



Záverečná správa projektu za rok 2013

Doba riešenia	júl 2013 – január 2014
Registračné číslo projektu	8/2013
Dátum prijatia správy na VVČ (vyplní IPA)	

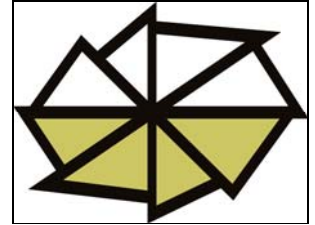
Názov projektu	Štúdium genetickej diverzity a diferenciácie muflonej zveri na Slovensku
-----------------------	--

Vedúci projektu

Priezvisko, meno, tituly: Bakan, Jana, Ing., PhD.	Potvrdzujem správnosť údajov v správe
Telefónne číslo a e-mail: 045/5206255, jana.bakan@tuzvo.sk Dátum a podpis vedúceho projektu:

Spoluriešitelia

--



Výsledky riešenia projektu

- spôsob, metódy a priebeh riešenia
- dosiahnuté výsledky a porovnanie s cieľmi projektu
- uplatnenie výsledkov a ich prínos v riešenej problematike



a.) Spôsob, metódy a priebeh riešenia

Na zistenie miery genetickej diverzity a diferenciácie slovenských populácií muflóna lesného (*Ovis orientalis musimon*) bolo v poľovných sezónach 2013 a 2014 zozbieraných 113 vzoriek tkaniva z muflónnej zveri a na porovnanie 6 ovčích vzoriek tkaniva. Tkanivá boli vyizolované modifikovanou metódou CTAB (DOYLE & DOYLE 1987), ktorá bola ďalej modifikovaná pre použitie na extrakciu DNA zo živočíchov (OLIVEIRA *et al.* 2007). Na amplifikáciu malo byť použitých 18 variabilných nukleárných mikrosatelitných markérov. Tri mikrosatelity bolo potrebné vylúčiť, pre výskyt nešpecifických produktov. DNA bola amplifikovaná pomocou Quiagen Multiplex Mix (Qiagen). Amplifikácia prebiehala v cykléroch PTC200 (MJ Research), T personal (Biometra), GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), iQ5 real-time PCR detection system (Bio-Rad). PCR produkty boli analyzované pomocou automatického kapilárneho genetického analyzátoru ABI 3130® (Applied Biosystems, USA), ktorý pri fragmentačnej analýze využíval fluorescenčne značené primery. Vyhodnotením zaznamenaných dát bol vygenerovaný hrubý záznam v podobe grafu. Získané výsledky boli vyhodnotené pomocou softvéru GeneMapper verzia 4.0 (Applied Biosystems), ktorý je súčasťou genetického analyzátoru. Výstupom boli genotypy jednotlivých vzoriek v grafickom zobrazení. Z programu GeneMapper bola exportovaná genotypová tabuľka, ktorá bola upravená do tvarov, ktoré akceptujú ostatné genetické počítačové programy a bola vyhodnotená *F*-štatistika, Bayesianská zhukovacia metóda.

b.) Dosiahnuté výsledky a porovnanie s cieľmi projektu

Cieľom štúdie bolo stanovenie miery genetickej diverzity populácií muflóna lesného (*Ovis orientalis musimon*) a určenie miery genetickej diferenciácie medzi slovenskými populáciami muflóna lesného (*Ovis orientalis musimon*). Ďalším cieľom bolo zistiť, či muflónia zver na Slovensku vykazuje známky populačného bottlenecku.

Základné charakteristiky nukleárných mikrosatelitov u skúmanej muflónnej populácie boli zisťované v programe FSTAT 2.9.3. (GOUDET 1995). Získané výsledky, ako počet alel v populácii cez všetky lokusy, bázičný rozsah lokusov, pozorovaná heterozygotnosť H_o a index fikácie F_{IS} sú uvedené v tabuľke 1. Celkovo bolo identifikovaných 100 alel na preskúmaných 119 jedincoch, z toho 113 muflónov a 6 oviec domácich.

Možný efekt demografických bottleneckov bol testovaný programom BOTTLENECK 1.2 (COURNET & LUIKART 1996). Grafická metóda MODE-SHIFT pozostáva zo zoskupenia alel polymorfných lokusov (minimálne 5 lokusov) do tzv. tried alelických frekvencií, kde 0–0,100 je trieda s nízkou alelickou frekvenciou a trieda 0,901–1,000 má vysokú alelickú frekvenciu. Grafická metóda vyhodnotí, že sa v skúmanej populácii vyskytol bottleneck, ak zaznamená menej alel nižšej frekvencie v jednej alebo viacerých stredných triedach alelických frekvencií (LUIKART *et al.* 1998). U muflónov bol potvrdený nedávny bottleneck.

Genetická diferenciácia populácií bola hodnotená na základe modelového prístupu procedúr STRUCTURE verzia 2.2.1 (PRITCHARD *et al.* 2003). Vývoj logaritmu sumárnej pravdepodobnosti (*log likelihood*) a parametra ΔK (EVANNO *et al.* 2005) ukázal počet skupín 3 (obrázky č.2 a č.3).

Ak nestačí predloha, použite kópiu tejto strany.



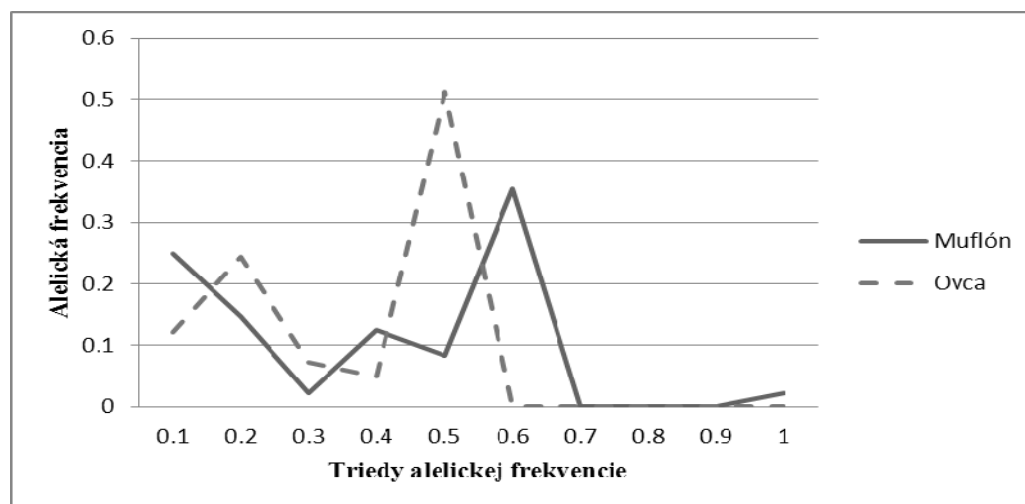
Výsledky riešenia projektu (pokračovanie)

Tab. 1 Charakteristiky nukleárných mikrosatelitov u skúmanej muflónovej populácii

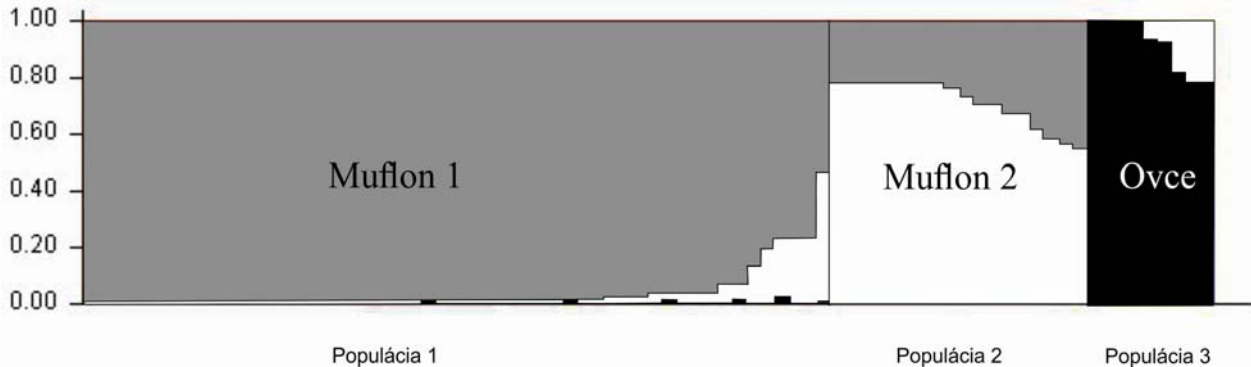
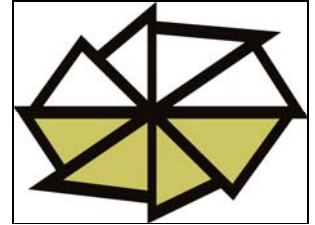
Lokus	Muflón lesný (113) (<i>Ovis orientalis musimon</i>)				Ovca domáca (6) (<i>Ovis aries</i>)			
	Počet alel	Rozsah (bp)	H_o	F_{IS}	Počet alel	Rozsah (bp)	H_o	F_{IS}
BM4513 !	13	135–171	0.876	-0.012	6	145–171	0.667	0.231*
BMS119 \$\$	1	121	Mono morfný	–	1	121	Mono morfný	–
□LST011 %	5	279–295	0.375	-0.077*	4	279–293	0.833	-0.220*
INRA063 †	5	141–155	0.300	0.032*	7	147–167	0.833	0.057*
INRA132 †	3	177–185	0.319	0.174*	4	171–179	1	-0.539*
MAF70 ¶	7	141–169	0.411	0.127*	5	141–155	1	-0.225*
OarCP49 !!	5	91–103	0.402	-0.077*	7	83–105	0.833	0.074□
OarFCB304 ●	8	149–181	0.655	0.123*	4	163–179	1	-0.463*
RM188 #	4	117–141	0.545	0.096*	4	129–141	0.667	0.149*
Roe1 ‡	5	135–151	0.505	0.173*	4	135–147	0.500	0.318*
RT27 \$	3	149–155	0.487	0.230*	4	149–155	0.667	0.070*
RT30 \$	1	175	Mono morfný	–	1	175	Mono morfný	–
TCRVB6	5	227–257	0.613	0.089*	4	227–257	1	-0.539*
TGLA53 Σ	5	145–161	0.583	0.063*	5	141–157	0.667	-0.177*
TGLA94 §	3	121–133	0.575	-0.084*	1	121	Mono morfný	–

* hladina významnosti $P < 95\%$

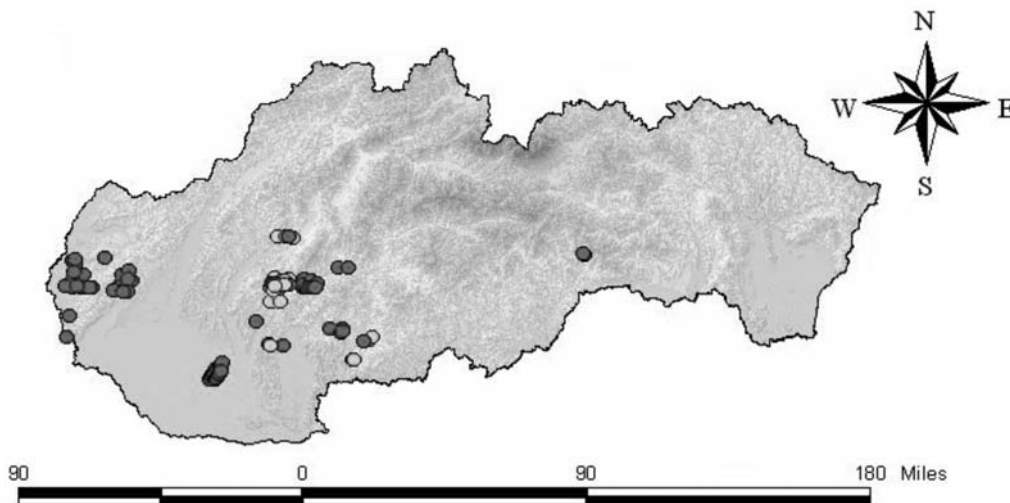
¶ Buschnan and Crawford (B) 1992, § Georges and Massey 1992, ● Buschnan and Crawford (A) 1993, # Barendse 1994, ! Bishop 1994, † Vaiman 1994, !! Ede 1995, % Kemp 1995, \$\$ Stone 1995, \$ Wilson 1997, ‡ Fickel and Reinsch 2000, Σ Slate 1998



Obr. 1 Vizualizovaný MODE-SHIFT, jeden z ukazovateľov populačného bottlenecku



Obr. 2 Podiel jednotlivých genofondov určených STRUCTURE



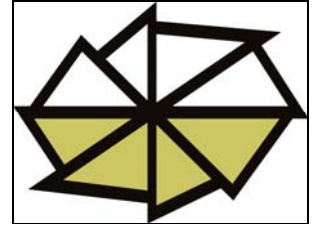
Obr. 3 Miesta zberu vzoriek muflóna lesného na Slovensku a ich rozdelenie do dvoch genetických skupín, na základe procedúry STRUCTURE. Legenda: Tmavé kruhy–muflón 1; svetlé kruhy–muflón 2.

c.) Uplatnenie výsledkov a ich prínos v riešenej problematike

Z použitých 15 nukleárných mikrosatelitných markérov boli 2 monomorfné, t.j. na danom lokuse sa vyskytla len jedna alela. Pozorovaná heterozygotnosť (H_o) sa pohybovala v rozhraní od 0,300 po 0,876 s priemernou hodnotou 0,511. Index fixácie (F_{IS}) varioval od -0,084 po 0,230. Bola zistená kladná priemerná hodnota (0,066), čo znamená nadbytok homozygotov v populácii. Jedna z možných príčin je genetický drift, konkrétne fixácia alel. To znamená, že frekvencia určitej alely rastie, kým frekvencia ostatných alel klesá. Ďalší jeden z najčastejších mechanizmov vyvolávajúci genetický drift je efekt zhardlenia, resp. bottleneck. Naše výsledky potvrdzujú, že u slovenskej muflónovej populácii nedávno prebehol bottleneck.

Na území Slovenska boli zistené dve odlišné genetické skupiny muflónovej zveri, čo potvrdzuje historické pramene. Tieto pramene opisujú dovezenie muflónovej zveri v 60-tych rokoch 19. storočia do dvoch lokalít. Prvý tzv. „nitriansky alebo gýmešský kmeň“, bol dovezený grófom Forgáčom zo Sardínie a Korziky do zverničky v Jelenci. V roku 1883 vypustili do voľnej prírody približne 150 jedincov. Druhý „žinkovský kmeň“ bol dovezený v roku 1898 grófom Andráčim do Betliara. Po sérii zazverovaní českých, moravských aj slovenských revírov sa muflón vyviezol z Oponíc pri Topoľčanoch do Maďarska. Neskôr nastali komplikácie so zušľachtovaním a prevodným „vyhladozácim“ krížením (Hell et al. 1996), čo sa objavilo aj na kvalite trofejovej zveri. V budúcnosti bude potrebné doplniť a porovnať populácie muflónov aj z iných krajín.

Treťou zistenou genetickou skupinou, boli domáce ovce. V súčasnej populačnej štruktúre muflónov sa však nepotvrdila ich prítomnosť, no s určitosťou sa to dá zistiť len sekvenovaním mitochondriálnej DNA.



Zoznam výstupov, ktoré vznikli na základe výsledkov projektu

- a) publikované výstupy
- b) zoznam výstupov odovzdaných do tlače v roku 2013
- c) iné výstupy

Publikačnú činnosť vykázat' v súlade s Organizačnou smernicou č. 7/2013 o bibliografickej registrácii a kategorizácii publikačnej činnosti, umeleckej činnosti a ohlasov na TU vo Zvolene.



c.) iné výstupy

Konferencie:

Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku (2013)

Zoologické dni Ostrava 2014, ČR

Ak nestačí predloha, použite kópiu tejto strany.



Čerpanie bežných výdavkov spojených s riešením výskumného projektu:

Cestovné náhrady	
Konferencie, sympóziá, semináre	
Sieťové odvetvia - Komunikácie	
Literatúra	
Vzorkový materiál	
Drobný hmotný majetok	
Materiál, pracovné nástroje	615.38
Rutinná a štandardná údržba	
Mzdové náklady (max. 15 %)	
Dohody o vykonaní práce (max. 10 %)	
Spolu	

Rozpis čerpania pridelených finančných prostriedkov na riešenie projektu:

1. Materiál, pracovné nástroje **615,38 eur**, z toho

- Liz orange, size standard 332,00 eur
- Pipetové špičky s filtrom 130,01 eur
- Pipetové špičky biele (modré) 9,96 eur
- Pipetové špičky s filtrom 57,36 eur
- Pipetové špičky s filtrom 86,04 eur

Ak nestačí predloha, použite kópiu tejto strany.

IPA TUZVO

Interná projektová agentúra TUZVO

Technická univerzita vo Zvolene
Referát vedeckovýskumnej činnosti
T.G. Masaryka 24, 960 53 Zvolen, Slovensko
tel: 045/5206 416, <http://www.tuzvo.sk>



<p>Názov a adresa pracoviska:</p> <p>TUZVO KF, LF T.G. Masaryka 24 960 53 Zvolen</p>	<p>Vyjadrenie fakulty, resp. org. súčasť TUZVO (prodekan pre VVČ, resp. ním poverený zástupca, riaditeľ org. súčasť)</p> <p>.....</p> <p>Dátum a podpis:</p>
--	--