and_endangered_animal_species_in_Iran Accessed 16 Oct 2022
7. Randi E, Mucci N, Claro-Hergueta F, Bonnet A, Douzery EJP (2001) A mitochondrial DNA control region phylogeny of the *Cervinae*: speciation in *Cervus* and implications for conservation. Animal Conservation 4:1–11. <https://doi.org/10.1017/S1367943001001019>
8. Arslangündoğdu Z, Kasperek M, Sarbaçak H, Kaçar MS, Yöntem O, Şahin MT (2010) Development of the population of the European Fallow Deer, *Dama dama dama* (Linnaeus, 1758), in Turkey. Zoology in the Middle East 49:3–12. <https://doi.org/10.1080/09397140.2010.10638383>
9. Masseti M, Pecchioli E, Vernesi C (2008) Phylogeography of the last surviving populations of Rhodian and Anatolian fallow deer (*Dama dama dama* L., 1758). Biological Journal of the Linnean Society 93:835–844. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00951.x>
10. Chapman D (1997) Fallow Deer: Their History, Distribution, and Biology. Coch-y-bonddu Books, Machynlleth
11. Pemberton JM, Smith RH (1985) Lack of biochemical polymorphism in British fallow deer. Heredity 55:199–207. <https://doi.org/10.1038/hdy.1985.92>
12. Yannouli E, Trantalidou K (1998) The Fallow deer (*Dama dama* L. 1758) in Greece. Archaeological Presence and Representation, 1999. In: N. Benecke (eds) The Holocene history of the European Vertebrate Fauna: Modern Aspects of Research. Verlag Marie Leidorf GmbH, Berlin, pp 247–263
13. Baker K, Gray H, Ramovs V, Mertzaniidou D, Akın Pekşen Ç, Bilgin C, Sykes N, Hoelzel R (2017) Strong population structure in a species manipulated by humans since the Neolithic: the European fallow deer (*Dama dama dama*). Heredity 119:16–26. <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.11>
14. Davis S, MacKinnon M (2009) Did the Romans bring fallow deer to Portugal?. Environmental Archaeology 14:15–26. <https://doi.org/10.1179/174963109X400646>
15. Valenzuela A, Baker K, Carden R, Evans J, Higham T, Hoelzel R, Lamb A, Madgwick R, Miller H, Alcover J, Cau Ontiveros M, Sykes N (2016) Both introduced and extinct: The fallow deer of Roman Mallorca. Journal of Archaeological Science: Reports 9:168–177. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.06.038>
16. Madgwick R, Sykes N, Miller H, Symmons R, Morris J, Lamb A (2013) Fallow deer (*Dama dama dama*) management in Roman South-East Britain. Archaeol Anthropol Sci 5:111–122. <https://doi.org/10.1007/s12520-013-0120-0>

17. Perdikaris S, Bain A, Grouard S, Baker K, Gonzalez E, Hoelzel AR, Miller H, Persaud R, Sykes N (2018) From Icon of Empire to National Emblem: New Evidence for the Fallow Deer of Barbuda. *Environmental Archaeology* 23:47–55. <https://doi.org/10.1080/14614103.2017.1349027>
18. Kusza S, Ashrafzadeh M, Tóth B, Jávora A (2018) Maternal genetic variation in the northeastern Hungarian fallow deer (*Dama dama*) population. *Mammalian Biology* 93:21–28. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.08.005>
19. Csányi S, Márton M., Major FCs, Schally G (2021) Vadgazdálkodási Adattár - 2020/2021.vadászati év. In: OVA http://www.ova.info.hu/vg_stat/VA-2020-2021.pdf. Accessed 1 Oct 2022
20. (1996) (1996/LV.) A vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról.
21. Elek B (2019) The criminalization of poaching in Hungary. *Zbornik radova Pravnog fakulteta, Novi Sad* 53:639–648. <https://doi.org/10.5937/zrpfns53-20330>
22. Szabolcsi Z, Egyed B, Zenke P, Padar Z, Borsy A, Steger V, Pasztor E, Csanyi S, Buzas Z, Orosz L (2014) Constructing STR multiplexes for individual identification of Hungarian red deer. *J Forensic Sci* 59:1090–1099. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12403>
23. Faragó S, Köller J, Zoltán A (2009) Természeti-vadászati örökségünk. A legkiválóbb magyar vadásztróféák. Nimród Vadászújság, Magyarország
24. Linacre A, Gusmão L, Hecht W, Hellmann AP, Mayr WR, Parson W, Prinz M, Schneider PM, Morling N (2011) ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Science International: Genetics* 5:501–505. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.017>
25. (2015) Deer DNA used for first time in UK to prosecute poacher. In: BBC News <https://www.bbc.com/news/uk-scotland-highlands-islands-31127652> Access 1 Oct 2022
26. Jones KC, Levine KF, Banks JD (2000) DNA-based genetic markers in black-tailed and mule deer for forensic applications. *California Fish and Game* 86:115–126 https://www.researchgate.net/publication/292315308_DNA-based_genetic_markers_in_black-tailed_nad_mule_deer_for_forensic_applications Accessed 16 Oct 2022
27. Morf NV, Kopps AM, Nater A, Lendvay B, Vasiljevic N, Webster LMI, Fautley RG, Ogden R, Kratzer A (2021) STRoe deer: A validated forensic STR profiling system for the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Forensic Science International: Animals and Environments* 1:100023. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100023>
28. Jones K, Levine K, Banks J (2002) Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Molecular Ecology Notes* 2:425–427. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00264.x>
29. Meredith EP, Rodzen JA, Levine KF, Banks JD (2005) Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conserv Genet* 6:151–153. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7735-8>
30. Wu H, Wan Q-H, Fang S-G, Zhang S-Y (2005) Application of mitochondrial DNA sequence analysis in the forensic identification of Chinese sika deer subspecies. *Forensic Science International* 148:101–105. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.072>
31. Wilson-Wilde L (2010) Wildlife crime: a global problem. *Forensic Sci Med Pathol* 6:221–222. <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9167-8>
32. Ferreras P, Aldama JJ, Beltrán JF, Delibes M (1992) Rates and causes of mortality in a fragmented population of Iberian lynx *Felis pardina* Temminck, 1824. *Biological Conservation* 61:197–202. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91116-A](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91116-A)
33. Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Rojas M, Hernández PE, García T, Martín R (2007) Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci* 76:234–240. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.11.004>
34. Brodmann PD, Nicholas G, Schaltenbrand P, Ilg EC (2001) Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *Eur Food Res Technol* 212:491–496. <https://doi.org/10.1007/s002170000284>
35. Dajana D, Uroš G, Nesic K, Davitkov D, Vucicevic M, Nesic V, Stanimirovic Z (2017) Improved DNA-Based Identification of *Cervidae* Species in Forensic Investigations. *Acta Veterinaria* 67:449–458. <https://doi.org/10.1515/acve-2017-0037>
36. Kim M-J, Lee Y-M, Suh S-M, Kim H-Y (2020) Species Identification of Red Deer (*Cervus elaphus*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), and Water Deer (*Hydropotes inermis*) Using Capillary Electrophoresis-Based Multiplex PCR. *Foods* 9:982. <https://doi.org/10.3390/foods9080982>
37. Parkanyi V, Ondruska L, Vasicek D, Slamecka J (2013) Multilevel D-loop PCR identification of hunting game. *Appl Transl Genom* 3:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2013.03.001>

38. Gilson A, Syvanen M, Levine K, Banks J (1998) Deer gender determination by polymerase chain reaction: Validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *California Fish and Game* 84:159–169. ISSN/ISBN: 0008-1078
39. Mattioli S (2011) Family *Cervidae* (deer) In: Wilson D, Mittermeier R (eds) *Handbook of the mammals of the world*. Lynx Edicions, Barcelona, pp 350-443
40. Moore M, Baker B, Bauman T, Curtis M, Espinoza E, Ferrell C, Frankham G, Frazier K, Giles J, Hawk D, Rovie-Ryan J, Johnson R, Knott T, Kornfield I, Lindquist C, Lord W, Morgan K, O'Brien R, Ogden R, Webster L (2021) The Society for Wildlife Forensic Science standards and guidelines. *Forensic Science International: Animals and Environments* 1:100015. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100015>
41. Moore MK, Frazier K (2019) Humans Are Animals, Too: Critical Commonalities and Differences Between Human and Wildlife Forensic Genetics. *Journal of Forensic Sciences* 64:1603–1621. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14066>
42. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453–2465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x>
43. Anderson JD, Honeycutt RL, Gonzales RA, Gee KL, Skow LC, Gallagher RL, Honeycutt DA, DeYoung RW (2002) Development of Microsatellite DNA Markers for the Automated Genetic Characterization of White-Tailed Deer Populations. *The Journal of Wildlife Management* 66:67–74. <https://doi.org/10.2307/3802872>
44. Haanes H, Røed K, Mysterud A, Langvatn R, Rosef O (2010) Consequences for genetic diversity and population performance of introducing continental red deer into the northern distribution range. *Conservation Genetics* 11:1653–1665. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0048-1>
45. DeYoung RW, Demarais S, Honeycutt RL, Gonzales RA, Gee KL, Anderson JD (2003) Evaluation of a DNA Microsatellite Panel Useful for Genetic Exclusion Studies in White-Tailed Deer. *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)* 31:220–232. <https://www.jstor.org/stable/3784377> Accessed 16 Oct 2022
46. Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M, Hetzel DJ (1991) The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10:654–660. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90448-n](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90448-n)
47. Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 20:2587–2595. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2587>
48. Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, Smith FP (1998) A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 92:75–88. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00010-3)
49. Zianni M, Tessanne K, Merighi M, Laguna R, Tabita FR (2006) Identification of the DNA Bases of a DNase I Footprint by the Use of Dye Primer Sequencing on an Automated Capillary DNA Analysis Instrument. *J Biomol Tech* 17:103–113. PMID: PMC2291779
50. Blacket M, Robin C, Good R, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular ecology resources* 12:456–63. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x>
51. Webley LS, Zenger KR, Hall GP, Cooper DW (2007) Genetic structure of introduced European fallow deer (*Dama dama dama*) in Tasmania, Australia. *Eur J Wildl Res* 53:40–46. <https://doi.org/10.1007/s10344-006-0069-8>
52. Pitarch JL, Raksa HC, Arnal MC, Revilla M, Martínez D, Fernández de Luco D, Badiola JJ, Goldmann W, Acín C (2018) Low sequence diversity of the prion protein gene (PRNP) in wild deer and goat species from Spain. *Veterinary Research* 49:33. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0528-8>
53. Douzery E, Randi E (1997) The mitochondrial control region of *Cervidae*: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution* 14:1154–1166. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025725>
54. Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238–247. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.3.238>
55. Hartl GB, Schlegel A, Slowak M (1986) Genetic variability in fallow deer, *Dama dama* L. *Anim Genet* 17:335–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1986.tb00726.x>
56. Scandura M, Tiedemann R, Apollonio M, Hartl GB (1998) Genetic variation in an isolated Italian population of fallow deer *Dama dama* as revealed by RAPD-PCR. *Acta Theriologica Supplement* 43:163-169. <https://rcin.org.pl/ibs/dlibra/publication/28735/edition/12815> Accessed 16 Oct 2022

57. Randi E, Apollonio M (1988) Low biochemical variability in European fallow deer (*Dama dama* L.): natural bottlenecks and the effects of domestication. *Heredity* 61:405–410. <https://doi.org/10.1038/hdy.1988.131>
58. Polziehn RO, Hamr J, Mallory FF, Strobeck C (2000) Microsatellite analysis of North American wapiti (*Cervus elaphus*) populations. *Mol Ecol* 9:1561–1576. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01033.x>
59. Bentley A (1998) An introduction to the deer of Australia, with special reference to Victoria, Bunyip ed. Australian Deer Research Foundation, Melbourne
60. Hill E (2021) Forensic and Population Genetic Analysis of Introduced and Endangered Hog Deer (*Axis porcinus*). Thesis, La Trobe <https://doi.org/10.26181/6035a4b7f118f>
61. Caparroz R, Mantellatto AMB, Bertioli DJ, Figueiredo MG, Duarte JMB (2015) Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. *Genet Mol Biol* 38:338–345. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738320140344>
62. Brinkman TJ, Person DK, Schwartz MK, Pilgrim KL, Colson KE, Hundertmark KJ (2010) Individual identification of Sitka black-tailed deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets. *Conservation Genet Resour* 2:115–118. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9176-7>
63. Yang W, Zheng J, Jia B, Wei H, Wang G, Yang F (2018) Isolation of novel microsatellite markers and their application for genetic diversity and parentage analyses in sika deer. *Gene* 643:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.007>
64. (2020) PCR PRIMER DESIGN In: LabXchange. https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:05cd9910-1ea6-49ef-9360-f6d9fd6523f0/items/lx-pb:05cd9910-1ea6-49ef-9360-f6d9fd6523f0:lx_simulation:b503b618. Accessed 5 Oct 2022
65. Zhang C, Xing D (2010) Microfluidic gradient PCR (MG-PCR): a new method for microfluidic DNA amplification. *Biomed Microdevices* 12:1–12. <https://doi.org/10.1007/s10544-009-9352-2>
66. Roche Applied Science (2006) GS Guide to Amplicon Sequencing. Roche Diagnostics. GmbHUSM-00022.B - December 2006
67. Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyzis RK (1991) Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10:807–815. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90467-s](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90467-s)
68. Hearne CM, Ghosh S, Todd JA (1992) Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet* 8:288–294. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90256-4](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90256-4)
69. Chung DT, Drábek J, Opel KL, Butler JM, McCord BR (2004) A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR Miniplex primer sets. *J Forensic Sci* 49:733–740. PMID: 15317187
70. Leibelt C, Budowle B, Collins P, Daoudi Y, Moretti T, Nunn G, Reeder D, Roby R (2003) Identification of a D8S1179 primer binding site mutation and the validation of a primer designed to recover null alleles. *Forensic Sci Int* 133:220–227. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(03\)00035-5](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00035-5)
71. Takayama T, Takada N, Suzuki R, Nagaoka S, Watanabe Y (2007) Identification of a rare mutation in a TH01 primer binding site. *Leg Med (Tokyo)* 9:289–292. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2007.04.003>
72. Tolle F, Wilke J, Wengel J, Mayer G (2014) By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX. *PLoS One* 9:114693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114693>
73. Boyle B, Dallaire N, MacKay J (2009) Evaluation of the impact of single nucleotide polymorphisms and primer mismatches on quantitative PCR. *BMC Biotechnology* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-75>
74. Edwards MC, Gibbs RA (1994) Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Res* 3:65–75. <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.s65>
75. Missiaggia A, Grattapaglia D (2006) Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genet Mol Res* 5:72–78. PMID: 16755499
76. Luttman AM, Komine M, Thaiwong T, Carpenter T, Ewart SL, Kiupel M, Langohr IM, Venta PJ (2022) Development of a 17-Plex of Penta- and Tetra-Nucleotide Microsatellites for DNA Profiling and Paternity Testing in Horses. *Front Vet Sci* 9:861623. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.861623>
77. Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Jansen van Vuuren B, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A (2012) Pattern and timing of diversification of *Cetartiodactyla* (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies* 335:32–50. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.11.002>

78. Gyurcsó A., Kasza Gy., Ózsvári L (2022) A vadhús közfogyasztásának története és élelmiszerláncbiztonsági előírásai Magyarországon. Hung Vet J 144:623-639.
<https://doi.org/10.56385>