

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet

Őzek egyedi szintű azonosítása tetramer mikroszatellita markerek alapján Magyarországon



TDK dolgozat

Készítette: Surányi Melinda

Témavezető: Zorkóczy Orsolya Krisztina

ÁTE, Állattenyésztési, Takarmányozástani és
Laborállat-tudományi Intézettudományos segédmunkatárs

Társtémavezető: Dr. Zenke Petra

ÁTE, Állattenyésztési, Takarmányozástani és
Laborállat-tudományi Intézettudományos főmunkatárs

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzés.....	4
3. Irodalmi áttekintés	5
2.1 Az európai őz (<i>Capreolus capreolus</i>) általános bemutatása	5
2.2 Az európai őz vadászata Magyarországon	6
2.3 Vadorzás	8
2.4 Közlekedési balesetek okozása vadonélő állatok által	9
2.5 Mikroszatellita alapú egyedi azonosítás	10
2.6 Fluoreszcens jelölésű univerzális primerek	12
4. Anyagok és módszerek	13
4.1 Mintagyűjtés	13
4.2 Mintafeldolgozás és DNS preparáció	13
4.3 „Farkazásos” technika	14
4.4 Monoplex tesztelés	14
4.5 Multiplex tesztelés és kapilláris elektroforézis.....	15
5. Eredmények	17
5.1 „Farkazásos” technika alkalmazása monoplex tesztelésben.....	17
5.2 Multiplex tesztelés	17
5.3 Polimorfizmus vizsgálata	18
5.4 Egyediség vizsgálata.....	19
5.5 Vizsgált populációk diverzitása.....	20
6. Összefoglalás	21
7. Irodalomjegyzék	26
8. Köszönetnyilvánítás	33

1. Bevezetés

Az európai őz a legkisebb vadászható agancsos nagyvad Európában. Magyarországon pedig széleskörű elterjedése „mindenki nagyvadjává” teszi.

Habár az orrvadászat fogalma egyszerűen körbejárható, a való életben való bizonyítása sok esetben nehézségekbe ütközik. Ugyanis még a vad tetemének meglétekor sem bizonyítható minden esetben, hogy az elejtéséhez a legális vadászat minden feltétele hiánytalanul megvalósult.

Előfordulnak olyan esetek, amelyeknél az állat már feldolgozásra (nyúzás, zsigerelés, csontozás stb.) került vagy már fel sem lelhető, csupán különböző biológiai maradványokból (szőr, vér, csont stb.) lehet következtetni a bűncselekmény esetleges megtörténte [18, 20].

A mikroszatellita alapú egyedi azonosításra alkalmas genetikai módszerek szinte bármilyen szövetből elvégezhetőek és alkalmasak az esetleges maradványok, és a lefoglalt hús vagy trófeák közötti azonosság elemzésével a vadorzás elkövetésének vizsgálatára, valamint a tetem sorsának nyomonkövetésére [36].

Kutatásunk során egy európai őzekre kifejlesztett tetramer mikroszatellitákból álló markerszett alkalmazhatóságát vizsgáltuk a hazai őzpopulációkon, a magyarországi őzek egyedi szintű azonosításának céljából.

2. Célkitűzés

Célunk egy olyan polimorf mikroszatellita markerkészlet tesztelése volt, amely alkalmas lehet az európai őz magyarországi populációin belül igazságügyi célból történő egyedi szintű azonosításra.

E cél eléréséhez az alábbi lépéseket terveztük elvégezni:

- Őz minták begyűjtése különböző, egymástól természetes barrierek által elkülönülő hazai területekről.
- Költséghatékonyság megvalósítása érdekében az eredeti módszertantól eltérő, farkazásos technikával történő fluoreszcens jelölés markerszettel való alkalmazhatóságának tesztelése.
- Az STRoe markerkészlet alkalmasságának felmérése egyedi szintű azonosításra hazai őz populációkban.
- Populációs adatbázis kiépítésének megkezdése a hazai őzállományon az igazságügyi célú vizsgálatok szempontjából is megfelelő markerkészlettel.
- A vizsgált populációk genetikai diverzitásának felmérése.

3. Irodalmi áttekintés

2.1 Az európai őz (*Capreolus capreolus*) általános bemutatása

Az európai őz (*Capreolus capreolus*) a szarvasfélék családjának (*Cervidae*) elterjedt képviselője az európai kontinensen az utolsó jégkorszak óta [1]. Németországbeli fosszilis fog- és koponyamaradványok alapján az agancsmorfológiájában is igen hasonló előalakja, a *Procapreolus sp.* már a késő miocén idején meghódította a nyugat-európai térséget is [2]. Napjainkra Izland, Írország, Ciprus, Korzika, Szardínia és a kisebb szigetek kivételével mindenhol megtalálható [3]. Nagymértékű elterjedése nagyban köszönhető annak, hogy az eredetileg erdős sztyeppeken élő faj nagyon jól alkalmazkodott a mezőgazdasági környezethez [1].

Megjelenésében könnyen elkülöníthető más, Magyarországon is elterjedt szarvasféléktől. A kifejlett egyedekre ivari dimorfizmus jellemző. Ezek közül a legszembeütőbb különbség a hím egyedek agancsviselése. A két ivart tükörfoltjukról is meg lehet különböztetni, mivel az bakoknál vese, sutáknál pedig inkább szív alakú [4]. A gidák fehér pettyekkel tarkított vörösesbarna szőrzettel jönnek a világra május-júniusi hónapokban, majd az ősz kezdetére ez fokozatosan eltűnik (1. ábra). A felnőtt egyedek szőrzete az éghajlati viszonyoknak megfelelően nyáron rövid és világos, míg télen megdúsul, hosszabb és tömörebb lesz, színe pedig megfakul, szürkésbarnára sötétedik [1].



1. ábra Bal oldali képen egy őzsuta és egy agancsát viselő őzbak látható. Jól látható mindkét ivar tükörfoltja is: a baké vesére, míg a sutáé egy szívre emlékeztet. A jobb oldali képen pedig egy őzgida látható pettyes rejtőszínezetű szőrzetében [82, 83].

Magyarországon az Alföld fásítási programja a második világháborút követő években átrajzolta az addigi síkság látképét. Az ősi élőhely elhagyásának mozgatórugójaként az ún. parcellás gazdálkodás kialakulása szolgált, amely során a különböző növénykultúrájú kisebb-nagyobb földterületeket cserjés-fás sávok és erdőcsoportok különítik el egymástól [4]. Az úgynevezett mezővédő erdősávok és erdőfoltok remek búvó és telelő helyül szolgáltak az őzállománynak, amelyet egyre inkább kicsalogatott a megjelenő nagytáblás gazdálkodás által biztosított nyugalom és bő táplálékforrás az erdőségekből a mezőgazdasági területekre [1]. Ekkoriban hódította meg az európai őz a Duna-Tisza közének és a Tisántúlnak legtöbb területét [4]. Az őz kiemelkedő alkalmazkodó-képességét remekül mutatja az is, hogy a mezőgazdasági technológiai fejlesztések (gépesítés, növényvédőszer alkalmazása) kevésbé zavarják, mint más fajokat [1]. Napjainkra Magyarország minden vadászterületén elérhető vadászható fajjá vált [4].

A magyar vadászati szakirodalom két élőhely szerinti ökotípust különböztet meg [1]. Az erdei és a mezei típust viselkedése, táplálkozása, valamint agancsminősége is megkülönbözteti egymástól [5]. Az erdei típus sutái kisebb létszámú csoportokban, míg bakjai külön mozognak, csak a télen alkotnak nagyobb csapatokat, ezzel szemben a mezei egyedek egész évben nagyobb, vegyes ivarú csapatokban élnek [1].

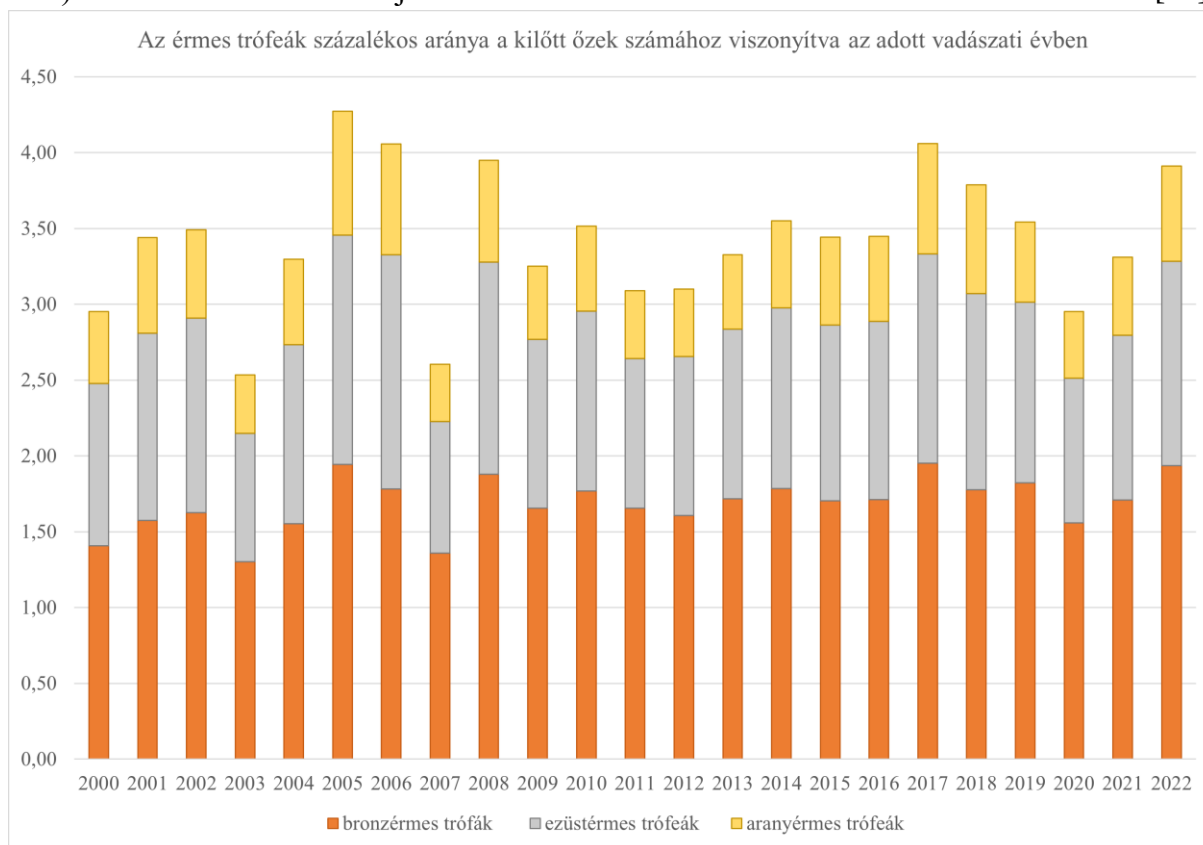
2.2 Az európai őz vadászata Magyarországon

Az európai őz a legkisebb vadászható agancsos nagyvad Európában, Magyarországon pedig széleskörű elterjedése „mindenki nagyvadjává” teszi. Gazdasági jelentőségét húsának minősége és élvezeti értéke, valamint sportvadászati népszerűsége adja [6]. Az adott ivarra vonatkozó vadászati idényét a mindenkori miniszteri rendelet szabályozza, így a bakokat április 15. és szeptember 30. között, míg a sutákat és gidáikat október 1-től február utolsó napjáig löhetik ki a vadászok [7].

Bár agancstömege töredéke a dāmavadénak és a gímszarvasénak, a fél kilogramm feletti trófeák már igen értékesnek számítanak [8]. A különleges formájú, abnormális agancsok pedig különösképpen lelkesítik a vadászokat. Az őz trófeája az állat agancsa, de esetenként annak bőre vagy a csőkevényes szemfoga is lehet az, amelyet gyöngyfognak is neveznek [9].

Az európai őz első ismert magyar terítékadata 1950 példányt említ 1879-ből [1]. Az állomány nagysága a 19-20. század fordulóján visszaesőben volt az ellenőrizetlen vadászata miatt [4]. A múlt század első felében lezajló két világháború további károkat okozott a vadállományban, 1946-ban csupán 10.000 példányt tartottak számon. [4]. A környezeti pusztítás mellett a vadonélő állatokat nagy számban használták fel a katonák és a lakosság ételmezésére. A vadászok behívásra kerültek, míg a hazatérő fegyveres katonák tovább garázdálkodtak ellenállás híján, így a vadászás mértéke megnőtt [10].

A megfogyatkozott hazai őzállomány minőségjavulása és mennyiségi növekedése a második világháborút követően a trófeabírálati rendszer országos kiépítésének és javarészt annak a martonvásári trófeának volt köszönhető, mely évtizedeken át világelsőnek minősült [4], napjainkban pedig még mindig az előkelő 12. helyet foglalta el a világranglistán 2010-ben [8]. A magyarországi trófeák kétharmada őzekből származik [11] és az érmes trófeák aránya (2. ábra) az elmúlt három évben újra növekedést mutat a korábbi évek hullámvázát követően [12].



2. ábra Az elmúlt 23 vadászati év érmes őztrófeáinak százalékos aránya az adott évben kilőtt őzek számához képest.

Jelenleg az európai állományt csaknem 15 millió egyedre becsülik, habár a kontinens országaiból gyűjtött adatok megbízhatósága régióként eltérő lehet [3]. Magyarországon a jelentett őzállomány 1984-ben csupán 219.000 volt, míg 2005-ben elérte a 310.852 egyedszámot [13]. A hazai őzállomány jelenlegi nagysága 2022. tavaszán meghaladta a 369.000-es jelentett egyedszámot, amiből a 2022/2023. vadászati évben közel 109.400 állat került terítékre [12]. A nyolcvanas-kilencvenes évekhez képest ma háromszor több őzet lőnek anélkül, hogy ez az állomány csökkenését okozná [11, 12].

2.3 Vadorzás

Magyarországon a szabad vadászat gyakorlatát a 12-13. században a hűbérúr rendszer korlátozta először, ezzel tovább nehezítve a megszorodott lakosság élelmezését, ami táptalajul szolgált az orrvadászat kialakulásának [14].

Napjainkban a vadonélő állatok védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadászatról az 1996. évi LV. törvény rendelkezik [10], amely meghatározza a vadászatra jogosultak körét és kötelezettségeit, a vadászat törvényes formáit, valamint a vadászati jog haszonbérletének módját is. A törvény kimondja, hogy a vad az állam tulajdonában van és a vadászterületen elejtett, elfogott vad (ideértve annak trófeáját is), a hullatott agancs, az elhullott vad teteme a vadászatra jogosult tulajdonába kerül [15]. Ha a vad nem vadászterületen kerül elejtésre vagy befogásra, illetve a trófeája begyűjtésre, úgy az élőhelyének megfelelő vadászterület szerinti vadászatra jogosult tulajdonába kerül, amennyiben ez nem igazolható, úgy a fellelés helyéhez legközelebbi vadászterületé a tulajdonjoga [15].

Az orrvadászat olyan vadelejtések gyűjtőfogalma, amelyek esetén nem teljesülnek a vadászat törvény által előírt feltételei, tehát vadorzás valósul meg. Ez jelentheti illegális vadászati eszközök és módszerek alkalmazását, a vadászati idény figyelmen kívül hagyását, a vadászvizsga, vadászati és fegyverhasználati engedély nélkülözését, vagy akár adott vadászterületen való jogosulatlan vadászatot [15]. Az elejtett vadak általában a fekete piacon, az illegális kereskedelemben kerülnek értékesítésre [16]. Az orrvadászat mellett gyakran felmerül az állatkínzás gyanúja is, hiszen az illegális vadászati eszközök egy része az állat szenvedését szükségtelenül meghosszabbíthatja, súlyosbíthatja [17, 18]. A vadorzásról és büntetőjogi következményeiről a BTK (Büntető Törvénykönyv) 245. paragrafusa rendelkezik [19].

Habár az orvvadászat fogalma egyszerűen körbejárható, a való életben való bizonyítása sok esetben nehézségekbe ütközik. Ugyanis még a vad tetemének meglétekor sem bizonyítható minden esetben, hogy az elejtéséhez a legális vadászat minden feltétele hiánytalanul megvalósult. Előfordulnak olyan esetek, amelyeknél az állat már feldolgozásra (nyúzás, zsigerelés, csontozás stb.) került vagy már fel sem lelhető, csupán különböző biológiai maradványokból (szőr, vér, csont stb.) lehet következtetni a bűncselekmény esetleges megtörténte [18, 20].

2.4 Közlekedési balesetek okozása vadonélő állatok által

A vadonélő állatokkal való ütközés lehetősége a gépjárművezetés velejárója. Eshetőségét elkerülni nem, csak csökkenteni lehet különféle intézkedésekkel mind a közútkezelők, mind a járművezetők részéről. Az Országos Vadgazdálkodási Adattár által közölt 2022/23-as adatok alapján a vad-gépjármű ütközések 83%-át őzek okozták a hazai vadászható nagyvadfajok közül. A vizsgált évben az őzek a hivatalos kilövéseken felüli elhullásának okát az esetek közel felében (45%) közlekedési balesetek jelentették [12].

A vad-gépjármű ütközések kiemelt időszaka Európában főleg április-májusra tehető, amikor a tavalyi gidák elhagyják addigi otthonukat és újabb területeket keresnek fel, valamint a bakok maguk is igyekeznek területet foglalni, a meglévő territóriumuk határait kibővíteni, felkészülve az üzekedésre [21]. Hazánkban ez a tendencia kevésbé jellemző, ugyanis a vadelütéses balesetek száma júniustól egészen októberig emelkedik, amikor az őzek üzekedése (július-augusztus) zajlik. Ebben az időszakban az állatok veszélyérzete csökken és nappali időszakban is aktívabbá válnak [22]. Tovább fokozza a balesetek előfordulásának ezen időszakban való gyakoriságát, hogy ezekben a nyári hónapokban a kedvezőtlen útviszonyok és a hőség miatt kevésbé elővigyázatosak maguk a járművezetők is [22]. Valamint az, hogy az állatok a rájuk általában jellemző hajnali és szürkületi órákban, illetve éjszaka szintén kiemelten aktívak, ilyenkor pedig a vezetők látási viszonyai a nappali órákhoz képest csökkennek [21].

A 2023. évi XLIV. törvényben kerültek kihirdetésre az 1996-os vadászati törvény módosításai, melyek könnyítettek a vad-gépjármű ütközések során a vadászatra jogosultak kárrendezési kötelezettségein. Eszerint „nem minősül a vadászatra jogosult felróható magatartásának vagy a tevékenységi körében előálló rendellenességnek, ha a vad az életmódjából, szokásos táplálkozási, szaporodási viselkedéséből következő helyváltoztatása miatt jelenik meg a lakott területen kívül közúton, autóúton, autópályán vagy a település belterületén, kivéve, ha a vad megjelenése a vadászatra jogosult tevékenységével áll okozati összefüggésben” [23].

A hivatalos úton bejelentett vadgázolások és a valóban megtörtént vad-gépjármű ütközések száma között jelentős a különbség, ugyanis az elkövetők nem szívesen jelentik be ezeket az eseteket, így a valódi esetszámra csak következtetni lehet [24]. Habár az új törvénymódosítás óta eltelt idő rövidebbé miatt még nem áll rendelkezésünkre elegendő adat, várhatóan a jövőben az eddiginél is kevesebb bejelentés fog megtörténni a járművezetők részéről, pedig a vadászható fajok elütése károkozást jelent a vadászatra jogosultak számára. Mindezek mellett a vadélütések lehetőséget kínálnak a vad testének elszállítására és feldolgozására, esetenként akár értékesítésére is, ami nem csak gazdasági kárral, hanem humán- és állategészségügyi veszélyekkel is együttjárhat. Ilyen, kockázatot jelentő fertőző ágensek lehetnek a teljesség igénye nélkül a veszettség, brucellózis, tuberkulózis, Q-láz, amelyek állatról-emberre, vagy vadállatról-háziállatra való terjedését az állat nem szakszerű kezelése elősegítheti [25, 26].

2.5 Mikroszatellita alapú egyedi azonosítás

Az európai őzet elterjedésének köszönhetően Európa számos országában, számos okból vetették már genetikai vizsgálatok alá. Ezek a vizsgálatok különféle mitokondriális és nukleáris markereket használtak fel együttesen főként populációstruktúra [27–29] és filogenetikai (fejlődéstörténeti) kutatásokban [30–33]. Mikroszatellitákat (STR-eket, Short Tandem Repeat, rövid tandem ismétlődések) alkalmaztak populációanalízisben a diverzitás és heterozigotizmus feltérképezésére [34, 35], valamint az igazságügyi felhasználhatóságuk felmérésére [36, 37]. Ezekből a kutatásokból eredő sokszínű STR-k felhasználása miatt Európa szerte a kutatások folyamán megannyi régiót azonosítottak az európai őz genomjában, amelyek kevés kivételtől eltekintve polimorfnak bizonyultak.

A mikroszatellita alapú egyedi azonosításra alkalmas genetikai módszerek szinte bármilyen szövetből elvégezhetőek és alkalmasak az esetleges maradványok, és a lefoglalt hús vagy trófeák közötti azonosság elemzésével a vadászás elkövetésének vizsgálatára, valamint a tetem sorsának nyomonkövetésére [36]. Európán belül és kívül már sikeresen alkalmaztak mikroszatellita markereket illegális vadászat elkövetésének bizonyítására és hasonló esetek felderítésére [38–41].

A mikroszatelliták kiemelt jelentőségüket a DNS (dezoxi-ribonukleinsav) -alapú azonosítási vizsgálatokban azzal érdemelték ki, hogy egyfajta genomiális szintű „ujjlenyomatként” is értelmezhetőek nagy változatosságuk miatt [42].

Mikroszatelliták alatt a DNS olyan rövid szakaszait értjük, amelyek 1-10 bázispár hosszúságú mintázatok többszörös ismétléséből épülnek fel (pl. GGAAGGAA) [43]. Az azonos bázismintából álló STR-k (rövid tandem ismétlődések) az ismétlődések számában különbözhetnek egymástól, így adott lókuszon rengeteg allél jelenhet meg adott populáción belül (hosszpolimorfizmus), egy egyeden belül azonban legfeljebb csak kettő, egy anyai és egy apai [42]. A mikroszatelliták magasabb rendű élőlényekben – akár csak az európai őz – igen nagy számban és nagy variabilitásban fordulnak elő a genomban [44]. Az allélek és lókuszek magas száma miatt minden egyedben egy egyedi mintázat lelhető fel, amely alapján megvalósítható a minták egyedi azonosítása is [45].

Az alapján, hogy hány bázisból épül fel az alapmintázat, megkülönböztetünk dimer (pl. TATATA), trimer (TGATGATGA), tetramer, pentamer stb. mikroszatellitákat [46]. Ezen tulajdonságuk alapvetően meghatározza a laboratóriumi munkában való felhasználhatóságukat. A di- és trimer STR-k PCR (Polimerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció) készülékben való sokszorozása során különböző, az eredeti allélnél egy-egy ismétlődéssel hosszabb vagy rövidebb melléktermék keletkezhet. Ezekre a szakaszokra gyakorta hivatkoznak „dadogásként” [47], amely nem csak *in vitro*, hanem *in vivo* körülmények között is előfordulnak [48]. A „dadogást” a DNS-polimeráz aktivitásának az ismétlődésen belül való szünetelése és disszociációja okozza [48]. Ennek oka a templát DNS-szál felhurkolódása, az úgynevezett „hairpin” kialakulása, amely megakadályozza az enzim tovább haladását és a szubsztrát-enzim komplex felbomlásához vezet, aminek köszönhetően a termék nem fogja elérni a teljes hosszát [48].

Az igazságügyi vizsgálatok során fontos, hogy kevert minták (több egyedtől származó örökítőanyag) esetén is azonosíthatóak legyenek az egyedek. A dimer mikroszatelliták esetében már egy egyedtől származó minta esetén is az egy-két ismétlődéssel rövidebb vagy hosszabb melléktermékek ellehetetlenítenék a valódi allélhosszúság meghatározását [49]. Ezzel szemben a tetramer STR-ek esetén kevésbé jelentős a dadogás mértéke, ezért jóval kevesebb a melléktermékek száma és könnyebben is elkülöníthetőek ezek a főtermékcsúcsoktól [50].

Előfordul, hogy adott fajban leírt mikrosatellita markerek működőképesek más fajokból származó minták esetében is [51]. Ennek oka rendszerint a primerkötő régiók konzervációja a rokon, egymáshoz genetikai értelemben közelálló fajok között [52].

Kevert minták (több fajból származó) esetén jelentős hátrányt jelenthet, ha olyan mértékben konzerválódott STR szakaszokat alkalmaznánk, amelyek több vadászható fajban is amplifikálódnak a célfajra fejlesztett primer párral és protokollal.

Egy 2021-ben megjelent kutatás során egy 12 mikroszatellita markert tartalmazó szettet publikáltak, ami alkalmas volt a Svájci-fennsík őzpopulációjában az igazságügyi genetika feltételeinek megfelelő egyedi szintű azonosításra [53]. A kevert mintákban való felhasználhatóság vizsgálatára fajspecifikus tesztek is végeztek, ami alapján az STRoe deer markerkészlettel a *Cervidae* család más fajaiból csak részleges profilt kaptak, valamint nem specifikus csúcsok jelentek meg, míg a *Bovidae* család tagjaiból származó minták esetén, ahová főként kérődző háziállataink tartoznak, nem specifikus, fajközötti amplifikációs termékek keletkeztek [53]. Ezek alapján a markerszett kifejezetten alkalmas törvényszéki esetekben való felhasználásra, azonban a populációk közötti esetleges genetikai eltérések miatt, mint például a fixálódott allélek egyes populációkban való jelenléte, amivel dámszarvas (*Dama dama*) populációk Európa szintű vizsgálatánál találkozottak [54], a szett tesztelése a helyi populációra mindenképpen szükséges.

2.6 Fluoreszcens jelölésű univerzális primerek

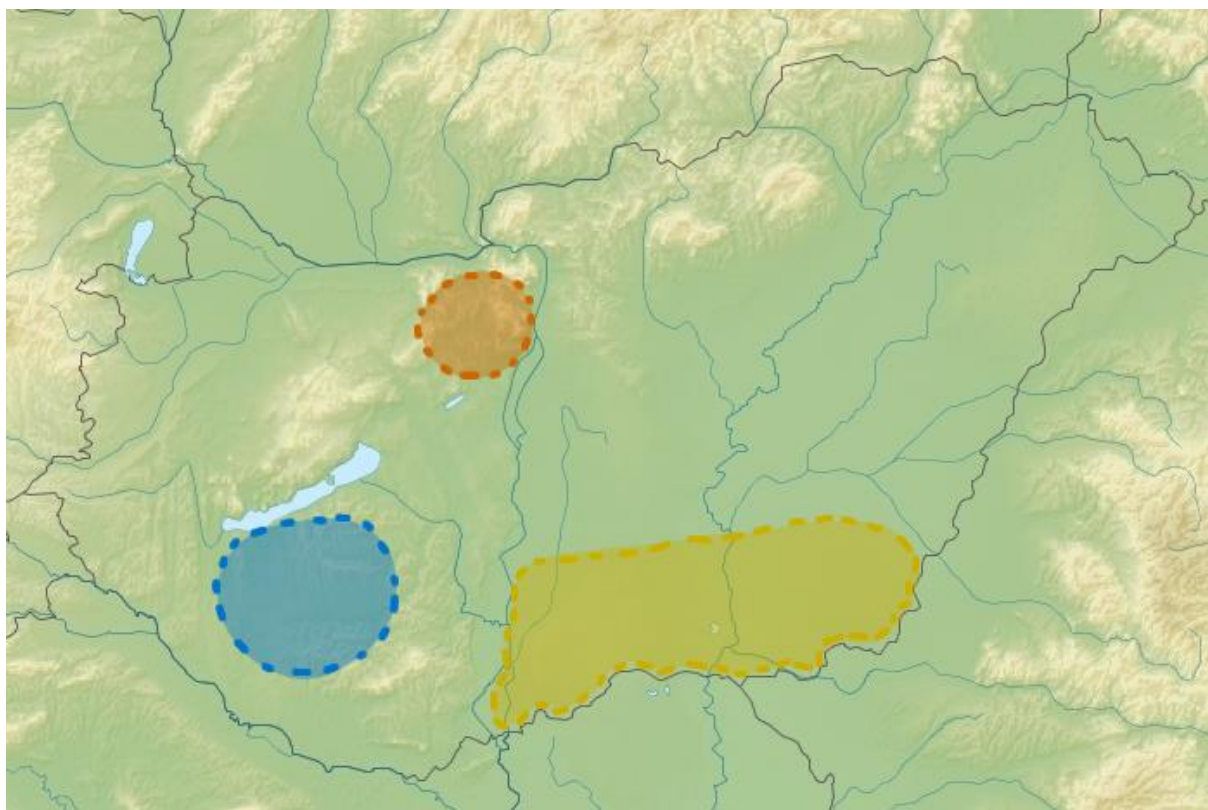
Az egyedi azonosítás során használt markerkészleteket kevés kivételtől eltekintve általában multiplex PCR-ben alkalmazzák [45, 53, 55], ahol az amplifikált lókuszek mérete kevéssé van átfedésben egymással [56]. Multiplex PCR során több, eltérő hosszúságú DNS-fragment keletkezik, amelyeket a kapilláris elektroforézissel való detektálásukhoz és azonosításukhoz fluoreszcens festékanyaggal kell jelölni [57].

A hagyományos módszernél a forward primer közvetlenül van jelölve a fluoreszcens festékkel [58]. Ettől eltérően, az úgynevezett „farkazásos” módszernél a különböző színjelölések univerzális primerekre kerülnek, a lókuszszerkezet forward primerek pedig egy, a megfelelő színjelölés univerzális primerével megegyező farokszekvenciát kapnak az 5' végükre [59]. A farokkal ellátott lókuszszerkezet forward primer a korai ciklusokban a templát szálról komplement másolatot készít, majd a folyamat végén a termék végére helyezi a farkat. Ezt követően a reverz primer is végighalad a termékén és amikor elkészíti annak komplement szálát, akkor a farokszekvenciának megfelelő komplement bázispárokat is beépíti a PCR fragmentum végére. A farokkal ellátott specifikus forward primerek a korai ciklusokban kimerülnek, így a későbbi anelláció során a farokszekvenciára specifikus, jelöléssel ellátott univerzális primerek érvényesülnek [59].

4. Anyagok és módszerek

4.1 Mintagyűjtés

A markerek teszteléséhez használt őz minták 2017-2023. között hivatásos vadászok által elvégzett legális kilövésekből származnak az ország három térségéből (3. ábra). Vizsgálatainkhoz összesen 45 szövetmintát (izom és szőrös bőr) használtunk fel az ország három területéről egyenlő mértékben: a Budai-hegységből (n=15), a Dunántúli dombság területéről (n=15), valamint a Dél-Alföldről (n=15).



3. ábra Mintagyűjtési területek vázlatosan jelölve. Budai-hegység (narancssárga), Dunántúli-dombság (kék), Dél-Alföld (sárga) [84].

4.2 Mintafeldolgozás és DNS preparáció

A mintákon steril eszközökkel, steril körülmények között bemetszéseket végeztünk, hogy az izomszövet belsejéből kivágott minta a lehető legkisebb eséllyel tartalmazzon bármiféle kontaminációt, keresztszennyeződést. Ezt követően a kimetszett szövetdarabokból a FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kittel (Favorgen Biotech, Ping-Tung, Taiwan) tártuk fel és tisztítottuk a DNS-t a protokoll leírásának megfelelően.

Az izolált DNS minőségi ellenőrzésére agarózgél-elektroforézist használtunk: interkaláló DNS-festéket tartalmazó 2%-os agarózgél-t öntöttünk, majd minden mintából 5 µl-t mértünk a gél zsebeibe. Az elektroforézist 230 V feszültség mellett 40 percig végeztük, majd a gél kék fény átvilágítás mellett digitalizáltuk és az elkészült felvételeket értékeltük.

A kinyert DNS koncentrációját Qubit® 2.0 fluorometerrel mértük meg. A tisztított DNS mintákat további felhasználásukig -20°C-on tároltuk az Állatorvostudományi Egyetem Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézetében.

4.3 „Farkazásos” technika

A markereink jelölésére a korábban már ismertetett „farkazásos” technikát alkalmaztuk. Színjelölésük megegyezett az eredetileírásokban közölt jelölésekkel [53, 59]. A fark szekvenciák (univerzális primerek) főbb tulajdonságait az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat A kutatás során felhasznált négy univerzális primer elnevezése, szekvenciája, színjelölése, bázispárban megadott mérete és annealációs hőmérséklet optimuma.

Univerzális primer	Fark szekvencia (5'-3')	Fluoreszcens festék	Hossz (bp)	Primer T _m	Referencia
A tail	GCCTCCCTCGCGCCA	6-FAM	15	63 °C	[67]
B tail	GCCTTGCCAGCCCGC	VIC	15	57 °C	[67]
C tail	CAGGACCAGGCTACCGTG	NED	18	59 °C	[59]
D tail	CGGAGAGCCGAGAGGTG	PET	17	59 °C	[59]

4.4 Monoplex tesztelés

Először monoplex PCR-ben teszteltünk külön minden markert az eredeti közleményben megadott eredeti protokoll alapján, majd az amplifikálási reakciók eredményét agarózgél-elektroforézissel ellenőriztük. Ha az eredmény nem volt megfelelő (túl sok melléktermék vagy nem kellő mennyiségű főtermék keletkezett, esetleg egyáltalán nem keletkezett a céltermék), úgy gradiens PCR alkalmazásával kíséreltük meg a hőmérsékleti program optimalizálását. Ez azt jelentette, hogy több annealációs hőmérsékleten is megvizsgáltuk a reakciótermékek minőségét és mennyiségét. Ezek ellenőrzésére szintén agarózgél-elektroforézist alkalmaztunk. A folyamatot addig ismételtük, amíg el nem értük az optimális beállításokat.

A PCR során szükséges anyagokat 5 µl végtérfogatra számítva 0,5 µl tisztított DNS-t, 1 µl (10mM) univerzális, forward és reverz primert tartalmazó mixet, 2,4 µl vizet (Ultra Pure Water) és 1 µl DreamTaq PCR Master mixet (ami nukleotidokat, DNS polimerázt, MgCl₂-t és puffert tartalmaz) mértünk össze. Az összemérés során 0,1 µl 20 mg/ml BSA-t (Bovine Serum Albumin) is hozzáadtunk az esetleges inhibitorok gátlásának céljából. A reakciók során felhasznált, jelölt primerek fontosabb tulajdonságait a 2. táblázat ismerteti.

2. táblázat Az általunk felhasznált markerek fontosabb adatai: a lókuszt neve, farkazásos technikával alkalmazott színjelölésük, valamint a forward és reverse primerek szekvenciái.

Lókuszt neve	Univerzális fark	Forward primer szekvencia (5'-3')	Reverse primer szekvencia (3'-5')
Capcap1	C tail	AGGATGGACAGGACCTTCTGA	GATCCTCTCGCTTCTCTCTACT
Capcap2	A tail	TGGGTTCCTTGCCTTCTC	GTTTCATGTGCTTATTGACCATCTGT
Capcap3.1	B tail	TGTCTTTCCTTGTCTATCTCTCTGT	GTTTGTCAGAGAAACAGAACCCAGCAG
Capcap5	D tail	ACCAGCTCTCATACAACACCC	ACGTGGGTTAATGGTTCAAGGT
Capcap10	A tail	GCACCTCACTGCAATGGAAAG	GGAGTGGGAAGGTTGCTCTAG
Capcap15	C tail	GAATGCTGTGGTGTCTCTGC	GTTTCTGGCTGGATTCTGTAGGACA
Capcap17	A tail	TCCATTGGTTGGTACACGGA	GGAAGTCCCACTAGAGGCTCT
Capcap25	B tail	CAGATAACACGGTGGCTCTGA	CATGGTGCCTGGTACATAGCT
Capcap29	C tail	AAGCCCATGACCTGAAACCAA	GCTTCCAGCAGGAGGGTATAT
Capcap31	B tail	ATTACACCACAGCTTCCCTG	GAGGCCCAGCATCTGAGTAAA
Capcap35	B tail	ACCCAAACCAAACACCTGAA	GTTTCTCCCTCGGGATAATCAAGTATT
Capcap36	A tail	GGCTCAGGGCTAAGATGTGAT	GTTTTTGACCAGGAAGAAAGCCACA

4.5 Multiplex tesztelés és kapilláris elektroforézis

A markereket megkíséreltük az eredeti cikkben szereplő multiplex PCR összeállítás szerint alkalmazni. Amennyiben ez nem adott kielégítő eredményt, úgy a markerek párosításával olyan plexeket állítottunk össze, amelyekben a lehető legtöbb markert tudtuk egy reakcióelegyen amplifikálni.

A keletkezett fragmentumok detektálásához és méretük pontos meghatározásához ABI Prism3500 GeneticAnalyzer készüléket (AppliedBiosystems) használtunk, GeneScan™-500 LIZ™ méret standarddal és a GeneScanAnalysis v3.1 szoftver analízissel. A kapilláris elektroforézis során detektált allélek méretét az OSIRIS program 2.16-os verziójában [60] vizualizáltuk és olvastuk le.

Statisztikai elemzéseinket a GenAlEx 6.5 programmal [61, 62] végeztük el, ahol megállapítottuk az egyes markerek alléljainak tényleges (Na, Number of Allels) és effektív számát (Ne, Number of Effective alleles), a várható (He, expected heterozygosity) és megfigyelt heterozigotizást (Ho, observed heterozygosity), a Hardy-Weinberg egyensúlyt (HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium), a PI (Probability of Identity, identitásvalószínűség), és PI_{sibs} (Probability of Identity for siblings, identitásvalószínűség testvérek között) értékét a teljes mintaszámra, valamint a populációkra külön vonatkoztatva is. A PI és PI_{sibs} értékek kiszámításához az alábbi képletek használtak:

$$PI = \sum_{i=1}^n (p_i^2) + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$$

$$PI_{sib} = 0,25 + (0,5 \sum p_i^2) + [0,5 (\sum p_i^2)] - (0,25 \sum p_i^4)$$

ahol p_i az i -edik allél gyakorisága adott lókuszon

Ezen kívül kiszámoltuk a PD (Probability of Discrimination) és PIC (Polymorphic Information Content, polimorfizmus információs tartalom) értékeket is. Először minden lókuszra (adott populáción belül) meghatároztuk a PD_i -t, amely annak a valószínűségét mutatja, hogy adott lókuszon két véletlenszerűen kiválasztott egyed genotípusosan egyezik.

$$PD_i = 1 - \sum x_i^2$$

ahol x_i = az i -edik genotípus megfigyelt gyakorisága

Az így kapott eredményeket pedig kombináltuk minden lókuszra:

$$PD = 1 - \prod (1 - PD_i)$$

A PIC értéket kiszámításához a következő egyenletet alkalmaztuk:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

ahol a $p_{i,j}$ a megfigyelt allélek gyakorisága.

A populációk közötti genetikai differenciálódás mértékének kifejezésére kiszámítottuk a privát allélek számát, továbbá a populáció-párokra vonatkozó fixációs indexet (F_{ST} , fixation index), valamint a migránsok effektív számát (Nm) is.

5. Eredmények

5.1 „Farkazásos” technika alkalmazása monoplex tesztelésben

A monoplex tesztelés során a felhasznált 12 marker közül tíz működött az eredeti protokollban leírtak alapján. Módosított PCR protokollal a *Capcap2* markert is sikeresen tudtuk alkalmazni a későbbiekben (3. táblázat). A *Capcap3.1* marker azonban további PCR beállításokat követően is jelentős mennyiségű mellékterméket adott, ami a valódi, de kis mértékű termékcúcsok értelmezését, és így értékelését is a legtöbb mintánál ellehetetlenítette. Ezért a kapott adatok kiértékelésekor ennek a markernek az eredményeit nem vettük figyelembe.

3. táblázat. Az általunk alkalmazott PCR-beállítások. A markerek nevei mellett szereplő azonos szimbólumok a diplexben együtt működő párokat jelölik. A ciklusszám az adott sorra vonatkozó ciklusszám. Min: perc, sec: másodperc, °C: hőmérséklet Celsiusban.

PCR program	Markerek	Kezdeti denaturáció	Ciklusszám	Denaturáció	Anelláció	Elongáció	Végső elongáció
1.	Capcap2	1 min 94 °C	35	30 sec 94 °C	90 sec 67°C	90 sec 72 °C	20 min 72 °C
2.	Capcap1 ♦	1 min 94 °C	5	(30 sec 90°C	90 sec 62°C	90 sec 72°C)	20 min 72°C
	Capcap5 □		5	(30 sec 94°C	90 sec 58°C	90 sec 72 °C)	
	Capcap10 Δ		5	(30 sec 94°C	90 sec 55°C	90 sec 72°C)	
	Capcap15 Δ		20	(30 sec 94°C	90 sec 50°C	90 sec 72°C)	
	Capcap17 ●						
	Capcap25						
	Capcap29 ♦						
	Capcap31 □						
	Capcap35 ●						
	Capcap36						

5.2 Multiplex tesztelés

Az eredeti markerszettől eltérően az úgynevezett „farkazásos” technikával jelölt primerek az eredeti protokollban leírt multiplex PCR rendszerben nem voltak együttes működésre bírhatóak. A monoplex tesztelés után maradt 11 markerből három kizárólag monoplexben, nyolc pedig négy diplexbe rendezve működött (3. táblázat). A *Capcap1* és *Capcap29* markerek esetén a primereket 1:1,5 arányban mértük be, minden más diplexben 1:1 aránnyal dolgoztunk. Ezen felül az eredeti protokoll igazításával sem tudtunk több markert tartalmazó multiplexeket összeállítani.

5.3 Polimorfizmus vizsgálata

A vizsgált 45 mintából két-két minta (azonos mintagyűjtési helyről és azonos időintervallumból) minden lókuszon teljesen azonos genetikai profilt mutatott, ezért duplikátumként (ismétlésből adódó mintavételi hibaként) kezeltük és a további elemzéseinkben módosított mintaszámmal ($n=43$) dolgoztunk. A többi minta genotípusa maximum hat lókuszon adott egyezést a 11 markerből.

Minden általunk tesztelt marker polimorfnak bizonyult allélszámaik alapján. Minimum öt és maximum nyolc allélszámot figyeltünk meg lókuszonként, míg az effektív allélszám szélsőértéke 1,99 (*Capcap25*) és 5,67 (*Capcap10*) volt. Az allélszámok és effektív allélszámok között jelentős különbségeket tapasztaltunk a *Capcap5*, *Capcap17*, *Capcap25* és *Capcap35* marker esetében, ahol az effektív allélszám kisebb volt, mint a tényleges allélszám fele. A PIC értéket vizsgálva az előzőekhez hasonlóan a *Capcap5*, *Capcap17* és *Capcap25* markereknél volt a legkisebb a kapott szám.

A megfigyelt heterozigotizáció 0,4-0,84 között mozgott, míg a várható heterozigotizációt 0,5-0,82 szélsőértékek között találtuk. Szembetűnő eltérést a *Capcap1* marker esetében tapasztaltunk, ahol a megfigyelt heterozigotizáció 0,2-vel elmaradt a várható heterozigotizációtól, valamint *Capcap5*, *Capcap17* és *Capcap25* markereknél 0,1 értékben volt kisebb a megfigyelt heterozigotizáció, mint a várható.

A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés összesen négy esetben hozott szignifikáns eltérést két szignifikancia szinten: a *Capcap2* és *Capcap5* esetében $p<0,01$, míg a *Capcap25* és *Capcap29* markernél $p<0,001$ volt. A vizsgált lókuszek polimorfizmusának vizsgálatakor megállapítottuk azok PIC értékét is a különböző populációkban (4. táblázat).

4. táblázat Statisztikai alapértékek a 11 lókuszra a teljes vizsgált mintaszám alapján (n=43): allélszám (Na), effektív allélszám (Ne), polimorfizmus információs érték (PIC), megfigyelt heterozigotizás (Ho), várható heterozigotizás (He), valamint a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikanciája két szinten, ahol ns=nem szignifikáns, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

lókusznév	Na	Ne	PIC	Ho	He	Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés és szignifikanciája	
Capcap1	5	3,80	0,70	0,53	0,74	0,08	ns
Capcap2	6	4,76	0,76	0,84	0,79	0,016	*
Capcap5	8	2,88	0,62	0,56	0,65	0,022	*
Capcap10	8	5,67	0,80	0,74	0,82	0,85	ns
Capcap15	5	3,92	0,70	0,77	0,74	0,83	ns
Capcap17	6	2,57	0,54	0,51	0,61	0,54	ns
Capcap25	5	1,99	0,47	0,40	0,50	$1,2 \times 10^{-4}$	***
Capcap29	7	3,90	0,70	0,70	0,74	$5,98 \times 10^{-8}$	***
Capcap31	5	4,33	0,73	0,77	0,77	0,96	ns
Capcap35	8	3,66	0,69	0,70	0,73	0,18	ns
Capcap36	7	3,64	0,68	0,65	0,72	0,46	ns
minimum	5	1,99	0,47	0,40	0,50		
maximum	8	5,67	0,80	0,84	0,82		
átlagérték	6,36	3,74	0,67	0,65	0,71		
szórás	0,39	0,31	0,1	0,04	0,03		
medián	6	3.80	0.7	0.70	0.74		

5.4 Egyediség vizsgálata

Az összes minta együttes vizsgálatával (n=43) megállapított PI érték $5,9 \times 10^{-11}$ volt, a populációkon belül a Budai-hegységben (n=15) $3,7 \times 10^{-10}$, a Dél-Alföldön (n=15) 2×10^{-10} , valamint a Dunántúli-dombság populációjában (n=13) $1,5 \times 10^{-10}$ volt.

Ugyanezekre a mintacsoportokra kiszámítottuk a PI_{sibs} értékeket is. Az összes mintára nézve ez $7,8 \times 10^{-5}$ volt, míg a populációk esetében a Budai-hegységben és a Dél-Alföldön egyaránt $1,2 \times 10^{-4}$ értéket kaptunk, a Dunántúli-dombság populációját tekintve pedig $9,7 \times 10^{-5}$.

A PD értékére a teljes elemszámra számítva 0,9999999997, a három populációra számítva a Budai-hegységben 0,9999999817, a Dél-Alföldön 0,9999999938, a Dunántúli-dombságban pedig 0,9999999944 eredményt kaptunk.

5.5 Vizsgált populációk diverzitása

A populációk genetikai diverzitásának leírásához kiszámítottuk a rájuk vonatkozó tényleges allélszámok, effektív allélszámok, PIC értékek, valamint a várható és megfigyelt heterozigótia fokok minimumát, maximumát, átlagát és a hozzá tartozó szórását, továbbá a mediánját is (5. táblázat). Jelentős eltéréseket a populációk között nem tapasztaltunk.

5. táblázat A populációkban számított valódi (N_a) és effektív allélszámok (N_e), polimorfizmus információs érték (PIC), megfigyelt (H_o) és várható heterozigotizáció (H_e) értékek.

Populáció	N_a	N_e	PIC	H_o	H_e
Budai-hegység					
minimum	4,00	1,97	0,33	0,40	0,49
maximum	7,00	4,13	0,71	0,87	0,76
átlag	5,27	3,34	0,58	0,59	0,69
szórás	0,24	0,20	0,12	0,05	0,02
medián	5,00	3,60	0,61	0,53	0,72
Dél-Alföld					
minimum	4,00	1,53	0,50	0,13	0,34
maximum	8,00	5,63	0,74	0,93	0,82
átlag	5,55	3,59	0,66	0,64	0,68
szórás	0,39	0,36	0,07	0,07	0,04
medián	5,00	3,60	0,67	0,67	0,72
Dunántúli-dombság					
minimum	3,00	1,53	0,35	0,54	0,41
maximum	7,00	5,63	0,77	0,85	0,80
átlag	3,36	3,59	0,65	0,73	0,70
szórás	0,41	0,28	0,13	0,03	0,03
medián	5,00	3,80	0,69	0,77	0,74

A populációk közötti kölcsönhatások jellemzésére megállapítottuk a populáció-párok közötti fixációs indexet (F_{ST}) és a virtuális vándorló egyedek számát (N_m , Number of Migrants). A Budai-hegység és a Dél-Alföld populációi között az F_{ST} 0,02, míg az N_m 11,5 volt. A Dél-Alföld és Dunántúli-dombság populációi között az F_{ST} értéket 0,02-nek, az N_m értéket pedig 12,6-nek állapítottunk meg, a Budai-hegység és Dunántúli-dombság összehasonlításánál pedig az F_{ST} 0,03-nek, míg N_m 7,9-nek adódott.

6. Összefoglalás

Kutatásunk során egy európai őzekre kifejlesztett tetramer mikroszatellitákból álló markerszett alkalmazhatóságát vizsgáltuk hazai őzpopulációkon, a magyarországi őzek egyedi szintű azonosításának céljából.

A markerszett tesztelésénél a költségek csökkentése érdekében az eredeti módszertantól eltérően univerzális primerekkel, és a megegyező szekvenciájú „farkakkal” jelölt lokuszspezifikus primerekkel dolgoztunk. Az eredeti PCR-protokoll használata során az eltérő jelölésmód alkalmazása miatt különböző akadályokba ütköztünk. A *Capcap2* marker az eredeti programmal nem működött, így ennél gradiens PCR módszerrel határoztuk meg a 67°C-os annealációs hőmérsékleti optimumot. Ez váratlanul magasabb volt mind az eredeti program 50°C-tól 62°C-ig terjedő annealációs tartományánál [53], mind az univerzális „A tail” szakirodalmában szereplő 63°C-os [67] annealációs optimumánál. Univerzális primerek használatából eredő primer-optimum változásra a korábbi, ezt a technikát alkalmazó nemzetközi szakirodalomban nem találtunk említést [59, 68, 69], azonban a Tanszék megelőző kutatásaiban már tapasztalták ezt a jelenséget [70, 71]. Ezen kívül a 12 marker közül egynél, a *Capcap3.1*-nél egyáltalán nem tudtuk olyan PCR beállítást kidolgozni, ahol az erős és állandó melléktermékcsúcs jelenléte ne akadályozta volna a főtermékcsúcsok leolvasását. Emögött kétféle jelenség is állhat. Előfordul, hogy a primerek kölcsönösen gátolják egymás működését primer-dimerizáció révén, és így specifikus melléktermékként jelenhetnek meg [72]. Ezen kívül a primerek nem célhelyre való bekötődése a templát szálon is eredményezhet olyan PCR fragmentumokat, amelyek zavarják a főtermékek későbbi azonosítását [73].

Az előzetes tesztelést követően a 11 marker mono- és diplexekben került amplifikálásra, mivel az eredeti multiplex beállítások nem jártak sikerrel. Emögött főként primer-interakciós okok állhatnak, mint a korábban említett primer-dimerizáció [72], de előfordulhatnak olyan kölcsönhatások, amelyekben nem primer-dimerek, hanem primer-klusterek képződhetnek. Klusterek alatt olyan primer-kölcsönhatást értünk, ahol több molekula tapad egymáshoz, ellehetetlenítve ezzel azok rendeltetésszerű működését, de a primer-dimerrel ellentétben ez „láthatatlan” az agaróz gélelektroforézises visszaellenőrzésnél [74].

Továbbá a „farkazásos” módszer sajátossága, hogy egy fluoreszcensen jelölt univerzális primer több termék jelölésére is felhasználódik egy multiplex elegyben. Amennyiben a párhuzamosan termelődő fragmentek egyikéből több van, vagy más okból kifolyólag nagyobb affinitással bír az univerzális fark felé, úgy az azonos farkokkal jelölt markerek kompetícióba kerülhetnek, ami egy vagy több marker elégtelen jelöléséhez vezethet. Ezt a fajta primer kompetíciót már

korábban leírták hagyományos fluoreszcens jelölésnél is [75], de mivel az eredeti markerszett fejlesztésénél ez az akadály nem jelentkezett [53], ezért az általunk alkalmazott technikának tudható be a probléma. A fenti nehézségekből kifolyólag bár a markerszett tesztelésének költségei csökkentek, a jövőbeni rendszeres, valamint nagyobb mintaelemszámmal való alkalmazásában idő- és munkaigényessége miatt az eredeti jelölés és PCR-protokoll alkalmazását javasoljuk.

A magyarországi őzek genetikai állománya az általunk vizsgált 11 mikroszatellita marker esetében polimorfnek bizonyult, és lókuszonként 5-8 allélt sikerült azonosítanunk. Svájcban az eredeti markerszett alapján 4-12 allélt találtak a 12 marker alkalmazásakor, a vizsgált mintaelemszám azonban jóval nagyobb ($n=513$) volt [53]. Feltehetően a mintaelemszám növelésével és a mintavételi terület bővítésével mi is további allélokat fogunk találni a magyar populációkban.

A faj genetikai sokszínűségét korábban már több kutatás is leírta Európa szerte mitokondriális kontroll régió [76, 77] és mikroszatellita markerek kizárólagos [37] és együttes alkalmazásával egyaránt [27–29, 35]. Jelen kutatáshoz hasonló paraméterekkel dolgozva, 12 dimer mikroszatellitát 30 őzmintában vizsgálva Poetsch és munkatársai csupán 1-6 allélszámot írtak le Északkelet-Németországban, ennek ellenére számításaik alapján az egyedi azonosítás feltételei ott is teljesültek [37]. Ezen felül olyan populációkban sem volt alacsonyabb az allélok száma, mint a tengerekkel határolt Brit-szigeteken, ahol szintén nagymértékű polimorfizmust írtak le kontroll régió és mikroszatelliták együttes vizsgálatával [27].

Más hazai szarvasféléket érintő vizsgálatokkal összevetve az őzek mikroszatellita és kontroll régió által vizsgált eredményei kiemelkedőek [76]. A magyar dámszarvasok esetében a vizsgált 25 tetramer mikroszatellita markerből csupán négy mutatott polimorfizmust 27 egyed mintái alapján [78], míg gímszarvasokban 14 tetramer mikroszatellita közül tíz esetén találtak háromnál több allélt 100 egyed vizsgálata során [79].

Mind az effektív allélszámok, mind a PIC értékek alapján a markerszett legkevésbé informatív tagjai a *Capcap5*, *Capcap17*, és *Capcap25* markerek voltak. Ennek ellenére ezen markerekre kapott PIC értékek sem maradtak el az eredeti markerszett eredményeihez képest [53], mutatva ezzel a markerszett hazai populációra való hatékony alkalmazhatóságát.

A populáció diverzitásának felméréséhez megállapítottuk az átlagos várható heterozigotitást (0,68-0,7) és az átlagos megfigyelt heterozigotitást (0,69-0,73) is. Eredményeinkhez képest a korábban említett európai kutatásokban kapott értékek ennél alacsonyabbak voltak [28, 35] vagy hasonló értéket értek el [27]. Annak megállapításához, hogy a vizsgált populációink mennyire különülnek el egymástól kiszámítottuk az egymástól való elkülönülést leíró F_{ST} és

Nm értékeket is. Eszerint vizsgált populációink között kevés az allélfrekvenciából és a privát allélokból adódó különbség, az átvándorló egyedek száma a mintaelemszámhoz viszonyítva pedig magas. Azonban más kutatások alapján még nagyobb mintaelemszám alkalmazása esetén sem nőtt a populációk közötti differencia mértéke, amennyiben azok elég közel feküdtek egymáshoz. Lengyelországban több mint 200 km-es földrajzi távolság mellett találták úgy, hogy az F_{ST} értékek enyhén emelkedettek voltak a két populáció között [28]. Ennek hátterében feltehetően az őzek kiváló adaptációs képessége és számukra átjárhatatlan fizikai akadályok hiánya állhat. Ezek alapján az általunk választott populációk között nem voltak elegendőek a meglévő természetes vagy mesterséges akadályok, mint a Duna, vagy az M1, M5, M6 és M7 autópályák, valamint más, nagyobb, kerítéssel védett autóutak az állományok izolációjához. A heterozigotizáció, F_{ST} valamint Nm értékek alapján a hazai populációkat jelenleg nem fenyegeti a beltenyésztés és annak káros következményei.

A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés Bonferroni-korrekciót követően két marker esetében (*Capcap25*, *Capcap29*) továbbra is szignifikáns volt [63]. Ez leggyakrabban a null allélok jelenlétével magyarázható, illetve a nem véletlenszerű párosodással [64]. A null allélok olyan allélok, amelyek valamilyen okból nem jelennek meg a PCR reakciót követően, tehát a detekció során a mintát tévesen homozigótának értelmezzük az adott lókuszon [65, 66]. A jelenség oka lehet a preferenciális sokszorozás a PCR során, azaz a rövidebb allélok sokkal nagyobb arányban termelődnek és kimerítik a primereket, mielőtt azok a hosszabb allélokat felszaporítanák, így utóbbiak nem jelennek meg termékcsúcsként; vagy maga a polimeráz enzim hibás működése miatt („*slippage*”) nem jönnek létre teljes másolatok [65]. Az őzek szaporodási rendszerében nem véletlenszerűen történik az egymással pározó egyedek kiválasztása, egy őzbak általában 4-10 őzsutát boríthat egy üzekeedés ideje alatt [1]. Amennyiben egy bak több pározási időszakon keresztül is megőrzi sutáit, az egyes lókuszek esetén megemelheti a homozigóták arányát. A svájci őzpopulációban a markerszett vizsgálata során a Bonferroni-korrekciót követően nem találtak szignifikáns eltérést a Hardy-Weinberg egyensúlytól egyik lókusztan esetében sem [53]. Ennek hátterében a magasabb mintaelemszám állhat, ezért feltételezzük, hogy nagyobb hazai mintaelemszám vizsgálata esetén csökken az eltérés szignifikanciája.

A fentiek elemzésével megállapíthatjuk, hogy az európai őz állományai a kontinensen nagymértékű polimorfizmust és diverzitást mutatnak, így Magyarországon is. Azonban fontos kiemelni, hogy az általunk vizsgált populációkkal nem fedtük le az ország teljes területét, sőt a mintavétel főként a déli vármegyékre, valamint Pest észak-nyugati, valamint Komárom-Esztergom vármegye területére korlátozódott, így a teljes, országos állomány állapotáról ez a

kutatás nem adott képet. Ennek fényében további populációk bevonása és a mintaelemszámok emelése szükséges az általunk megkezdett adatbázis növelésének céljából.

Az igazságügyi alkalmazhatóság vizsgálatához a teljes mintaszámra ($n=43$) és külön-külön a három populációban is kiszámítottuk a PI és PI_{sibs} , illetve a PD értékeket. A PI eredménye alapján határozhatjuk meg annak valószínűségét, hogy két véletlenszerűen kiválasztott minta milyen eséllyel rendelkezik azonos genotípussal, valamint ugyanezen valószínűséget abban az esetben, ha testvérekből származó mintákat vizsgálunk meg PI_{sibs} kiszámításának segítségével [80]. A populációkra külön számolt PI értékeket azonos nagyságrendben találtuk: a Budai-hegység populációban $3,7 \times 10^{-10}$, a Dél-Alföldi populációban 2×10^{-10} , a Dunántúli-dombság populációban pedig $1,5 \times 10^{-10}$. Az összes mintára kiszámított PI érték $5,9 \times 10^{-11}$ volt. A teljes elemszámra számított érték alapján azt jelenti, hogy 100 milliárd egyed vizsgálatánál átlagosan hat egyed esetében találunk ugyanolyan genotípust. Figyelembe véve, hogy az őz becsült egyedszáma egész Európában 15 millióra tehető, annak az esélye, hogy két magyarországi minta esetén egyező genotípust találjunk igen csekély. Ha feltételezzük, hogy vizsgált mintáink testvérektől származnak, akkor az egyezés valószínűsége ugyan növekedhet, az általunk megkapott legmagasabb érték esetén is 12 minta egyezőségét jelentené 100.000 egyedszám mellett. A szakirodalom 0,001 érték alatt kellően alacsonynak ítéli meg természetes populációk esetén [80].

Fontos megemlíteni, hogy a mintavétel biztonsága kiemelt tényező a minták egyediségének vizsgálatánál. Az általunk vizsgált minták közül két esetben is azonos genotípust kaptunk, aminek mintavételezési hiba lehetett az oka. A kérdéses minták ugyanis egy helyről, egy időintervallumban lettek véve. A többi egyed profilja maximum hat lókuszra egyezett a 11-ből, valamint a kapott PI_{sibs} értékek alapján annak a valószínűsége, hogy két testvérnek teljesen megegyezzen a genotípusa mind a teljes, mind a populációkra külön nézve rendkívül alacsony volt. Az érintett populációban (Dunántúli-dombság) az ezt leíró érték $9,7 \times 10^{-5}$ volt, aminek a szemléletes jelentése, hogy 100 000 egyedből átlagosan tíznek fog megegyezni a genotípusa, amennyiben ezek testvérek. Továbbá annak az esélye, hogy megközelítőleg azonos időben kerüljenek ilyen testvérek terítékre, valamint, hogy ebből a ritka eseményből egyszerre kettő is előforduljon valószínűtlennek tűnik.

Tekintettel arra, hogy 11 markert vontunk be a vizsgálatba, aminek mindegyike polimorfnak bizonyult, és a teljes magyar őzpopuláció becsült állománynagysága a mintagyűjtés időtartama alatt (2017-2023. vadászati évek adatai alapján) 361.000-369.000 között volt, ezek az értékek a nemzetközi irányelvek szerint megfelelnek az egyedi azonosítás feltételeinek [80]. A PD érték kifejezi annak valószínűségét, hogy két véletlenszerűen kiválasztott egyed genotípusa a vizsgált

lókuszon eltérő genotípust mutat [81]. Ez a vizsgált populációkban és összmintaszámra számítva is megközelítőleg egy volt, tehát annak a valószínűsége, hogy a markerszettel két egyed genotípus alapján elkülöníthető egymástól nagyon magas.

Összegzésként, a tesztelt markerszettben szereplő 12 marker közül 11 marker polimorfizmusát mutattuk ki három magyarországi őzpopulációban. Ezek vizsgálata alapján, a markerszett alkalmazásával a nemzetközi irányelveknek megfelelően egyedi szinten azonosítani lehet a hazai őzeket biológiai maradványaik alapján, amely különös jelentőséggel bír törvényszéki esetek elbírálásában, legyen szó illegális vadászatról, illegális hús- és trófeakereskedelemről, vagy vadgazolásról. Az utóbbi esetekben a nemrégai törvénymódosítás fényében különösen hasznos lehet az általunk tesztelt módszer a kártérítés megítéléséhez elengedhetetlen vétkes fél megállapítása során, mivel vita merülhet fel, ha például az őz csak az ütközést követően, a helyszíntől messzebbre pusztul el.

Emellett a markerszett nem csak igazságügyi vizsgálatok, de más tudományos kutatások eszközeként is szolgálhat, például populáció struktúra meghatározására, és beltenyésztés felmérését célzó vizsgálatokban. A jövőben mindenképp szükséges az adatbázis kiépítésének folytatása nagyobb mértékű és az ország több pontját érintő mintagyűjtések révén. Az európai őz Magyarország leggyakoribb vadászható nagyvadja, értékes és gyarapodó állományát érdemes a molekuláris biológiai eszközeivel is védeni, illetve támogatni.

7. Irodalomjegyzék

1. Faragó S (2015) Vadászati állattan, 4. Mezőgazda Kiadó, Budapest
2. Azanza B, Rössner GE, Ortiz-Jaureguizar E (2013) The early Turolian (late Miocene) Cervidae (Artiodactyla, Mammalia) from the fossil site of Dorn-Dürkheim 1 (Germany) and implications on the origin of crown cervids. *Paleobiodivers Paleoenviron* 93:217–258. <https://doi.org/10.1007/s12549-013-0118-8>
3. (2016) THE IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES™. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T42395A22161386.en>
4. Berdár B (1983) Az őz és vadászata. Mezőgazda Kiadó, Budapest
5. Széky P (2011) Vadászati állattan és vadegészségtan I. In: Nagy E (ed) 7. VM Vidékfejlesztési, Képzési és Szaktanácsadási Intézet, Budapest, p 182
6. Wallendums Péter Mindenki nagyvadja. <http://hazaivadasz.hu/2013/05/15/mindenki-nagyvadja/?fbclid=IwAR1EsMPzRdc4VdevtPHPQNbvrthtN7mMVhwqaX7La4juXplSxRvKXNw0Bd4>. Accessed 3 Oct 2023
7. (2004) 79/2004. (V. 4.) FVM rendelet a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról szóló 1996. évi LV. törvény végrehajtásának szabályairól
8. Breith S, Bozóki L, Winsmann-Steins B (2010) Europäischer Trophäenkatalog. Eujäger, Balatonföldvár, pp 10–28
9. Szidnai L (1978) Trófeák kikészítése és bírálata. Mezőgazda Kiadó, Budapest
10. Gyurcsó A, Kasza G, Ózsvári L (2023) Az illegális vadászat elleni jogi szabályozás és a vadvédelem története Magyarországon : Irodalmi áttekintés esettanulmányokkal. *Magy Allatorvosok Lapja* 145:297–308. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.05.297-308>
11. Csányi S, Márton M, Schally G (2022) Vadgazdálkodási Adattár 2021/2022. vadászati év
12. Csányi S, Márton M, Bóti S, Schally G (2023) Vadgazdálkodási Adattár - 2022/2023. vadászati év. Gödöllő
13. Csányi S (2010) Az őzállomány nagysága és hasznosítása Európában Human-wildlife conflicts in Hungary View project Animal forensic genetics View project
14. Bakóczy Antal (1973) Vadorzók. Mezőgazdasági Könyvkiadó Vállalat, Budapest

15. Országgyűlés (1996) 1996. évi LV. törvény a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról
16. Zsigmond C (2022) Bünszervezetek a nemzetközi illegális állat- és növénykereskedelemben. *Magyar Rendészet* 22:195–223.
<https://doi.org/10.32577/mr.2022.1.12>
17. Bertaldó A (2016) Az állatkínzás bűncselekménye. *Belügyi Szemle* 64:102–115.
<https://doi.org/10.38146/bsz.2016.4.8>
18. Sas (2021) Adrenalinvadászokat és rapsicokat üldöz a rendőrség.
<https://index.hu/belfold/2021/09/15/szarvasboges-erdojaras-orvvadaszat-rapsicok-vadaszat-rendorseg/>. Accessed 30 Sep 2023
19. (2012) 2012. évi C. törvény a Büntető Törvénykönyvről . 245. §
20. MTI (2023) Nógrádi orrvadászok ellen indult eljárás.
<https://magyarmezogazdasag.hu/2023/04/12/nogradi-orrvadaszok-ellen-indult-eljaras/>. Accessed 30 Sep 2023
21. Langbein J, Putman R, Pokorny B (2011) Traffic collisions involving deer and other ungulates in Europe and available measures for mitigation. In: *Ungulate Management in Europe*. Cambridge University Press, pp 215–259
22. Torák M, Borsos A (2019) A vadveszély közlekedésbiztonsági kezelésének elemzése. *Közlekedéstudományi Szemle* 69:61–70. <https://doi.org/10.24228/ktsz.2019.4.5>
23. (2023) 2023. évi XLIV. törvény egyes törvényeknek az agrárminiszter feladatkörét érintő módosításáról
24. Konstantina G, R SR, J BM, J DB (2014) Empirical Bayes Approach for Estimating Urban Deer-Vehicle Crashes Using Police and Maintenance Records. *J Transp Eng* 140:04013002. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)TE.1943-5436.0000629](https://doi.org/10.1061/(ASCE)TE.1943-5436.0000629)
25. Beregi Attila (2011) Vadegészségtan. Jegyzet vadgazda mérnöki szakos hallgatók részére
26. European Court of Auditors. (2016) Az állatbetegségek megfékezésére irányuló felszámolási, védekezési és figyelemmel kíséresi programok. Különjelentés 06 sz., 2016. Publications Office
27. Baker KH, Rus Hoelzel A (2013) Evolution of population genetic structure of the British roe deer by natural and anthropogenic processes (*Capreolus capreolus*). *Ecol Evol* 3:89–102. <https://doi.org/10.1002/ece3.430>

28. Olano-Marin J, Plis K, Sönnichsen L, et al (2014) Weak Population Structure in European Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Evidence of Introgressive Hybridization with Siberian Roe Deer (*C. pygargus*) in Northeastern Poland. PLoS One 9:e109147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109147>
29. Randi E (1998) Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*)
30. Gilbert C, Ropiquet A, Hassanin A (2006) Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. Mol Phylogenet Evol 40:101–117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.02.017>
31. Lorenzini R, José CS, Braza F, Aragón S (2003) Genetic differentiation and phylogeography of roe deer in Spain, as suggested by mitochondrial DNA and microsatellite analysis. Italian Journal of Zoology 70:89–99. <https://doi.org/10.1080/11250000309356500>
32. Randi E, Alves PC, Carranza J, et al (2004) Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: The effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. Mol Ecol 13:3071–3083. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02279.x>
33. Randi E, Mucci N, Pierpaoli M, Douzery E (1998) New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome b gene. Proceedings Biological sciences / The Royal Society 265:793–801. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0362>
34. Da Silva A, Gaillard JM, Yoccoz NG, et al (2009) Heterozygosity-fitness correlations revealed by neutral and candidate gene markers in roe deer from a long-term study. Evolution (N Y) 63:403–417. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00542.x>
35. Coulon A, Cosson JF, Angibault JM, et al (2004) Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: An individual-based approach. Mol Ecol 13:2841–2850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02253.x>
36. Davitkov D, Glavinic U, Nešić K, et al (2017) Improved DNA-based identification of cervidae species in forensic investigations. Acta Vet Brno 67:449–458. <https://doi.org/10.1515/acve-2017-0037>
37. Poetsch M, Seefeldt S, Maschke M, Lignitz E (2001) Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer possible employment in forensic applications

38. González BA, Agapito AM, Novoa-Muñoz F, et al (2020) Utility of genetic variation in coat color genes to distinguish wild, domestic and hybrid South American camelids for forensic and judicial applications. *Forensic Sci Int Genet* 45:102226. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102226>
39. Mucci N, Mengoni C, Randi E (2014) Wildlife DNA forensics against crime: Resolution of a case of tortoise theft. *Forensic Sci Int Genet* 8:200–202. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.001>
40. Lorenzini R (2005) DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: A case study. *Forensic Sci Int* 153:218–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.032>
41. Marín JC, Saucedo CE, Corti P, González BA (2009) Application of DNA Forensic Techniques for Identifying Poached Guanacos (*Lama guanicoe*) in Chilean Patagonia. *J Forensic Sci* 54:1073–1076. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01087.x>
42. GUICHOUX E, LAGACHE L, WAGNER S, et al (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11:591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
43. Wright JM (1994) Mutation at VNTRs: Are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites? *Genome* 37:345–347. <https://doi.org/10.1139/g94-047>
44. Li YC, Korol AB, Fahima T, et al (2002) Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Mol Ecol* 11:2453–2465
45. Krüger J, Schleinitz D (2017) Genetic fingerprinting using microsatellite markers in a multiplex PCR reaction: A compilation of methodological approaches from primer design to detection systems. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp 1–15
46. Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Surveys and analysis. *Genome Res* 10:967–981. <https://doi.org/10.1101/gr.10.7.967>
47. Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA
48. Viguera E (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 20:2587–2595. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2587>
49. Litt M, Hauge X, Sharma V (1993) Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *Biotechniques* 15:280–284
50. Gill P, Kimpton CP, Urquhart A, et al (1995) Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework-a strategy for the future

51. THÉVENON S (2003) Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Mol Ecol Notes*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286>
52. Sargeant LL, Georges M (1991) The Conservation of Dinucleotide Microsatellites among Mammalian Genomes Allows the Use of Heterologous PCR Primer Pairs in Closely Related Species
53. Morf N V., Kopps AM, Nater A, et al (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>
54. Baker KH, Gray HWI, Ramovs V, et al (2017) Strong population structure in a species manipulated by humans since the Neolithic: The European fallow deer (*Dama dama*). *Heredity (Edinb)* 119:16–26. <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.11>
55. Eichmann C, Berger B, Steinlechner M, Parson W (2005) Estimating the probability of identity in a random dog population using 15 highly polymorphic canine STR markers. *Forensic Sci Int* 151:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.07.002>
56. Jones KC, Levine KF, Banks JD (2002) Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Mol Ecol Notes* 2:425–427. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00264.x>
57. Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 25:1397–1412
58. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:674–679. <https://doi.org/10.1038/321674a0>
59. Blacket MJ, Robin C, Good RT, et al (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour* 12:456–463. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x>
60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/osiris/> OSIRIS
61. PEAKALL R, SMOUSE PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

62. Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
63. Ye Z, Wang Z, Hou Y (2020) Does Bonferroni correction “rescue” the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium? *Forensic Sci Int Genet* 46
64. Waples RS, Allendorf F (2015) Testing for hardy-weinberg proportions: Have we lost the plot? *Journal of Heredity* 106:1–19
65. Gagneux P, Boesch C, Woodruff DS (1997) Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair
66. Chakraborty R, De Andrade M, Daiger And SP, Budowle B Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications
67. Roche Applied Science (2006) GS Guide to Amplicon Sequencing. Roche Diagnostics. GmbHUSM- 00022.B
68. Grattapaglia D Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers
69. Real KM, Schmidt DJ, Hughes JM (2009) *Mogurnda adspersa* microsatellite markers: Multiplexing and multi-tailed primer tagging. *Conserv Genet Resour* 1:411–414. <https://doi.org/10.1007/s12686-009-9095-7>
70. Turi O, Zenke P, Zorkóczy O (2022) Mikroszatellita markerkészlet igazságügyi célú fejlesztése a Magyarországon élő dámszarvasok egyedi szintű azonosítására. TDK-dolgozat, Állatorvostudományi Egyetem
71. Turi O, Wagenhoffer Z, Battay M, et al (2023) Mikroszatellita-markerek tesztelése dámszarvasok egyedi azonosítása céljából. *Magy Állatorvosok Lapja* 145:183–192. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.03.183-192>
72. Das S, Mohapatra SC, Hsu JT (1999) Studies on primer-dimer formation in polymerase chain reaction (PCR)
73. Zazzi M, Romano L, Brasini A, Valensin PE (1993) Simultaneous Amplification of Multiple HIV-1 DNA Sequences from Clinical Specimens by Using Nested-Primer Polymerase Chain Reaction multiplex PCR procedure provides an attractive means for simple, rapid, and cost-effective direct detection of HIV-1 DNA in patient samples. Mary Ann Liebert, Inc., Publishers
74. Wei T, Lu G, Clover G (2008) Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of

- three strawberry viruses. *J Virol Methods* 151:132–139.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.003>
75. Brownie J, Shawcross S, Theaker J, et al (1997) The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. Oxford University Press
 76. Petes V, Dr. Zenke P, Dr. Zorkóczy O (2022) A magyarországi őzpopulációk igazságügyi célú genetikai vizsgálata a mitokondriális kontroll régióval. Allatorvostudományi Egyetem
 77. Plis K, Niedziałkowska M, Borowik T, et al (2022) Mitochondrial DNA diversity and the population genetic structure of contemporary roe deer (*Capreolus capreolus*) in Europe. *Mammalian Biology* 102:1743–1754. <https://doi.org/10.1007/s42991-022-00274-y>
 78. Zorkóczy OK, Turi O, Wagenhoffer Z, et al (2023) A Selection of 14 Tetrameric Microsatellite Markers for Genetic Investigations in Fallow Deer (*Dama dama*). *Animals* 13:2083. <https://doi.org/10.3390/ani13132083>
 79. Szabolcsi Z, Egyed B, Zenke P, et al (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>
 80. Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol Ecol* 10:249–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x>
 81. Jones DA (1972) Blood Samples : Probability of Discrimination. *Journal of the Forensic Science Society* 12:355–359. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(72\)70695-7](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(72)70695-7)
 82. istockphoto.com (2014) Hím és nőstény őz . <https://www.istockphoto.com/hu/fot%C3%B3/h%C3%ADm-%C3%A9s-n%C5%91st%C3%A9ny-%C5%91z-gm485982785-38234208>. Accessed 3 Sep 2023
 83. istockphoto.com (2017) Fiatal vad őz a fűben, *Capreolus capreolus*. <https://www.istockphoto.com/hu/fot%C3%B3/fiatal-vad-%C5%91z-a-f%C5%B1ben-capreolus-capreolus-%C3%BAjsz%C3%BCl%C3%B6tt-%C5%91z-vad-tavaszi-term%C3%A9szet-gm686721548-126161207>. Accessed 3 Sep 2023
 84. Hungary relief location map. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hungary_relief_location_map.jpg. Accessed 5 Sep 2023

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, Zorkóczy Orsolyának és Dr. Zenke Petrának, hogy belevontak ezen kutatásukba, valamint iránymutatást és segítséget adtak a laboratóriumi munkálatok és a dolgozat megírása során. Köszönettel tartozom Dr. Gáspárdy Andrásnak, az Állattenyésztési és Genetikai Tanszék, valamint Dr. Wagenhoffer Zsombornak az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállattudományi Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosítottak az Intézet Genetikai laboratóriumában végzett munkához.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani mindazon a hivatásos vadásznak is, akik biztosították számunkra a kutatáshoz felhasznált őzmintákat. Köszönetet szeretnék mondani a hozzám legközelebb álló embereknek, a családomnak és a barátaimnak, akik folyamatosan támogatást nyújtottak a munkámhoz.

A tanulmány az Állatorvostudományi Egyetem Budapest stratégiai kutatási alapja (SRF-001 sz. támogatás) támogatásával készült.