

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
Állattenyésztés-technológia és Menedzsment Tanszék

A doktori iskola vezetője:
PROF. DR. KOVÁCS MELINDA
az MTA levelező tagja

Témavezetők:
PROF. DR. HORN PÉTER
az MTA rendes tagja

PROF. DR. OROSZ LÁSZLÓ
az MTA rendes tagja

APAI LESZÁRMAZÁSI VONALAK VIZSGÁLATA KÁRPÁT-
MEDENCEI GÍMSZARVAS POPULÁCIÓKBAN

Készítette:
FRANK KRISZTIÁN

KAPOSVÁR

2018

DOI: 10.17166/KE2018.004

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Az európai gímszarvas (*Cervus elaphus*) Magyarország faunájának kiemelkedő nagyvad faja. Nagy területen elterjedt Európában és Ázsia, valamint Észak-Afrika egyes részein. Elterjedési területének nagy részén gyakori és tömeges előfordulású, bár Közép- és Dél-Európában a populációk fokozódó fragmentációja figyelhető meg. Egyes területekről pedig eltűnt a faj a túlvadászat, az élőhelyek eltűnése valamint a nem megfelelő gazdálkodás miatt. Évtizedek, évszázadok óta jelentős emberi hatások érik a faj állományait szelektív vadászat, tenyésztés, áttelepítés, és az élőhelyek átalakításának, feldarabolásának formájában. Ezen hatások erőteljesen befolyásolták és ma is befolyásolják a populációk összetételét, dinamikáját és genetikáját.

A gímszarvas sokféle gazdasági, társadalmi és természeti haszonnal bír; jelentős a hobbivadászat, valamint a vadhús előállítás szempontjából is. A vadgazdálkodás és sport vadászat több munkahelyet biztosít, valamint turisztikai hasznot is jelent, látogatók számára szórakozási lehetőség szolgáltatásával. Európai populációinak módszeres genetikai kutatása jelentősen hozzájárulhat a természetvédelmi, valamint vadgazdálkodási ismeretek bővüléséhez. Szarvas egyedek genetikai úton történő azonosítása állattenyésztési, kriminalisztikai, valamint természetvédelmi szempontból is igen fontos tényezővé vált mára hazánkban, mivel a magyarországi gímszarvas populáció vadgazdálkodási szempontból jelentős értéket képvisel. Hazánkban egyre inkább terjednek a zártrendszerű vadgazdaságok, melyek keretei között kialakított gímszarvas tenyésztést jelentős mértékben elősegítheti egy olyan DNS alapú genotipizálási rendszer, amely nemcsak egyedek azonosítására alkalmazható, hanem ezzel együtt a tenyészállatok közötti rokonsági kapcsolatok is feltárhatók. Ugyanakkor az egyre gyakoribb

orvvadászat elleni védekezés egyik fontos eszköze lehet az egyedazonosítás lehetőségének megteremtése.

Az állattenyésztési gyakorlat és a molekuláris szintű alap kutatások kapcsolódása teremtette meg jelenlegi munkánk alapjait, melynek célja egy egyedi gímszarvas DNS-profil felállítására alkalmas genetikai marker készlet kialakítása, és gyakorlati felhasználásra történő adaptációja. Munkám elsődleges célja olyan ivari kromoszómás mikroszatellita markerek fejlesztése, melyek lehetővé tennék gímszarvas apai vonalak részletes feltérképezését és nyomon követését. Ezen vizsgálatokat összevetném mitokondrium D-loop szekvencia adatokkal, így a populációk diverzitásának felmérését, illetve a leszármazási vonalak követését is pontosítanám. Ezen munka során a feladatomból volt:

- 1) Genomszekvenálásból származó adatok segítségével bioinformatikailag feltérképezni a gímszarvas genomban található mikroszatellita markereket, továbbá a megfelelő lókuszokra PCR vizsgálathoz használható primereket tervezni;
- 2) A tervezett primer párok közül ivari kromoszómás markerek válogatása, tesztelése és optimalizálása PCR alapú genotipizálási eljáráshoz;
- 3) A fejlesztett markerek segítségével magyarországi gímszarvas populációk egyedeinek genotipizálása genetikai diverzitás felmérése, valamint apai leszármazási vonalak feltérképezése céljából;
- 4) Az újonnan fejlesztett markerekkel kapott diverzitásmutatók összevetése autoszómás mikroszatellita markerekkel kapott diverzitás értékekkel, illetve a mitokondriális kontroll régió szekvencia analízisével kapott eredményekkel.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A markerfejlesztés alapját egy a Kaposvári Egyetem Vadgazdálkodási Tájéközpontból (Bószénfa, Somogy megye) származó gímszarvas bika genomszekvenáltatásának eredményeként kapott szekvenciák *de novo* illesztésével kapott összefüggő genomszakaszok (scaffoldok) jelentették. A markerek teszteléséhez szintén innen származó, zártkertben tartott és nevelt gímszarvas bikák vérmintáit használtam fel. Az ivari kromoszómás markerek teszteléséhez ezen túlmenően a vérvételen átesett fiatal bikák anyaállatából szőrminták gyűjtése is történt.

A populációgenetikai vizsgálatokhoz legálisan szervezett vadászatok során terítékre került gímszarvas bikákból történt szövet mintavétel, az elejtett állatok harántcsíkt izomszövetéből (hús).

A bioinformatikai markerfejlesztés a genomszekvenálás eredményeként kapott szekvenciák (readek) *de novo* illesztésével kialakult összefüggő genomszakaszokon (scaffoldok) történt. Ezek a scaffold szekvenciákon az ismétlődő motívumok (mikroszatelliták) szűrése QDD Perl szkript csomag segítségével történt. A mindkét oldalon legalább 80 bp hosszúságú határoló régióval rendelkező egyedi lókuszokra Primer3 segítségével terveztem primereket. A scaffoldok szarvasmarha referenciához illesztésével történt, az X illetve Y kromoszómára eső szakaszok kiválasztása. A mikroszatellita adatbázisunkat ezután X illetve Y kromoszómás régiókkal szűrtem az ivari kromoszómás mikroszatelliták kiválogására.

Az ivari kromoszómás mikroszatelliták közül 18 lókuszt, valamint a rájuk tervezett primereket választottam ki genetikai vizsgálatokhoz. Az egyedi PCR-ek során detektálható terméket adó primerpárokat nagyság szerint két 8-8 primer párt tartalmazó multiplex rendszerbe rendeztem, és az így kapott multiplexeket optimalizáltam PCR vizsgálathoz.

A populációgenetikai vizsgálatokhoz 130 gímszarvas bika mintát dolgoztam fel, a Kárpát-medence 5 területéről (Bószénfa, Lábod, Vajszló, Gemenc, Zemlén). Az egyedi genotípusok alapján az allélgyakoriságok, valamint ivari kromoszómás mikroszatelliták esetében a haplotípus gyakoriságok meghatározása, továbbá az alléldiverzitások, heterozigotitás értékek és diverzitás indexek számítását Cervus és GenAlEx programok segítségével végeztem; az egyedi genotípusokat főkomponens analízissel (PCA) és klaszteranalízissel is értékeltem, az egyedek populációhoz rendelése céljából PAST program és Structure program segítségével.

A mitokondriális kontroll régió vizsgálatához a teljes D-loopot és az azt határoló két tRNS gén részleges szekvenciáját tartalmazó 1014 bp-os szakaszt szaporítottam fel. A mitokondriális DNS nehéz láncának nukleotid szekvenciáit MEGA6 szoftver ClustalW algoritmusával illesztettem egymáshoz. A haplotípusok meghatározásához, valamint a populációk összehasonlításához DnaSP programot használtam. A szekvenciák közötti filogenetikai kapcsolatok feltárása a BEAST beépített Bayesi algoritmusával történt.

3. EREDMÉNYEK

A teljes gímszarvas genomban összesen 978 010 mikroszatellita motívumot azonosítottam 771 401 lókuszon. Ezek közül 617 216 lókuszt egyszerű ismétlődést tartalmaz, 154 158 lókuszt pedig összetett ismétlődést, azaz legalább kétféle ismétlődő motívum található egymástól 100 bp távolságon belül. A motívumok közel fele (45,65%) mononukleotid ismétlődés, ahol egy bázis ismétlődik. A tetranukleotid (négy bázis) ismétlődések aránya is viszonylag magas (26,06%), ami azért fontos, mert módszertanilag ezen mikroszatelliták értékelése a legkönnyebb. Primer tervezés 73 870 lókusztörtént sikerrel. Jelenleg ez a legnagyobb ismert gímszarvas STR marker adatbázis, amely későbbi populációgenetikai vizsgálatokhoz szükséges markerek fejlesztésére is használható, így nagyban megkönnyítheti a kutatók munkáját.

Az összes scaffold közül 1779 illeszkedett a szarvasmarha X referencia kromoszómára, 78 pedig az Y kromoszómára. Ezek alapján a gímszarvas X kromoszómán 29 454 mikroszatellita lókuszt, az Y kromoszómán pedig 714 mikroszatellita lókuszt található.

A genetikai vizsgálatokhoz kiválasztott 18 ivari kromoszómás lókuszt tervezett primerek közül, 15 marker adott detektálható terméket; ezek közül 13 mutatott az eddig levizsgált gímszarvas mintákon polimorfizmust, azaz legalább két eltérő nagyságú allélt. Az egy lókuszon található allélok száma 1 és 6 között változott, az átlagos allélszám 3,3 volt. A számított átlagos géndiverzitás érték 0,27, a legmagasabb géndiverzitás értéket (0,662) a Cel_010 marker mutatta, a legalacsonyabbat a két monomorf marker, Cel_002 és Cel_015.

Az Y kromoszómás mikroszatelliták géndiverzitása, mint a markerek információtartalmának mértéke, megfeleltethető az autoszómás mikroszatelliták esetében használt kizárás valószínűség értékeknek, ami a

markerek használhatóságát mutatja. Ezek alapján a fejlesztett ivari kromoszómás markerek, a monomorf lókuszokat leszámítva, közepesen informatív markereknek tekinthetők. Az ivari kromoszómák öröklődése miatt az ivari kromoszómás lókuszokon az egyes allélek nem véletlenszerű kombinációban határoznak meg egy adott DNS-profilt, hanem kapcsoltan öröklődnek. Így ezeknek a közepesen informatív markereknek az együttes megbízhatósága növekedhet, ez alkalmassá teheti ezeket a mikroszatellitákat populációgenetikai felhasználásra.

A kapcsolt allélek specifikus kombinációját haplotípusnak nevezzük, Y kromoszómás populációs és evolúciós felmérések esetén informatívabb a haplotípus-gyakoriságokkal számolni az autoszómás rendszereknél használatos allélgyakoriságokkal szemben. A vizsgált bikákban összesen 19 különböző Y kromoszómás vonalat, valamint 76 különböző X kromoszóma haplotípust tudtam elkülöníteni. A 19 Y kromoszómás vonal közül 11 csak egy-egy populációban volt jelen, a többi vonal viszont több populációban is megfigyelhető volt. A leggyakoribb Y kromoszómás vonalba (Y_04) 50 egyed tartozott, ez a vonal mindegyik vizsgált vadon élő populációban jelen volt. Ezen túl még egy Y kromoszómás vonal (Y_01) volt 43 egyedben megfigyelhető. A többi vonalhoz csak néhány egyed tartozott, ezek gyakorisága jóval alacsonyabb volt.

Az Y kromoszómás vonalak alacsony száma arra utal, hogy az egyes populációk néhány alapító bikára vezethetők vissza. A lábodi populációban csak 5, a vajszlói populációban csak 4 Y kromoszómás vonalat találtam, ezek között volt a két leggyakoribb vonal, amelyekhez mindkét populációban a bikák több mint 80%-a tartozott. A gemenci és a zempléni populációkban ennél nagyobb változatosság volt jelen, Gemencen 10, a Zempléni hegységben 11 haplotípussal. Ebben a két populációban is az Y_01 és Y_04 vonal fordult elő a legnagyobb gyakorisággal, de kevésbé voltak dominánsak mint Lábodon vagy Vajszlón. Zemplénben a leggyakoribb Y kromoszómás

vonal is csak a bikák 36%-ban fordult elő. Az egyes populációkban jelentősen eltért az egyes Y kromoszómás vonalak gyakorisága. Ezt főleg az unikális (csak egy populációban előforduló) haplotípusok okozták. A Neiféle haplotípus diverzitásra a zempléni mintákban kaptam a legmagasabb értéket, a bőszenfai mintákban a legalacsonyabbat.

Az Y kromoszóma vonalak filogenetikai fája két ágra ágazik, azaz két klád jelenlétére utal. Ez azt jelenti, hogy a magyarországi gímszarvasokban két apai leszármazási ág van jelen. Az I. kládot az Y_11 és Y_19 közötti vonalak alkotják, a II. kládot pedig az Y_01 és Y_10 közöttiek. Az Y kromoszómás vonalak filogenetikai helyzete, azaz, hogy a fa melyik ágán helyezkednek el, nem mutat egyezést a bikák földrajzi eredetével; a filogenetikai fa mindkét ágán található mind a Dunántúlról mind a Zempléni-hegységből származó állatok.

Az ivari kromoszómás markerek által meghatározott haplotípusok segítségével az egymáshoz kapcsolódó populációk genetikai struktúrája és genetikai kapcsolata is vizsgálható. A legtöbb közös Y kromoszóma vonalat a gemenci és a zempléni populáció között találtam, bár megjegyzendő, hogy a többi populáció esetében az alacsony mintaszámok miatt a közös haplotípusok száma alulbecsült lehet. A közös vonalak rendkívül alacsony száma ellenére a populációk egyezési valószínűségei viszonylag magas értéket mutatnak. Bár ez nem túl meglepő, ha figyelembe vesszük a mintavétel korlátozott földrajzi léptékét; távolabbi populációk vizsgálata esetében határozottabb elkülönülést várhatunk. A lábodi, vajszlói és gemenci populációk apai vonalai nagyobb hasonlóságot mutatnak egymással, míg a zempléni populáció ezektől valamennyire különbözik.

Az X kromoszómás haplotípusok nagy száma miatt a haplotípusok többsége, 55 haplotípus, csak egy-egy állatban volt megtalálható, ami legalább egy nagyságrenddel kisebb egyezési valószínűségeket eredményez, így a populációk jobban elválaszthatók. Meglepő módon a legtöbb közös X

kromoszómás haplotípuson a lábodi és a zempléni populáció osztozik, a legkevesebben pedig a lábodi és a vajszlói. Ez szöges ellentétben van a populációk földrajzi távolságával, bár itt is meg kell jegyezni, hogy a lábodi és vajszlói minták alacsony száma miatt ezek az eredmények torzítottak lehetnek. Ezen adatok alapján úgy tűnik, hogy a populációk anyai vonalai jobban különböznek egymástól, mint az apai vonalaik. Erre számítani is lehetett, mivel a gímszarvas bikák hajlamosak a vándorlásra, míg a tehenekre inkább a területhűség jellemző.

Az Y kromoszómás vonalak molekuláris varianciaanalízise (AMOVA) alapján a genetikai variabilitás nagy része (87%) az egyedek között található, csak 13%-át okozza a populációk közötti variabilitás. A populációk az apai vonalaik alapján szignifikánsan különböznek egymástól ($\Phi_{st} = 0,131$, $p < 0,001$); a páronkénti összehasonlítások alapján minden vadon élő populáció különbözik a többitől (minden $p \leq 0,04$). Azaz már ez a négy újonnan fejlesztett Y kromoszómás markerrel leírható haplotípusok alkalmasak a közeli gímszarvas populációk elválasztására.

Autoszómás markerekkel relatíve magas diverzitást mértem a gímszarvasokban, az egy lókuszon található allélek száma 6 és 18 között változott, az átlagos allélszám 13,8 volt. A heterozigotitás értékek is magasak voltak, az átlagos várt heterozigotitás 0,833, az átlagos megfigyelt heterozigotitás értéke pedig 0,759. Egyik marker esetében sem tapasztaltam szignifikáns eltérést a Hardy-Weinberg egyensúlytól. A lókuszosokra számított diverzitás indexek (PIC és Shannon-Weaver index) is kifejezetten magasnak adódtak. A PIC lókuszonkénti értéke 0,456 és 0,904 között változott, a markerekre összesített értéke pedig 0,815. A Shannon-Weaver index értékei lókuszonként 1,004 és 2,552 között voltak, az összes marker átlagában pedig 2,131. Az alkalmazott markerek nagyon informatívnak és nagyon diverznek számítanak, kifejezetten alkalmasak populációgenetikai vizsgálatokhoz, akár kismértékű különbségek kimutatására is.

A heterozigotitás és alléldiverzitás értékek populációnként is hasonló tartományban mozogtak, mint a teljes minta szettre számítva. A legalacsonyabb alléldiverzitás értéket ($N_A = 5,7$) a bőszenfai bikákban tapasztaltam, ami az alacsony mintaszámot figyelembe véve nem meglepő, és nem feltétlenül reprezentálja a teljes állományt. A legmagasabb alléldiverzitás a zempléni populációban volt megfigyelhető ($N_A = 10,7$), de a többi populációban is ezt közelítő értékek jelentkeztek. A genetikai diverzitás mutatók közül a PIC átlagos értéke populációnként 0,640 és 0,805 között változott, a bőszenfai állatoknál volt a legalacsonyabb, a zempléni populációban pedig a legmagasabb. A Shannon-Weaver index 1,415 és 2,031 között változott, a PIC-hez hasonló tendenciával. A kapott értékek alapján a magyarországi gímszarvas állomány genetikai diverzitása kiemelkedően magas, leginkább a Közép-Európa környező területein tapasztalt genetikai diverzitáshoz hasonlítható.

Az autoszómás STR-ek esetében kiemelendő még a populációnként számított egyedazonosítási valószínűség („*probability of identity*”), ami a markerek egyedazonosítási megbízhatóságát mutatja, elsősorban igazságügyi célból történő felhasználás során. Minél kisebb ez a valószínűség, annál biztosabb az egyedazonosítás. Ennek az értéke a bőszenfai bikákban a legmagasabb, ami nem meglepő a korlátozott mintaszámot és a minták közötti magas rokonsági fokot tekintve, azaz ebben az állományban lenne a legbizonytalanabb az egyedazonosítás, de még itt is nagyjából tízmilliárd egyedenként fordulhat elő téves azonosítás, ami elég nagy megbízhatóságot jelent. A vadon élő populációkban ennél még legalább 3 nagyságrenddel jobb megbízhatóságot kaptam, ami már igazságügyi vonatkozásban is megfelelő és nagyon megbízható markerekre utal.

Populációnként megvizsgálva az egyes lókuszon tapasztalható allélgyakoriságokat, akár jelentős különbségek is tapasztalhatók a populációk között. Ez arra utalhat, hogy a populációk genetikailag nem igazán

érintkeznek egymással, nincs nagyfokú génáramlás közöttük. A genetikai strukturáltság vizsgálatára első lépésben AMOVA vizsgálatot végeztem. Az autoszómás STR markerek genetikai variabilitásának nagy része (90%) az egyedeken belül található, az egyedek közötti variabilitás csak 6%, a populációk közötti variabilitás pedig csak 4% a teljes variabilitáson belül. A populációk szignifikánsan különböznek egymástól ($F_{st} = 0,040$, $p < 0,001$). A különböző populációk páronkénti összehasonlítása alapján csak a vajszlói és lábodi populáció között nincs szignifikáns elkülönülés ($F_{st} = 0,005$, $p = 0,185$), a többi populáció szignifikánsan különbözik egymástól (minden $p \leq 0,002$).

A populációk genetikai strukturáltságának további vizsgálatára főkomponens analízist (PCA) végeztem. A PCA alapján az egyes populációk nem válnak el teljesen, de kismértékű elkülönülés feltételezhető közöttük. A gemenci, lábodi és vajszlói populációk nagyrészt átfednek, de Zemplén kissé elkülönül ezektől. A bőszenfai állatok pedig kevert állományra utalnak. A szélső pontok által határolt sokszögek nagysága alapján a gemenci populáció genetikai diverzitása a legnagyobb, a legkisebb a diverzitás pedig a bőszenfai bikák esetében jelentkezik, a többi sokszög területe ezek között van, és nagyjából megegyezik. Ez a tendencia megfelel a diverzitás indexek esetében láthatóknak, és genetikailag diverz populációkra utal, melyek között génáramlás van, azaz genetikailag nem függetlenek egymástól.

A Structure program a legmagasabb átlagos valószínűség értéket (“*likelihood score*”) kettő és három genetikai egység ($K = 2$ illetve $K = 3$) esetében számított, ami két illetve három alpopuláció meglétét valószínűsíti; míg a log Pr érték második deriváltjának változása $K = 5$ esetében volt a legalacsonyabb, ami öt alpopuláció létezésére utal. Viszont az egyedi genotípusok klaszterezése nem mutat egyértelmű alpopulációra utaló elkülönülést, leginkább csak kevert genotípusokat láthatók. Az autoszómás STR-ek alapján a zempléni populáció különbözik a dunántúli állományoktól,

bár háromnál több klaszter esetében leginkább egy kevert populációnak tűnik.

A mitokondriális kontroll régió szekvenciájának vizsgálatát a magyarországi gímszarvas bikák közül két populációból (Gemenc és Zemplén) származó 87 állaton volt lehetőségem elvégezni. A teljes kontroll régió illesztés 916 bp hosszúságú; a magyar szekvenciákban 68 variábilis pozíciót tartalmaz, ezek közül 62 parszimónia informatív karakter, így összesen 39 különböző haplotípust eredményeznek. A magyarországi minták haplotípus és nukleotid diverzitása is magasnak mondható, az összesített adatsorban $D = 0,929$, illetve $\pi = 0,015$. Ezek az adatok is megerősítik, az autoszómás és ivari kromoszómás STR vizsgálatokhoz hasonlóan, hogy a magyarországi gímszarvasok genetikai diverzitása az európai populációkhoz képest kiemelkedően magas.

A detektált mitokondriális kontroll régió haplotípusok filogenetikai fáján két elkülönült klád figyelhető meg, ami arra utal, hogy a magyarországi gímszarvasokban két leszármazási vonal van jelen. Csak két haplotípus, Hap1 és Hap3, volt jelen Gemencen és Zemplénben is, a többi haplotípus csak az egyik vagy másik populációban volt jelen. A haplotípusok földrajzi eredete viszont nem mutat teljes egyezést a filogenetikai kládokkal; a fa mindkét ágán megtalálhatók mind a gemenci mind a zempléni populációból származó állatok. Ez is mutatja, hogy ez a két populáció, dacára a köztük lévő földrajzi távolságnak, érintkeznek, vagy legalábbis korábban érintkezett egymással. Az európai szekvenciákkal összevetve a magyar mintákat mind a nyugat-európai A mind a kelet-európai C haplocsoportba tartozó szekvenciák megtalálhatók a Kárpát-medencében, míg a mediterrán B haplocsoportba tartozó mitokondriális haplotípus nem került elő. A gemenci populációban a C haplocsoport, a zempléni populációban az A haplocsoport volt a domináns, bár mindkét régióban találtam mindkét haplocsoportba tartozó szekvenciákat. A nyugat-európai vonalhoz tartozó Hap1 és Hap3 haplotípus mindkét

populációban jelen volt, és összesen 15 (41,7%) balkáni leszármazási vonalhoz tartozó egyedét találtam a zempléni populációban és 4 (7,8%) ibériai leszármazási vonalhoz tartozó egyedét Gemencen. Ezek voltak azok a haplotípusok, amelyeknek a filogenetikai pozíciója nem egyezett a földrajzi eredettel. A gemenci 51 bika közül 47 (92,2%) tartozott a balkáni eredetű C haplocsoportba, a zempléni 36 bika közül pedig 21 (58,3%) az ibériai eredetű A haplocsoportba. Ezek alapján a Kárpát-medencébe a jégkorszak után két irányból települtek be a gímszarvasok. Egyrészt az eljegesedéseket a Balkánon átvészelő állatok észak felé terjedve, másrészt az Ibériából származó egyedek Közép-Európán keresztül; a két leszármazási vonal képviselői pedig valahol a Duna mentén találkozhattak és természetes úton keveredhettek egymással.

Az Y kromoszómás STR markerekkel kapott haplotípusok filogenetikai fáján is két elkülönült klád figyelhető meg, a 19 magyarországi Y kromoszóma haplotípus közül 15 volt megtalálható a gemenci illetve a zempléni gímszarvas populációban. A mitokondriális haplocsoportokhoz hasonlóan, Y kromoszómásan is két leszármazási vonal van jelen a gemenci és a zempléni gímszarvasokban; de az Y kromoszómás vonalak földrajzi eredete sem mutat teljes egyezést a filogenetikai helyzetével. A mitokondriális haplotípusokkal szemben az Y kromoszómás vonalak közül több, szám szerint 6 volt jelen mindkét régióban, 4 vonalat csak gemenci, míg 5 vonalat csak zempléni állatokban detektáltam.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

A disszertáció témájának általános biológiai, populációgenetikai illetve evolúcióbiológiai alapkutatási szinten túl, alkalmazott vadbiológiai illetve vadgazdálkodási vonatkozásai is vannak, mivel a kapott eredmények gyakorlati felhasználása egy kiemelten fontos nagyvadfaj életmódjának megértését, és ezáltal a vadon élő illetve zárttéri körülmények között tartott állományok hosszú távú fenntartását segíthetik.

Gímszarvas mikroszatellita markerek fejlesztése korábban leginkább más fajokból származó markerek adaptálásával történt, ami hosszadalmas labormunkával járt. Ehhez képest a bioinformatikai markerszűrések eredményeként több mint 978 000 mikroszatellita motívum, valamint közel 74 000 primer tervezésre alkalmas genomi lókuszt lett azonosítva a gímszarvas genomában. A referencia ivari kromoszómára térképeződés alapján a gímszarvas X kromoszómán 29 454, az Y kromoszómán pedig 714 STR található. Ez a bioinformatikai protokoll jelentősen egyszerűsítette új STR markerek fejlesztését, és nagy mennyiségű potenciális markerjelöltet eredményezett. A kapott STR illetve primer adatbázist a markerek rokon fajok közötti kereszt-amplifikáció miatt sok szarvas faj esetében lehet új markerek kereséséhez használni. Ezáltal nagy gyakorlati jelentősége lehet a jövőben populációk eredetének, kapcsolatának és a közöttük lévő génáramlás tanulmányozásában. Megjegyzendő még, hogy a bemutatott bioinformatikai protokoll más fajokban is hasonlóan egyszerűen használható jó minőségű mikroszatellita markerek fejlesztésére genomszekvenálási adatokból.

Az ivari kromoszómára térképeződő markerek közül 18 primer párt választottam ki a genetikai vizsgálatokhoz. Ezek közül 3 nem adott értékelhető PCR terméket, így a fejlesztett markerek több mint 83%-a megfelelő genetikai vizsgálathoz történő felhasználásra. Ez a bioinformatikai markerfejlesztési protokoll alkalmas akár kromoszóma specifikus markerek

fejlesztésére is, ahogy az ivari kromoszómák esetén demonstráltam is; így akár QTL térképezéshez, genetikai térkép alapú klónozáshoz, fizikai és genetikai kromoszóma térképek integrációjához vagy marker alapú szelekcióhoz használható jó minőségű markerek válogatására is alkalmas a módszer.

A választott markerek közül 13 mutatott az eddig levizsgált gímszarvas mintákon polimorfizmust, azaz legalább két eltérő nagyságú allélt. Az STR-ek közepesen informatív markernek számítanak, viszont az ivari kromoszómás lókuszokon az egyes allélek nem véletlenszerű kombinációban határoznak meg egy DNS-profilt, hanem kapcsolatosan öröklődnek, így ezek a közepesen informatív markerek is alkalmasak populációgenetikai felhasználásra.

A fejlesztett ivari kromoszómás markerek polimorfizmusa lehetőséget teremt leszármazási vonalak felmérésére, valamint populációk genetikai struktúrájának és genetikai kapcsolatainak vizsgálatára is. A vizsgált populációkban talált X illetve Y kromoszóma haplotípusok alapján az egyes élőhelyek állományai különböznek egymástól, de vannak átfedések közöttük. Ezt a keveredést a bikák vándorlása is okozhatta, bár az emberi áttelepítések hatása sem zárható ki. Viszont az áttelepítések Y kromoszómás vonalakra gyakorolt hatásáról ezidáig nem áll rendelkezésre vizsgálat, ezek feltérképezése vadgazdálkodási illetve igazságügyi szempontból is fontos lehet, ezek segítségével a jövőben az illegális áttelepítések könnyebben kimutathatóak lehetnek.

Az autoszómás STR markerekkel magas genetikai diverzitást mértem, az átlagos allélszám 13,8 volt. Ez a magas alléldiverzitás megfelel a közép-európai gímszarvasokban leírtaknak, és kifejezetten előnyös populációgenetikai vizsgálatokhoz. A heterozigotitás is magas volt, az átlagos várt heterozigotitás 0,833, az átlagos megfigyelt heterozigotitás értéke pedig 0,759. Ezek az értékek megfelelnek a markerekkel korábban

genotipizált magyarországi gímszarvasok heterozigotizálásának, és nem különböznek más gímszarvas populációk heterozigotizációjától. A további diverzitás indexek alapján nagyon informatívnak és nagyon diverznek számítanak, azaz kifejezetten alkalmasak populációgenetikai vizsgálatokhoz. Ez nem is meglepő, mivel ezek a markerek igazságügyi egyedazonosítási célból lettek fejlesztve, így akár rokonsági viszonyok feltárását is segíthetik, alkalmazásuk igazságügyi egyedazonosításra, illetve az állattenyésztési, vadgazdálkodási gyakorlatban apasági/anyasági vizsgálatokhoz javasolt. A genetikai diverzitás, valamint a genetikai struktúra vizsgálatára erőteljesebb mintavétel lenne ajánlatos a Kárpát-medencéből, amely minták egyedi genotipizálása és a eredmények értékelése szükséges. A felmért populációk diverzitás indexei hasonló eredményeket mutattak az autoszómás és az ivari kromoszómás markerekkel. A legalacsonyabb diverzitást a tenyészetbe vont bőszenfai állatokkal kaptuk, de ennek oka lehet az alacsony mintaszám. A szabadtéri populációk diverzitása közel azonos értékeket adott, a zempléni populációban mutatva a legnagyobb értékeket.

A teljes mitokondriális kontroll régió szekvenciájának meghatározás először történt meg kárpát-medencei gímszarvasokban. A teljes szekvencia illesztés 916 bp hosszúságú, a magyarországi szekvenciákban 68 variábilis pozíciót tartalmaz, ezek közül 62 parszimónia informatív karakter, így összesen 39 különböző mitokondriális haplotípust eredményeznek. A magyarországi minták haplotípus és nukleotid diverzitása is magas, közelít az egész európai állományt jellemző diverzitáshoz. A mitokondriális vizsgálatok is megerősítik, az autoszómás és ivari kromoszómás STR vizsgálatokhoz hasonlóan, hogy a magyarországi gímszarvasok genetikai diverzitása az európai populációkhoz képest kiemelkedően magas.

A mitokondriális kontroll régió haplotípusok filogenetikai fáján két elkülönült klád figyelhető meg. Az európai szekvenciákkal összevetve a magyar mintákat mind a nyugat-európai A, mind a kelet-európai C

haplocsoportba tartozó szekvenciák megtalálhatók a Kárpát-medencében, míg a mediterrán B haplocsoportba tartozó haplotípus nem került detektálásra. A gemenci populációban a C haplocsoport, a zempléni populációban az A haplocsoport volt a domináns, bár mindkét régióban előfordult mindkét haplocsoportba tartozó szekvencia. Ezek alapján a Kárpát-medencébe két irányból települtek be gímszarvasok a jégkorszak után; az eljegesedéseket a Balkánon átvészelő állatok észak felé terjedve, másrészt az Ibériából származó egyedek Közép-Európán keresztül. A talált mintázatot okozhatnák emberi betelepítések is, amennyiben az egyik leszármazási vonalhoz tartozó haplotípusokat hordozó teheneket az emberek hozták be a Kárpát-medencébe. A faj fontossága miatt évszázados múltja van gímszarvas egyedek áttelepítésének, de az áttelepítések a nagyléptékű filogenetikai mintázatra nem voltak hatással, legalábbis a mitokondriális vonalak esetében, ezért a természetes vándorlással történő terjedés tűnik elfogadhatóbbnak a talált mintázat magyarázatára.

A gímszarvas populációk strukturáltsága és a közöttük lévő kapcsolat mind autoszómás mind Y kromoszómás STR markerekkel, valamint mtDNS segítségével is kimutatható volt. A magyarországi populációk esetében csekély genetikai strukturáltságot találtam, ami az AMOVA, PCA és Structure elemzésekben is megmutatkozott, és a populációk elkülönítését is nehezítette. Következésképpen ezek az állományok genetikailag kapcsolódnak egymáshoz, az *a priori* definiált populációk között bizonyos fokú génáramlás létezik. Figyelemre méltó, hogy a genetikai differenciáció nem minden marker típus esetében mutat összefüggést a populációk közötti földrajzi távolsággal, bár itt megjegyzendő, hogy bizonyos területekről származó alacsony mintaszámok torzíthatják az eredményeket, illetve a populációk földrajzi eredetének különbözősége nem feltétlenül esik egybe a populációk tényleges elkülönülésével.

A genetikai struktúra megléte fontos vadgazdálkodási kérdés, mivel a genetikai diverzitás közvetlen összefüggést mutat az állomány egészségügyi állapotával; a beltenyésztettség növekedése közvetlen egészségügyi problémák megjelenésével jár, ezáltal az állomány életképességét illetve egyéb minőségi jellemzőinek romlását okozza. A diverzitás csökkenésének közvetlen hatása van az állományok hasznosítására, hasznosíthatóságára. A populációk közötti génáramlás, amit az állományok között vándorló állatok okoznak, segít a genetikai diverzitás fenntartásában. Közismert, hogy az emberi tevékenységek, illetve az ember környezet-átalakító hatása erőteljes hatással van a populációk közötti kapcsolatok alakulására sok állatfaj esetében, ezáltal a közöttük lévő génáramlást is akadályozhatja. A populációk közötti genetikai kapcsolatok feltérképezése ilyen módon segít fenntartani a genetikai diverzitást, és elkerülni a beltenyésztettség kialakulását. Azaz az eredmények közvetlenül hasznosíthatóak lennének a vadgazdálkodásban; így ajánlatos lenne a vadgazdálkodási szempontból fontos populációk és környezetük genetikai felmérése és nyomon követése, az egyes populációk közötti átjárhatóság biztosítása az állatok részére.

5. ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK

1. A munkám egy gímszarvas genom projekten alapul, illetve ahhoz szorosan kapcsolódik, amelynek eredményeként meghatároztuk az első gímszarvas referencia genomot (CerEla1.0), amely az NCBI Assembly adatbázisában az MKHE00000000.1 hozzáférési számon elérhető. A genomszekvenálásból származó szekvencia adatokat felhasználására egy bioinformatikai protokollt használtam mikroszatellita markerek fejlesztéséhez gímszarvas esetében, és ilyen módon több százezer ismétlődő motívumból, valamint több tízezer mikroszatellitára tervezett primerből álló adatbázist hoztam létre.
2. A tervezett primer párok közül ivari kromoszómára térképeződő markereket válogattam, a választott markereket teszteltem és PCR protokollt optimalizáltam gímszarvas egyedek genotipizálásához. Ilyen módon leírtam 15 primer párt, amelyek közül 13 mutatott gímszarvas mintákon polimorfizmust, azaz legalább két eltérő nagyságú allélt. Így kialakítottam két 8 primer párt tartalmazó multiplex rendszert, a primerek szekvenciájának, fluoreszcens jelölésének, kromoszóma lokalizációjának és a PCR termékek mérettartományának leírásával.
3. A fejlesztett markerek segítségével elvégeztem Kárpát-medence gímszarvas populációiból származó egyedek genotipizálását, ezáltal elsőként mértem fel magyarországi gímszarvasok Y kromoszómás genetikai diverzitását, valamint elsőként térképeztem fel ezen populációk apai leszármazási vonalait. Így kimutattam a populációk apai vonalainak strukturáltságát, de a populációk közötti genetikai kapcsolatot is, amit feltehetően a génáramlás tart fenn.

4. Az Y kromoszómás markerekkel kapott diverzitásmutatókat összevettem autoszómás mikroszatellita diverzitás értékekkel. Így kimutattam, hogy a Kárpát-medencében élő gímszarvas populációk európai szinten kiemelkedően diverznek számítanak. Továbbá ezek az eredmények is megerősítették a populációk közötti gyenge genetikai strukturáltságot, és a közöttük lévő génáramlást.

5. A Kárpát-medencéből származó gímszarvasokból elsőként határoztam meg a teljes mitokondriális kontroll régió szekvenciáját. Ezen szekvenciák segítségével feltérképeztem a populációk filogenetikai leszármazását, így megerősítettem azt a feltételezést, hogy a Kárpát-medencét a jégkorszak után két irányból népesítették be a gímszarvasok; feltételezhető, hogy ez a betelepülés természetes módon ment végbe, és emberi áttelepítése csak kis mértékben érintette a filogenetikai mintázatot. Az Y kromoszómás vonalak filogenetikai mintázata szintén valószínűsíti a két irányból történő betelepülést, bár ebben az esetben nem állnak rendelkezésre európai adatok a filogenetikai kapcsolatok összevetéséhez.

6. JAVASLATOK

A gímszarvas mikroszatellita markerek fejlesztéséhez használt bioinformatikai protokoll jelentősen egyszerűsítette új STR markerek fejlesztését, és nagy mennyiségű potenciális markerjelöltet eredményezett. A kapott STR illetve primer adatbázis a markerek rokon fajok közötti kereszt-amplifikáció miatt sok szarvas faj esetében lehet új markerek fejlesztésének az alapja. Ezáltal nagy gyakorlati jelentősége lehet a jövőben populációk eredetének, kapcsolatának és a közöttük lévő génáramlás tanulmányozásában. Megjegyzendő még, hogy a bemutatott bioinformatikai protokoll más fajokban is hasonlóan egyszerűen használható jó minőségű mikroszatellita markerek fejlesztésére genomszekvenálási adatokból. A leírt bioinformatikai markerfejlesztési protokoll alkalmas akár kromoszóma specifikus markerek fejlesztésére is, ahogy az ivari kromoszómák esetén demonstráltam is; így akár QTL térképezéshez, genetikai térkép alapú klónozáshoz, fizikai és genetikai kromoszóma térképek integrációjához vagy marker alapú szelekcióhoz használható jó minőségű markerek válogatására is alkalmas a módszer.

Az Y kromoszómás STR-ek közepesen informatív markernek számítanak, viszont az ivari kromoszómás lókuszon az egyes allélek nem véletlenszerű kombinációban határoznak meg egy DNS-profilt, hanem kapcsoltan öröklődnek, így ezek a közepesen informatív markerek is alkalmasak populációgenetikai felhasználásra. A fejlesztett ivari kromoszómás markerek polimorfizmusa lehetőséget teremt leszármazási vonalak felmérésére, valamint populációk genetikai struktúrájának és genetikai kapcsolatainak vizsgálatára is.

A vizsgált populációkban talált X illetve Y kromoszóma haplotípusok alapján az egyes élőhelyek állományai különböznek egymástól, de keveredés is megfigyelhető közöttük. Ezt a keveredést a bikák vándorlása is okozhatta, bár

az emberi áttelepítések hatása sem zárható ki. Viszont az áttelepítések Y kromoszómás vonalakra gyakorolt hatásáról ezidáig nem áll rendelkezésre vizsgálat, ezek feltérképezése vadgazdálkodási illetve igazságügyi szempontból is fontos lehet, ezek segítségével a jövőben az illegális áttelepítések könnyebben kimutathatóak lehetnek. Ennek érdekében a magyarországi, valamint az európai gímszarvas állományok kiterjedtebb genotipizálása lenne szükséges az Y kromoszómás markerekkel.

A gímszarvas populációk strukturáltsága és a közöttük lévő kapcsolat mind autoszómás mind Y kromoszómás STR markerekkel, valamint mtDNS segítségével is kimutatható volt. A magyarországi populációk esetében csekély genetikai strukturáltságot találtam, ami a populációk elkülönítését is nehezítette. Következésképpen ezek az állományok genetikailag kapcsolódnak egymáshoz. Ezen okok miatt további genetikai vizsgálatok lennének szükségesek a dél-dunántúli gímszarvas populációk genetikai struktúrájának vizsgálatára; a genetikai diverzitás fenntartását pedig fontos lenne természetvédelmi illetve vadgazdálkodási célul kitűzni.

A populációk közötti genetikai kapcsolatok feltérképezése segít fenntartani a genetikai diverzitást, és elkerülni a beltenyésztettség kialakulását. Azaz az eredmények közvetlenül hasznosíthatóak lennének a vadgazdálkodásban; így ajánlatos lenne a vadgazdálkodási szempontból fontos populációk és környezetük genetikai felmérése és nyomon követése, az egyes populációk közötti átjárhatóság biztosítása az állatok részére.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Lektorált folyóiratban megjelent idegen nyelvű publikációk

Frank K., Barta E., Bana Á.N., Nagy J., Horn P., Orosz L., Stéger V. (2016) Complete mitochondrial genome sequence of a Hungarian red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) from high-throughput sequencing data and its phylogenetic position within the family Cervidae. *Acta Biologica Hungarica* 67(2): 133-147. doi: 10.1556/018.67.2016.2.2

Frank K., Bleier N., Tóth B., Sugár L., Horn P., Barta E., Orosz L., Stéger V. (2017) The presence of Balkan and Iberian red deer (*Cervus elaphus*) mitochondrial DNA lineages in the Carpathian Basin. *Mammalian Biology* 86: 48-55. doi: 10.1016/j.mambio.2017.04.005

Bana Á.N., Nyíri A., Nagy J., Frank K., Nagy T., Stéger V., Schiller M., Lakatos P., Sugár L., Horn P., Barta E., Orosz L. (2018) The red deer *Cervus elaphus* genome CerEla1.0: sequencing, annotation, genes, chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics Online First*. doi: 10.1007/s00438-017-1412-3

Konferencia kiadványban megjelent teljes terjedelmű cikk

Frank K., Stéger V., Bana Á.N., Nagy T., Nagy J., Wilhelm J., Kálmán Zs., Barta E., Horn P., Orosz L. (2015) Gímszarvas mikroszatellita marker fejlesztés újgenerációs szekvenálási adatok segítségével. XXI. Ifjúsági Tudományos Fórum, Pannon Egyetem, Keszthely, 2015. május 21. ISBN 978-963-9639-78-2

Előadások

Frank K., Barta E., Bana Á. N., Nagy J., Horn P., Orosz L., Stéger V. (2016) A magyarországi gímszarvas (*Cervus elaphus hippelaphus*) teljes mitokondriális genomja. Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája „FIBOK 2016”, 2016. március 22.

Frank K., Bleier N., Sugár L., Stéger V., Horn P., Orosz L. (2017): Gímszarvas (*Cervus elaphus*) populációgenetikai vizsgálata mitokondriális szekvenciák segítségével. A Magyar Biológiai Társaság XXX. Vándorgyűlése, 2017. február 17.