

# SZAKDOLGOZAT

Szives András László

2022.

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM  
ÁLLATTENYÉSZTÉSI, TAKARMÁNYOZÁSTANI ÉS LABORÁLLAT-  
TUDOMÁNYI TANSZÉK

**Igazságügyi célú molekuláris genetikai vizsgálatok a kutyák és farkasok  
elkülönítésére polimorf markerek alapján**

Szakedolgozat

Készítette: Szives András László

III. évfolyam, Biológia BSc hallgató

Témavezető: Dr. Zenke Petra

Tudományos főmunkatárs

2022.

# Tartalomjegyzék

Idegen szavak és rövidítések jegyzéke .....	4
1.Bevezetés.....	5
1.1. Farkasok elterjedése.....	5
1.2. A farkasok domesztikációja és a hibridizáció kérdése.....	6
1.3. A taxonómiai- és hibridazonosításban alkalmazott markerek.....	7
1.3.1. Megkülönböztetés morfológia alapján.....	7
1.3.2. Uniparentális markerek.....	8
1.3.3. Biparentális markerek .....	9
1.4. Genetikai vizsgálatok a kutyák és farkasok elkülönítésére .....	9
1.5. Igazságügyi vadvilág genetica .....	11
1.6. Farkasok érintettsége törvényszéki esetekben .....	12
1.6.1 Állattámadás és gazdasági károkozás.....	12
1.6.2. Orvvadászat és illegális kereskedelem.....	13
1.6.3. A magyar farkasállománnyal kapcsolatos esetek .....	14
2. Célkitűzés .....	15
3.Anyag és módszer .....	15
3.1Mintagyűjtés .....	15
3.1.1Elővizsgálatok, DNS izolálás és kvantifikálás .....	18
3.2.DNS markerek PCR amplifikálása, detektálása és kiértékelése .....	18
3.2.1.Terepről gyűjtött minták előzetes tesztelése .....	18
3.2.2.Mitokondriális KR vizsgálatok, elemzések .....	19
3.2.3. STR vizsgálatok és elemzések.....	19
3.2.4.Y-kromoszómás STR vizsgálatok .....	20
3.2.5. Mitokondriális KR elemzések .....	20
3.2.5.STR elemzések .....	21
3.2.6 Minták előkészítése a vizsgálatokhoz.....	21
4.Eredmények .....	23
4.1.DNS markerek PCR amplifikálása és kimutatása.....	23
4.1.1.Kétmarkeres előtesztelések eredménye .....	23
4.1.2.Mitokondriális vizsgálatok eredménye.....	23
4.1.3.Biparentális mikroszatellita vizsgálatok eredménye .....	23
4.1.4.Y-kromoszómás STR vizsgálatok eredménye.....	24
4.2.Statisztikai elemzések eredménye .....	24
4.2.1.Mitokondriális haplotípusok csoportosítása .....	24

<b>4.2.2.Mikroszatellita allél elemzések eredménye .....</b>	<b>27</b>
<b>5.Diskusszió .....</b>	<b>28</b>
<b>6. Összefoglalás .....</b>	<b>32</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>34</b>
<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>36</b>
<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>44</b>

## **Idegen szavak és rövidítések jegyzéke**

ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning

ÁTE: Állatorvostudományi Egyetem

bp: bázispár

CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

EVMA: Európa Vadvilágának Megmentéséért Alapítvány

HV (I, II): hipervariábilis régió (I, illetve II. szakasza)

indel: inszerció/delécio

ISAG: International Society for Animal Genetics – Nemzetközi Állatgenetikai Társaság

K: klaszter, csoport

KR: kontroll régió

LnP(D): az adatok valószínűségének természetes alapú logaritmus

MCMC: Markov Chain Monte Carlo – Markov lánc Monte Carlo

mp: másodperc

mtDNS: mitokondriális DNS

MTM: Magyar Természettudományi Múzeum

PCR: Polymerase Chain Reaction – polimeráz láncreakció

PopART: Population Analysis with Reticulate Trees

SNP: Single Nucleotide Polymorphism – egynukleotidos polimorfizmus, pontmutáció

STR: Short Tandem Repeat – rövid tandem ismétlődés

VUW: Veterinärmedizinische Universität Wien – Bécsi Állatorvostudományi Egyetem

# 1.Bevezetés

## 1.1. Farkasok elterjedése

Magas adaptációs képességének és nagy mozgékonyágának köszönhetően a szürke farkas (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) hatalmas területeket képes bejárni és meghódítani. Ennek köszönhetően a taxon az északi féltekének szinte minden életközösségében megtelepedett [1].

Mielőtt a szürke farkas jelenkori elterjedését ismertetném, szeretném röviden felvázolni, hogyan jutott el és hódította meg a *Canis* nemzetség Euráziát, és hogyan alakult ki a szürke farkas. Egészen a késő miocénig a csupán az Észak-Amerikai kontinensen volt jelen a nemzetség [2], majd onnan a késő neogénben elkezdtek átvándorolni Euráziába [3, 4]. A *Canis* nemzetség eurázsiai elterjedésében körülbelül 2,6 millió évvel ezelőtt történt egy hirtelen, robbanásszerű expanzió, amit Azzaroli „wolf event” -nek nevezett el és írt le először [5]. Az esemény következtében ez a taxon egészen Nyugat-Európáig eljutott, és nagy adaptációs képességüknek köszönhetően a nemzetség jelentős diverzifikáción esett át, mely a fosszilis leletek alapján igazolt [2, 5, 6, 7]. A diverzifikáció miatt – Észak-Amerikában, Ázsiában és Európában – megjelentek a modern farkasok köztük a szürke farkas is [2, 3, 6, 7]. Mivel legnagyobb testű tagja a *Canis* nemzetségenk, és nagy ökológiai plaszticitással bír, a szürke farkas (a továbbiakban az egyszerűség kedvéért farkasként említem) könnyedén benépesítette az egész északi féltekét a negyedidőszak végére, és számos alfajt hozott létre a különböző területi adottságokhoz alkalmazkodva. [6, 7].

A farkasok az elmúlt kétszáz évben a vadászatuknak és az egyre növekvő emberi térhódításnak köszönhetően drasztikusan visszaszorultak, eltűntek területeik nagy részéről, ez főleg igaz az európai területeikre [8, 9]. Az 1900-as évek elején az európai farkaspopuláció erősen lecsökkent, csupán Nyugat-Európán belül Olaszországban és az Ibériai-félszigeten, továbbá a Balkánon és más Kelet-Európai területeken maradtak fenn populációk [10]. A faj ma már CITES listán szerepel, mely védett státusz és a prédaállataik expanziója a megmaradt populációk stabilizálódásához, és egykori területek visszahódításának kezdetéhez vezetett [10, 11]. Európán belül a farkasok – kilenc állam kivételével – védettek vagy fokozottan védettek, így a kontinensen megközelítőleg 12000-13000 példány él, melyek bár lassú, de növekvő tendenciát mutató európai populációt alkotnak [10,12].

Hazánkban – ahogy Európa többi államában – a 19. század végére a farkasállomány erősen megcsappant, majd közel 100 év után egy farkast észleltek az Aggteleki Nemzeti Parkban, majd az elkövetkező években újra történtek farkas észlelések [13, 14]. A 20.század végétől a hazai farkasok száma lassan emelkedni kezdett és 1993-ban megkapták a védett

státuszt, amit 2001-ben a fokozottan védett státusz követett [12, 13]. Az Aggteleki Nemzeti Park után a Bükk Nemzeti Park területén is megjelentek a farkasok, mely park területén 2010-től egy állandó populáció van jelen [13]. Jelenleg hazánkban 50-60 példányra becsülik a farkas állományt, mely még ugyan kicsi, de stabil és növekedőképes [12, 15].

## 1.2. A farkasok domesztikációja és a hibridizáció kérdése

A történelem során az ember sok állat és növényfajt házasított, de mind közül legkorábban a kutyát [16], bár domesztikációjának kezdetének helye és ideje vitatott. A feltárt leletek alapján feltételezhetően már 30-35 ezer évvel ezelőtt elkezdődhetett az emberek és farkasok között kialakulni egy kapcsolat, egy proto-domesztikáció, ezt a feltételezést egy Belgiumban, a Goyet-i barlangban talált kutya koponya támasztja alá, amit 31700 évesnek datáltak [17], bár ekkor még nem volt elterjedt az emberi törzseknél a farkas szelídítése [18]. Az igazi domesztikációt 14-15 ezer évvel ezelőttre datálják, és több helyszínt is hozzárendelnek az eseményhez; (i) Távol-Kelet, (ii) Közel-Kelet, (iii) emellett 12 ezer évvel ezelőtt Észak-Amerikában, de egyre elfogadottabbá válik a Távol-Keleti kiindulása a domesztikációnak [18, 19, 20]. A házasítás eredményeként született meg a *Canis lupus familiaris*, mely az általánosan elfogadott nézet szerint a farkas egyik alfajának tekintendő [18].

Hibridizáció az a jelenség, amikor két közeli rokonságban álló taxon (faj, alfaj) kereszteződik, ami főleg akkor következik be természetes körülmények között, ha a két taxon areáinak határai közel vannak egymáshoz, illetve azok átfedik egymást. A kereszteződésből született hibridek lehetnek fertilibek (pl. farkas-kutya hibrid) vagy sterilek (pl. öszvér), és mindkét taxon genetikai állományát hordozzák. Alap esetben a hibridizáció, ha természetes körülmények között történik, akkor szignifikáns szerepet tölthet be új fajok keletkezésében, illetve fenntartja a genetikai diverzitást [21]. Antropogén hatásokra a domesztikáció során kialakult allélok introgressziója a vad taxonokba viszont veszélyezteti a genetikai integritást [22,23], továbbá növekedni fog a homogenitás, ami az adott faj genetikai úton való kihalásához vezethet [24]. A genetikai állomány leromlásán kívül előfordulhat, hogy a hibridek valamely szülő taxont kiszorítják az adott területről [25].

A hibridizáció jelensége főleg igaz a *Canis* nemzetség tagjaira, ezek ugyanis képesek fertilis utódokat létrehozni kereszteződés során [26, 27, 28]. Ahogy azt fentebb is említettem, az antropogén allélok introgressziója „beszennyezheti” a farkasok génállományát a hibridek révén. Ennek a kiküszöbölésére különböző stratégiákat találtak ki (például a hibridek likvidálása a populációból). A farkasok és kutyák kereszteződése sok tényezőtől függ:

befolyásolja a farkasok egyedszáma, a kóbor kutyák jelenléte és a két taxon területének átfedtségének mértéke [29, 30, 31]. Európában a hibridizáció mértéke területenként változó. Vannak területek, ahol a hibridizáció mértéke alacsony, ritka jelenség, ilyen területek a Skandináv térség, Ibériai-félsziget, és az Appennini-félsziget, ezzel szemben a kontinens Észak- (Észtország, Lettország) és dél-keleti (Balkán) térségeiben erősebb a két taxon kereszteződésének mértéke [32, 33, 34, 35, 36, 37]. Az utóbbi területeken jelentkező nagyobb szintű hibridizációt a farkasok védett státuszának hiánya okozza, ami lehetőséget ad a vadászatokra, emiatt kisebbek a populációk, és gyakrabban találkozhatnak kutyákkal [37].

Ám nem csak a kutya tartók gondatlansága miatt történhet hibridizáció, hanem szándékosan is keresztezhetik a farkasokat kutyákkal örkkutyák kitenyésztése céljából, mint például a csehszlovák farkaskutyát [38, 39].

Korábban taglaltam, hogy milyen negatív hatást jelenthetnek a hibridek valamely szülő taxonra nézve, most viszont röviden azt szeretném felvázolni, hogy az emberre milyen hatást gyakorolhatnak. Hibridizáció során megváltozhat az utód morfológiája, fiziológiája és viselkedése, mely akár úgy nyilvánulhat meg, hogy a hibrid kevésbé tart az embertől, és annak települései közelébe merészkedik – és szinantrop magatartása miatt akár tartósan települések közelében tartózkodhatnak –, a településen levadászható haszonállatokból élve [40, 41].

### **1.3. A taxonómiai- és hibridazonosításban alkalmazott markerek**

#### **1.3.1. Megkülönböztetés morfológia alapján**

Bár az esetek túlnyomó részében nem lehet küllem alapján beazonosítani a hibrideket, még is van négy morfológiai bélyeg, ami árulkodó jelként szolgálhat az identifikálásban [42]. Ezen bélyegek közül a leglátványosabb az atipikus bunda, melynek színe, mintázata, és szőr formája alapján már távolabbról is kiszűrhető egy hibrid [43]. A másik három informatív bélyegek: (i) a testi arányok, (ii) farkaskarom megléte, végül (iii) a karom színe, melyeket már csak közelebbről, egy elhullott vagy elfogott példányon lehet megvizsgálni [42, 43, 44]. Az említett bélyegek tanulmányozása bár egy jó kiindulási alapot adhat, nincs bizonyítva olyan mértékű kapcsolat a morfológiai és genetikai bélyegek között, hogy genetikai vizsgálatok nélkül kijelenthessük az adott példányról, hogy hibrid.

Egy területen tartózkodó populációk monitorozására a kamera-csapda egy alkalmas módszer, és a lencsevégre kapott példányokról az ivar meghatározásán kívül – amit viselkedésmintázatok alapján lehet megállapítani –, a fentebb említett külső bélyegek alapján akár meghatározható egy feltételezett hibrid példányszám is [45, 46].



Általában, mikor két fajt, illetve azok hibridjét kell megkülönböztetni (pl. igazságügyi eseteknél), nem feltétlen állnak rendelkezésre morfológiai adatok, amik a taxon meghatározásához kiindulópontként szolgálhatnak. Azok megerősítése céljából megbízható eredményekért genetikai vizsgálatokhoz kell fordulni. Taxonok elkülönítésére uni- és/vagy biparentális markereket lehet alkalmazni [36, 47].

### 1.3.2. Uniparentális markerek

Uniparentális genetikai markerek közé tartozik a mitokondriális DNS (mtDNS) és az ivari Y kromoszóma. Azért hívják ezeket a markereket uniparentálisnak (egy szülő), mert csak az egyik szülő örökíti tovább, mtDNS anyai ágon, Y kromoszóma apai ágon öröklődik. Mivel csak az egyik szülő örökíti, így nem történik rekombináció, melynek hiánya olyan tulajdonsággal ruházza fel ezeket a genetikai információkat, ami lekövethetővé teszi a fajspecifikus allélek átadódását. Ezzel elősegítve közeli rokonságban álló fajok különböző populációi közötti kapcsolatainak feltárását, így kutyák és farkasok esetében is [48].

A sejtekben nagy mennyiségben jelenlevő mitokondriumok miatt (100-1000) és a bennük lévő genom kópiaszám miatt (9-12) minimális mennyiségű, degradált mintákból is elegendő DNS-t lehet kivonni a vizsgálatokhoz. Ezen felül a nukleáris genommal ellentétben, a mitokondriumot és annak cirkuláris genomját egy fehérjeburok védi, ami még jobban késlelteti a mtDNS fragmentálódását, degradálódását [49]. A mtDNS kontroll régiójának (KR) hipervariábilis régiói (HVI és HVII) a nukleáris genomhoz képest 10-szer nagyobb mutációs rátával rendelkeznek, emiatt nagymértékű polimorfizmus jellemző ezekre a területekre, ezért populáció-, evolúció- és igazságügyi genetikai kutatásokhoz alkalmasak [50]. A KR-ban leggyakrabban bekövetkező mutációk: szubsztitúciós, inszerció/delécio típusúak, amik, ha pontmutáció szintjén történnek, akkor SNP (Single Nucleotide Polymorphism) módszerekkel vizsgálhatóak és kiértékelhetőek [51]. Domesztikáció során, a kutyák beltenyésztése miatt, bennük gyakran azonos mutációk detektálhatók azonos lokuszokban, emiatt a csökkent genetikai diverzitás miatt több egyedet is hozzárendelhetünk egy haplotípushoz [52], míg a farkasokban megmaradt változatosság miatt náluk diverzebb képet kapunk a mtDNS mutációiról [53].

Ahogy azt már fentebb említettem, az Y kromoszóma is uniparentális tulajdonságokkal bír, így a mtDNS-hez hasonlóan öröklődési mechanizmusok felderítésére, fajok és egyedek meghatározására, elkülönítésére alkalmazhatják. Az anyai öröklődést monitorozó mtDNS vizsgálatok kiegészítésére alkalmas az apai ágon öröklődő Y kromoszóma, ezzel egy teljesebb képet adva hibridek azonosításában, vagy rokoni kapcsolatok feltárásában [54]. Uniparentális marker lévén, az Y kromoszómára nem jellemző a rekombinálódás, ezen felül egyrészt nagy

mérete miatt, másrészt, mert ezen gonoszóma nagy része nem kódoló régiókból áll, szinte kifogyhatatlan forrása a polimorfizmusoknak, így kifejezetten alkalmas bizonyos populáció genetikai analízisekhez [54].

### **1.3.3. Biparentális markerek**

Az uniparentális markerekkel ellentétben a biparentális genetikai markereket mind két szülő – mendeli öröklődésnek megfelelően – tovább örökíti. Megtalálhatóak egyaránt kódoló és nem kódoló régiókban.

Bűnügyi eseteknél, a nyomozás során az elkövető identifikálásához, annak genetikai profilját kell meghatározni, amihez a helyszínen talált biológiai mintákból (vér, nyál, szőr stb.) nyernek ki DNS-t. A vizsgálatok STR-ek (Short Tandem Repeats) tipizálásán alapulnak, ezek néhány bázispárnyi (2-6 bp) szekvencia tandemszerű ismétlődéseiből álló mikroszatelliták. Az ismétlődések száma nagyon változatos lehet nem csak rokon fajok között, de egy fajon belül egyedek között is, így egyedi DNS profilt lehet kinyerni ezek használatával. Biparentális markerek lévén mindkét a szülő tovább örökíti a rá jellemző alléleket az utódba, ezért rokonsági viszonyok feltárására is alkalmasak az STR-ek [55].

Igazságügyi alkalmazás mellett a mikroszatellitákat, nagy változatosságuk és megbízható tipizálásuk miatt, fajok és alfajok elkülönítésére is használják. Hogy néhány példát említsek; 2015-ben egy 28 mikroszatellitából álló marker készletet sikeresen alkalmaztak három zebra faj (*Equus quagga*, *E. grevyi*, *E. zebra*), illetve hibridjeik elkülönítésében [56], 2019-ben az ISAG (International Society for Animal Genetics) által ajánlott 13 STR-t használták a ló és szamár hibridjeinek azonosítására [57], 2020-ban kifejlesztettek, és publikáltak egy 20 STR-t és SNP vizsgálatokat magába foglaló módszert a vaddisznók (*Sus scrofa*) és a házi sertések (*S. s. domesticus*), valamint hibridjeik elkülönítésére [58]. Magyarországon – hogy hazai példát is említsek – két (magyarországi, romániai) aranyakál (*Canis aureus*) populáció genetikai elkülönítésére 22 STR-t alkalmaztak sikeresen 2020-ban [59]. A fajok, alfajok elkülönítése az élelmiszeriparban is fontos kérdés (pl. házi sertésből vagy vaddisznóból származik a húskészítmény), melynél az inzerciós-deléciós (indel) markerek bevétele a mikroszatellita vizsgálatokba nyomon követhetőbbé teszi a húskészítmények összetételét [60].

## **1.4. Genetikai vizsgálatok a kutyák és farkasok elkülönítésére**

A dolgozatomban vizsgált két taxon genetikai tanulmányozásait több mint két évtizede kezdték meg filogenetikai vizsgálatokkal, ami még csak a mtDNS KR-t célozta [48]. Nem

sokkal később filogeográfiai, igazságügyi és hibridizáció témákban is elkezdtek további genetikai teszteleket taxon- és egyed azonosítás céljából [35, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67]. Ahogy már fentebb említettem, mint uniparentlis marker, a mtDNS csak anyai ágon öröklődik, így önmagában nem alkalmas hibridizáció detektálásában, ezen kívül a KR vizsgálata mégis hasznos módszernek bizonyult más kutatásokban világszerte [14, 68, 69, 70]. A mitokondriumot célzó vizsgálatok mellett, 2001-ben elkezdtek alkalmazni az Y-kromoszómás markereket, amiket először a Skandináv térség farkasainak haplotipizálására használtak, majd kutyákon is elvégeztek ilyen irányú tanulmányozást, továbbá mtDNS-el együtt hibridizáció felmérését célzó kutatásokban is használták [25, 54, 71]. Idővel a kutatók áttértek a biparentális markerek használatára, melyek önmagukban is megbízható eredménnyel képesek fajokat, alfajokat és hibridjeiket elkülöníteni, továbbá uniparentális markerek bevonásával a korábbiaknál megbízhatóbb és pontosabb eredményt adó módszereket lehet kifejleszteni, melyek alkalmazása manapság is javasolt a farkasok és kutyák közötti hibridizáció vizsgálatában [1, 10, 24, 35, 36, 37, 38, 43, 47, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88].

Közel 10 évvel ezelőtt Amerikában elkezdtek felmérni a genom szinten előforduló SNP-eket, amiket a kutyák farkasokból történő domesztikáció igazolására használtak, ehhez hasonlóan Európában is folytatnak SNP alapú vizsgálatokat a farkasok genetikai diverzitásának felmérésére [89, 90, 91]. Ezen kívül ezt a vizsgálati módszert alkalmazzák a csehszlovák farkaskutya genetikai összetételének igazolására, a domesztikáció indukált génmutációk feltárására [92], valamint hibridek azonosítására [39, 93]. Hogy egy példát említsek, a közelmúltban, a farkasok és kutyák igazságügyi célú megkülönböztetésére 12 ún. ősi informatív (ancestral informative) SNP-ből álló panelt hoztak létre és validáltak [9]. Más markerekhez hasonlóan, az SNP-k is összevonhatóak a többi markerrel a módszerek pontosításának növelése érdekében [94, 95].

A pontmutációkon, kisebb szekvenciákon alapuló markerek használata mellett, a genetikai vizsgálatoknak egy új eszköze terjedt el, ami már teljes géneknek szekvencia és kópiaszám különbségein alapszik. Domesztikáció során, a kutyák étvendjében egyre nagyobb helyet foglalt el a szénhidrát, emiatt a szénhidrátok lebontásában és felvételében szerepet játszó fehérjéket kódoló gének aktívabbak bennük, mint a farkasokban. Eddig három, a szénhidrát anyagcserében szerepet játszó génre helyezték a hangsúlyt, ezen gének a; SLC5A1, AMY2B és MGAM. A domesztikáció során ezekben bekövetkezett mutációk alkalmasak a kutyák és farkasok elkülönítésére, például az AMY2B gén kópiaszámát összehasonlítva a két taxonban

kirívó a különbség, mivel farkasokban 2-8 kópia, míg a kutyákban 4-36 kópia van jelen [96, 97].

A géneket tovább vizsgálva – a kópiaszám mellett –, azok szekvenciájában történő néhány bp-s változások is alkalmasak a farkasok, kutyák és hibridjeik azonosítására. Egy génen belül történő rövid szakasz kiesése vagy beépülése az ún. deléciós-inzerciós változás [95]. Kutyákban és farkasok a bunda színét a  $\beta$ -defensin CBD103 gén alakítja ki. A CBD103 szekvenciájában detektált három bp-s deléció a farkasokban egy szokatlanul sötét bundaszínt eredményez. Mivel nem jellemző a farkasokra a sötét bunda, ezért a közel fekete színű egyedek feltételezhetően hibridek [74, 88]. Egy másik, a kutyafélék bunda színét befolyásoló (melanogenezis) gén a KITLG gén (KIT ligand), amiben egy öt bp-s deléciót detektáltak. A deléció okozta szekvencia beli eltéréseken kívül, a szénhidrát anyagcserében részt vevő fehérjéket kódoló génekhez hasonlóan, a KITLG a kópiaszámában is eltér a két taxonban, emiatt egy hasznos eszköze a farkasok és kutyák elkülönítését végző kutatásoknak [86, 94, 98]. Mind a  $\beta$ -defensin CBD103 génben, mind a KITLG génben fellelt deléciók alkalmasak a *Canis lupus* és alfaja, *Canis lupus familiaris* elkülönítésére, és hibridjeik kimutatására, de mivel a vizsgálatokhoz intakt génre van szükség, nem alkalmazhatóak az igazságügyi nyomozásokban.

## 1.5. Igazságügyi vadvilág genetikája

A vadvilágot érintő igazságügyi vizsgálatok számos diszciplínát magába foglalnak – pl. genetikája, morfológia, állatorvosi tudományok stb. –, melyek együttes alkalmazásával az állati eredetű nyomot, mint bizonyítékot felhasználva nyomozásokat végezhetnek jogsértésekben, úgymint az illegális kereskedelem, orvvadászat stb. Humán kriminológiában régóta alkalmazzák a genetikai vizsgálatokat, és a közelmúltban már elkezdték nem-humán alkalmazását is. Bár humán eseteknél a felmerülő kérdés, hogy ki volt az elkövető, áldozat, és nem-humán eseteknél, hogy egyáltalán történt-e bűncselekmény, a vizsgálatokhoz felhasznált eszközök, módszerek hasonlóak. Az egyik leggyakoribb kihívás az igazságügyi genetikában a taxonómiai azonosítás, ami egy kulcsfontosságú lépés a vadvilágot érintő bűncselekmények elleni harc során a védett fajok, illetve azok származékainak azonosítása (pl. orvvadászat, mérgezéses esetek, illegális tartás és kereskedelem), fogyasztóvédelmi és élelmiszerbiztonsági szempontból a termék összetételének meghatározása, állattámadás és gazdasági károkozás esetén pedig az elkövető állat faji (olykor alfaj, fajta) azonosítása szükséges.

Farkasok esetében is már régóta alkalmaznak genetiaki markereket populációk genetikai diverzitásának felméréséhez, és egyedek megkülönböztetéséhez, amik bár alkalmas eszköznek

bizonyultak a konzervációbiológiában, de nem felelnek meg az igazságügyi genetika kritériumainak. Mivel a konzervációbiológiában alkalmazott markerek nem alkalmasak törvényszéki felhasználásra, ezért indokolt annak követelményeinek – amiket jogszabályok, nemzetközi standardok és szakmai ajánlások határoznak meg – megfelelő, validált markerkészlet kifejlesztése adott fajra és adott populációra [99, 100]. Hogy egy példát említsek, elvárás az egyik legszélesebb körben alkalmazott markerek, a mikroszatelliták esetén a tetra-, ill. pentamer ismétlődésű szerkezetet, amitől megbízható genotipizáló eszközzé válnak. Újabb markerek, módszerek validálásánál, négy szempontot kell szem előtt tartani: módszerek, markerek érzékenysége, specificitása, reprodukálhatósága és megbízhatósága [101].

Mindamellett, hogy vadállatokat célzó genetikai vizsgálatok hazánkban is megkezdődtek, törvényszéki – hazai és nemzetközi jogviták rendezésére szolgáló – analízáló módszerek csupán részben állnak a hatóságok, illetve a jogi- vagy természetes személyek rendelkezésére és hazai fajokra nézve az igazságügyi kritériumokat kielégítő genetikai markerek kidolgozatlanok [102, 103, 104, 105].

## **1.6. Farkasok érintettsége törvényszéki esetekben**

### **1.6.1 Állattámadás és gazdasági károkozás**

Az emberi expanzió és a farkasok visszatérése egyre nagyobb területen történő osztozkodáshoz vezet, a szoros szomszédság mind a két fél számára hátrányos. Az erdők pusztításával, települések növekedésével, a farkasok egyre inkább arra kényszerülnek, hogy emberközeli területekre, akár kisebb települések szélére merészkedjenek, és az ott fellelhető háztáji állatokat (pl. baromfik, kutya), tenyésztett nagytestű haszonállatokat vadásszák le [13, 77, 15]. A hagyományos állattartást gyakorló területek – ahol felügyelet nélkül legelnek az állatok – vannak a legjobban kitéve a farkasok pusztításának [106]. A farkasok visszatelepülésével az érintett területeken élő lakosokban félelem támad, mivel nincsenek hozzászokva a nagyragadozók közelségéhez, ami ahhoz vezet, hogy a média a farkasokkal kapcsolatos negatív híreket túlzóan közölheti, akár objektív elemzéseket figyelmen kívül hagyva ezeket az állatokat okolhatja az esetleges károkért [107, 108, 109]. Meg kell említeni azt is, hogy a mai, urbanizálódó világban, egyre kisebb jelentőséget tulajdonítanak a földműveléssel, állattenyésztéssel foglalkozó vidéki területeknek, ezért a helyi gazdák beszámolóit az ember-farkas konfliktusról, hogy felkeltsék magukra a figyelmet, akár túlzóak is lehetnek [107]. Azért kapnak a farkasok ekkora figyelmet, mivel a többi európai nagyragadozóhoz képest gyorsabban kezdték rekolonizálni egykori területeiket. Mindazonáltal,

hogy a farkasok normális körülmények között elkerülik az embert és településeit – mivel nem megszokott számukra az emberi jelenlét –, az új generációkban, akik kisebb települések mellett nőnek fel, habituáció miatt nem lesz félelem az ember iránt, így bátran bemerészkednek majd a helyi emberi község területére [15]. Az ember közelségétől nem tartó farkasok már nem csak a haszonállatokra, hanem az erdőben és településeken tartózkodó emberekre is veszélyt fognak jelenteni [15]. A most felvázolt jövőkép igazából már a jelen, a feltételezéseket egy 2018-ban publikált esettanulmány támasztja alá, ami öt ember elleni farkas támadást foglal össze Lengyelországban. Ebben az esettanulmányban leírt támadásokat fiatal, egy év körüli farkasok követték el, akik településekhez viszonylag közel születtek. A támadások előtt a szóban forgó példányokat falvak közelében, illetve falvak utcáin látták járni. Nowak és munkatársai tanulmányukkal bizonyítják, hogy az újabb farkas generációk egyre kevésbé fognak tartani tőlünk [110]. Bár a hazai farkas populáció kis létszáma miatt még távol áll attól, hogy az emberekre veszélyt jelentsen, haszonállatainkat már rendszeresen tizedelik [15, 111, 112]. Európában máshol is gondot jelentenek az állattenyésztők részére a visszatérő farkasok. Luxemburgba nagyjából 40 év után elkezdtek visszatérni a farkasok, amit Schley és munkatársai bizonyították haszonállatok tetemeiből és a tetemek körüli területekről begyűjtött biológiai mintákon elvégzett genetikai vizsgálatokkal [113].

Azon esetekben, amikor emberi mulasztás miatt kutyák okoznak gazdasági kárt, illetve állattámadást, a kutyatartók a jogi lépéseket és felelősségre vonást igyekeznek elkerülni azzal, hogy az elkövető állatot farkasként írják le. Számos olyan, háziállatot és embert érintő támadásról számoltak be, amikről a nyomozások után kiderült, hogy az elkövető kutya volt [77, 78]. Olaszországban egy farkasnak leírt állat támadott emberre, mely állatról kiderült a DNS tipizálás után, hogy egy helyi őrkutya volt, a leírtakkal ellentétben nem farkas, még csak nem is hibrid. A genetikai analízis eredményét az áldozat is alátámasztotta, aki a kutya védelme miatt hazudott a hatóságoknak, mert meg akarta védeni az állatot a rá váró elaltatástól [78].

### **1.6.2. Orvvadászat és illegális kereskedelem**

Az Interpol felmérései szerint a vadvilágot érintő illegális tevékenységek a második legprofitálabb bűntettek a kábítószer- és fegyverkereskedelem után, melynek évi hasznát húsz milliárd dollárra becsülik [114, 115]. A vadvilággal kapcsolatos jogsértések főleg a hullóok, madarak és emlősök illegális vadászatát és termékeikkel történő kereskedelmet foglalják magukba [116, 117, 118, 119], mely aktivitásokat azért nem sikerült globálisan megfékezni, mert a potenciálisan nagy haszon mellett amúgy is eltörpülnek a relatív alacsony büntetések. [120]. Nem kell egzotikusabb tájakra utaznunk, hogy illegális vadászattal találkozzunk. Az

északi féltekén elterjedt farkas Európa legtöbb országában védett, de az ellenük folytatott orvvadászatok a mai napig gyakran előfordul, és termékeikkel ugyan úgy kereskednek, mint az orrszarvútülökkel [78]. Farkasok elejtésekor a gyanúsítottak védekezhetnek azzal az állítással, hogy a kilőtt példány csak egy farkasra hasonlító kutya, aminek kilövése megengedett, mivel vadgazdálkodási szempontból dúvadnak minősül.

Hogy hatékonyan tudjanak a bűnüldöző szervek reagálni az előbb bemutatott és ehhez hasonló esetre, robosztus és megbízható módszerekre és egy, az érintett területen tartózkodó farkasokból és kutyákból felállított adatbázisra van szükség.

### **1.6.3. A magyar farkasállománnyal kapcsolatos esetek**

Hazánkban, mint kiemelt közösségi jelentőségű őshonos nagyragadozó, a farkas alacsony egyedszáma miatt fokozottan védett, előfordulási területe főleg az Északi-középhegységre korlátozódik, de Dél-Magyarországon is felbukkannak a határon átvándorló egyedek [121, 122]. A farkasok elejtése bűncselekmény, viszont a kóbor kutya az egyik legtöbb gondot okozó állat a vadászterületen, így, ahogy fentebb említettem, dúvadnak minősül. „A vadász a vadállomány védelme érdekében elfoghatja vagy elejtheti a vadat űző vagy a vadat elejtő kutyát... ha a vad sérelme másként nem hárítható el... valamint akár meg is ölheti fertőzés tovább terjedése... vagy másként el nem hárítható támadás megakadályozása céljából a kutyát (vagy a macskát).” Illetve „...ha az állat tulajdonosának felderítésére nincs közvetlen lehetőség.” írja a 1996. évi LV. törvény a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadászatról; 37.§ 4. bekezdése [123]. Hazánkban több esetben is szükséges volt genetikai vizsgálatokat elvégezni a kilőtt állat taxonómiai besorolásához, mivel a vadászok csupán küllem alapján tudják megkülönböztetni a farkast a kutyától.

## 2. Célkitűzés

Magyarországon 2010 óta igazolt az állandó farkaspopuláció, ezért minket is érintenek a korábban leírt konfliktusok. Ahhoz, hogy a hatóságok hatékonyan lépjenek fel gazdasági károkozásnál, illetve illegális vadászat gyanújakor, egy megbízható módszerre és a hazai kutya, farkas populációból alkotott adatbázisra van szükség. Mivel a szóban forgó két taxon és hibridjeik azonosítására nincs hazánkban nemzetközi ajánlásoknak megfelelő marker- és vizsgálati rendszer, így munkám egyik célja új módszertani tesztlések megkezdése volt. A tesztlésekhez uni- (Y-kromoszóma és mtDNS) és biparentális (STR) markereket használtunk, amiket a szakirodalom alapján gyűjtöttünk össze (bűnügyi esetekben használt) és vizsgálatokat végeztünk hazai, illetve környező országból származó farkas és hazai kutya mintákon. A markerek alkalmasságát, érzékenységét és reprodukálhatóságát különböző biológiai mintákon teszteltük. A markerkészlet kifejlesztése mellett a másik célunk egy genetikai adatbázis felállítása volt, amihez a mintákat kutyákból és farkasokból gyűjtöttük. Egy ilyen adatbázis jó alapul szolgál későbbi összehasonlító vizsgálatok során.

## 3. Anyag és módszer

### 3.1 Mintagyűjtés

A dolgozatomhoz a mintákat főképp fogságban tartott (állatkertek, vadasparkok, farkastenyésztők) farkasokból és kutyákból vettük, általában nem invazív módon, az állattartók beleegyezésével. Az Állatorvostudományi Egyetemen kívül a következő intézmények biztosítottak mintákat a dolgozatomhoz: Magyar Természettudományi Múzeum, az Európa Vadvilágának Megmentéséért Alapítvány, a Bécsi Állatorvostudományi Egyetem, Miskolci Állatkert és Kultúrpark, és a Budakeszi Vadaspark. A projektünket így 35 farkas és 35 kutya mintával indítottuk el (1. táblázat).



1. **Ábra** A begyűjtött minták közül a legtöbb esetben bélsár- (A) és szőrmintákat gyűjtöttünk (B), de a MTM jóvoltából bőrmintákat (C) is kaptunk.



Invazív mintavételezést csupán az ÁTE klinikáján egy csehszlovák farkaskutyán végeztünk el nyálminta vételezés keretein belül, továbbá a Gödöllőn tartott farkasokból is így gyűjtöttünk szőrmintákat, amit Horkai Zoltán, EVMA (<https://horkai.com/hu/>) vezetőjének segítségével hajtottunk végre. A többi mintát a kifutókban, az állatok környezetéből (fakéregről, földről és ketreacrácsról) gyűjtöttük be (1. ábra). A szőröket szobahőmérsékleten tároltuk és szállítottuk, míg az ürülékeket körültekintőbben gyűjtöttük, figyelembe véve azok frissességét és állagát, gyűjtés után fagyasztva (-20°C) szállítottuk, illetve tároltuk.

Szőr és ürülékminták mellett az MTM biztosított számunkra bőrmintákat, amiket kikészített farkasbőrökből vettünk roncsolásos mintavétellel, figyelve a károkozás mértékének minimalizálására. A mintavétellel olyan területeket céloztunk meg a bőrön, amik relatíve védve maradtak, emiatt használható mennyiségű és minőségű DNS-t tartalmazhattak.

**1. Táblázat** A genetikai vizsgálatokhoz használt farkas és kutyaminták típusa, származási helye és taxonómiai besorolása. Rövidítések; VUW: Vet. Med. Universitat Wien, MTM: Magyar Természettudományi Múzeum, ÁTE: Állatorvostudományi Egyetem, EVMA: Európa Vadvilaganak Megmentéséért Alapítvány, Bkeszi VP: Budakeszi Vadaspark, Miskolci ÁK: Miskolci Állatkert és Kultúrpark, C.l.: *Canis lupus*

FARKAS				KUTYA			
Minta kod	Minta típus	Származási hely	Alfaj	Minta-kod	Minta típus	Szarm. hely	Fajta
W1	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D1	nyál	ÁTE	Csehszlovák farkaskutya
W2	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D2	DNS	ÁTE	Berni pásztorkutya
W3	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D3	DNS	ATE	Bordeaux-i dog
W4	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D4	DNS	ATE	Golden retriever
W5	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D5	DNS	ATE	Rovidsz. nemet vizsla
W6	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D6	DNS	ATE	Kaukazusi juhaskutya
W7	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D7	DNS	ATE	Am. staffordshire terrier
W8	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D8	DNS	ATE	Sziberiai husky
W9	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D9	DNS	ATE	Dobermann
W10	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D10	DNS	ATE	Puli
W11	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D11	DNS	ATE	Ongol juhaskutya
W12	bor	EVMA	<i>C.l. arctos</i>	D12	DNS	ATE	Napolyi masztif
W13	bor	EVMA	<i>C.l.</i>	D13	DNS	ATE	Komondor
W14	bor	EVMA	<i>C.l.</i>	D14	DNS	ATE	Nemet dog
W15	bor	EVMA	<i>C.l.</i>	D15	DNS	ATE	Labrador retriever
W16	szor	EVMA	<i>C.l.</i>	D16	DNS	ATE	Berni pasztorkutya
W17	belsar	Bkeszi VP	<i>C.l.</i>	D17	DNS	ATE	Mudi
W18	belsar	Bkeszi VP	<i>C.l.</i>	D18	DNS	ATE	Rovidsz. nemet vizsla
W19	szor	Bkeszi VP	<i>C.l.</i>	D19	DNS	ATE	Ir szetter
W20	belsar	Miskolci AK	<i>C.l. italicus</i>	D20	DNS	ATE	Brie-i juhaskutya
W21	belsar	Miskolci AK	<i>C.l.</i>	D21	DNS	ATE	Weimari vizsla
W22	belsar	Miskolci AK	<i>C.l.</i>	D22	DNS	ATE	Nemet dog
W23	belsar	Miskolci AK	<i>C.l.</i>	D23	DNS	ATE	Sarplaninai juhaskutya
W24	belsar	Miskolci AK	<i>C.l.</i>	D24	DNS	ATE	Magyar agar
W25	bor	MTM	<i>C.l.</i>	D25	DNS	ATE	Hovawart
W26	bor	MTM	<i>C.l.</i>	D26	DNS	ATE	Leonbergi
W27	bor	MTM	<i>C.l.</i>	D27	DNS	ATE	Moszkvai orkutya
W28	bor	MTM.	<i>C.l.</i>	D28	DNS	ATE	Hannoveri vereb
W29	szor	Nograd megye	<i>C.l.</i>	D29	DNS	ATE	Sziberiai husky
W30	DNS	VUW	<i>C.l.</i>	D30	DNS	ÁTE	Szamojed
W31	DNS	VUW	<i>C.l. italicus</i>	D31	DNS	ÁTE	Csau csau
W32	DNS	VUW	<i>C.l. italicus</i>	D32	DNS	ÁTE	Kuvasz
W33	DNS	VUW	<i>C.l.</i>	D33	DNS	ÁTE	Kaukázusi juhaskutya
W34	DNS	VUW	<i>C.l.</i>	D34	DNS	ÁTE	Csau csau
W35	DNS	VUW	<i>C.l. italicus</i>	D35	DNS	ÁTE	Fox terrier

### **3.1.1 Elővizsgálatok, DNS izolálás és kvantifikálás**

Elővizsgálatot csak a szőrmintákon végeztünk el trinokuláris fénymikroszkóppal, ezzel a gyökérhüvelyi sejtek meglétét és számát figyeltük meg. A kevesebb gyökérhüvelyi sejtet tartalmazó mintáknál a bevágott szőrszálak számának emelésével növeltük meg a kinyerhető genetikai anyag mennyiségét. A szőrhagymák gyökéri végének kb. 0,5-1 cm hosszú részét steril olló és csipesz segítségével 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe vágtuk be. A DNS extrakcióhoz a QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit-et használtuk a gyártó által írt protokoll szerint.

Az ürülék minták előkészítését fagyasztott állapotban kezdtük meg. Felszínükről steril szikével lekapargattunk kb. 25 mg-ot, melyet 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztünk. A QIAamp<sup>®</sup> Fast DNA Stool Mini Kit-et alkalmaztunk a DNS extrakcióhoz, amit a gyártó által készített protokoll alapján hajtottunk végre. A nyálmintából történő a DNS kivonáshoz a QIAamp<sup>®</sup> DNeasy Blood and Tissue Kit-et használtuk és a gyártó által ajánlott protokoll szerint jártunk el.

A MTM-ből kapott szőrös bőrmintákat 2 ml-es Eppendorf csövekbe bevágtuk, amiket azután többször 70%-os etanollal és steril bidesztillált vízzel átmostuk a kontamináció csökkentése érdekében. Majd a FavorPrep<sup>TM</sup> Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit segítségével elvégeztük a DNS kinyerését a gyártó útmutatásai szerint.

A DNS kivonás és tisztítás sikerességét minden esetben agarózgél elektroforézissel ellenőriztük le, amihez 1,5%-os agaróz gélt használtunk, mely interkaláló DNS-festéket (GR Safe) tartalmazott. Minden mintából a gél zsebeibe 5-5 µl-t töltöttünk be és 35 percen keresztül futtattuk a gélelektroforézist, majd kék fényel megvilágítva digitális felvételeket készítettünk. Hogy pontosabban is meghatározzuk a minták DNS mennyiségét Qubit fluorométerrel (dsDNA High Sensitivity Kit) is kvantáltuk a kivont örökítőanyagot, ebben az esetben is 5 µl-t használtunk mintánként a méréshez. A minták további vizsgálatát az Állatorvostudományi Egyetem Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézetének Genetikai laboratóriumában végeztük.

### **3.2. DNS markerek PCR amplifikálása, detektálása és kiértékelése**

#### **3.2.1. Terepről gyűjtött minták előzetes tesztelése**

Mivel a mintáink túlnyomórészt nem invazív módon, a kifutókból gyűjtöttük, emiatt nem tudtuk melyik, és milyen ivarú egyedről származnak az adott szőr-/belsőszárminták. Ebben az esetben előzetes genetikai vizsgálatokat kellett elvégeznünk, amiket tíz mintán hajtottunk végre (W20-29). Az előzetes tesztelésekhez két markert használtunk, az egyik az egyedek

megkülönböztetését teszi lehetővé, a másik az ivar detektálását. A WILSM-TF-ral az egyedek megkülönböztetését tudtuk elvégezni, mely mikroszatellita marker hiperpolimorf, kutyafélékre specifikus [124]. Az ivar detektálását SRY markerrel végeztük el, amit duplex PCR reakcióban amplifikáltuk a leírt protokoll alapján [125].

### **3.2.2. Mitokondriális KR vizsgálatok, elemzések**

A mtDNS vizsgálatokat 18 farkas és 14 kutya mintán (2. táblázat) végeztük el, mely mintákat különböző anyai leszármazási vonalokból válogattunk össze. Ahogy korábban már leírtam, a mitokondriumot érintő genetikai vizsgálatokban a KR-t használják, azon belül is a hipervariabilis (HV) részeket, mivel HV régiókban a legtöbb a pontmutációk száma. A vizsgálatunkat a HVI régión végeztük el (15458–16130 bp-k között), mely szakaszt az F15406 és R16147 primerek – amik a primerek bekötésének helyét is magába foglalja – segítségével sokszorosítottuk fel PCR-rel. Azon esetekben, amikor a minták kópiaszáma alacsony volt, erősen sérült és rossz minőségű, a vizsgált régiót két kisebb, egymást átfedő szakaszra osztottuk fel; HVI/1 (393bp) és HVI/2 (462 bp), melyeket a F15406-R15799 és F15685-R16147 primer párokkal sokszorosítottunk fel két reakcióban [126].

A mintákat 25 µl térfogatban amplifikáltuk, 36 cikluson keresztül az alábbi beállításokkal: denaturáció 94°C 15 mp, anelláció 56°C 30 mp és elongináció 72°C 30 mp. A reakció után agarózgél elektroforézissel ellenőriztük vissza a PCR termékeket, majd GenElute™ PCR Clean-Up Kit-el tisztítottuk. A múzeumi bőrök esetén, amennyiben nem volt látható PCR termék az agaróz gélen, tisztítás után egy „második körös” amplifikálást is elvégeztünk az első körben történt sokszorosítás beállításaiival megegyező módon.

A kontroll régió HVI szakaszának bázissorrend meghatározását a mórhalmi Seqomics Biotechnológiai Kft. végezte. Az eredmények elemzéséhez a kapott szekvencia adatokat a Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp) programmal értékeltük ki és a következő paramétereket állapítottuk meg: a referencia szekvenciához (Acc. Number: NC\_002008) viszonyított megfigyelt összes polimorf nukleotid pozíció és a populációban megfigyelt összes eltérő haplotípus.

### **3.2.3. STR vizsgálatok és elemzések**

A biparentális vizsgálatokhoz, a már bizonyítottan igazságügyi felhasználásra is alkalmas StockMarks™ for Dogs Genotyping Kit-et (Thermo Fisher) használtuk. Ez a készlet kilenc tetramer és egy trimer szerkezetű STR-t tartalmaz. Követve a vizsgálati protokoll előírásait, ezeket a mikroszatellitákat sokszorosítottunk fel a farkasmintákon. Kutyaik esetében

ezek a genotípus adatok rendelkezésre álltak [127]. Annak érdekében, hogy minél több alléloszlási adat álljon rendelkezésünkre a két taxon elválasztásához, további négy polimorf, tetra- illetve pentamer szerkezetű STR lokusz (PEZ21, PEZ16, REN124, WILMS-TF) vizsgálatával egészítettük ki a markerkészletünket. Az amplifikálási reakciókat és PCR programokat egy másik tanulmány alapján állítottuk be [125].

A multiplex reakciók után ebben az esetben is agarózgél elektroforézissel ellenőriztük vissza a PCR termékeket, majd a fluoreszcensen jelölt primerekkel végzett amplifikálás eredményeként létrejött fragmenseket kapilláris elektroforézissel választottuk el, illetve UV-gerjesztéssel detektáltuk. Az elektroforetikus elválasztás ABI Prism3130XL Genetic Analyzer készüléken (Applied Biosystems), GeneScan™ 500 LIZ™ méret standarddal és a GeneScanAnalysis v3.1 software (Applied Biosystems) segítségével történt (Biomi Kft, Gödöllő). A kapott eredményeket a GeneMapper™ szoftverrel értékeltük ki és határoztuk meg az egyes minták genotípusát.

#### **3.2.4. Y-kromoszómás STR vizsgálatok**

Az ismert, illetve az előtesztelések (WILMS-TF/SRY) elvégzése után hím ivarúnak detektált állatokból származó mintákon Y-kromoszómás STR vizsgálatokat végeztünk el. Ehhez, a mintákon négy (MS34A, MS34B, MS41A és MS41B) dimer szerkezetű, számos nemzetközi kutatásban alkalmazott Y-kromoszómás STR tesztelését is elvégeztük. Számos PCR protokoll kipróbálása után az Aghbolaghi és munkatársai [38] által kifejlesztett programra esett a választásunk, amit kutya és farkas DNS mintákon alkalmaztunk (2. táblázat).

A fluoreszcensen jelölt primerekkel végzett multiplex amplifikálás után agarózgél elektroforézissel ellenőriztük vissza a PCR termékeket, a biparentális mikroszatelliták kimutatásával megegyező módon, kapilláris elektroforézissel detektáltuk a létrejött fragmenseket. A kapott eredményeket a GeneMapper™ szoftverrel értékeltük ki és határoztuk meg az egyes minták haplotípusát.

Az Y-kromoszómás STR profilokat nem emeltük be egy elemzésbe sem, ennek az okát a következő fejezetben, az eredményekkel együtt tárgyalom ki.

#### **3.2.5. Mitokondriális KR elemzések**

Farkas adatbázisunkat összesen 18 saját vizsgálatból származó, anyai leszármazás szempontjából független egyed szekvenciájából, illetve 12 darab GenBank-ból letöltött, Európából származó farkas szekvenciából állítottuk össze (2. táblázat). Mitokondriális kutya haplotípus adatbázisunk 14 db saját vizsgálatból származó szekvenciából és 16 db letöltött, közepes-nagyméretű fajtákból nyert szekvenciákból állt (2. táblázat).

A minták SNP mutációin alapuló összehasonlítását és csoportosítást a Phylogeny.fr szekvencia elemző honlapon (<http://www.phylogeny.fr/index.cgi>) a PhyML algoritmussal [128] végeztük el, mely program maximum-likelihood-t használ a szekvenciák csoportosítására. A szintén online elérhető ASAP web (Assemble Species by Automatic Partitioning) honlapon hierarchikus klaszerezéssel hajtottuk végre a mintáink csoportosítását (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>). [129]. Az előbbi programnál az alapbeállításokkal („one click” mód), az ASAP-ban, pedig K80 Kimura modellel végeztük az elemzéseket.

### **3.2.5.STR elemzések**

Fentebb leírt – mikroszatellitákról szóló – bekezdésben már említettem, hogy kutyákat illetően, már van egy nagy egyedszámú adatbázisunk. Ebből az adatbázisból válogattunk ki 35 DNS profilt olyan kutyafajtákból, amik méretük és életkörülményeik miatt találkozhatnak és kereszteződhetnek farkasokkal. A farkas profilok közül pedig 15 egymással közeli rokonságban nem állót tudunk beemelni az elemzésekbe. Az STR profilokat a Structure 2.3.4 programmal [130] hasonlítottuk össze és csoportosítottuk. A Structure-ben az elemzéshez az admixture és a független allél frekvencia modelleket alkalmaztuk (Allele frequency independent model), és  $10^4$  Burn-in periódussal,  $10^5$  MCMC iterációval futtattuk, minden  $K=1-10$ -re ötször. A megfelelő  $K$  értéket a Structure Harvester v0.6.94 [131] webes szoftverrel választottuk ki. A kapott eredményeket GenAlEx 6.5 szoftverben [132], főkomponens-analízissel ellenőriztük le.

### **3.2.6 Minták előkészítése a vizsgálatokhoz**

Vizsgálataink folytatásához a begyűjtött minták közül tizenháromat ki kellett vennünk a statisztikai értékelésből, mert közeli rokoni kapcsolatban álltak egymással, vagy nem tudunk használható genetikai anyagot kinyerni a teljes vizsgálathoz belőlük, vagy az elővizsgálatok eredményei alapján más mintákkal azonosnak bizonyultak – egy állattól lett begyűjtve a két minta. Ezen felül a W20-21 és W17-18 minták szintén azonos egyedektől származnak, ezek közül az egyik mintát az egyik, másik mintát másik vizsgálatba vontuk be. A genetikai vizsgálatokhoz felhasznált mintát a 2. táblázat foglalja össze.

**2. Táblázat** A vizsgálatokhoz felhasznált minták és azokon elvégzett vizsgálatok típusa látható a táblázatban. Az NCBI GenBankból letöltött szekvenciáknál feltüntettük azok egyedi kódját (accession number) és a minták származási helyét.

Farkas					Kutya				
Minta	Alfaj	STR	mtDNS	MSY	Minta	Fajta	STR	mtDNS	MSY
W1	<i>C.l.</i>	X	X	X	D1	Csehszlovák farkaskutya	X	X	
W2	<i>C.l.</i>	X	X	X	D2	Berni pásztorkutya	X	X	X
W3	<i>C.l.</i>	X	X		D3	Bordeaux-i dog	X	X	X
W4	<i>C.l.</i>	X	X	X	D4	Golden retriever	X	X	X
W5	<i>C.l.</i>	X	X		D5	Rövidsz. német vizsla	X	X	
W7	<i>C.l.</i>	X	X	X	D6	Kaukázusi juhászkutya	X		
W12	<i>C. l. arctos</i>		X		D7	Am. staffordshire terrier	X	X	X
W16	<i>C.l.</i>	X		X	D8	Szibériai husky	X		
W17	<i>C.l.</i>		X		D9	Dobermann	X	X	X
W18	<i>C.l.</i>	X		X	D10	Puli	X		
W20	<i>C. l. italicus</i>		X		D11	Óangol juhászkutya	X		
W21	<i>C.l.</i>	X			D12	Nápolyi masztiff	X		
W25	<i>C.l.</i>		X		D13	Komondor	X		
W27	<i>C.l.</i>		X		D14	Német dog	X	X	X
W28	<i>C.l.</i>		X		D15	Labrador retriever	X		
W29	<i>C.l.</i>		X		D16	Berni pásztorkutya	X		
W30	<i>C.l.</i>	X			D17	Mudi	X		X
W31	<i>C.l italicus.</i>	X	X		D18	Rövidsz. német vizsla	X	X	X
W32	<i>C.l italicus.</i>	X	X		D19	Ír szetter	X	X	X
W33	<i>C.l.</i>	X	X		D20	Brie-i juhászkutya	X		
W34	<i>C.l.</i>	X	X		D21	Weimari vizsla	X		
W35	<i>C.l italicus.</i>	X	X		D22	Német dog	X	X	X
W36	<i>C. l. IL (KF661042)</i>		X		D23	Sarplaninai juhászkutya	X		
W37	<i>C. l. FIN (KF661053)</i>		X		D24	Magyar agár	X		X
W38	<i>C. l. LV (JN182087)</i>		X		D25	Hovawart	X		
W39	<i>C. l. EST (JN182046)</i>		X		D26	Leonbergi	X		
W40	<i>C. l. LV (JN182060)</i>		X		D27	Moszkvai örökutya	X		X
W41	<i>C. l. LV (JN182074)</i>		X		D28	Hannoveri véreb	X	X	X
W42	<i>C. l. pallipes E (KU644666)</i>		X		D29	Szibériai husky	X		
W43	<i>C. l. E (KU696391)</i>		X		D30	Szamojéd	X		
W44	<i>C. l. E (KU644669)</i>		X		D31	Csau csau	X		
W45	<i>C. l. S (DQ480504)</i>		X		D32	Kuvasz	X		
W46	<i>C. l. H (KP665915)</i>		X		D33	Kaukázusi juhászkutya	X	X	X
W47	<i>C. l. H (KP665919)</i>		X		D34	Csau csau	X		
					D35	Fox terrier	X	X	X
					D36	Gol. retr. (KP665906)		X	
					D37	Pumi (KP665907)		X	
					D38	Pumi (KP665908)		X	
					D39	Labr. retr. (KP665909)		X	
					D40	Németjuh. (KP665910)		X	
					D41	Erdélyi k. (KP665911)		X	
					D42	Puli (KP665912)		X	
					D43	Komondor (KP665916)		X	
					D44	Mudi (KP665917)		X	
					D45	Pumi (KP665918)		X	
					D46	Gol. retr. (KP665920)		X	
					D47	Magyar agár (KP665923)		X	
					D48	Drsz. m. vizs. (KP665930)		X	
					D49	Rsz. m. vizs. (KP665932)		X	
					D50	Rsz. m. vizs. (KP665934)		X	
					D51	Rsz. m. vizs. (KP665935)		X	

## **4.Eredmények**

### **4.1.DNS markerek PCR amplifikálása és kimutatása**

Az összesen rendelkezésre álló 35 farkas mintából 22-nél tudtunk kinyerni teljes, vagy részleges, de még használható genetikai profilt. A mtDNS HVI régiót több mintából is sikeresen ki tudtuk nyerni és PCR-ben felsokszorosítani, a mikroszatelliták esetében már kevesebb mintából tudtunk kinyerni használható profilokat (2. táblázat).

#### **4.1.1.Kétmarkeres előtesztelések eredménye**

A terepről gyűjtött tíz mintán minden esetben ki tudtuk mutatni az egyed ivarát, de a WILMS-TF lokusz alléltípusát a múzeumi és az erdőben fellelt szőrmintán (W25-29) nem sikerült meghatározni. Az előzetes teszteléssel így sikerült megállapítanunk, hogy a W20-24 minták közül melyik tartozik az állatkertben tartott nőtény, illetve hím farkashoz.

#### **4.1.2.Mitokondriális vizsgálatok eredménye**

Összesen 33 mintából (18 farkas és 15 kutya) sikerült felsokszorosítani a mtDNS HVI régióját és szekvenálással megállapítani a haplotípusokat. Összesen tizenegy különböző farkas, illetve tíz eltérő kutya haplotípust mutattunk ki, a két taxon eredményei között nem volt megegyező mutációs mintázat. Az összes polimorf nukleotid pozíció száma farkasokban 30, kutyákban pedig 27 volt a vizsgált régióban. A farkasmintáinkban gyakori volt a bázis deléció a 15938-as pozícióban, ezzel szemben kutyáknál mindössze egy ilyen esetet találtunk. Ezen felül farkasokban több esetben citozin inszerciót is detektáltunk a 15534-es pozícióban. A releváns, Magyarországon természetes körülmények között élő/élt egyedek szekvenciáit feltöltöttük a NCBI GenBank adatbázisába, melyekre az MZ927017-MZ927031 (D1-5, D7, D9, D14, D18, D19, D22, D28, D33, D35) és OK513084-OK513087 (W29, W25, W28, W27) azonosító számot kaptuk.

#### **4.1.3.Biparentális mikroszatellita vizsgálatok eredménye**

A farkas mintáink egy részénél a sejtmagi génállomány annyira sérült volt, hogy a nukleáris markerekkel nem tudtunk genetikai profilt megállapítani. Az összes farkas mintából 15-ből tudtunk kinyerni a felhasznált 14 STR-re genetikai profilt (2. táblázat). Az elemzésekbe azokat a mintákat vontuk be, melyekből a felhasznált 14 STR-ből minimum 12-re tudtuk kinyerni genetikai adatot.



#### 4.1.4.Y-kromoszómás STR vizsgálatok eredménye

Az MSY markerekkel megvizsgált hím ivarú farkas és kutya minták több, mint felénél (összesen 21-ből 13-nál) sikerült csak teljes, értékelhető profilt alkotni. nyolc minta esetén részleges, illetve bizonytalan eredményeket kaptunk – több lehetséges allél egy lokuszon, ill. az ismételt vizsgálatok eredményei más-más alléltípust adtak (3. táblázat).

**3. Táblázat** Négy MSY markeren kimutatott allélek hímivarú kutyák és farkasok között. Jelölések: -; nincs eredmény, /; nem egyértelmű az eredmény (piros színnel kiemelve).

Minta	MS34A	MS34B	MS41A	MS41B
D2	12	-	-	30
D3	13	18	-	30
D4	13	-	-	30
D7	17	15	17	32
D9	13	15/17	-	30
D14	14	17	17	27
D17	13	15	-	30
D18	13	14/15	-	30
D19	13/15/17	17	17	23
D22	13	-	-	30
D24	13/14	16	17	31
D27	14	17	17	28
D28	14	18	17	30
D33	14	17	17	28
D35	17	15	17	33
W1	14	16	17	24
W2	13	18	17	24
W4	13	17	17	24
W7	13	17	17	30
W16	13	18	17	26
W18	13	18	17	24

A vizsgálatok során kapott eredmények bizonytalansága, illetve csekély polimorfizmus (MS41A lokusz) miatt a tesztelést nem végeztük el minden rendelkezésre álló hím ivarú kutya, illetve farkas mintán és a statisztikai elemzésbe sem vettük bele az Y-kromoszómás alléleket.

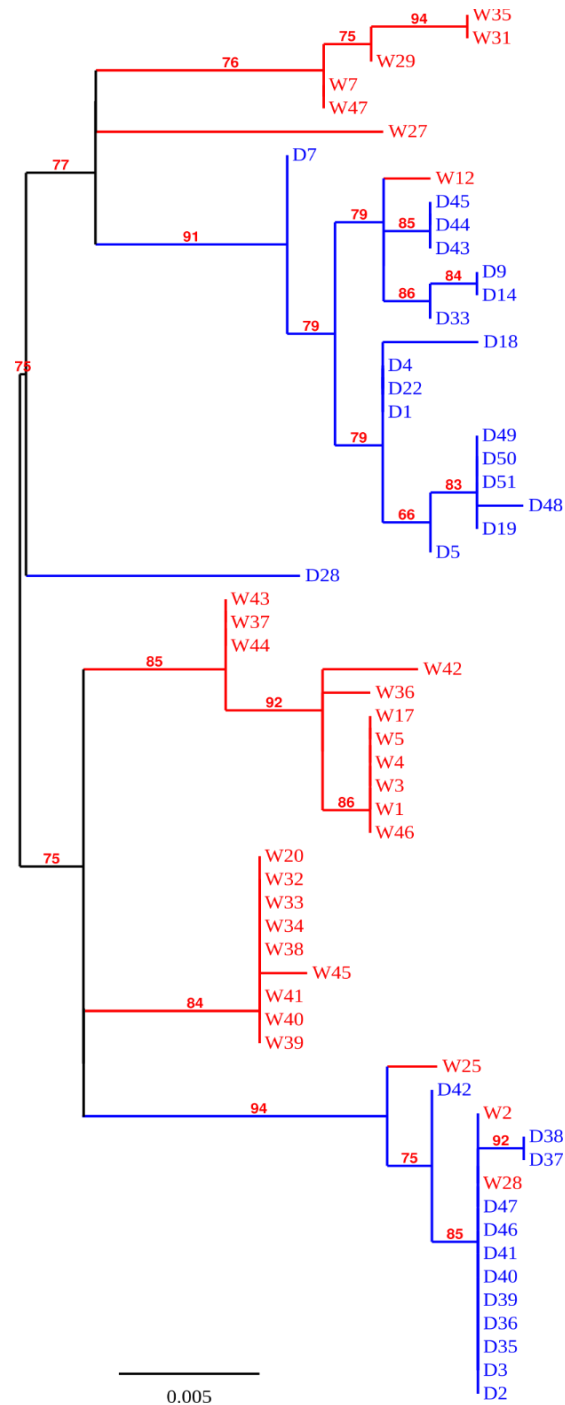
## 4.2.Statisztikai elemzések eredménye

### 4.2.1.Mitokondriális haplotípusok csoportosítása

A HVI szekvenciákat két honlapon, – az ASAP és Phylogeny.fr – található programokkal elemeztük (2. és 3. ábra). Mint korábbi tanulmányomban leírt elemzésben, amit a PoPArt szekvencia elemző szoftverrel végeztem, itt is a szekvenciákon belül fellelhető különbségek alapján csoportosítottuk a mintákat [101].

Phylogeny.fr honlapon a PhyML által készített kladogram a 2. ábrán látható. Ami azonnal feltűnhet, hogy a farkasokat a program több, de kisebb egyedszámú csoportokba

osztotta szét, mint a kutyákat, ahol inkább két nagyobb ágra kerültek a minták. A farkasok, és a kutyák esetében van egy-egy minta (W27, D28), amik önállóan alkotnak ágakat, illetve a farkasok közül négy minta lett kutyákhoz sorolva: W2, W12, W25, W28.



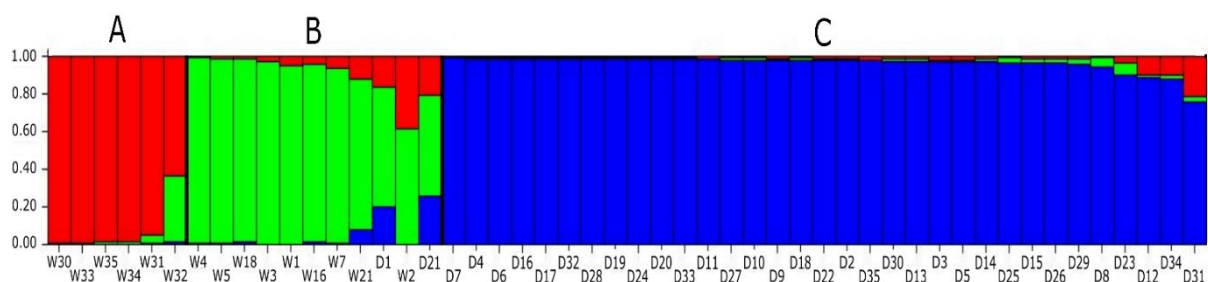
2. Ábra Phylogeny.fr honlapon készített filogenetikai elemzés. A piros szín a farkas, a kék a kutya mintákat jelöli. Az ágakon, az azokat támogató értékek láthatóak



Phylogeny.fr és ASAP honlapokon lefuttatott elemzésekkel kapott eredmények korrelálnak a korábban, PoPART-tal elvégzett elemzéssel: W27 és D28 minták távolabb állnak a többi mintától, a W2, W12, W25, W28 mintákat, a programok kutyákkal osztotta egy csoportba. Így, hogy három program ugyan azt az eredményt adta, biztosak lehetünk abban, hogy a minták csoportosítását nem befolyásolta adatkezelési és elemzési hiba, pusztán a szekvenciák alapján lettek rendszerezve a minták.

#### 4.2.2. Mikroszatellita allél elemzések eredménye

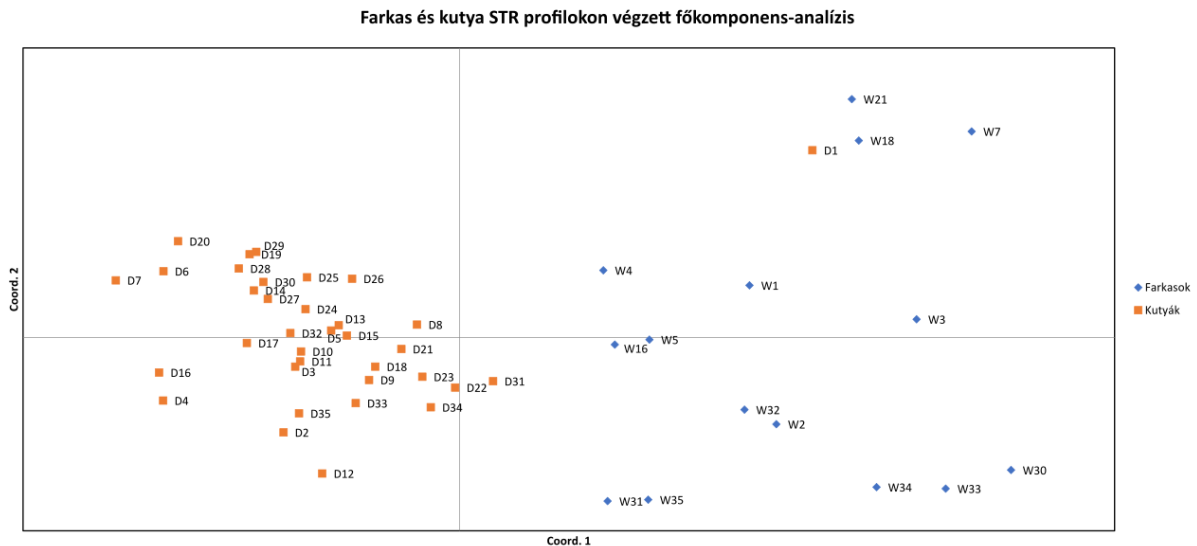
A Structure elemzése szerint a kutyák és farkasok optimális csoportszáma a  $K=3$  (K, klaszter) bizonyult ( $\ln P(D) = -2488.8$ ). A három klaszter egy kutya és két farkas (Ausztriából kapott, illetve a hazai farkas minták) csoportból áll (4. ábra). A klaszterek jól elkülönülnek egymástól, csak a két farkas csoport között van kismértékű átfedés két egyedben (W2, W32), melyek 40%-ban egyeztek meg a másik farkas klaszter genetikai profiljaival. A hazai farkas minták közül a W21-es minta hasonlít leginkább a kutyákhoz, de ez is mindössze 15%-ban. Ezzel szemben két kutyát is a hazai farkas csoportba sorolt, az egyik a Csehszlovák farkaskutya (D1), ami legalább 60%-ban megegyezik a hazai farkas mintákkal. A másik, farkasokhoz sorolt kutya egy weimári vizsla (D21), ami csaknem 60%-ban megegyezik a hazai farkas klaszterrel a kimutatott genetikai profilja alapján. A kutya csoporton belüli minták egymással nagyfokú egyezést mutatnak, csupán egyetlen egyednél tapasztaltunk 80%-nál kisebb hasonlóságot (D31, csau csau).



**4. Ábra** 14 STR marker alapján készített barplot ( $K=3$ ) a Structure programmal. A (piros): VUW farkas minták, B (zöld): hazai farkas minták, C (kék): hazai kutya minták. Minden oszlop egy egyedet jelöl. Az ábra y tengelye az egyedeken belül kimutatott genetikai információ százalékos eloszlását mutatja.

A GenAlEx-ben elvégzett elemzés közel azonos eredménnyel szolgált, mint a Structure-ban lefuttatott analízis, az eredménye az 5. ábrán szerepel. A kutyákat a program lényegesen kisebb helyre sűrítette be, míg a farkasokat egy lényegesen nagyobb területen szórta szét. A farkasokat már nem osztotta fel a program egyértelműen két csoportra, bár az ausztriából származó farkas minták (W30-35) jól láthatóan az ábra alján oszlanak el a többi

farkasmintával ellentétben, amik viszont az ábra középső vonalától felfele foglalnak helyet. Továbbá a Structure által kimutatott genetikai átfedés a hazai és ausztriai farkasok között itt is megmutatkozik a W2 és a W32 minták egymáshoz közeli elhelyezkedésében. Ami a Structure által farkasokhoz sorolt kutyákat illeti (D1, D21), a GenAlEx csak a D1 mintát helyezte farkasokhoz közeli pozícióba, míg a D21-t meghagyta a kutyák csoportjában.



**5. Ábra** A 14 STR-ből felállított genetikai profilok GenAlEx-szel készített főkomponens-analízis eredménye.

## 5. Diszkusszió

Az elmúlt két évtizedben Európában és világszinten is egyre jobban elterjedt a genetikai módszerek alkalmazása a hibridek detektálására és a fajok elkülönítésére [25,68,43]. Az eddigi módszerek fejlődésével és új technikák megjelenésével egyre megbízhatóbb eredményeket sikerül felmutatni a hibridizáció és a farkas-kutya elkülönítés terén [9,95]. Európában eddig Spanyolországban, Olaszországban, a Skandináv és a kelet európai térségben foglalkoztak a farkasok elterjedésével és kutyákkal történő kereszteződésükkel [24,54,66,74]. A farkas állományok genetikai vizsgálata Európa más térségeiben, így hazánkban is korán megkezdődött [14]. Magyarország már 2010 óta rendelkezik egy kis létszámú, de növekvő farkas populációval [13], ezért minket is érint a faj védelme és a farkas-ember konfliktusok megelőzése, megoldása. Eddigi tapasztalatok alapján, ahol az emberi településekhez közeli farkaspopuláció növekszik, ott előbb-utóbb megjelenhet a haszonállatok megtizedelése [78,111,133], az emberek elleni vélt vagy valós támadások bejelentése [78,131] valamint a farkasok illegális vadászata és

termékeikkel való kereskedelem [9,79]. Az ilyen igazságügyi esetek háttérének felderítéséhez általában különböző típusú molekuláris genetikai markereket, illetve ezek analíziseinek ötvözetét használják [9,62,77,78,79].

Munkánk során mi is megkezdjük azon markerek tesztelését, melyek a kitűzött céljainknak leginkább megfelelnek, és az összesített eredményeink alapján többnyire sikeresnek bizonyultak a bi- és uniparentális módszerekkel végzett genetikai kutatásaink.

Az elővizsgálatokhoz használt markerek hasznosnak bizonyultak, mert az eredmények alapján nem csak ivar szerint tudtuk csoportosítani a mintákat, hanem az egyedi azonosítást is valószínűsíthettük.

A mitokondriális kontroll régió HVI részének szekvencia eredményei azt mutatják, hogy csupán ezzel a módszerrel a kutyákat nem lehet minden esetben elkülöníteni a farkasoktól, amint ez a korábbi kutatások alapján várható volt [34, 35, 36]. Ahogy azt a 2. és 3. ábra is egyértelműen mutatja, a magyarországi kutyák mtDNS szekvenciái kevésbé bizonyultak diverznek – így a minták mind két program kevesebb, de nagyobb létszámú csoportba osztotta – a farkasokhoz képest, amint ezt más kutatások is alátámasztják [47, 52, 53, 67]. Azon minták közül, amiket az STR vizsgálatokba is bevettünk (W1-5, W7) és a Structure farkasnak jelölt, csupán a W2 került a kutyákkal egy csoportba mind a két szekvenciaelemző program által, emiatt feltételezhetjük, – hogy bár az STR profilját farkas allélek alkotja – ez az egyed lehet, hogy egy hibrid. Továbbá mitokondriális szekvencia alapján a W12, W25, W28 minták is kutyákkal közös csoportba kerültek. Ezeken a mintákon nem tudunk STR vizsgálatokat elvégezni, így ebben az esetben is csak feltételesen kezelhetjük hibridnek ezeket. Biztosan azért nem jelenthetjük ki a kérdéses mintáinkról, hogy hibridek, mert (i) a HVI régió egy viszonylag rövid, nem konzervatív szakasz, így a nagy mutációs rátája miatt is kialakulhatott a kutya mintáinkhoz hasonló szekvencia [48], (ii) illetve a haplotípusok megállapításakor nem volt átfedés a két taxon között. Kiegészítés képpen a HVII régiót beemelése pontosíthatja a szekvencia alapú beazonosítást, továbbá szükséges a mikroszatellita vizsgálatok elvégzése a megbízhatóbb eredményekért. Összefoglalva, amennyiben a hibridizációs esemény kizárható, a mitokondriális HVI régió vizsgálata nem sorolható a legérzékenyebb módszerek közé, de minimális hibával képes elkülöníteni a farkasokat a kutyáktól. Ha nem zárjuk ki a hibridizációt, vizsgálata csupán kiegészítő módszernek alkalmazható, önmagában nem képes megbízható eredménnyel szolgálni, mivel a hibrideket nem képes detektálni [37].

Az autoszómás mikroszatellita alléleloszlások alapján – más, hasonló számú STR lokuszt vizsgáló kutatásokhoz hasonlóan [1, 43, 72, 87] – az alkalmazott statisztikai programok egyértelműen el tudták különíteni a farkasokat a kutyáktól (4. és 5. ábra). A Structure által

farkasokhoz sorolt Csehszlovák farkaskutya (D1) nem volt meglepő eredmény, mivel ezt a fajtát az '50-es években tenyésztették ki, így bőven tartalmazhat farkasokra jellemző allélokat [39]. Meglepőnek tűnhet viszont a weimári vizsla (D21) farkasokhoz sorolása, de a profilt alkotó allélek alapján nem kizárt, hogy valamelyik felmenője kereszteződhetett a múltban farkassal, ugyanis a fajtát eredetileg vadászathoz tenyésztették ki a 19. században [134], azaz volt alkalom introgresszióra. Mivel ezen a mintán nem végeztünk mitokondriális DNS vizsgálatot, így nem jelenthetjük ki biztosan a hibridizációt, csupán feltételezhetjük. A GenAlEx-ben ellenőrzés képpen lefuttatott főkomponens-analízis is alátámasztja a Structure-ben elvégzett elemzést, viszont D21-t a kutyák csoportjába helyezi a GenAlEx, ezért a másik programban ennek a mintának a besorolását akár a Structure pontatlanságának tekinthetjük, nem feltétlen kell hibridizációt feltételezni. A HVI régió vizsgálatok eredményeinél tapasztalt genetikai diverzitás béli különbségeket a főkomponens-analízissel is detektálhatjuk. Az STR profilok alapján a farkas minták nagyobb szórást mutatnak, míg a kutyák egy nagyobb agglomerátumba sűrűsödnek be (5. ábra), újfent alátámasztva azt a tényt, miszerint a domesztikáció miatt a kutyák genetikai változatossága lényegesen kisebb, mint a farkasoké [47, 52, 53]. Bár a D21 mintát illetően a két program eredménye eltért egymástól, lényeges különbség nem mutatkozott meg a statisztikai módszerek között, ami azt bizonyítja, hogy az alkalmazott mikroszatelliták alkalmasak az általunk vizsgált két taxon elkülönítésére. Ám ne hagyjuk figyelmen kívül azt a tényt, hogy több marker bevonásával tovább növelhetjük a módszer pontosságát.

Az apai ágon öröklődő uniparentális MSY markereket végül nem vettük bele az STR alapú statisztikai vizsgálatokba, mert nem bizonyultak megfelelőnek az általunk kitűzött célokhoz, úgymint a vizsgált lokusz polimorfizmus foka, az eredmények megbízhatósága, illetve reprodukálhatósága. Ez egyrészt a dimer szerkezetű struktúrájuknak köszönhető (kevésbé megbízható módon azonosíthatók) [135]. Másrészt annak, hogy több kópiában is előfordulnak az Y-kromoszómán és a különböző kópiák PCR sokszorosításához használt primerek csak egy-egy bázisban térnek el egymástól [54]. Egyéb kutatásokban az MSY 41 A/B marker szintén nem bizonyult kellőképpen diverznek [71], ezért a jövőben más Y-kromoszómás lokuszok tesztelését tervezzük.

Összegezve kijelenthetjük, hogy a tesztelt 14 autoszómás STR markerünk és a mtDNS HVI régió együttes vizsgálata többnyire alkalmas volt a farkasok és kutyák helyes besorolására. A kérdéses mintáknál azonban szükségesnek látjuk további uni-, és biparentális markerek, a megkülönböztetést lehetővé tevő gének [74, 96], illetve az ún. SNaPshot eljárás [9] bevonását a kutatásba. A magyarországi farkas és kutyapopuláció megkülönböztetéséhez szükséges

genetikai adatbázisok létrehozása során azonban szükségesnek tartjuk a releváns minták számának növelése mellett olyan további lokuszok vizsgálatát, melyek a jövőben megfelelnek az igazságügyi alkalmazáshoz szükséges kritériumoknak [136], valamint lehetővé teszik az eredmények nemzetközi szintű összehasonlítását. Mivel a farkasok genetikai kutatásával világszinten igen intenzíven foglalkoznak, ezért számos mikroszatellita, mtDNS és nukleáris SNP vizsgálati módszert és markert alkalmaznak [136]. Egy nemzetközileg elfogadott és harmonizált marker készlettel és módszertannal, így eredményeink összevethetőségével segíteni tudjuk a kontinensen, illetve a hazánkban is zajló farkasgenetikai kutatásokat mind a konzervációbiológia, mind pedig az igazságügyi alkalmazás területén.



## 6. Összefoglalás

Több évtizednyi távollét után a szürke farkas (*Canis lupus* L., 1758) a 21. század elején rekolonizálni kezdte egykori területeit az Aggteleki és a Bükk Nemzeti Parkban. Európában az erős emberi jelenlét miatt a farkasok kénytelenek nagy területeken osztozni az emberekkel, ami konfliktusok forrása lehet. Farkas oldalról a háziállat állományok megtizedelésében, emberi oldalról pedig a farkasok elleni illegális vadászatban és a termékeikkel való kereskedelemben mutatkozik meg. Indirekt módon, a kutyák nem megfelelő tartásával, az emberek felelősek a hibridizációért, és ezzel az adott területen élő farkas populáció genetikai leromlásáért. Az ilyen és ehhez hasonló (bűn)cselekményeknél vizsgált kérdés, hogy az elkövető/áldozat az farkas vagy kutya, esetleg hibrid. Erre a kérdésre évtizedek óta számos genetikai kutatás próbál választ adni. Jelen kutatásomban azt vizsgálom, hogy igazságügyi alkalmazás szempontjából mely genetikai módszerek a legalkalmasabbak farkasok, kutyák, illetve hibridjeik egymástól való elkülönítésére megbízható módon.

A vizsgálatokhoz összesen 35 darab farkastól, kutya-farkas hibridtől, illetve csehszlovák farkaskutyától származó (szőr, bőr, ürülék, nyál, tisztított DNS) mintát gyűjtöttünk/kaptunk. Az összehasonlító kutya adatbázis kialakításához rendelkezésünkre álltak magyarországi kutyáktól származó tisztított DNS minták. Vizsgálatainkhoz a DNS kivonás után egyaránt alkalmaztunk uniparentális (mitokondriális kontroll régió, Y-kromoszómás mikroszatellita ill. SRY) és biparentális (autoszómás mikroszatellita) markereket, melyeket PCR technikával sokszorozítottunk fel. A kontroll régió szekvencia analízissel kapott pontmutációs mintázata alapján meghatároztuk a kérdéses kutya és farkas egyedek haplotípusát, majd az ASAP és Phylogeny.fr honlapokon analizáltuk az eredményeket. A multiplex formában, fluoreszcensen jelölt primerekkel sokszorozított mikroszatellita markereket kapilláris elektroforézissel detektáltuk. A kimutatott allélekből felállított genetikai profilokat a Structure 2.3.4 és GenAlEx 6.5 programokkal, előbbinél bayesi csoportosítással, utóbbinál főkomponens-analízissel vizsgáltuk.

A vizsgált farkas és kutyamintákból sikerült a mitokondriális kontroll régió alapján a haplotípust meghatározni – melyeket feltöltöttünk a GenBank adatbázisába –, és nem találtunk azonos pontmutációs mintázatot kutyák és farkasok között. A nukleáris markerek analízise nem minden esetben járt sikerrel, mivel sok esetben csak kis mennyiségű, degradált biológiai minta állt rendelkezésre, illetve az Y kromoszómás markerek esetén a vizsgálati módszer korlátozó tényezőinek. A kimutatott mikroszatellita alléleloszlások alapján szintén különbség mutatkozott a farkas- és kutyaállományok között.

Össességében eddigi eredményeink is alátámasztják annak lehetőségét, hogy nagyszámú genetikai marker párhuzamos vizsgálatával – melyek megfelelnek az igazságügyi célú alkalmazás kritériumrendszerének –, kellő statisztikai valószínűséggel alátámasztható egy kérdéses eredetű minta alfaj szintű besorolása.

## 7. Summary

### Molecular genetic studies to distinguish dogs and wolves for forensic purposes

After several decades of absence, the grey wolf (*Canis lupus*) started recolonizing its former territories in Hungary at the beginning of the 21st century. First, the Aggtelek National Park and then the areas of the Bükk National Park were invaded by them. Due to the intense presence of mankind, wolves are forced to share great areas of land with humans, thus potentially leading to several conflicts. From the wolves' perspective, it means the decimation of domestic livestock. As far as humans are concerned, these conflicts may manifest in the illegal hunting of them and trading with their products. Indirectly, people are responsible for hybridization as well, because of inappropriate canine husbandry and as a result, the genetic deterioration of the wolf population. When facing such instances, it should be examined whether the perpetrator/victim is a wolf, a dog, or a hybrid. Many genetic studies trying to get the answer to this question. My study aims to find an appropriate genetic method to distinguish wolves, dogs, and their hybrids, which can be used in a forensic application as well.

For this research, altogether 36 samples (hair, skin, faecal matter, saliva, and purified DNA) from wolves, hybrids as well as from Czechoslovakian wolfhound were collected. For the comparative canine database DNA samples from Hungarian dog populations were used (haplo- and genotypes were partially available). After DNA isolation, uniparental (mitochondrial control region, Y-chromosome microsatellites, and SRY) and biparental (autosomal microsatellites) markers were amplified by polymerase chain reaction. Based on the point mutation pattern of the control region determined by sequencing analysis, haplotypes were grouped using ASAP and Phylogeny.fr websites. Microsatellite markers amplified with fluorescently labeled primers were detected by capillary electrophoresis. Genetic profiles based on the detected alleles were analyzed using Structure 2.3.4 and GenAlEx 6.5. The profiles were grouped by the Bayes theorem in the former program and principal component analysis in the latter program.

The mitochondrial control region (HV1) haplotypes were successfully determined from the examined samples, these sequences were uploaded to the GenBank database. We did not find a similar point mutation pattern between wolves and dogs. On contrary, the analysis of nuclear markers was not always successful. This is partial because in some cases only a little amount of degraded biological samples were available, and because of the suboptimal

nature of the investigative method regarding the Y-chromosomal markers. However, based on the detected microsatellite allele distribution difference was shown between wolf and dog groups, further markers and more wolf samples should be involved.

Overall, our previous results support that simultaneous application of a large number of genetic markers – meeting with the standards of the forensic application criteria –, could be adequate to determine the precise taxonomic origin of a questionable sample with appropriate statistical probability.

## Irodalomjegyzék

- [1] Korbalev MP, Korablev NP, Korablev PN (2020) Genetic diversity and population structure of the grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) and evidence of wolf×dog hybridisation in the centre of European Russia. *Mamm. biol.* 101:91-104 <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00074-2>
- [2] Luccenti SB, Bukhsianidze M, Martínez-Navarro B, Lordkipanidze D (2020) The wolf from Dmanisi and Augmented Reality: review, implications and opportunities. *Front. Earth Sci.* 8:131 <https://doi.org/10.3389/feart.2020.00131>
- [3] Stonikova M, Rook L (2010) Dispersal of the Canini (*Mammalia, Canidae: Caninae*) across Eurasia during the Late Miocene to Early Pleistocene. *Quaternary International* 212:86-97 <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2009.06.008>
- [4] Sardella R, Palombo MR (2007) The Pliocene-Pleistocene boundary: which significance for the so called "Wolf Event"? Evidences from Western Europe. *QUATERNAIRE* 18:65-71 <https://doi.org/10.4000/quaternaire.969>
- [5] Azzaroli A (1983) Quaternary mammals and the "end-Villafranchian" dispersal event - a turning point in the history of Eurasia. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 44:117-139 [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(83\)90008-1](https://doi.org/10.1016/0031-0182(83)90008-1)
- [6] Ersmark E, Klütsch CFC, Chan YL, Sinding MS, Fain SR, Illarionova NA, Oskarsson M, Uhlén M, Zhang Y, Dalé L, Savolainen P (2016) From the Past to the Present: Wolf Phylogeography and Demographic History Based on the Mitochondrial Control Region. *Front. Ecol. Evol.* 4:134 <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00134>
- [7] Sardella R, Bertè D, Iurino DA, Cherin M, Tagliacozzo A (2014) The wolf from Grotta Romanelli (Apulia, Italy) and its implications in the evolutionary history of *Canis lupus* in the Late Pleistocene of Southern Italy. *Quaternary International* 328-329:179-195 <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2013.11.016>
- [8] Leonard JA, Vilá C, Wayne RK (2005) FAST TRACK: Legacy lost: genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). *Molecular Ecology* 14:9-17 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02389.x>
- [9] Jiang HH, Li B, Ma Y, Bai SY, Dahmer TD, Linacre A, Xu YC (2020) Forensic validation of a panel of 12 SNPs for identification of Mongolian wolf and dog. *Sci. Rep.* 10:13249 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70225-5>
- [10] Đana M, Šnjegotab D, Veličkovića N, Stefanovića M, Vidakovića DO, Čirović D (2016) Genetic Variability and Population Structure of Grey Wolf (*Canis lupus*) in Serbia. *Russ. J. of Genet.* 52:821-827 <https://doi.org/10.1134/S1022795416080044>
- [11] Chapron G, López-Bao JV (2014) Conserving Carnivores: Politics in Play. *Science* 343:1199-1200 <https://doi.org/10.1126/science.343.6176.1199-b>
- [12] International Wolf Center <https://wolf.org/wow/europe/>. Látogatva: 2021.04.16
- [13] Anthony BP, Tarr K (2019) The wolves are back! Local attitudes towards the recently re-populated grey wolf and wolf management, in Bükk National Park, Hungary. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 65:195–214 <https://doi.org/10.17109/AZH.65.2.195.2019>
- [14] Hausknecht R, Szabó Á, Firmánszky G, Gula R, Kuehn R (2010) Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring. *Mamm. biol.* 75:348–352 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2009.10.001>
- [15] Arnold J, Miller C, Sürth P, Heltai M, Patkó L (2020) Az együttélés lehetséges: Kérdések és válaszok a farkasokról. - WFF Magyarország, Magyarország, 101pp.
- [16] Ardalan A, Kluetsch CFC, Zhang A, Erdogan M, Uhlén M, Houshmand M, Tepeli C, Ashtiani SRM, Savolainen P (2011) Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but implies dog–wolf hybridization. *Eco. and Evol.* 1:373-385 <https://doi.org/10.1002/ece3.35>
- [17] Germonpré M, Sablin MV, Stevens RE, Hedges REM, Hofreiter M, Stiller M, Després VR (2009) Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Jour. of Arch. Sci.* 36:473-490 <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.09.033>

- [18] Galibert F, Quignon P, Hitte C, André C (2011) Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *Compt. Rend. Biol.* 334:190-196 <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.011>
- [19] Zöldág L (2008) Állatorvosi genetika és állattenyésztés. Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar, Budapest
- [20] Gojobori J, Arakawa N, Xiayire X, Matsumoto Y, Matsumura S, Hongo H, Ishiguro N, Terai Y (2021) The Japanese wolf is most closely related to modern dogs and its ancestral genome has been widely inherited by dogs throughout East Eurasia. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.10.10.463851>
- [21] Avise JC, (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland
- [22] Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* 16:613–622 [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X)
- [23] Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20:229–237 <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.010>
- [24] Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes S, Álvares F, García EJ, Palacios V, Cortés Y, Talegón J, Ferrand N (2011) Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Mol. Ecol.* 20:5154-5166 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05345.x>
- [25] Hailer F, Leonard JA (2008) Hybridization among Three Native North American *Canis* Species in a Region of Natural Sympatry. *PLOS ONE* 3(10) e3333 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003333>
- [26] Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD, Roy MS, Girman DJ, Garcia-Moreno J, Ostrander EA, Wayne RK (1994) Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Mol. Ecol.* 3:301–312 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00070.x>
- [27] Wayne RK, Brown DM (2001) Hybridization and conservation of carnivores. In: Gittleman, JL, Funk S, Macdonald DW, Wayne RK (Eds.) *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, 145–162
- [28] Adams JR, Kelly BT, Waits LP (2003) Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*). *Mol. Ecol.* 12:2175-2186 <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01895.x>
- [29] Boitani L (1992) Wolf research and conservation in Italy. *Biol. Conserv.* 61:125–132 [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91102-X](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91102-X)
- [30] Boitani L (2003) Wolf conservation and recovery. In: Mech LD, Boitani L (Eds.) *Wolves: Behaviour, Ecology and Conservation*. University of Chicago Press, Chicago, 317–340
- [31] Fico R, Verdone M, (1995) Lo studio delle popolazioni canine. *Rapporti di Sanità Pubblica Veterinaria. Igiene Urbana Veterinaria, ISS/WHO/FAO-CC/IZSTe/95.25* (in Italian).
- [32] Randi E, Lucchini V (2002) Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Genetics* 3:31–45 <https://doi.org/10.1023/A:1014229610646>
- [33] Verardi A, Lucchini V, Randi E (2006) Detecting introgressive hybridisation between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Mol. Ecol.* 15:2845–2855 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x>
- [34] Vilá C, Walker C, Sundqvist A-K, Flagstad Ø, Andersone Z, Casulli A, Kojola I, Valdmann H, Halverson J, Ellegren H (2003) Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90:17–24 <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800175>
- [35] Randi E, Lucchini V, Christensen MF, Mucci N, Funk SM, Dolf G, Loeschcke V (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conserv. Biol.* 14:464–473 <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.98280.x>
- [36] Andersone Z, Lucchini V, Randi E, Ozolins J (2002) Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mamm. biol.* 67:79-90 <https://doi.org/10.1078/1616-5047-00012>

- [37] Hindrikson M, Mannil P, Ozolins J, Krzywinski A, Saarma U (2012) Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves. PLOS ONE 7: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046465>
- [38] Aghbolaghi MA, Rezaei HR, Scandura M, Kaboli M (2014) Low gene flow between Iranian Grey Wolves (*Canis lupus*) and dogs documented using uniparental genetic markers. Zoology in the Middle East 60:95-106 <http://dx.doi.org/10.1080/09397140.2014.914708>
- [39] Caniglia R, Fabbri E, Hulva P, Bolfiková BC, Jindřichová M, Stronen AV, Dykyy I, Camatta A, Carnier P, Randi E, Galaverni M (2018) Wolf outside, dog inside? The genomic make-up of the Czechoslovakian Wolfdog. BMC Genomics 19:533 <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4916-2>
- [40] Bibikov DI, Ovsyannikov NG, Filimonov AN (1985) The status and management of the wolf populations in the USSR. Acta Zool Fennica 174: 269–271
- [41] Khosravi R, Rezaei HR, Kaboli M (2013) Detecting Hybridization between Iranian Wild Wolf (*Canis Lupus Pallipes*) and Free-Ranging Domestic Dog (*Canis familiaris*) by Analysis of Microsatellite Markers. Zoological Science 30:27-34 <https://doi.org/10.2108/zsj.30.27>
- [42] Ciucci P, Lucchini V, Boitani L, Randi E (2003) Dewclaws in wolves as evidence of admixed ancestry with dogs. Can. J. Zool. 81:2077-2081 <https://doi.org/10.1139/Z03-183>
- [43] Lorenzini R, Fanelli R, Grifoni G, Scholl F, Fico R (2013) Wolf–dog crossbreeding: “Smelling” a hybrid may not be easy. Mam. Biol. 79:149-156 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2013.07.080>
- [44] Boitani L (1983) Wolf and dog competition in Italy. Acta Zool. Fenn. 174:259–264
- [45] Popova E, Zlatanova D (2019) Living a dog’s life: a putative gray wolf in a feral dog group. Mamm. 84:115-120 <https://doi.org/10.1515/mammalia-2019-0010>
- [46] Crispino F, Costanzo M, Lucia A, Gervasio G (2021) Early and double breeding in a pack of hybrid wolves in Calabria (Southern Italy). Biodiversity Journal 12:379-384 <https://doi.org/10.31396/Biodiv.Jour.2021.12.2.379.384>
- [47] Kusak J, Fabbri E, Galov A, Gomerčić T, Arbanasić H, Caniglia R, Galaverni M, Reljić S, Huber D, Randi E (2018) Wolf-dog hybridization in Croatia. Veterinarski arhiv 88:375-395 <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.170314>
- [48] Tsuda K, Kikkawa Y, Yonekawa H, Tanabe Y (1997) Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: Evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. Genes Genet. Syst. 72:229-238 <https://doi.org/10.1266/ggs.72.229>
- [49] Just RS, Irwin JA, O’Callaghan JE, Saunier JL, Coble MD, Vallone PM, Butler JM, Barritt SM, Parsons TJ (2004) Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. Forensic Sci. Int. 146:147–149 <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.045>
- [50] Kim KS, Lee SE, Jeong HW, Ha JH (1998) The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. Molecular phylogenetics and evolution, 10:210–220 <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0513>
- [51] Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gil, P, Morling N, Parson W, Schneider P (2001) Considerations by the European DNA Profiling (EDNAP) Group on the Working Practices, Nomenclature and Interpretation of Mitochondrial DNA Profiles. Forensic Sci. Int. 124:83–91 [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00573-4](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00573-4)
- [52] Eichmann C, Parson W (2007) Molecular characterization of the canine mitochondrial DNA control region for forensic applications. Int. J. Legal Med. 121:411–6 <https://doi.org/10.1007/s00414-006-0143-5>
- [53] Sindičić, M. et al., 2011. Mitochondrial DNA control region as a tool for species identification and distinction between wolves and dogs from Croatia. Veterinarski Arhiv 81:249–258 <https://doi.org/10.1093/molbev/msi248>
- [54] Sundqvist A-K, Ellegren H, Oliver M, Vilá C (2001) Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. Mol. Ecol. 10:1959-1966 <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01326.x>

- [55] Eichmann C, Berger B, Reinhold M, Lutz M, Parson W (2004) Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *Int. J. Legal Med.* 118:337–42 <https://doi.org/10.1007/s00414-004-0479-7>
- [56] Ito H, Langenhorst T, Ogden R, Inoue-Murayama M (2015) Population genetic diversity and hybrid detection in captive zebras. *Sci. Rep.* 5:13171 <https://doi.org/10.1038/srep13171>
- [57] Dang W, Shang S, Zhang X, Yu Y, Irwin DM, Wang Z, Zhang S (2019) A novel 13-plex STR typing system for individual identification and parentage testing of donkeys (*Equus asinus*). *Equine Vet. J.* 0:1-8 <https://doi.org/10.1111/evj.13158>
- [58] Lorenzini R, Fanelli R, Tancredi F, Siclari A, Garofalo L (2020) Matching STR and SNP genotyping to discriminate between wild boar, domestic pigs and their recent hybrids for forensic purposes. *Sci. Rep.* 10:3188 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59644-6>
- [59] Kemenszky P, Fehér P, Farkas A, Jánoska F, Frank K, Bedó P, Barta E, Varga L, Szemethy L, Stéger V (2020) Genetic differentiation of the Golden Jackal (*Canis aureus*) populations in southern Hungary and southern Romania as revealed by microsatellite data analysis North-West. *J. of Zool.* 17:111-116
- [60] Szemethy D, Mihalik B, Frank K, Nagy T, Újváry D, Kusza Sz, Szemethy L, Barta E, Stéger V (2021) Development of Wild Boar Species-Specific DNA Markers for a Potential Quality Control and Traceability Method in Meat Products. *Food Analytical Methods* 14:18-27 <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01840-1>
- [61] Vilá C, Maldonado J, Wayne R, (1999) Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *J. Hered.* 90:71–77 <https://doi.org/10.1093/jhered/90.1.71>
- [62] Savolainen P, Lundeberg J. (1999) Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs. *J Forensic Sci.* 44:77-81
- [63] Savolainen P, Zhang Y, Luo J, Lundeberg J, Leitner T (2002) Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* 298:1610–1613 <https://doi.org/10.1126/science.1073906>
- [64] Leonard JA, Wayne RK, Wheeler J, Valadez R, Guillén S, Vilá C (2002) Ancient DNA Evidence for Old World Origin of New World Dogs. *Science* 298:1613-1616 <https://doi.org/10.1126/science.1076980>
- [65] Valière N, Fumagalli L, Gielly L, Miquel C, Lequette B, Poulle M-L, Weber J-M, Arlettaz R, Taberlet P (2003) Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation* 6:83-92 <https://doi.org/10.1017/S1367943003003111>
- [66] Verginelli F, Capelli C, Coia V, Musiani M, Falchetti M, Ottini L, Palmirota R, Tagliacozzo A, De Grossi Mazzorin I, Mariani-Costantini R (2005) Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and South-East European wolves. *Mol Biol Evol.* 22:2541-2551. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi248>
- [67] Ryabinina OM (2006) Mitochondrial DNA variation in Asian Shepherd Dogs. *Russ. J. Genet.* 42:748–751 <https://doi.org/10.1134/S1022795406070088>
- [68] Ishiguro N, Inoshima Y, Shigehara N. (2009) Mitochondrial DNA analysis of the Japanese wolf (*Canis lupus hodophilax* Temminck, 1839) and comparison with representative wolf and domestic dog haplotypes. *Zoolog Sci.* 26:765-770 <https://doi.org/10.2108/zsj.26.765>
- [69] Pilot M, Branicki W, Jędrzejewski W, Goszczyński J, Jędrzejewska B, Dykyy I, Shkvyrya M, Tsingarska E (2010) Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evol. Biol.* 10:104 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-104>
- [70] Djan M, Maletić V, Trbojević I, Popović D, Veličković N, Burazerović J, Čirović D (2014) Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation. *Mam. Biol.* 79:277-282 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2014.03.001>
- [71] Bannasch DL, Bannasch MJ, Ryun JR, Famula TR, Pedersen NC (2005) Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mamm Genome.* 16:273-80. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-2435-8>
- [72] van Asch B, Alves C, Santos L, Pinheiro R, Pereira F, Gusmão L, Amorim A (2010) Genetic profiles and sex identification of found-dead wolves determined by the use of an 11-loci PCR multiplex. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4:68-72. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.05.003>



- [73] Randi E (2008) Blackwell Publishing Ltd Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Mol. Ecol.* 17:285-293 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03417.x>
- [74] Randi E, Hulva P, Fabbri E, Galaverni M, Galov A, Kusak J, Bigi D, Bolfíková BC, Smetanová M, Caniglia R (2014) Multilocus Detection of Wolf x Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection. *PLOS ONE* 9(3) e86409 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086409>
- [75] Koblmüller S, Nord M, Wayne RK, Leonard JA (2009) Origin and status of the Great Lakes wolf. *Mol Ecol.* 18:2313-2326 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04176.x>
- [76] Munoz-Fuentes V, Darimont CT, Paquet PC, Leonard JA (2010) The genetic legacy of extirpation and recolonization in Vancouver Island wolves. *Conserv. Genet.* 11:547–556 <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9974-1>
- [77] Caniglia R, Fabbri E, Mastrogiuseppe L, Randi E (2013) Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7:397-404 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.11.001>
- [78] Caniglia R, Galaverni M, Delogu M, Fabbri E, Musto C, Randi E (2016) Big bad wolf or man’s best friend? Unmasking a false wolf aggression on humans. *Forensic. Sci. Int. Genet.* 24 E4-E6 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.06.009>
- [79] Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, Randi E (2010) Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4:334-338 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.012>
- [80] Iacolina L, Scandura M, Gazzola A, Cappai N, Capitani C, Mattili L, Vercillo F, Apollonio, M (2010) Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: A contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. *Mam. Biol.* 75:341-347 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.02.004>
- [81] Wesselink M, Kuiper I (2011) Individual identification of fox (*Vulpes vulpes*) in forensic wildlife investigations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 3:214-215 <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.08.107>
- [82] Kopaliani N, Shakarashvili M, Gurielidze Z, Qurkhuli T, Tarkhnishvili D (2014) Gene Flow between Wolf and Shepherd Dog Populations in Georgia (Caucasus). *J. Hered.* 105:345-353 <https://doi.org/10.1093/jhered/esu014>
- [83] Fabbri E, Caniglia R, Kusak J, Galov A, Gomerčić T, Arbanasić H, Huber D, Randi E (2014) Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. *Mam. Biol.* 79:138-148
- [84] Torres RT, Ferreria E, Rocha RG, Fonseca C (2017) Hybridization between wolf and domestic dog: First evidence from an endangered population in central Portugal. *Mam. Biol.* 86:70-74 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.05.001>
- [85] Bassi E, Canu A, Firmo I, Mattioli L, Scandura M, Apollonio M (2017) Trophic overlap between wolves and free-ranging wolf x dog hybrids in the Apennine Mountains, Italy. *Global Ecol. Conserv.* 9:39-49 <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.11.002>
- [86] Pacheco C, López-Bao JV, García EJ, Lema FJ, Llaneza L, Palacios V, Godinho R (2017) Spatial assessment of wolf-dog hybridization in a single breeding period. *Sci. Rep.* 7:42475 <https://doi.org/10.1038/srep42475>
- [87] Dufrenes C, Remollino N, Stoffel C, Manz R, Weber J-M, Fumagalli L (2018) Two decades of non-invasive genetic monitoring of the grey wolves recolonizing the Alps support very limited dog introgression. *Sci. Rep.* 9:148 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37331-x>
- [88] Santostasi NL, Gimenez O, Caniglia R, Fabbri E, Molinari L, Reggioni W, Ciucci P (2021) Estimating Admixture at the Population Scale: Taking Imperfect Detectability and Uncertainty in Hybrid Classification Seriously. *The Journal of Wildlife Management* 85:1031-1046 <https://doi.org/10.1002/jwmg.22038>
- [89] von Holdt BM, Pollinger JP, Lohmueller KE, Han E, Parker HG, Quignon P, Degenhardt JD, Boyko AR, Earl DA, Auton A, Reynolds A, Bryc K, Brisbin A, Knowles JC, Mosher DS, Spady TC, Elkahouloun A, Geffen E, Pilot M, Jedrzejewski W, Greco C, Randi E, Bannasch D, Wilton A, Shearman J, Musiani M, Cargill M, Jones PG, Qian Z, Huang W et al. (2010) Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature.* 464:898-902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>

- [90] Mozón J, Kays R, Dykhuizen DE (2014) Assessment of coyote-wolf-dog admixture using ancestry-informative diagnostic SNPs. *Mol. Ecol.* 23:182-197 <https://doi.org/10.1111/mec.12570>
- [91] Stronen AV, Jędrzejewska B, Pertoldi C, Demontis D, Randi E, Niedziałkowska M, Pilot M, Sidorovich VE, Dykyy I, Kusak J, Tsingarska E, Kojola I, Karamanlidis AA, Ornicans A, Lobkov VA, Durmenko V, Czarnomska SD (2013) North-South Differentiation and a Region of High Diversity in European Wolves (*Canis lupus*). *PLOS ONE* 8(10) e76454 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076454>
- [92] Pendleton AL, Shen F, Taravella AM, Emery S, Veeramah KR, Boyko AR, Kidd JM (2018) Comparison of village dog and wolf genomes highlights the role of the neural crest in dog domestication. *BMC Biol.* 16(1) 64 <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0535-2>
- [93] Harmoinen J, von Thaden A, Aspi J, Kvist L, Cocchiararo B, Jarausch A, Gazzola A, Sin T, Lohi H, Hytönen M, Kojola I, Stronen AV, Caniglia R, Mattucci F, Galaverni M, Godinho R, Ruiz-González A, Randi E, Muñoz-Fuentes V, Nowak C (2021) Reliable wolf-dog hybrid detection in Europe using a reduced SNP panel developed for non-invasively collected samples. *BMC Genomics* 22:473 <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07761-5>
- [94] Godinho R, López-Bao JV, Castro D, Llanea L, Lopes S, Silva P, Ferrand N (2014) Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining noninvasive samples with ancestry informative markers. *Mol Ecol Resour.* 15:317-28 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12313>
- [95] Ghanatsaman ZA, Wang G-D, Nanaei HA, Fozi MA, Peng M-S, Esmailizadeh A, Zhang Y (2020) Whole genome resequencing of the Iranian native dogs and wolves to unravel variome during dog domestication. *BMC Genomics* 21:207 <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6619-8>
- [96] Axelsson E, Ratnakumar A, Arendt M, Maqbool K, Webster MT, Perloski M, Liberg O, Arnemo JM, Hedhammar Å, Lindblad-Toh K (2013) The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495:360-364 <https://doi.org/10.1038/nature11837>
- [97] Ollivier M, Tresset A., Bastian F, Lagoutte L, Axelsson E, Arendt M-L, Bălăşescu A, Marshour M, Sablin MV, Salanova L, Vigne J-D, Hitte C, Hänni C (2016) Amy2B copy number variation reveals starch diet adaptations in ancient European dogs. *R. Soc. open sci.* 3:160449 <http://doi.org/10.1098/rsos.160449>
- [98] Weich K, Affolter V, York D, Rebhun R, Grahn R, Kallenberg A, Bannasch D (2020) Pigment Intensity in Dogs is Associated with a Copy Number Variant Upstream of KITLG. *Genes* 11(1) 75 <https://doi.org/10.3390/genes11010075>
- [99] Linacre A (2021) Animal Forensic Genetics. *Genes* 12(4) 515 <https://doi.org/10.3390/genes12040515>
- [100] Linacre A, Gusmao L, Hecht W, Hellmann AP, Mayr WR, Parson W, Prinz M, Schneider PM, Morling N (2011) ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5:501-505
- [101] Szives A, Zorkóczy O, Lehotzky P, Somogyi N, Gáspárdy A, Zenke P (2022) Kutya, vagy farkas? Igazságügyi célú molekuláris genetikai vizsgálatok a két taxon fajon belüli elkülönítésére. *Magyar Állatorvosok Lapja* 144:233-247
- [102] Szabolcsi Z, Egyed B, Zenke P, Pádár Zs, Borsy A, Stéger V, Páasztor E, Csányi S, Búzás Zs, Orosz L (2014) Constructing STR Multiplexes for Individual Identification of Hungarian Red Deer. *J. Forensic Sci.* 59:1090-1099 <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12403>
- [103] Zenke P, Egyed B, Pádár Zs, Kovacs G (2015) Increasing relevance of non-human genetics in Hungarian forensic practice. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 5:250–252 <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.100>
- [104] Zenke P, Egyed B, Pádár Zs (2017) A vadászható fajok védelme: az orrvadászat bizonyíthatósága az igazságügyi genetika segítségével. *Magyar Állatorvosok Lapja* 139:631-639
- [105] Zenke P, Egyed B, Kovács G, Pádár Zs (2019) Implementation of genetic based individualization of White stork (*Ciconia ciconia*) in forensic casework. *Forensic Sci, Int. Genet.* 40:245-247 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.02.001>
- [106] Russo C, Mattiello S, Bibbiani C, Baglini A, Bonghi P, Facchini C (2016) Impact of wolf (*Canis lupus*) on animal husbandry in an Apennine Province. *Italian Journal of Animal Science* 13:3303 <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3303>

- [107] Linnell JDC (2013) From conflict to coexistence? Insights from multi-disciplinary research into the relationships between people, large carnivores and institutions. European Commission, Brussels, 56
- [108] Rigg R, Findo S, Wechselberger M, Gorman ML, Sillero-Zubiri C, Macdonald DW (2011) Mitigating carnivore–livestock conflict in Europe: Lessons from Slovakia. *Oryx* 45:272–280  
<https://doi.org/10.1017/s0030605310000074>
- [109] Fernández-Gil A, Naves J, Ordiz A, Quevedo M, Revilla E, Delibes M (2016) Conflict Misleads Large Carnivore Management and Conservation: Brown Bears and Wolves in Spain. *PLOS ONE* 11(3) e0151541  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151541>
- [110] Nowak S, Szewczyk M, Tomczak P, Całus I, Figura M, Mysłajek RW (2021) Social and environmental factors influencing contemporary cases of wolf aggression towards people in Poland. *Eur. J. Wildl. Res.* 67: 69  
<https://doi.org/10.1007/s10344-020-01455-1>
- [111] Rákaptak a borjúhúsról a zempléni farkasfalkák (videó) Kisalföld.hu 2020.10.18.  
<https://www.kisalfold.hu/egyperces/rakaptak-a-borjuhusra-a-zempleni-farkasfalkak-video-10364660/>  
(Látogatva: 2021.10.17.)
- [112] Brutális farkastámadások a megyénkben BOON A Borsod-Abaúj-Zemplén megyei hírportál 2021.03.01.  
<https://boon.hu/kozelet/helyi-kozelet/brutalis-farkastamadasok-a-megyenkben-5242498/> (Látogatva: 2021.10.17.)
- [113] Schley L, Jacobs M, Collet S, Kristiansen A, Herr J (2021) First wolves in Luxembourg since 1893, originating from the Alpine and Central European populations. *Mamm.* 85:193-197  
<https://doi.org/10.1515/mammalia-2020-0119>
- [114] Linacre A (2021) Wildlife crime in Australia. *Emerg. Top. Life Sci.* 5:487-494  
<https://doi.org/10.1042/ETLS20200288>
- [115] Alacs E, Georges A (2008) Wildlife across our borders: A review of the illegal trade in Australia. *Aust. J. Forensic Sci.*, 40:147–160 <https://doi.org/10.1080/00450610802491382>
- [116] van Hoppe MJC, Dy MAV, van den Einden M, Iyenga A (2016) SkydancerPlex: A novel STR multiplex validated for forensic use in the hen harrier (*Circus cyaneus*). *Forensic Sci. Int. Genet.* 22:100–109  
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.02.003>
- [117] Ciavaglia S, Linacre A (2018) OzPythonPlex: An optimised forensic STR multiplex assay set for the Australasian carpet python (*Morelia spilota*). *Forensic Sci. Int. Genet.* 34:231–248  
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.002>
- [118] Zhang H, Ades G, Miller MP, Yang F, Lai KW, Fischer GA (2020) Genetic identification of African pangolins and their origin in illegal trade. *Glob. Ecol. Conserv.* 23 e01119  
<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01119>
- [119] Byard RW (2016) Traditional medicines and species extinction: Another side to forensic wildlife investigation. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 12 125–127 <https://doi.org/10.1007/s12024-016-9742-8>
- [120] Linacre A, Ciavaglia SA (2017) Wildlife Forensic Science. In *Handbook of Forensic Genetics*; Amorin, A., Budowle, B., Eds.; World Scientific Publishing: London, UK, pp. 449–772
- [121] 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet a védett és a fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségben természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről
- [122] 275/2004. (X. 8.) Korm. rendelet az európai közösségi jelentőségű természetvédelmi rendeltetésű területekről
- [123] 1996. évi LV. törvény a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadászatról
- [124] Zenke P, Maróti-Agóts Á, Pádár Zs, Zöldág L (2009) Characterization of the WILMS-TF microsatellite marker in Hungarian dog populations Short communication. *Acta Biol. Hun.* 60:329-332  
<https://doi.org/10.1556/abiol.60.2009.3.10>
- [125] Zenke P. (2010) Mikroszatellita-polimorfizmusok vizsgálata kutya eredetű anyagmaradványokból. Phd értekezés, Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

- [126] Berger C, Berger B, Parson W (2012) Sequence Analysis of the Canine Mitochondrial DNA Control Region from Shed Hair Samples in Criminal Investigations. In: Alonso A (eds) DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 830. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2_23)
- [127] Zenke P, Egyed B, Zöldág L, Pádár Zs (2011) Population genetic study in Hungarian canine populations using forensically informative STR loci. Forensic Sci. Int. Genet. 5:31-36 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.03.013>
- [128] Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. (Web Server issue):W465-9.
- [129] Puillandre N, Brouillet S, Achaz G (2020) ASAP: assemble species by automatic partitioning. Mol. Ecol. 21:609-620 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- [130] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-59. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- [131] Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources vol. 4:359-361 <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- [132] Peakall R and Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28, 2537-2539.
- [133] Véget kell vetni a farkasromantikának? Új szó 2021.10.17. <https://uj szo.com/panorama/veget-kell-vetni-a-farkasromantikanak> (Látogatva: 2021.10.17.)
- [134] Kropatsh R, Streitberger K, Schulte-Middelmann T, Dekomien G, Eppelen JT (2011) On ancestors of dog breeds with focus on Weimaraner hunting dogs. J. Anim. Breed. Genet. 128:64-72 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2010.00874.x>
- [135] Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. Nucleic Acid Res 24:2807-2812
- [136] de Groot A, Nowak C, Skrbinšek T, Asip J, Godinho R, Jansman HAH, Liberg O, Marucco F, Nowak S, Randi E, Śmietana W, Taberlet P, Muñoz-Fuentes V, Mysłajek RW, Pilot M, Reinhardt I, Szewczyk M, Vilá C (2015) Decades of population genetic research reveal the need for harmonization of molecular markers: The grey wolf *Canis lupus* as a case study. Mamm. Rev. 46:44-59 <https://doi.org/10.1111/mam.12052>

## **Köszönetnyilvánítás**

Elsősorban szeretném megköszönni az Állattenyésztési és Genetikai Tanszék vezetőjének, Dr. Gáspárdy Andrásnak, hogy biztosította számomra a labormunkák megkezdéséhez és elvégzéséhez szükséges helyet és eszközöket.

Továbbá, köszönöm a mintákat biztosító intézményeknek (Budakeszi Vadaspark, Miskolci Állatkert és Kultúrpark, Magyar Természettudományi Múzeum, Bécsi Állatorvostudományi Egyetem) és dolgozóiknak – kivált képpen Horkai Zoltánnak, az EVMA vezetőjének, akitől a legtöbb mintát kaptuk – az önzetlen segítségnyújtásukat.

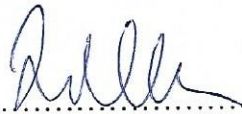
Köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Zenke Petrát, aki rengeteg segítséggel látott el, végig patronált a kutatás során és a dolgozat készítése közben, és fenntartotta lelkesedésemet.

Hálás vagyok még Zorkóczy Orsolya PhD hallgatónak, aki mindig örömmel segítette a munkánkat, és Szűts Tamás tanár úrnak, amiért önként időt szánt rám új programok megtanítása és az eredmények kiértékelése miatt.

Alulírott Dr. Zenke Petra igazolom, hogy Szives András László

„Igazságügyi célú molekuláris genetikai vizsgálatok a kutyák és farkasok elkülönítésére polimorf markerek alapján” című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védeésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2022. 04. 25.



.....  
a témavezető neve és aláírása

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-  
tudományi Intézet

HuVetA  
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\*

Név: .....Szives András László.....

Elérhetőség (e-mail

cím):...andrisszives@gmail.com...../.....YZJGZ0@student.univet.hu.....

A feltöltendő mű címe: ..... Igazságügyi célú molekuláris genetikai vizsgálatok a kutyák és farkasok elkülönítésére polimorf markerek alapján.....

A mű megjelenési adatai: .....2022. Budapest.....

Az átadott fájlok száma: .....1.....

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédelemű PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2022 . év .....04.....hó .....24...nap



alíírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*





**Intézmény tölti ki!**  
**Iktatószám:**  
**Érkezett:**

## KÉRVÉNY

(Kérjük olvashatóan, nyomtatott betűvel kitölteni!)

**Kérelmező adatai** (mindent rovatot kötelező kitölteni):

Név: .....Szives András László.....

Értesítési cím: .....1155 Budapest Tátika utca 3.....

Telefonszám: .....+36 70 635 4122 .....

NEPTUN-kód: .....YZJGZO.....

Szak: Biológia BSc.....

Évfolyam: III......

**Kérelem tárgya:** Szakdolgozati védés alóli felmentés.....

**Kérelmének pontos kifejtése, rövid indoklása:**

Az Állatorvostudományi Egyetem biológia alapképzés képzési tervének 4.1-es fejezetének 16. pontja alapján szeretném kérvényezni a szakdolgozati védés alóli felmentésemet, korábbi tudományos diákköri konferencián való részvételemet és helyezésemet figyelembe véve.

**A kérelem alapjául szolgáló tudományos diákköri konferencián való szereplés részletei:**

Bemutatott munka címe: Igazságügyi célú molekuláris genetikai vizsgálatok a kutyák és farkasok megkülönböztetésére polimorf markerek alapján

TDK konferencia tanéve: 2021/22

.....  
 2022.04.29

dátum

.....  
 aláírás