



# NAGYRAGADOZÓK MAGYARORSZÁGON II.

Molekuláris biológiai módszerek a vadbiológiában



Előszó	3
Bevezető	5
Leggyakoribb vizsgálati módszerek	7
Morfológiai előválogatás	7
DNS szekvenciák	9
Molekuláris markerek	10
Mikroszatellitek	10
SNP-k	11
Betekintés a vadfajok populációgenetikájába	12
Fajok azonosítása és eloszlásuk meghatározása	12
Hibridizáció	12
Egyed és ivarazonosítás	12
A hazai nagytestű ragadozó fajok terepi mintavételezésből származó leggyakoribb mintatípusok, azok gyűjtése, tárolása és feldolgozása	14
Ürülék	15
Vizelet	16
Szőr	17
Nyál	17
Szövet	17
Vér	18
Csont	18
Gerezna	19
Laboratóriumi vizsgálatok	19
Esettanulmányok	21
Teljes genetikai profil felvétele elhullott állat teteméről vett nyálmintából	21
Minimális mozgáskörzet becslése genetikai vizsgálati eredmények felhasználásával	21
Fokozottan védett ragadozó tetem genetikai vizsgálata során detektált visszafogás, rokonsági kapcsolatok	22
Kóborló egyedek genetikai profiljának rögzítése az esetleges újabb előfordulás megállapítása céljából	23

**Szerzők:** Fehér Péter, Dr. Frank Krisztián, Dr. Szemethy László, Dr. Stéger Viktor

**Szakmai lektor:** Dr. Patkó László

**Szerkesztés, nyelvi lektor:** Kokics Viktória

**Kiadás:** WWF Magyarország Alapítvány, Budapest, 2020

**Képek:** Tomas Hulik (borító), Patkó László (7., 8. oldal), Fehér Péter (6., 13., 15-20., 22. oldal)

**Grafika:** Stég Design

**ISBN:** 978-963-8470-30-0

Javasolt hivatkozás: Fehér P., Frank K., Szemethy L., Stéger V. (2020): Nagyragadozók Magyarországon II., Molekuláris biológiai módszerek a vadbiológiában. WWF Magyarország Alapítvány, Budapest, 25 pp

Hiúzok, farkasok, medvék. Európa nagyragadozói, melyek a 21. század folyamatosan romló természeti környezetében is képesek voltak megtalálni a helyüket. Ez pedig közös erőfeszítéssel, több érdekcsoport egységes munkájával valósulhatott meg. A nagyragadozók nemcsak a természet rendszerének kulcsfontosságú szereplői, hanem az emberi történelemnek és kultúrának is részei: mondák és mesék főszereplői, félelemmel és tisztelettel övezve – az érintetlen vadon szimbólumai.

A nagyragadozók körülbelül egy évszázada fogytak meg Európa szerte, elsősorban az élőhelyvesztés és az üldöztetés miatt. Napjainkban azonban számos európai államban újra megjelentek, melyben a szigorodó vadászati szabályok és a természetvédelmi erőfeszítések egyaránt szerepet játszottak. Amit a természetbarátok sikerként ünnepelek, az a nagyragadozók által lakott területeken élőknél sokszor kihívást jelent.

Ennek a kiadványnak a célja, hogy segítsen eligazodni a molekuláris biológiai és laboratóriumi eljárások útvesztőiben. Ezek a modern eszközök és eljárások ma már hazánkban is elérhetőek. Annak ellenére, hogy az egyes érintettek tisztában vannak a laboratóriumi eljárások használatával, maga a labor sok esetben még mindig „fekete doboz” a nagyragadozókkal foglalkozó szakemberek körében. A kiadvány segítséget nyújt a laboratóriumi eljárások eredményeinek értelmezésében és abban, hogy meghatározhatjuk mely kérdésekre kaphatunk eredményesen választ a modern eljárások segítségével. A kiadvány összeállítói az alkalmazott genetikai módszerekben hazánkban és nemzetközi szinten is tapasztalatot szerzett szakemberek.

Szeretjük őket vagy sem, a nagyragadozónak szerepe van a természetben, csúcsragadozó a táplálékláncban és a jól működő, „önfelújító” erdők teljes értékű tagja. A WWF Magyarország hisz abban, hogy az emberek és a nagyragadozók képesek egymás mellett élni, és azon dolgozik, hogy helyi lakosok és gazdálkodók számára hazánk élőhelyein a ragadozók elfogadott fajokká váljanak.

*Sipos Katalin* | igazgató, WWF Magyarország

**Allél:** A gén alternatív állapota. Vad típusúnak az eredeti, a természetben leggyakoribb génformát nevezzük. Az új allélok mutációval keletkeznek. A diploid szervezetek sejtjei a gén két allélját tartalmazzák.

**Amplifikáció:** Egy adott gén- vagy DNS-szakasz megsokszorozódása természetes vagy mesterséges másolással.

**RNS** (ribonukleinsav): A DNS-hez hasonló óriásmolekula, sok ismétlődő egységből épül fel. Egységei a ribonukleotidok.

**DNS** (deoxiribonukleinsav): A nukleinsavak csoportjába tartozó összetett molekula, a genetikai információt tárolja magában, ez az örökítőanyag. A nukleotidok számunka legfontosabb komponensei a bázisok (adenin, guanin, citozin, timin). Ezek sorrendje határozza meg az egyes allélokat (az egyed tulajdonságait).

**DNS fragment:** A vadbiológiában jellemzően PCR (ld. későbbi fejezetek) alapú eljárásokkal nyert DNS darabok.

**DNS-szekvenálás:** A DNS bázissorrendjének (adenin, guanin, citozin, timin) meghatározása.

**Elektroforézis:** DNS fragmentek vagy fehérjék gélben (agaróz vagy poliakrilamid) történő méret szerinti szétválasztása.

**Fenotípus:** Egy szervezet megfigyelhető tulajdonságai, amelyeket a genotípus a környezettel együtt alakít ki. Az azonos fenotípus mögött eltérő genotípus lehet (homozigóta domináns és heterozigóta), illetve azonos genotípusú egyedek eltérő környezetben különböző fenotípust mutathatnak. Fenotípusos tulajdonság például a szőrzet színe, tömörsége, vastagsága.

**Gén:** Olyan nukleinsav szakaszok a DNS-ben vagy RNS-ben, amelyek a szervezet működését és növekedését befolyásoló fehérjék szabályozásához és előállításához szükséges információkat tartalmazzák.

**Genom:** A genom az egyed (faj) teljes genetikai állománya (DNS vagy RNS). A genom mérete (hossza) és a gének száma az evolúció során nő.

**Genomika:** A genomika a genomot és a gének kölcsönhatásait vizsgálja. A genomika a teljes genom DNS-szekvenciáját határozza meg és ebből következtet az egyes gének szekvenciájára (funkcionális genomika). Az összehasonlító genomika a fajok teljes genom szekvenciáját vizsgálja.

**Genotípus:** Egy sejt vagy szervezet genetikai információjának összessége.

**Lókuszt:** Más néven génhely, a gén vagy egyéb fontos szekvencia elfoglalt helyét jelenti a DNS-en (vagy az RNS-en).

**Marker:** A molekuláris genetikában egy DNS-szakasz, melynek helyét és a hozzárendelhető biológiai funkciót ismerjük, ki tudjuk mutatni.

**Polimorfizmus:** Különböző fenotípust mutató változatok előfordulása, illetve egy génnek két vagy több változata ugyanabban a populációban.

Jelen kiadvány célja, hogy bemutassa azokat a molekuláris genetikai módszereket, amelyek segítségével napjaikban is zajlik a hazai nagyragadozók állományának genetikai monitoringja, és ismertesse a genetikai vizsgálatokhoz használható terepi minták gyűjtésének módját, ezen minták feldolgozását, illetve különböző esettanulmányokon keresztül az eredmények hasznosulásának lehetőségeit. A kiadványban megfogalmazott genetikai vizsgálatra szánt minták gyűjtésének, tárolásának, szállításának és feldolgozásának módszertana a Nemzeti Agrárkutató és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (továbbiakban NAIK MBK) és a Bükki Nemzeti Park Igazgatóság (továbbiakban BNPI) együttműködésében (BNPI: 8-34/1/2017; NAIK/2404-1/2017) valósul meg. A jelenlegi kiadást a LIFE EuroLargeCarnivores (LIFE16 GIE/DE/000661) projekt támogatta.

Bízunk benne, hogy az útmutató segíteni fogja a terepi szakemberek és mintagyűjtők munkáját abban, hogy a genetikai vizsgálatra szánt minták gyűjtése, tárolása és átadása szakszerűen történjen, azért, hogy aztán a genetikai vizsgálatok sikeresen elvégezhetőek legyenek. A mintavételi protokoll ismertetése pedig segít a mintavételi csomagban található eszközök pontos és precíz használatában, illetve ismerteti, hogy a csomagban található védőeszközök használatával hogyan kerülhetők el a zoonózisok.

A genetikai variáció leírása, mérése és értelmezése a modern vadvilág populációbiológiájának központi eleme. A genetikai technikák és a vadon élő állatokra vonatkozó alkalmazások robbanásának egyik fő oka a polimeráz láncreakció (PCR) kifejlesztése volt, amely lehetővé tette a genetikai információk megszerzését a közvetett (ún. nem-invazív) módon gyűjtött, ismeretlen korú vagy kis mennyiségű mintákból is.

Egy másik technológiai áttörés a nagy kapacitású szekvenálás kifejlesztése, amely lehetővé teszi a genom (a szervezet teljes örökítő információkészlete) nagy részeinek értékelését és a világban bekövetkező genetikai változások meghatározását (genomika).

A DNS-markereknek a vadvilág populációbiológiájára vonatkozó néhány alkalmazása magában foglalja a hibridizáció vagy a rendszertani kapcsolat meghatározását, a rejtőzködő fajok és az egyedek azonosítását, a gyakoriság becslését, a genetikai variáció és szülői tulajdonságok számszerűsítését. Mivel a nem-invazív mintákból eredő rossz minőségű DNS elemzésében továbbra is fennáll

#### POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR):

A polimeráz láncreakció eljárás kidolgozása Kary Mullis nevéhez fűződik (1985), amiért 1993-ban kémiai Nobel-díjat is kapott. Ez egy olyan módszer, amelyet széles körben használnak a molekuláris biológiában, hogy egy kis mennyiségű DNS mintát megsokszorozzanak olyan mértékben, hogy az vizsgálható legyen.

#### A REAKCIÓ LÉPÉSEI:

**Dentaurálás:** a kettős szálú DNS magas hőmérsékleten (>90 °C) történő szétválasztása.

**Anelláció:** az ún. primerek (rövid mesterséges szakaszok, melyek a korábban szétválasztott szálak végeivel komplexenterek) a külön vált DNS szálak végeihez kapcsolódnak (kb. 60 °C).

**Polimerizáció:** a DNS szintetizálása, a polimeráz enzim segítségével történik (72 °C) és a templátnak megfelelően épülnek be a dezoxiribonukleotidok, így az eredetivel azonos DNS szakaszt hoz létre. A megfelelő mennyiség eléréséhez ez a ciklus 20-30-szor megismétlődik.

A reakció egy PCR készülékben megy végbe, aminek legfontosabb tulajdonsága, hogy gyors hőmérsékletváltozásra legyen képes. Esetünkben a módszer lényege tulajdonképpen az, hogy a jellemzően kevés DNS-t tartalmazó mintákból (pl. ürülék, szőr) vizsgálható mennyiségű DNS-t szintetizáljunk.

néhány kihívás, a legelőnyösebb megközelítés az, ha az állatok kezelése során a nem roncsoló mintavételből (pl. vér- vagy szövet) jobb minőségű mintákat gyűjtünk, ahelyett, hogy csak a nem-invazív mintavételre támaszkodnánk. Ez azonban a vadonélő állatok vizsgálata során csak azok közvetlen módon történő vizsgálatával lehetséges (invazív mintavételezés). Ezek az archivált minták olyan alapokat biztosíthatnak, mint például a gyakoriság vagy a genetikai kapcsolatok jövőbeni változásainak vizsgálata, valamint az igazságügyi szakértők számára létfontosságú adatbázisok kiépítése. Ezen technikák és alkalmazások közül sok gyermekcipőben jár még, de rohamosan fejlődik. Fontos megjegyezni, hogy a genetikai vizsgálati eredmények statisztikai valószínűséget mutatnak, a mintaszám és a markerek száma és jellemzői befolyásolhatják a statisztikai valószínűség mértékét. Viszont nem minden esetben igaz az, hogy több genetikai marker használatával statisztikailag pontosabb eredményt kapunk. Ezért továbbra is a genetikai eszközök legerősebb alkalmazásai a küllemi, demográfiai, ökológiai és terepi adatokkal együtt használhatók a legbiztosabban.



PCR készülékek. Funkciójukat tekintve valójában a hőmérsékletet gyorsan változtatni tudó termosztátok, amelyek a megadott protokoll alapján végzik a DNS szintetizálását.

# LEGGYAKORIBB VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

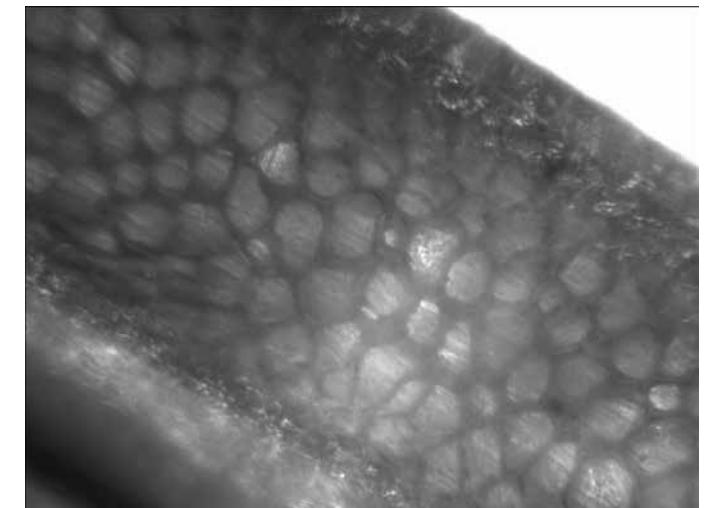
## A RAGADOZÓ FAJOK ESETÉBEN GYAKRAN HASZNÁLT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK BEMUTATÁSA

Ebben a fejezetben a vadbiológiában leggyakrabban használt molekuláris genetikai és morfológiai módszereket mutatjuk be, illetve azt, hogy ezek a módszerek milyen kérdésekre adhatnak választ az egyed vagy a populációk vizsgálata során.

### MORFOLÓGIAI ELŐVÁLOGATÁS

A küllemi előválogatás célja, hogy faj, nemzetség vagy család (pl. kutyaféle, macskaféle) szintjére leszűkítsük a minta eredetét, ezzel megkönnyítve a későbbi genetikai határozásokat. Vannak minták (pl. ürülék, szőr) ahol a küllemi előválogatást könnyebb elvégezni, mint más minták esetén (pl. vizelet, vér). Ürülék esetén a terepi fellelés körülményei (pl. hol helyezte el a fajt), valamint a szín, szag, méret, forma és tartalom (pl. szőr, csontok) segíti a határozást. Szőrminta esetén a szín, forma, méret és tapintás segíti a szabadszemmel történő előválogatást, míg a kutikula (szőr felszíne) és medulla (a szőr belső, üreges része) minta a mikroszkopikus határozást. A mikroszkóppal történő szőrhatározás lépései a következők:

1. A gyűjtött minta szükség szerinti mélyfagyasztása és csíráatlanítása. Amennyiben a mintát később genetikai vizsgálatnak is alávetjük az UV-s csíráatlanítást kerülnünk kell, mert, ez roncsolhatja az örökítőanyagot (DNS-t), mely a szőrtüszőben található.



Gímszarvas medulla fénymikroszkóp alatt (400x nagyítás).

2. A terepen gyűjtött minta szőrökre bontása, majd jól záródó tasakba helyezése és címkézése. A bontás lehetőség szerint egyszínű (pl. fehér) lapon történjen.

3. A tisztításhoz a szőrszalakat 70%-os alkoholba helyezzük néhány órára, majd pár percig etil-éterbe rakjuk a szennyeződések eltávolítása érdekében,

4. Az így előkészített szőröket milliméterpapírra helyezzük és megvizsgáljuk azok szabad szemmel látható tulajdonságait (méret, sávozottság, szín, alak, tapintás).

5. Kutikula lenyomat készítéséhez zselatin fixet (20%-os) használhatunk. A zselatint vékony rétegbe elhúzzuk a tárgylemezen, majd behelyezzük a szőrt, ügyelve arra, hogy a zselatin oldat ne lepje el a mintát.

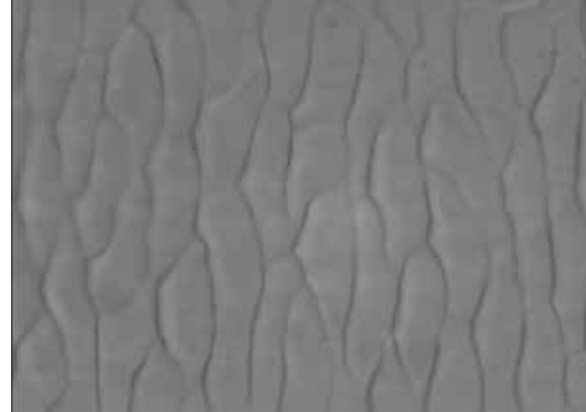
6. Ha a zselatin megszilárdult a szőrt tű/szike segítségével vesszük le a tárgylemezről (minimális sérülés itt elkerülhetetlen).

7. Ezután a tárgylemezt mikroszkóp alá helyezzük (400x-os vagy 100x-os nagyítással vizsgáljuk).

8. A szőr ezután ismét tárgylemezre kerül, ahol körömlakkal rögzítjük két végénél. A rögzítést követően a szőrt elvágjuk és paraffin olajat/immerziós olajat/kanadabalzsamot csöpögtetünk rá. Az olajos átitatás után a medulla mintázat láthatóvá válik mikroszkóp alatt.

9. A mikroszkópkamerával minden esetben fényképes dokumentációt készítünk a következő fontos határozóbélyegekről:

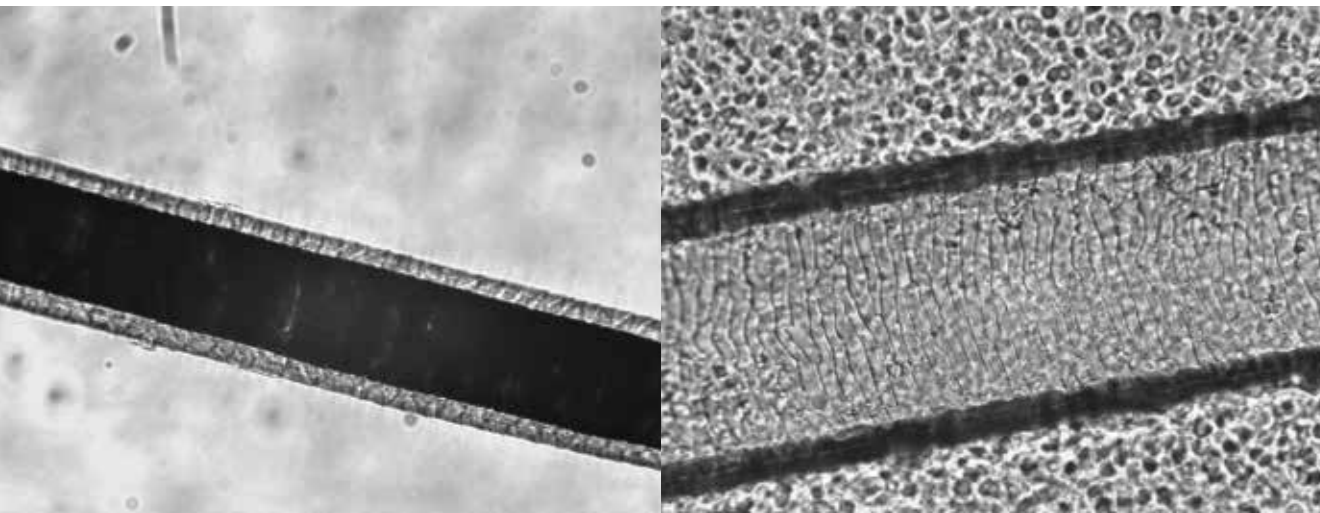
- kutikula mintázat az alnyélen
- kutikula mintázat a felnyél legvastagabb pontján
- medulla mintázat olajos átitatással a felnyél legvastagabb pontján.



Gímszarvas kutikula fénymikroszkóp alatt (400x nagyítás).

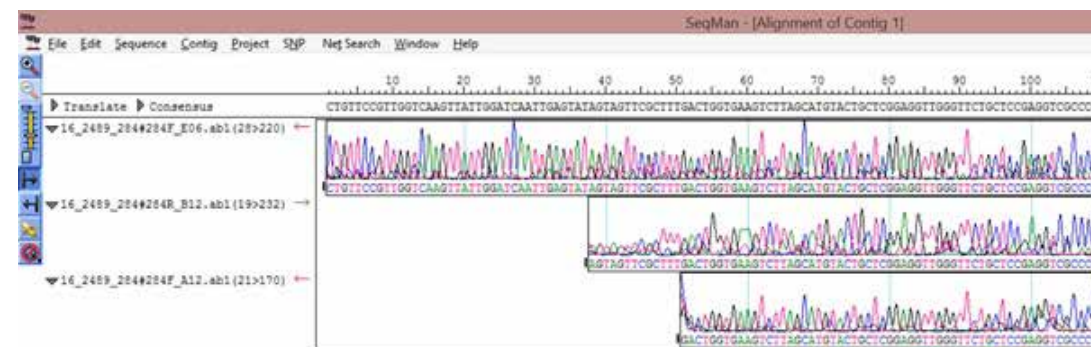
Híúz medulla fénymikroszkóp alatt (400x nagyítás).

Híúz kutikula fénymikroszkóp alatt (400x nagyítás).



## DNS SEKVENCIÁK

A megsokszorozott (amplifikált) szakaszok szekvenálhatók - meghatározva a nukleotidok (a DNS-t vagy RNS-t felépítő szerkezeti egységei) sorrendjét - és összehasonlíthatók egy nemzetközi DNS-adatbázissal (ún. génbank). Ennek számos előnye van a nem-invazív mintákból származó fajok azonosításában. A közvetlen DNS-szekvenálás (nukleáris vagy mitokondriális) ma a legszélesebb körben alkalmazott technikák közé tartozik, mert rendkívül informatív, és a közelmúltban sokkal könnyebbé és olcsóbbá vált.



16S rRNS szekvencia elektroferogram képe a DNA Star programcsomag SeqMan programjában illetve. A nukleotidok különböző színnel vannak jelölve (adenin-zöld, timin-piros, guanin-fekete, citozin-kék). A nukleotidok (adenin, guanin, timin, citozin, uracil) párokba rendeződve építik fel a DNS-t. A Földön élő összes élőlény és azok tulajdonságai ezeknek a bázispároknak a sorrendjével jellemezhető.

### SEKVENÁLÁS:

Olyan folyamat, amelynek során meghatározzák a molekulák elsődleges szerkezetét. DNS molekulák esetében a nukleotidok sorrendjének meghatározását jelenti. Napjainkra a molekuláris biológia egyik legmeghatározóbb eszközévé vált, ennek köszönhetően számos élőlény teljes genomját sikeresen meghatározták.

A genom méretéből adódóan, a szekvenálásból gyűjtött információ mennyisége meglehetősen nagy lehet. A DNS-szekvenálás egy célregió megsokszorozását, majd az egyes nukleotidoknak megfelelő, jelölt (radioaktív vagy fluoreszcens) DNS-fragmensek létrehozását jelenti. A DNS-fragmenseket ezután elektroforézissel elválasztjuk és szabad szemmel láthatóvá tesszük.

NUKLEÁRIS GENOM	MITOKONDRIÁLIS GENOM
A sejtmagban található	A mitokondriumban található
Lineáris, komplex felépítéssel	Kör alakú molekula
Körülbelül 3 milliárd bázispár	16-17.000 bázispár
Két kópia a testi sejtben	Több tucat kópia, több mitokondrium sejtenként
20-25.000 gént tartalmaz	37 gént tartalmaz
Nagy része a nem kódoló régió	Kis része a nem kódoló régió
Mindkét szülőtől egyenlően örökölt	Anyai öröklés

Különbségek a nukleáris és a mitokondriális genom között.

## MOLEKULÁRIS MARKEREK

Molekuláris markerként használhatók a DNS olyan meghatározott szakaszai, melyek specifikus szekvenciákat tartalmaznak, és követik a mendeli öröklésmentet. Lehetnek gének, vagy olyan DNS szakaszok egyaránt, amelyeknek nincs fenotípust kialakító szerepe. Az ideális DNS markerek nagyfokú polimorfizmussal rendelkeznek, lehetőleg kodominánsan öröklődnek, gyakori az előfordulásuk, és reprodukálható eredményt adnak. A molekuláris markerek főbb alkalmazási területe a genotípus-azonosítás, genotipizálás, genetikai diverzitás elemzése, génváltozatok és allélvariációk azonosítása, természetes populációk jellemzése.

## MIKROSZATELLITEK (STR, SHORT TANDEM REPEAT)

A mikroszatellit markerek rövid (1-10 bázispár, általában 2-5 bázispár hosszú) DNS szekvencia szakaszok tandem ismétlődéséből (gyakran angol néven: STR, Short Tandem Repeat) épülnek fel. Kedvező tulajdonságaik miatt populációbiológiában történő alkalmazásuk elég széles körben elterjedt. Az ismétlődések számának változása miatt polimorfak, és jellemző rájuk, hogy változatosak, konzervatívak, nincs fenotípust kialakító szerepük és kodominánsan öröklődnek. Megkülönböztetünk mono- (egy bázispáros), di- (két bázispáros), tri- (három bázispáros), tetra- (négy bázispáros), penta- (öt bázispáros) és hexa- (hat bázispáros) nukleotidokat. A tetranukleotid ismétlődések számának a legkedveltebbnek a méretkülönbségek detektálásának viszonylagos egyszerűsége miatt. A mikroszatellit lókuszokat PCR segítségével sokszorosítjuk, az allélok mérete az ismétlések méretétől és számától függően kerülnek meghatározásra. Az allélok méretének (allélhosszúság) meghatározása

Marker neve	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185
marker 1											
marker 2											
marker 3											
marker 4											

A markerek multiplex környezetben történő használatának tervezése. Az első sorban lévő számok az allélhosszúságot jelölik, a közel azonos mérettartományba tartozó markerek különböző színnel vannak jelölve, amik a kapilláris elektroforézis és az annak eredményéből végzett bioinformatikai kiértékelés során is detektálhatók.

kapilláris elektroforézis módszerrel történik. Az adatok feldolgozásához több bioinformatikai program is használható (például PeakScanner szoftver). A PCR vizsgálatok során a mikroszatelliteket használhatjuk külön-külön is reakciónként, de a vizsgálatok multiplex környezetben (egy reakcióban több marker vizsgálata) is elvégezhető. Ez azt jelenti, hogy egy reakcióban párhuzamosan több markert is vizsgálunk, ezzel a vizsgálatok költséghatékonyságát lehet elősegíteni. Ebben az esetben azonban fontos a markerek allélhosszúság tartományának ismerete, azaz hogy milyen méretű allélok megjelenését várjuk. A közel azonos hossztartományba eső markereket ugyanis csak korlátozottan lehet egy reakcióban használni, az allélméretetek detektálásának technikai tulajdonságai miatt.

A mikroszatellitek jól illeszkednek a hagyományos populációgenetikai modellekhez, mivel minden lókusz kodomináns (megkülönböztethető) és az allélok mendeli öröklésmentet mutatnak. A mikroszatellitek nagyon magas változatosságot (variabilitást) hordoznak, és PCR-alapú vizsgálatuk lehetővé teszi a roncsolás mentes és nem-invazív mintavételezés használatát.

## SNP-K

Az SNP (single-nucleotide polymorphism – egy pontos nukleotid-polimorfizmus) olyan DNS variáció, amely egyetlen bázispár különbség formájában jelentkezik két DNS szekvencia között. Különösen alkalmasak a nem-invazív mintavételre jellemző rossz minőségű minták vizsgálatára. Az SNP olyan, a DNS szekvenciában megjelenő variáció, mely akkor jön létre, ha a genomban egy nukleotid megváltozik. Egy variáció akkor tekinthető SNP-nek, ha a populáció több, mint 1%-a a DNS szekvencia egy adott pozíciójában eltérő nukleotidot hordoz. Tehát a legfőbb különbség az egyénekben azonosítható pontmutáció és a populáció több mint 1%-ban megjelenő SNP között annak gyakoriságában van. Ahogy a neve is jelzi, az SNP-k olyan régiók, ahol különböző fajok esetén vagy a fajon belüli egyedek egyetlen nukleotidban különböznek egymástól. A rossz minőségű mintákban az SNP-t tartalmazó DNS szakaszok könnyebben sokszorosíthatók, mint a mikroszatellitek, mivel a régió rövidebb (50–70 bázispár), mint a mikroszatellitek (80–300 bázispár). Továbbá az SNP-k gyakoribbak a genomban, a modern technológiák segítségével egyszerre több száz vagy akár több ezer SNP-hely vizsgálható egyszerre. Az SNP adatbázisok sok faj számára gyorsan elérhetővé válnak, a vizsgálati költségek azonban magasabbak a mikroszatellitekkel szemben, és az adatok értékelése is nehezekebb.

Marker típusa	Rendszertani elkülönítések	Regionális vagy szubszekifikus populációstruktúra	Genetikai diverzitás és szubpopulációs struktúra	Egyedazonosítás és rokonsági vizsgálatok
Mitokondriális DNS (mtDNS) szekvenciák	xxxx	xxxx	xx	x
Mikroszatellitek	x	xx	xxxx	xxxx
SNP	xxx	xx	xx	x

A gyakori típusú molekuláris markerek alkalmazása a vadbiológiában. (xxxx – nagyon jól alkalmazható, xxx – jól alkalmazható, xx – közepesen alkalmazható, x – kevésbé jól alkalmazható).

## FAJOK AZONOSÍTÁSA ÉS ELOSZLÁSUK MEGHATÁROZÁSA

Sok faj nehezen látható vagy kezelhető invazív módon (pl. élve fogó csapdázással), így ezen fajok azonosítását kizárólag a nem-invazív minták (pl. szőrszalag vagy az ürülék morfológiája) alapján végezhetjük, ami sok esetben nem túl megbízható. A DNS alapú elemzések révén ezek a fajok is viszonylag könnyen vizsgálhatók válnak, amit a nem-invazívan gyűjtött mintatípusok segítségével lehet elvégezni. Kis számú vagy degradált minta esetében a mitokondriális DNS (továbbiakban mtDNS) vizsgálat előnyösebb, mint a genomi DNS alapú, mivel a mtDNS nagyobb kópia számban van jelen, így a vizsgálat nagyobb valószínűséggel végezhető el sikeresen. A mtDNS alapú PCR vizsgálatokból származó szekvenciák a fajok között változást mutatnak a fajokon belül azonban konzerváltak (állandók). Ezek azok a különbségek, amelyek lehetővé teszik a mintákból történő fajazonosítást, ugyanakkor a fajon belüli elkülönítésre kevésbé alkalmasak.

## HIBRIDIZÁCIÓ

Az egyének taxonómiai csoportokhoz való hozzárendelése határozza meg a megőrzés és a gazdálkodás alapvető egységeit. A genetikai jellemzők kiegészítik a morfológiát és egyéb információkat (például a földrajzi távolságot) a rendszertani kapcsolat meghatározásához. Ennek során a genetikai információ feltárhatja, hogy az egyik fajba történetesen egymásba ágyazott csoportok ténylegesen eltérő evolúciós összel rendelkeznek, potenciálisan eltérő védelmi igényekkel. A genetikai markerek kiegészíthetnek más információkat is, hogy segítsenek megoldani a faj vagy alfajsztint alá tartozó fontos rendszertani kapcsolatokat, beleértve az evolúciós egységeket, rendszertani csoportok közötti hibridizációt, a nevezéktanral kapcsolatos kérdéseket és a fajok kezelésével kapcsolatos kérdéseket.

## EGYED ÉS IVARAZONOSÍTÁS

A fajazonosításon kívül a genetikai módszerek alkalmasak a vadon élő állatfajok egyed- és ivarhatározására is. Az emlősökben a női nemi kromoszóma XX, a hím pedig XY, a hímek az Y kromoszómához kapcsolt DNS markereket hordoznak a nőstények pedig nem.



*Kutyafélék ivarhatározása agarózsugárzó gélelektroforézis alapján. A nőstényekben 1 fragmentum látható (215 bázispár hosszú), a hímekben pedig kettő (215 és 247 bázispár hosszúságú).*

Az X és Y kromoszómán is elhelyezkedik az amelogenin gén, amely számos emlősben hosszpolimorfizmust mutat az X és Y kromoszóma között, ez lehetőséget biztosít, hogy egy amplifikáló primer pár segítségével a nőstényekben 1, a hímekben pedig 2 DNS fragmentet adjon. Ez a hosszpolimorfizmus teszi lehetővé azt, hogy meghatározható legyen a vizsgált minták ivara.

Az egyedek azonosítását (a genetikai profil felvételét) rendszerint az erősen variábilis nukleáris DNS-ből, különösen a mikroszatellit és az SNP vizsgálatok által határozzuk meg. A fajok megőrzéséhez és a velük való gazdálkodáshoz is fontos az egyedek számának és a populációk genetikai struktúrájának becslése. Az igazságügyi vizsgálatok során is fontos az egyedazonosítás. Egy ragadozó kártétel esetében ugyanis az állat faján és ivarán túl egyed szinten is elvégezhetjük a határozást, így a későbbi esetek során összehasonlíthatóvá válik, hogy egy vagy több egyed felelős a károkozásért.

Az egyes genotípusok másik hasznosítási módja a gyakoriság és egyéb alapvető értékek becslése, melyre az úgynevezett fogás-jelölés-visszafogás módszer alkalmas. Ha egy nem invazív mintából azonosítunk egy egyedet és azt a későbbiekben más mintákból is azonosítunk, akkor megállapíthatjuk például az egyed minimális mozgáskörzetét is, vagy mezőgazdasági kártétel esetén azt, hogy a gazda állatait ugyanaz az állat pusztította-e el.

Az olyan markerek, mint a mikroszatellitok és az SNP-k, az előbb említetteken kívül más paraméterek vizsgálatára is alkalmasak. Ezenkívül mendeli kodomináns kifejeződést mutatnak, vagyis azonosítják az egyed mindkét szülőitől örökölt tulajdonságait (alléleit). Ezekből az allélméretekből ki lehet számolni az allélfrekvenciákat, a heterozigóciát és a genetikai változatosság egyéb mutatóit. Ezek az adatok felhasználhatók a populáció struktúrájának becslésére, populációk közötti kapcsolat vizsgálatára, populációk eredetének vizsgálatára, beltenyésztettség vizsgálatára és a populáció drasztikus csökkenésének (palacknyak hatás) múlt és jelen béli vizsgálatára is.

Végül, az egyéni genotípusok lehetővé teszik az egyed-szülő kapcsolat vizsgálatát is. Ez a genetikai elemzés segíthet meghatározni populáción belül a szaporodni képes egyedek számát, a szülőnkénti utódszám átlagát és variancia értékét. A genetikai vizsgálatok nagyon hasznosak lehetnek abban az esetben is, ha a terepi megfigyelések nem sikeresek vagy pontatlanok, tehát fontos megjegyezni, hogy a legpontosabb eredményeket a terepi megfigyelések és a genetikai vizsgálatok összessége adja.

## A HAZAI NAGYTESTŰ RAGADOZÓ FAJOK TEREPI MINTAVÉTELEZÉSBŐL SZÁRMAZÓ LEGGYAKORIBB MINTATÍPUSOK, AZOK GYŰJTÉSE, TÁROLÁSA ÉS FELDOLGOZÁSA

A következő fejezetben a ragadozó fajok terepi mintavételezéséből származó leggyakoribb mintatípusokat mutatjuk be, azokon belül pedig megfogalmazzuk a sikeres genetikai vizsgálat elvégzéséhez szükséges, helyes mintavételezési és tárolási javaslatainkat is. A protokoll kidolgozása a Szent István Egyetem Vad-Világ Megőrzési Intézet „Fenntartható természetvédelem magyarországi Natura 2000 területeken” (Svájci –Magyar Együttműködési Program) SH/4/8. azonosító számú projekt keretén belül, az egyetem megbízásából valósult meg a NAIK MBK-ban (NAIK/2571-1/2016.46/258). A jelen kiadványban szereplő protokoll ennek egy átdolgozott és kibővített változata, mely a BNPI és a NAIK MBK együttműködésében (BNPI: 8-34/1/2017; NAIK/2404-1/2017) valósul meg.

Az általunk használt mintavételi csomagot igyekeztünk úgy kialakítani, hogy az a mintavételezést minél

Mintavételi lap	
Kapcsolattartó: Dr. Stéger Viktor PhD Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4. E-mail: viktor.steger@gmail.com Fax: 36-28-526-101	
Mintavétel helye, ideje:	.....
EOV koordináta:	.....
Minta gyűjtőjének neve, elérhetősége:	.....
Minta azonosító: 1	
Minta típusa: nyál fekália szőr szövet	
egyéb:	.....
Feltételezett állatfaj:	.....
Megjegyzés:	.....
	.....

A mintavételi lap, mely tartalmazza a minta legfontosabb információit.



A mintavételi csomag részei.

egyszerűbbé, egyértelműbbé tegye és a zoonózisok elkerülését biztosítsa a mintagyűjtés során. A csomag tartalmaz egy mintavételi lapot, mely egy hermetikusan zárható műanyag zacskóban van, ezt a minta típusától függetlenül ki kell tölteni. A lapon a legszükségesebb adatok szerepelnek, úgy, mint a mintavételezés pontos helye (EOV vagy WGS GPS koordináta) és ideje, a minta típusa (pl. ürülék, vizelet, szőr), a mintagyűjtő neve és elérhetősége. Ezen kívül, ha a mintával kapcsolatban valamilyen észrevétele van a mintagyűjtőnek, fontos, hogy a mintavételi lapon feltüntesse azt. Ilyen lehet például hóban történő vizeletminta gyűjtésénél a nyomokból következtethető felüljelölés valószínűsége vagy feltételezetten ragadozók által elejtett haszonállat esetében az, hogy a tetem körül a mintavételezés előtt a pásztoroktyúk is megfordultak és esetlegesen megnyalták az elejtett állati tetemet.

- A csomag tartalmaz továbbá egy pár gumikesztyűt, annak érdekében, hogy a mintavételezés során ne szennyeződjön más DNS-sel. A kesztyű használata nagyon fontos a mintavételezést végző személy egészségének megőrzése szempontjából, de fontos a minta szempontjából is, ugyanis a kesztyű használatával küszöbölhető ki a minta emberi DNS-sel való „szennyezése”, a humán kontamináció. Fontos, hogy a mintavételezés elejétől a végéig a gumikesztyű a kézen legyen.
- Az 50 ml-es centrifugacső lehetőséget biztosít téli havas hónapokban vizelet gyűjtésére, ezen kívül gyűjthető benne szőr is.
- Az úgynevezett mintavételi pálca vagy SWAB, ami egy hosszú nyelű fülpiszkálóra hasonlító eszköz, amivel több típusú minta is gyűjthető úgymint az ürülék, nyál, vér vagy szájkaparék.
- Az abszolút alkoholt tartalmazó 2 ml-es eppendorf cső alkalmas szövetminta tárolására vagy az előbb említett mintavételi pálca végét beletörve annak tárolására. Az alkohol a genetikai minta tartósítását biztosítja.
- Egy nagy hermetikusan zárható műanyag tasak alkalmas az ürülék begyűjtésére.

### ÜRÜLÉK

A nem-invazív minták közül az egyik leggyakoribb. Az ürülékmin-ták gyűjtésére a téli hónapok a legalkalmasabbak, mivel ekkor az alacsony hőmérséklet miatt a lebontó folyamatok lassabban zajlanak. Az év többi részén a hajnali órák jelenthetnek alkalmas időszakot, mivel ekkor még kevésbé degradálódik a melegtől az ürüléken található DNS, és a lebontó szervezetek (pl. bogarak) is kevésbé aktívak. Az eddig leírtak alapján fontos, hogy a minta minél frissebb legyen. Amennyiben az ürülék láthatóan friss (csillogó, fénylő, át-



Az ürülék felszínéről történő mintavételezés a mintavételi pálca segítségével.





A petricsészében lévő középső mintavételi pálcán van megfelelő mennyiségű minta, a bal oldalin túl kevés, a jobb oldalin pedig túl sok, ami befolyásolhatja a genetikai vizsgálat sikerességét.

látszó réteg van a felszínén), alkalmas arra, hogy a mintavételi pálcával vegyünk belőle mintát.

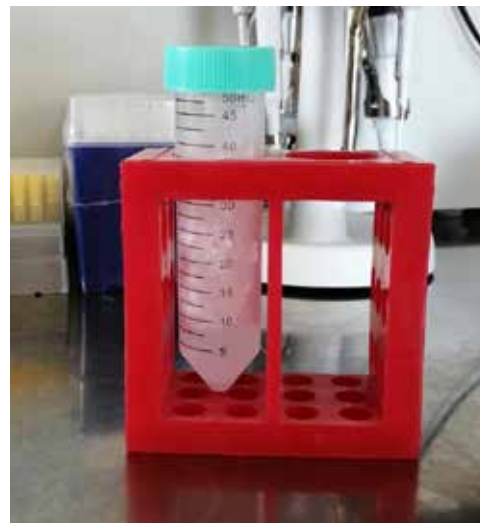
Fontos, hogy csak az ürülék felszínéről vegyünk a mintát, a pálca végét az ürülékbe ne nyomjuk bele, ugyanis genetikai vizsgálatra az ürülék felszínén lévő, az egyed bélfaláról leváló bélhám sejtek alkalmasak. A mintavételi pálcára kerülő minta mennyisége is fontos, a túl kevés és a túl sok minta is befolyásolhatja a genetikai vizsgálat sikerességét. Az ürülék belseje idegen DNS-t (táplálék, parazita) tartalmazhat, ami zavarhatja a meghatározást. A kenetet az ürülék felszínének több pontjáról is elkészíthetjük. Ennek végeztével a pálca végét törjük/vágjuk bele az alkoholt tartalmazó 2 ml-es eppendorf csőbe, annak tetejét pedig jól zárjuk le. Ezen

kívül magát az ürüléket is érdemes begyűjteni a mintavételi csomagban található nagy alakú zárható műanyag zacskóba. A zacskót a kinyitást követően fordítsuk ki, helyezük bele a kezünket, a zacskón keresztül fogjuk meg az ürüléket és a zacskót fordítsuk rá, majd zárjuk le. Nagyon fontos a genetikai vizsgálatig a minta tárolása is. Amennyiben lehetséges, a mintavételezés során a mintát gyűjtő személy autójában legyen olyan tároló eszköz (pl. hungarocell doboz benne jégakku vagy szárazjég), amely lehetővé teszi a minta 0°C körüli vagy az alatti tárolását néhány óráig. A genetikai vizsgálatokat végző laboratóriumokban a tárolásra biztosított legalább -20°C-os fagyasztó, viszont a minta begyűjtésétől a minta átadásáig fontos, hogy a genetikai minták fagyasztóban (-20°C) legyenek tárolva, illetve a genetikai vizsgálatot végző laboratóriumig a minta legalább a már előbb említett 0°C körüli hőmérsékletet biztosító dobozban, tárolóedényben legyen szállítva. Ezekre a DNS degradálódásának megakadályozása miatt van szükség, a nem megfelelő tárolás és szállítás ugyanis rontja a vizsgálatok sikerességének valószínűségét.

## VIZELET

Ennek a mintatípusnak a gyűjtésére is a téli, hideg hónapok a legalkalmasabbak, amikor a mintagyűjtésre szolgáló területet hó borítja. Ilyen időben ugyanis a vad nyomolvasása és követése során gyűjthető össze a vizelet. Az állat(ok) nyoma a terepi szakembernek segít több olyan tényező megállapításában, ami a genetikai vizsgálatoknál is előnyt jelent (pl. feltételezett egyedek számának meghatározása, felüljelölés).

A vizeletes havat az 50 ml-es centrifugacsőben kell gyűjteni, lehetőség szerint a csövet meg kell tölteni hóval. Fontos, hogy a minta ne olvadjon ki és rövid időn belül -20°C-os fagyasztóba kerüljön. A minta szállítása során pedig fontos, hogy jégakkut tartalmazó hungarocell dobozban történjen, szintén arra ügyelve, hogy a minta ne olvadjon ki.



A hóban történő nyomolvasás során talált ragadozó vizelet gyűjtésére alkalmas centrifugacső.

## SZŐR

Szintén gyakori mintatípusnak számít. Gyűjtésére az év teljes időszaka megfelelő. A minták elsősorban dörgölözőfákról, drótkerítésekről kerülnek begyűjtésre, de előfordulhatnak céltartan szőrgyűjtés céljából kihelyezett szőrgyűjtő eszközökről származó minták is. Ezen mintatípus esetében is fontosak a mintavételi helyen láttott egyéb, közvetett nyomok, jelek. Ezen információk mintavételi lapon történő feltűntetésével kizárható például a kereszt szennyeződés (a szőrszálak több egyedtől származnak) is. Abban az esetben, ha nem dönthető el egyértelműen, hogy a szőrszálak mely fajhoz/fajcsoporthoz tartoznak, a genetikai vizsgálatot szőrmorfológiai vizsgálat előzi meg.

A gyűjtött szőrököt légmentesen zárható műanyag vagy papír gyűjtőtasakokba helyezük. Annak érdekében, hogy egy szőrszálból a DNS izolálás pontos és megbízható legyen, fontos, hogy a szőrszálak szőrtüszőt is tartalmazzanak. A mintákat ebben a formában könnyű szállítani, rövid távon hűtés sem szükséges, ezért bizonyos esetekben egyszerű postai úton is eljuttathatók a vizsgálat helyszínére, azonban biztosabb, ha a szállítás is hűtve zajlik. A továbbiakban a tárolás szintén hűtve, száraz helyen történik.

## NYÁL

Ezzel a mintatípussal a legtöbb esetben mezőgazdasági kártételek (feltételezetten ragadozó által elejtett haszonállat) kapcsán végzünk genetikai vizsgálatot. A nyálminta – csak úgy, mint a többi minta – esetében is fontos, hogy minél hamarabb meg legyen mintázva a genetikai vizsgálatra. A 24 óránál régebbi genetikai vizsgálatra szánt minta nagy valószínűséggel alkalmatlan arra, hogy sikeres fajhatározást végezzünk rajta, ez az időintervallum téli, hideg időben néhány órával kitolódhat. A mintatípus esetében szintén a vizsgálatot nehezítő tényező a „szennyeződés” kérdése, nem tudhatjuk ugyanis, hogy a mintavételi helyet (harapási, rágási sebek) hány állat használta. Ezt nehezítheti a haszonállatok védelmét szolgáló nyájórzó kutyák jelenléte is a területen, akik szintén hozzáférhetnek az elhullott haszonállathoz. Ebből következően előfordulnak olyan esetek is, amikor az elejtett állatról vett nyálminta kutyától származik. A genetikai vizsgálat során ennek kizárására ajánljuk, hogy a helyszíni nyál mintavételezéskor a területen lévő nyájórzó kutyáktól is vegyünk genetikai mintát a szakemberek.

A genetikai vizsgálatra szánt nyál mintát a mintavételi pálca (SWAB) segítségével gyűjtjük, a pálca végét pedig a 2 ml-es abszolút alkoholt tartalmazó eppendorf csőbe törjük/vágjuk bele, a cső tetejét jól zárjuk le. A mintát lehetőség szerint hűtve tároljuk, a minta szállításához jégakkut tartalmazó hungarocell dobozt használjunk.



A 75-99%-os alkoholt tartalmazó 2 ml-es eppendorf cső benne szövetdarab.



Szőrtüszőt tartalmazó szőrszál fénymikroszkópos képe. A genetikai vizsgálatra alkalmas szőrszálaknak szőrtüszőt kell tartalmazniuk, a fedőszőrökön szabad szemmel is láthatók a szőrtüszők.

## SZÖVET

Nem gyakori mintatípus, az elhullott egyedek esetében használjuk genetikai vizsgálatokra, mivel viszonylag egyszerű belőle DNS-t izolálni.

A mintagyűjtés lehetőség szerint az állat hátsó combjából történik kés vagy szike segítségével.

Fontos, hogy a vágóeszköz a használat előtt alkohollal le legyen mosva, illetve több állat egy időben történő mintavételezésekor - azok között - a vágóeszközt szintén mossuk le a kontamináció elkerülése érdekében. A genetikai vizsgálat elvégzéséhez egy borsószemnyi izomszövet darab is elegendő, azonban a vizsgálat ismételhetősége érdekében ajánlott nagyobb mintát gyűjteni. A szövetet a 2 ml-es abszolút alkoholt tartalmazó eppendorf csőbe helyezzük, a cső tetejét jól zárjuk le. A mintát legalább hűtve, de lehetőség szerint fagyaszttva tároljuk, a szállításhoz jégakkut tartalmazó hungarocell dobozt ajánlunk.

## VÉR

Ennek a mintatípusnak a gyűjtésére elsősorban a védett vagy fokozottan védett állatok befogásakor (átszállítás, jelölés) van lehetőség, ezért ritka mintának számít. Előnye, a szövetmintához hasonlóan, hogy egyszerű a mintából történő DNS izolálás, illetve annak minősége és mennyisége az esetek túlnyomó többségében kifogástalan.

Genetikai vizsgálatokhoz minimum 200 mikroliter (kb. 10-15 csepp) vér szükséges, amit szakember (állatorvos) vesz az állattól egy 4 ml-es vérvételi csőbe, amelynek belső falán véralvadást gátló anyag (etilén-diamin-tetraecetsav – EDTA) található. Fontos, hogy a csőben található vér jól keveredjen el a véralvadást gátló anyaggal, ezért a mintavételt követően, a vérvételi cső lezárása után, azt szükséges jól átmozgatni. Ezt követően a minta tárolása 0°C körüli vagy az alatti hőmérsékleten történjen, a mintát jégakkut tartalmazó hungarocell dobozban szállítsuk.

Abban az esetben, ha nem áll rendelkezésre vérvető cső, de terepen vérminta gyűjthető (például sebesült állat vére az avarban), ez történhet mintavételi pálca segítségével is. A vércseppeket itassuk fel a mintavételi pálcával, annak végét törjük bele a 2 ml-es eppendorf csőbe, és azt szállításig tároljuk 0°C körüli vagy az alatti hőmérsékleten.

## CSONT

A csont- és fogszövetek is alkalmasak DNS diagnosztikára, amennyiben megfelelő körülmények között maradtak fent. A csapadékos nedves talaj és a benne található gombák és baktériumok a DNS lebomlását okozzák hosszú távon. A természetben talált elhullott állati maradványokból, illetve szakhatóság által lefoglalt kifőzött koponyákból kerülnek vizsgálatra ilyen minták. Koponya esetében az abból kivett fogak (általában őrlő- és szemfogak) alkalmasak a faj vagy egyedazonosításra. A mintagyűjtés gumikesztyűben történik a humán DNS-sel való keveredés elkerülése érdekében. A minta gyűjthető 50 ml-es centrifugacsőbe vagy műanyag gyűjtőtasakba is. A tárolás és szállítás nem feltétlenül igényel hűtést.



Vérmintavételi cső, belső falán véralvadást-gátló anyag (EDTA).

## GEREZNA

Szintén ritka mintatípus, elsősorban szakhatóság által lefoglalt illegálisan tartott védett vagy fokozottan védett fajok esetében kerül sor genetikai vizsgálatra fajhatározás céljából. A mintagyűjtés steril szikével történik. A kikészített bőrből körülbelül 16-20 cm<sup>2</sup>-es darab gyűjtése javasolt. A gyűjtés történhet 50 ml-es centrifugacsőbe vagy műanyag gyűjtőtasakba is. A tárolás és a szállítás nem igényel hűtést.



Aranysakál gerezna minta petricsészében feldolgozás előtt.

## LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK

A mintákat a laboratóriumba történő beérkezésekor egyedi azonosítóval látjuk el, hogy csökkentsük a kézi adatbevitelből fakadó hibákat; valamint a mintákat a hozzájuk kapcsolódó adatokkal együtt adatbázisunkban rögzítjük. A mintákat -20°C-on, esetenként -70 °C-on tároljuk, hogy a DNS degradálódását megelőzzük. A minták szennyezését elkerülendő, a preparálást elszívófülkében, a többi munkafolyamatot pedig ún. lamináris boxban végezzük megfelelő védőfelszerelésben (laborköpeny, hajháló, maszk, gumikesztyű, védőszemüveg).

A nem-invazív mintákból származó DNS kinyeréséhez kereskedelemben használható DNS izoláló protokollokat használunk.

Lehetőség van DNS izolálására izoláló robot segítségével, mellyel egy időben több minta izolálása történik. Ez egyrészt gyorsítja a laboratóriumi vizsgálat idejét, másrészt a robot segítségével javítható az izolált DNS minősége és mennyisége is, ugyanakkor a költség magasabb a kézi protokolloknál.

A DNS kinyeréshez szigorú szabályokat állítottunk fel a személyzet, felszerelés és anyagok mozgásával kapcsolatban, hogy megelőzzük a szennyeződést, valamint negatív kontrollakat is használtunk. Az izolált DNS minőségét és mennyiségét spektrofotométerrel, illetve agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőrizzük. Amennyiben a DNS tisztasága nem megfelelő a genetikai vizsgálatok elvégzéséhez, szintén kereskedelmi forgalomban vásárolható protokoll segítségével megtisztítjuk azt a különböző gátló anyagoktól (ürülék minta esetében például a táplálékban található egyes összetevők, gerezna esetében pedig a cserzőanyagok), melyek gátolhatják a PCR reakciót.

Fajhatározást a mitokondriális 12S rRNS (riboszómális RNS) és 16S rRNS gének szekvenciájának meghatározásával végzünk. A PCR reakció során kapott szekvenciák pedig szekvenátor

gép segítségével kerülnek meghatározásra. A kapott szekvenciákat bioinformatikai módon, különböző programok segítségével illesztjük. Az így kapott egyedi szekvenciákat a National Center for Biotechnology Information génbankjában (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) található szekvenciákkal vetjük össze a BLAST program segítségével.



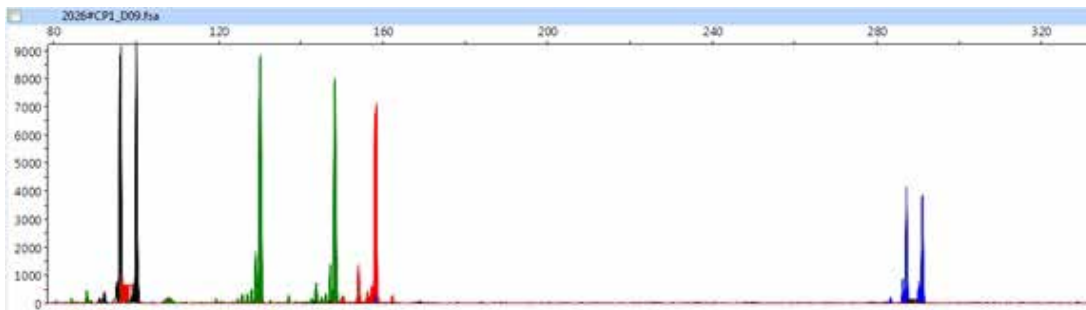
Néhány, DNS izolálására és a szennyezett DNS tisztítására alkalmas csomag (ún. Kit).



MagCore izoláló robot, mely egyidőben 16 minta izolálását teszi lehetővé.

Az egyedazonosítást nem kapcsolt autoszómás mikroszatellit (STR) markerekkel végezzük, a markereket multiplex körülmények között használjuk, ami azt jelenti, hogy egy reakcióban egyszerre több markert is vizsgálunk. Ez a költséghatékonyságot teszi lehetővé. A markereket nemzetközi szakirodalmak alapján válogattuk össze és optimalizáltuk őket multiplex környezetben. Kutya-félék esetében a markerek száma 23 (összesen 4 plexben), macskaféléknél 21 (összesen 3 plexben), a barna medve egyedazonosítására pedig 8 markert (összesen két plexben) használunk.

Az egyes színek a különböző markereket jelenítik meg. Az ábráról leolvasható a vizsgált minta markerenkénti allélhosszúsága. Abban az esetben, ha az egyed az adott markerre homozigóta, egy csúcs látható (például az ábrán a piros csúcs), ha adott markerre heterozigóta, két csúcs látható (fekete, zöld és kék színek). A csúcsok különbözősége így végső soron az egyedek közötti különbözőséget mutatja meg, ezáltal lehetővé válik az egyéni azonosítása az állatoknak.



Multiplex PCR vizsgálat elektroferogram képe PeakScanner programban megjelenítve

A PCR termékek méretének meghatározása kapilláris elektroforézissel történik egy speciális készüléken. A minták egyedi genotípusát, azaz a bennük található allélméreteket egy erre a célra készített bioinformatikai program (pl. PeakScanner) segítségével határozzuk meg. A leolvasott allélhosszúságokat (kromatogramokat) táblázatban rögzítjük, és a további értékelésekhez ezeket az eredményeket használjuk, szintén különböző bioinformatikai programokat használva. A fajok genetikai alapú szétválasztását főkoordináta analízissel (pl. PAST szoftver) és klaszterező algoritmus segítségével (pl. Structure szoftver) végezzük. Szintén ezekkel az adatokkal jellemezni tudjuk a vizsgált egyedek és populációk genetikai különbségeit. Más programok segítségével pedig jellemezni tudjuk a vizsgált fajok rokonsági kapcsolatait is. Itt is fontos megjegyezni, hogy ezek a bioinformatikai eljárások statisztikai modelleken alapulnak, tehát az eredmény valójában egy statisztikai valószínűséget jelent. A vizsgálatok során, a minta vagy csoportszám, illetve a markerek számának változtatásával a statisztikai valószínűségek is változhatnak.

## ESETTANULMÁNYOK

A következő példákon keresztül szeretnénk bemutatni, hogy a hazai genetikai vizsgálatok milyen célt szolgálnak a nagyragadozókkal kapcsolatos kutatásokban, illetve, hogy milyen esetekben tudnak segítségül szolgálni a terepi szakemberek számára. Gyakori kérdésként merül fel, hogy milyen anyagi vonzata van ezeknek a vizsgálatoknak. A költségek a minta típusától és annak minőségétől függően változhatnak. Gyengébb minőségű minta esetében a vizsgálatok ismétlésére lehet szükség, mely növeli annak költségét. Ezen tényezők figyelembe vételével egy minta genetikai profiljának megállapítása átlagosan bruttó 20.000-30.000 forint. Az itt bemutatott esettanulmányok a BNPI-vel való együttműködés során (BNPI: 8-34/1/2017; NAIK/2404-1/2017), annak megbízásából készültek.

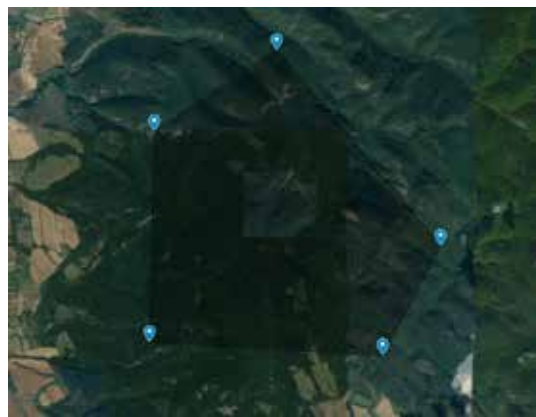
### TELJES GENETIKAI PROFIL FELVÉTELE ELHULLOTT ÁLLAT TETEMÉRŐL VETT NYÁLMENTÁBÓL

Feltehetően ragadozó által zsákmányolt vad vagy háziállat tetem vizsgálata esetén a közvetlen és a közvetett jelek vizsgálatával megállapítható a ragadozó faja. Ilyen esetekben segítség lehet a ragadozó nyálának genetikai vizsgálata, mely minta, ha megfelelő időben és a javaslatoknak megfelelő módon gyűjtötték és tárolták, faj vagy akár egyed szintű azonosítást tesz lehetővé. 2018 tavaszán laboratóriumunkba érkezett egy feltételezeten szürke farkas által elejtett muflon teteméről vett nyál minta. A mintavételi lapon szereplő adatok alapján, a muflon körüli nyomokból ítélve az elejtés friss volt, a nappali és az éjszakai hőmérséklet pedig kedvezett annak, hogy a DNS a lehető legkisebb mértékben degradálódjon. A mintavételezést követően a mintát a kért módon tárolták (ld. fentebb) és szállították a laboratóriumba. A kapott nyál mintából a gyári protokollnak megfelelően elvégeztük a DNS izolálást, melynek töménysége és tisztasága megfelelő volt a genetikai vizsgálat elvégzéséhez. A fajazonosításhoz 23 darab di- és tetranukleotid, az egyedazonosításhoz pedig 14 darab tetranukleotid, kutya-félékre specifikus autoszómás mikroszatellit markert használtunk, amik segítségével megtörtént a PCR vizsgálat. A kapilláris elektroforézis végeredményeként megtörtént a kapott allélméreteket detektálása, amik genotípus táblázatban kerültek rögzítésre. A működő mikroszatellit markerek száma lehetővé tette a faj és egyedazonosítás elvégzését is. A fajazonosítást a STRUCTURE programmal végeztük kutya és szürke farkas referencia minták felhasználásával. Az egyedazonosításhoz a PAST program főkoordináta-analízisét használtuk. A vizsgálatok során sikeres volt mind a faj, mind az egyedazonosítás. A tetemről vett nyál minta szürke farkastól származott, az azonosított hím egyed pedig a vizsgálat előtt más mintában nem azonosítottuk, így új példányt ismerhettünk meg a területen. Azokban az esetekben, ha a genetikai vizsgálatra szánt minta friss és nem kevert, lehetőség van az ilyen jellegű vizsgálatok elvégzésére, az így kapott eredmények pedig segítséget nyújthatnak a terepi szakembereknek a kérdéses esetek elbírálásában.

### MINIMÁLIS MOZGÁSKÖRZET BECSLÉSE GENETIKAI VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSÁVAL

A macskafélékre jellemző, hogy ürüléküket elkaparják, avarral, földdel rejtik el, genetikai vizsgálatra alkalmas minta gyűjtése éppen ezért nehéz. A legalkalmasabb időszak a téli, hóban történő nyomolvasás és a nyom vonalán talált ürülék vagy

vizelet gyűjtése. A Duna-Ipoly Nemzeti Park Igazgatóság és a Börzsöny Alapítvány évek óta keresi és gyűjti a téli időszakban többek között az eurázsiai hiúz genetikai vizsgálatára alkalmas mintákat. A NAIK MBK Alkalmazott Vad-és Haszonállat Genomika csoportja 2016-ban kezdte el vizsgálni a hazai fokozottan védett emlős ragadozó fajokat, köztük a hiúzt is. A Börzsöny területéről kapott ürülék mintákat 2009-től kezdődően gyűjtötték és megfelelő körülmények között -20 °C-os fagyasztóban tárolták. A szállítás jégakkumulátoros dobozban történt. A genetikai vizsgálat célja a területen előforduló feltehetően eurázsiai hiúz jelenlétének kimutatása, illetve létszámának és az egyedek ivarának megállapítása volt. Az ürüleből történő DNS izolálást követően, a 21 darab macskafélékre specifikus mikroszatellit marker segítségével megtörtént a PCR vizsgálat. Az ezt követő kapillaris elektroforézis eredményeként rögzítésre kerültek a lókuszonként detektált allélméreteket, amelyekből meg lehetett állapítani a területen előforduló egyedek számát. Az egyedek ivara az amelogenin génre tervezett sokszorosító primer pár segítségével került meghatározásra. A vizsgálatok során összesen 9 minta genetikai profilját sikerült rögzíteni, ezekből a mintákból pedig két egyedet azonosítani. Az egyik egyedet hétszeres, a másikat kétszeres visszafogással (az egyed több mintából történő azo-



*Az egy egyedhez tartozó minták GPS koordinátáinak feltüntetésével és a mintavételi pontok összekötésével kiszámolható az egyed minimális mozgáskörzete. A kép illusztráció, a szemléltetés célját szolgálja.*

nosítása). Mind a két egyed hím ivarú. A pontos mintavételezés során rögzítésre került a minták gyűjtésének éve és pontos GPS koordinátái is. Ezekkel az adatokkal megállapítható, hogy az egyedek 2009-2013 között fordultak elő a területen, a hét genetikai mintából azonosított állat esetében pedig a GPS koordináták segítségével annak minimális mozgáskörzete is azonosítható volt.

### **FOKOZOTTAN VÉDETT RAGADOZÓ TETEM GENETIKAI VIZSGÁLATA SORÁN DETEKTÁLT VISSZAFOGÁS, ROKONSÁGI KAPCSOLATOK**

A fokozottan védett ragadozó tetemből gyűjtött genetikai minta is sok fontos információval szolgálhat, annak ellenére, hogy a vizsgált állat már nem él. Kutatócsoportunk 2018 őszén kapott egy illegálisan elejtett szürke farkas izomszövet mintát. Nem élő állatról lévén szó, a combizomból vett minta volt a genetikai vizsgálatokra legalkalmasabb mintatípus a laborvizsgálatok elvégzése és az anyagi ráfordítás szempontjából is. A genetikai vizsgálatra szánt izomszövet mintát az állat hátsó combjából gyűjtötték 2 ml-es abszolút alkoholt tartalmazó eppendorf csőbe, amit -20 °C-on tároltak és megfelelő módon szállítottak. Az elejtett állattal kapcsolatban információt kaphattunk annak mozgáskörzetéről visszafogás esetén (ha az egyedet más genetikai mintákból is azonosítottuk már), illetve rokonsági kapcsolatokat is vizsgáltuk a már adatbázisunkban lévő szürke farkas mintákkal.

Az izomszövet mintából a protokollt készítő utasításai alapján genomi DNS-t izoláltunk, aminek töménysége és tisztasága lehetővé tette a PCR vizsgálatok elvégzését. Az egyedazonosításhoz 14 darab tetranukleotid mikroszatellit markert és az ivarhatározó markert használtuk, ezekkel a markerekkel történt a PCR vizsgálat. Az ezt követő kapillaris elektroforézis végeredményeként megtörtént a kapott allélméreteket detektálása, amik Microsoft Excel táblázatban kerültek rögzítésre. Az egyedazonosítás és a

visszafogás vizsgálatára a PAST program főkoordináta-analízisét, a rokonsági kapcsolatok vizsgálatára pedig a Colony programot használtuk.

A vizsgálat során mind a 14 autoszómás STR marker és az ivarhatározó marker is működött, így elvégezhető volt az egyedazonosítás, ezt követően pedig a genetikai profil összevetése az adatbázisunkban lévő többi mintával. A szürke farkas tetem genetikai profilja megegyezett egy 2018 telén gyűjtött ürülminta genotípusával, ez egy sikeres visszafogást jelentett. A rokonsági kapcsolatok vizsgálatánál pedig sikerült rokoni kapcsolatot találni egy másik, ugyanazon a területen mozgó hím egyeddel. Ezt az eredményt a BNPI kameracsapdás felvételei is megerősítették, ugyan is azon a területen, ahonnan a genetikai minták származnak közel egy éve rögzítette több felvétel is a két fiatal hím jelenlétét.

### **KÓBORLÓ EGYEDEK GENETIKAI PROFILJÁNAK RÖGZÍTÉSE AZ ESETLEGES ÚJABB ELŐFORDULÁS MEGÁLLAPÍTÁSA CÉLJÁBÓL**

Az Európában előforduló nagytestű ragadozó fajokra jellemző, hogy képesek akár rövid időn belül is nagy távolságokat megtenni. Így volt ezzel a 2018 nyarán az országot észak – déli irányban átszelő barna medve is. Az állatot több napos keresés után sikerült Szeged környékén altatólővedékkel elkábítani, melynek több célja is volt. A medve kapott egy jeladós nyakörvet a nyomkövethetőség miatt, átesett egy orvosi vizsgálaton, illetve ez idő alatt a szakemberek vért is vettek az állattól, a genetikai profil megállapítása miatt. A vérvételt állatorvos végezte, véralvadástgátló anyagot (EDTA) tartalmazó vérvető csőbe, ezt követően a minta jégakkumulátoros tartalmozó hungarocell dobozban került a laboratóriumba. A jeladóval ellátott állatot a szlovák-magyar határ közelében engedték vissza a természetbe, a jeladót viszont az állat rövid időn belül letépte magáról. Az ezt követő napokban többen is látni vélték az állatot a BNPI működési területén. Az egyik ilyen alkalommal egy medve egy gyümölcsös kertben lakmározott és a fáról való táplálkozás közben, a fa kérgéhez hozzádörgölözve az állat bundájáról néhány szőrszál a kérgegen maradt, ahonnan a szakemberek mintát tudtak gyűjteni. Ezzel a mintával genetikai szempontból vizsgálhatóvá vált, hogy a két medve ugyanaz az egyed-e.

Mintatípusoktól függően (vér, szőr) a szakemberek elvégezték a mintákból történő DNS izolálást. Ezt követően az egyedazonosításhoz használt 8 darab medvefélékre specifikus autoszómás mikroszatellit marker segítségével megtörtént a PCR vizsgálat. A kapillaris elektroforézis végeredményeként megtörtént a kapott allélméreteket detektálása, amik Microsoft Excel táblázatban kerültek rögzítésre, ezek az adatok pedig lehetővé tették, hogy a két mintát össze lehessen hasonlítani egymással. Ezen kívül a szakemberek ezeket a mintákat főkomponens-analízis során összehasonlították egy 2016-ban már azonosított barna medve genotípusával, melyet két ürüleb mintából is sikerült azonosítani.

A vérminta esetében mind a 8 autoszómás mikroszatellit markerrel sikeres volt a vizsgálat, a szőr minta esetében 6 mikroszatellit marker működött. Mivel a szőr esetében a vérmintához képest voltak hiányzó markerek, így nem lehet teljes bizonyossággal megállapítani, hogy a két minta egy egyedtől származik-e. Viszont abban az esetben, ha csak azt a 6 lókuszt vizsgáljuk, amiken mind a két minta esetében működött a PCR vizsgálat 100%-os egyezés mutatkozik a vér és a szőrminta között, így feltételezhető, hogy a két minta egy egyedtől származik vagy az egyedek, amelyekből a minták származnak nagyon közeli rokonsági kapcsolatban állnak egymással. A főkomponens-analízis eredménye azt igazolta, hogy a 2016-ban azonosított barna medve genotípusa nem egyezik sem a vér-, sem a szőrmintákéval, így újabb egyedet vagy egyedeket sikerült azonosítani genetikai vizsgálatok segítségével.

## AGGTELEKI NEMZETI PARK IGAZGATÓSÁG

Cím: 3758 Jósvafő, Tengerszem oldal 1.

Tel: +36 48 506 000

E-mail: info.anp@t-online.hu

## BÜKKI NEMZETI PARK IGAZGATÓSÁG

Cím: 3304 Eger, Sánc u. 6.

Tel: +36 36 411 581

Természetvédelmi ügyeleti telefonszám:

+36 30 861 3808 (szabadnapokon

és munkaszüneti napokon 8.00 és 19.00 között)

E-mail: titkarsag@bnpi.hu

## DUNA-IPOLY NEMZETI PARK IGAZGATÓSÁG

Cím: 1121 Budapest, Költő u. 21.

Tel: +36 1 391 4610

E-mail: dinpi@dinpi.hu

## WWF MAGYARORSZÁG ALAPÍTVÁNY

Cím: 1141 Budapest, Álmos vezér útja 69/A

Tel: +36 1 214 5554

E-mail: panda@wwf.hu

## NEMZETI AGRÁRKUTATÁSI ÉS INNOVÁCIÓS KÖZPONT, MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGIAI KUTATÓINTÉZET, GENOMIKAI FŐOSZTÁLY, ALKALMAZOTT VAD ÉS HASZONÁLLAT GENOMIKAI CSOPORT

Cím: 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

Telefon: +36 28 526 100

E-mail: titkarsag@naik.hu

