

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet

A magyarországi őzpopulációk igazságügyi célú genetikai vizsgálata a mitokondriális kontroll régióval



Készítette: Petes Valentina

Témavezető: Dr. Zenke Petra

ÁTE, Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet
tudományos főmunkatárs

Társtémavezető: Zorkóczy Orsolya

ÁTE, Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet
tudományos segédmunkatárs

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések és idegenszavak jegyzéke	2
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1 <i>Az európai őz elterjedése, életmódja és genetikai felosztása</i>	3
2.2 <i>A hazai őzállomány jelentősége</i>	5
2.3 <i>Igazságügyi állatgenetika</i>	7
2.4 <i>A mitokondriális DNS vizsgálatok</i>	8
3. Célkitűzések	9
4. Anyag és módszer	10
4.1 <i>Mintagyűjtés</i>	10
4.2 <i>Minták feldolgozása és DNS preparáció</i>	10
4.3 <i>PCR reakció és szekvenálás</i>	11
4.4 <i>DNS-szekvenciák keresése az NCBI GenBank adatbázisában</i>	12
4.5 <i>Szekvenciák illesztése a MEGA programmal</i>	13
4.6 <i>Haplotípusok meghatározása, szekvenciák geográfiai eredetének és genetikai távolságának elemzése</i>	13
5. Eredmények	15
5.1 <i>A hazai őzek genetikai diverzitásának és struktúrájának vizsgálata</i>	15
5.2 <i>A hazai őzek és a többi európai és ázsiai ország őzeinek viszonya</i>	21
6. Konklúzió és diszkusszió	23
7. Összefoglaló	27
8. Summary	28
9. Irodalomjegyzék	29
10. Köszönetnyilvánítás	36

1. Rövidítések és idegenszavak jegyzéke

barrier: két élőhely közötti akadály

klád: egy közös ős, és annak leszármazottjainak csoportja

glaciális: egy eljegesedés időszakának hidegebb periódusa

introgresszió: egy gén másik fajba való áramlása interspecifikus hibrid és a szülő faj visszakeresztezésével

refúgium: a környezetétől eltérő tulajdonságokkal rendelkező, az élőlényeknek menedékhelyként szolgáló élőhely

μ l= mikroliter

bp= bázispár

BSA= Bovine Serum Albumine (szarvasmarha szérum albumin)

DNS= Deoxiribonukleinsav

mg= milligramm

ml= milliliter

mM= millimol

mtDNS= mitokondriális DNS

ng= nanogramm

PCR= Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)

RNS= Ribonukleinsav

SNP= Single Nucleotide Polymorphism (egy pontos nukleotid polimorfizmus)

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az európai őz elterjedése, életmódja és genetikai felosztása

Az európai őz (1. ábra) (*Capreolus capreolus*), az egyik legelterjedtebb agancsos faj, a legtöbb európai országban megtalálható, de előfordul Észak-Anatóliában, illetve Kelet-Európa és Ázsia találkozásánál is (2. ábra) [1], ahol elterjedése átfedésben van közeli rokonfajával, a szibériai őzzel (*Capreolus pygargus*) [2]. A két faj között mind recens [3], mind múltbéli [4] hibridizációra és introgresszióra is van bizonyíték [5]. Ez a főleg füvekkel, levelekkel, cserjékkel és ágakkal táplálkozó kérődző élőhelyét a rendelkezésre álló táplálék és búvóhely függvényében választja meg [6][7]. Az őzek emésztőtraktusa remek adaptációs képességgel rendelkezik, így tudott gond nélkül alkalmazkodni a síkságok pusztaságai, legelői, mezőgazdasági területei és erdőségei mellett a hegyvidékek lombhullató és örökzöld növényekkel kevert erdeihöz is [8][9][10].



1.ábra: Európai őz (*Capreolus capreolus*): bak (bal oldal) és suta (jobb oldal) [11]

Az őzek hímjeire (1. ábra), a bakokra jellemző a territóriumfoglalás, ami elegendő táplálékforrás és megfelelő rejtékhely érdekében egészen tavasztól augusztus közepéig, a párzási időszak végéig tart [12]. Az őzek szociális viselkedését és populáción belüli kapcsolatait nagyban befolyásolja az élőhelyük. Az erdősebb részeken élő egyedek szívesebben élnek nagyobb csoportokban, míg a mezős részeken sokkal gyakrabban találkozunk magányos egyedeikkel, illetve kisebb, kevésbé állandó csoportokkal [13]. Így a

mezőgazdasági területeken élő őzekre kevésbé jellemző a beltenyésztettség erdőben élő társaikhoz képest [14].



2. ábra: Az európai őz (*Capreolus capreolus*) elterjedése Európában [15]

Az őzek természetes életmódja folyamatos antropogén hatásoknak van kitéve. Az ipari forradalom időszaka során bekövetkezett erdőirtások jelentősen átalakították az állatok addigi élőhelyeit, ugyanis az 1850-es évek végére az átlagos európai erdőterület mérete drasztikusan lecsökkent az első ezredfordulóhoz képest. A Nyugati- és Közép-európai régióban például a földművelésre alkalmas területek erdővel borított része 77,2%-ról 5,8%-ra csökkent [16]. Prédaállat révén kötődése az erdőségekhez erős, hiszen ősi élőhelye egy bokrokkal, cserjékkel, fás és lágyszárú növényekkel is rendelkező környezet volt [17], de az erdőirtás élőhelye elhagyására és nyílt területekre való vándorlásra kényszeríti [18]. Az urbanizáció hatására különböző populációi egyre inkább ki vannak szolgáltatva az élőhelyükön előforduló mesterséges akadályoknak [19][20][21]. Az infrastruktúra, az utak, vasút, kerítések, akár pár nap leforgása alatt képesek drasztikus változást okozni az élőhelyek felépítésében [22], az őz pedig nyugalmas élőhelyet keresve ösztönösen igyekszik elkerülni az infrastruktúra által megzavart területeket [18]. Ugyan léteznek alul és felüljárók [23], amik csökkenteni hivatottak az élőhely fragmentációját, Coulon és mtsai. 2006-os tanulmányából [24] láthatjuk, hogy bár egy több sávú utat megoldásként áthidalhatunk átjárókkal, ezek az átjárók továbbra is akadályként szolgálnak, és nem kompenzálják az út elválasztó, ún. „barrier” hatását. Bár a fent említett antropogén hatások és a mértéktelen vadászat megtizedelte számos európai ország vadállományát, a XX. század végére az őzpopulációk egyedszámukban helyreálltak [25][26]. Területi eloszlásukat tekintve legnagyobb egyedsűrűséggel Közép-Európában találkozunk, Európa északi és déli országaiban a többihez képest kevésbé terjedtek el [27].

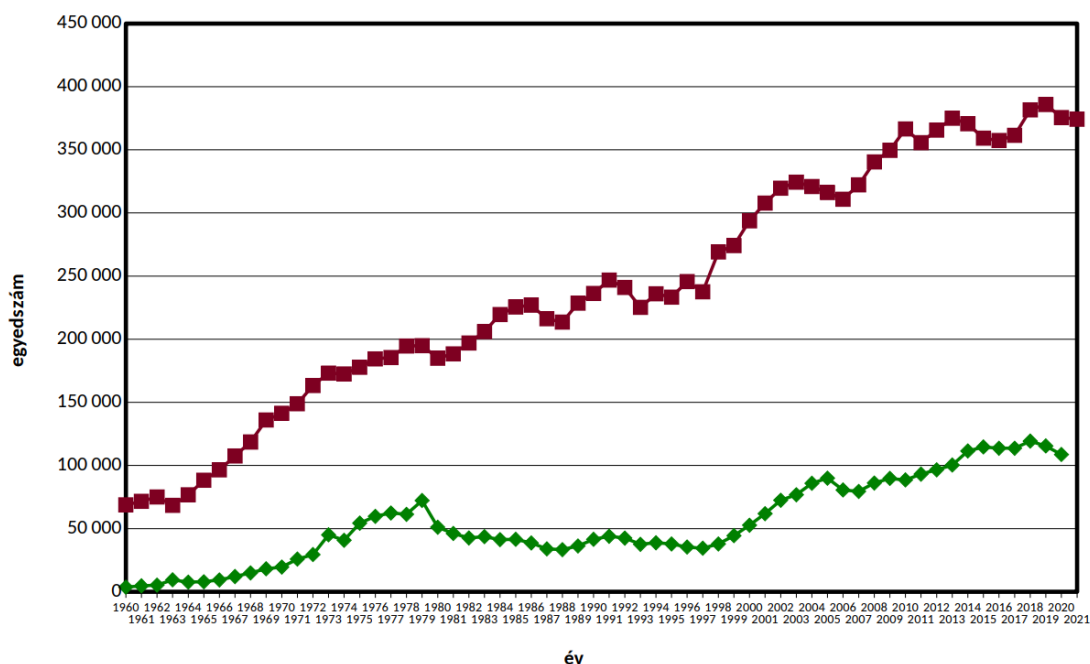
Számos kutatás foglalkozik az őzek filogenetikai és filogeográfiai célú feltérképezésével, illetve a rekolonizáció lehetőségének vizsgálatával [28][29]. Randi és mtsai. (2004) leírták, hogyan keletkezhetek az európai állományokon belül a legutóbbi jégkorszak glaciálisában kialakult refúgiumoknak köszönhetően genetikailag elkülönült populációk [30]. Mitokondriális DNS vizsgálatok alapján három nagy haplocsoportot határoztak meg, úgymint a nyugati klád (Ibériai-félsziget, Közép-, és Kelet-Európa) [31], keleti klád (Balkán-félsziget, Kelet-Európa és Görögország) illetve centrális klád (Észak-, Közép-, és Kelet-Európa, Ibériát is érintve [30]. Azt a feltételezést, hogy Görögországban, Észak-Ibériában és Dél-Olaszországban refúgiumpopulációk éltek, amik a legutóbbi jégkorszak hatására kényszerültek ezekre a területekre, később létrehozva a nyugati és keleti kládokat, ugyanez a kutatás [30] ezt a feltételezést sejtmagi mikroszatellita markerekkel is sikeresen alátámasztotta. Egy későbbi tanulmány szintén foglalkozott ezzel a témával és valószínűsítette, hogy a centrális klád feltehetően egy Kelet-, vagy Közép-európai menedékpopulációból származhat, hiszen itt a perifériás differenciálódással szemben egy kevert csoporttal találkozhatunk [32].

Az élőhely jellegzetességei mellett azonban a vadászat is nagy hatással van populációik genetikájára, ugyanis megváltoztathatja az állományok allélgyakoriságát [33], növelheti a hibridizáció valószínűségét, illetve beltenyészettséghez vezethet [34].

2.2 A hazai őzállomány jelentősége

Hazánk vadászati kultúrájában a fontos agancsos vadak közé emelkedett az őz is. Jó alkalmazkodóképességének köszönhetően az egész országban nagy számban előfordul, leginkább az ország délkeleti részében, Bács-Kiskun, Jász-Nagykun-Szolnok és Békés megyében van a legnagyobb egyedszámban [35]. Jelentősége abban is rejlik, hogy a külföldi vendégvadászok által való elejtése gazdasági bevételként szolgál, ugyanis jelentős költség fejében lövik ki ezt a szinte minden vadász számára elérhető vadat [36]. A vadászati kultúrában való kiemelt szerepéről árulkodik az is, hogy a leterített őzek száma is szignifikánsan növekszik az évek során, hiszen míg a kilencvenes évek terítéke alig érte el a 40.000 egyedet, a 2020/2021. vadászati évben 108.708 őzet ejtettek el [35] (3. ábra).

Őz



3. ábra: Őzek becsült egyedszáma (piros) és a teríték száma (zöld) 1960-tól 2021-ig a Vadgazdálkodási Adattár alapján

Az vadgazdálkodás része az egyes vadászterületeken előforduló vadak számának és az általuk okozott kár felmérése. Az egyedszám becslése sokszor kihívást jelent a szakemberek számára, ugyanis az alkalmazott technikák megbízhatósága kérdéses, vagy nem megfelelő az alkalmazásuk [37]. A vadkár mértékének megítélését nehezíti a tény, hogy a gímszarvas (*Cervus elaphus*), és az európai őz rágásképe nagyon hasonló [38], és a mezőgazdasági területeket érő pénzben mért vadkár több tízszerese az erdőkben előforduló veszteségeknek [35]. Ezek fényében elengedhetetlen a megfelelő éves vadgazdálkodási terv kialakítása és teljesítése, aminek része a vadon élő állatok genetikai diverzitásának ismerete és megőrzése is [39]. A megfelelő vadállomány menedzsment egyik fő eszköze maga a vadászat, az egyéb, ritkábban alkalmazott technikák mellett (pl. hormonális kezelések, csapdába ejtés majd kilövés, csapdába ejtés majd áthelyezés) [40]. Ez a tevékenység kiemelten fontos szerepet tölt be a vadászati kultúrában, hiszen a megfelelő állományszabályozás nélkül az őzek jelentősen elszaporodhatnak egyes területeken [41].

Az ellenőrzött vadászati tevékenységekkel szemben az orvvadászat is problémát jelent, megnehezítve a hivatásos vadászok munkáját, akik szakértelemmel próbálnak eleget tenni a kitűzött éves vadgazdálkodási tervnek [42]. Továbbá az országos úthálózat környezetében fellelhető vadon élő állatok számtalanszor esnek vadgázolás áldozatává, illetve közlekedési károk okozójává [43]. Az 1996. évi LV. törvény V. fejezetének 75 §-a tartalmazza a

vadgázolással kapcsolatos szabályokat, mely szerint a vadgázolást be kell jelenteni, az elhullott állat tetemét és agancsát pedig tilos birtokba venni, ugyanis az a vadászatra jogosult társaságok tulajdona [44]. A gázolók ezzel szemben sokszor hátrítva a felelősséget, vagy a nem megfelelő tájékozottság miatt nem követik ezeket a szabályokat és törvényt sértenek. Ezekben az esetekben a felmerült kérdéseket a hagyományos módszerekkel sokszor nem lehetséges megválaszolni, ekkor nyúlhat a törvényszék az igazságügyi állatgenetika vizsgálómódszereihez.

2.3 Igazságügyi állatgenetika

Napjaink egyik egyre nagyobb szereppel bíró tudományterületének alapvetően két fontos alterülete van: a vadon élő fajokkal és a háziasított fajokkal foglalkozó. A háziasított fajok esetében leginkább az egyedi azonosítás válik szükségessé pl. kutyáknál [45], szarvasmarhánál [46], sertésnél [47]. A vadon élő fajokkal kapcsolatos eljárásoknál azonban sokszor az állat faja is ismeretlen. Itt kap szerepet a faj és fajtaazonosítás például ismeretlen eredetű, vagy összetételű hentesáru beazonosítására [48], illetve orvvadászat gyanúja esetén az állati maradványok azonosítására [49]. Ezen kívül beszélhetünk hibridazonosításról, a különböző (al)fajok keresztezéséből létrejött egyedek detektálásához [50]. Populáció szintű azonosításról beszélünk abban az esetben, ha egy egyedet egy adott populációhoz rendelünk olyan genetikai variációk alapján, ami csak az adott populációra jellemző.

Az igazságügy vadon élő állatokkal foglalkozó ága állandó harcot vív az állatokhoz kötődő illegális tevékenységek felszámolásáért. Az állatokkal és részeikkel való illegális kereskedelem [51], az orvvadászat [52], a vadgázolások [53] és azok bejelentésének elmulasztása, a trófeákkal kapcsolatos visszaélés [54] és a vadon élő állatok élelmiszerként történő illegális forgalmazása [55] során szükség lehet a törvényszéki genetika alkalmazására. A közlekedési baleseteket okozó állatok elhagyhatják a helyszínt, a gázolók törvénytelenül eltulajdoníthatják a tetemeiket [56], illetve előfordul, hogy az orvvadászat helyszínein a tetem faja beazonosíthatatlan vagy csak vér, szőr és szövetminta áll a rendelkezésre. Az állat faji azonosítása így sokszor csak genetikai módszerekkel lehetséges, ehhez pedig számos markertípus áll rendelkezésünkre, úgymint a sejtmagi SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markerek [57], mikroszatelliták [58] és a mitokondriális DNS bizonyos szakaszai [59][60] is használhatóak.

2.4 A mitokondriális DNS vizsgálatok

Az emlősök minden sejtjében, eltérő számban előforduló mitokondrium genetikai anyaga a mitokondriális DNS (mtDNS), amely dupla szálú cirkuláris DNS [61]. Ez egy körülbelül 16 kilobázis hosszúságú lánc, ami akárcsak a nukleáris DNS, fehérjéket és RNS-t kódol [62]. Az mtDNS két fő részre osztható, a kódoló és a nem kódoló régióra. A nem kódoló régió, más nevén kontroll régió (D-loop) egy olyan szakasz, amely közepén található egy konzervatív rész, ami két hipervariábilis régiót választ el egymástól [63].

A mitokondriumok nagy számban fordulnak elő a sejtek citoplazmájában, és a mitokondrium mátrixán belül is több másolat fordul elő a DNS-ből, ezért kevés szövetből is nagy mennyiségű mtDNS mintát nyerhetünk ki. Mindezek mellett, a mitokondriumok egy proteinkapszulával rendelkeznek, aminek köszönhetően sokkal kevésbé vannak kitéve a degradációnak [64]. A vadgázolás és orrvadászat bűnügyi helyszínein található minta sokszor kis mennyiségű, és/vagy erősen degradálódott. A degradáció különböző környezeti hatások eredménye, mint a baktériumok okozta dekompozíció [65], az UV-hatás [66] és a nyirkos közeg [67]. Ezen hatásokra a DNS feldarabolódik, ami megnehezíti illetve ellehetetleníti a PCR technika során célzott DNS-szakaszok sokszorosítását [68]. Ezért a degradáció hatásának nagyobb mértékben kitétt sejtmagi DNS vizsgálatának sikertelensége sokszor szükségessé tesz a sokkal inkább ellenálló mitokondriális DNS vizsgálatát.

Említenünk kell azt a tényt is, hogy a mtDNS nem kódoló kontroll régiójának mutációs rátája a nukleáris DNS-hez viszonyítva nagyobb [69], és az így kialakult nagy variabilitásnak köszönhetően a mitokondriális DNS ezen szakasza alkalmas markernek bizonyulhat olyan esetekben, amikor két faj nukleáris DNS alapján szorosabb rokonságot mutat, de mitokondriális DNS alapján elkülöníthetők (pl. alfaj szintű azonosítás) [63]. Fontos tulajdonsága az öröklődése is, 1974-ben Hutchison felfedezte, hogy az mtDNS maternálisan öröklődik generációról generációra, tehát az anya bár az összes utódjának átadja a mitokondriális DNS-ét, azt csak a lányai örökítik tovább [70].

Fent említett tulajdonságai miatt hatékonyan lehet alkalmazni a populációgenetikai felmérésekben. Egy kérdéses minta adott populációhoz vagy anyai leszármazási vonalhoz való tartozása, illetve a geográfiai eredetének meghatározása bizonyos esetekben segítség lehet egy bűncselekmény megoldásában. Hogy ezek a módszerek kellő hatékonysággal alkalmazhatóak legyenek, fontos egy előzetes országos populációgenetikai feltérképezés.

3. Célkitűzések

Kutatásunk alapvető célja a hazai őzállomány anyai vonalakban fellelhető változatosságának felmérése a mitokondriális kontroll régió alapján, igazságügyi célú vizsgálatokhoz.

Ehhez szükséges az ország több populációját lefedő, eddig mások által nem vizsgált régióból származó őzminta begyűjtése, hogy kutatásunk minél reprezentatívabb legyen.

A begyűjtött mintákból tervezzük a megfelelő mtDNS szakasz PCR sokszorosítását és szekvenálását a haplotípusok megállapításához.

Az így kinyert genetikai információ alapján további célunk a magyarországi őzállomány és a más európai állományok között fennálló genetikai kapcsolat elemzése, a korábbi kutatásokban leírt őzszekvenciák felhasználásával (figyelembe véve az európai őzpopulációk szibériai őzekkel való introgresszióját, amire a két fajnak csupán a mitokondriális DNS-ében van bizonyíték).

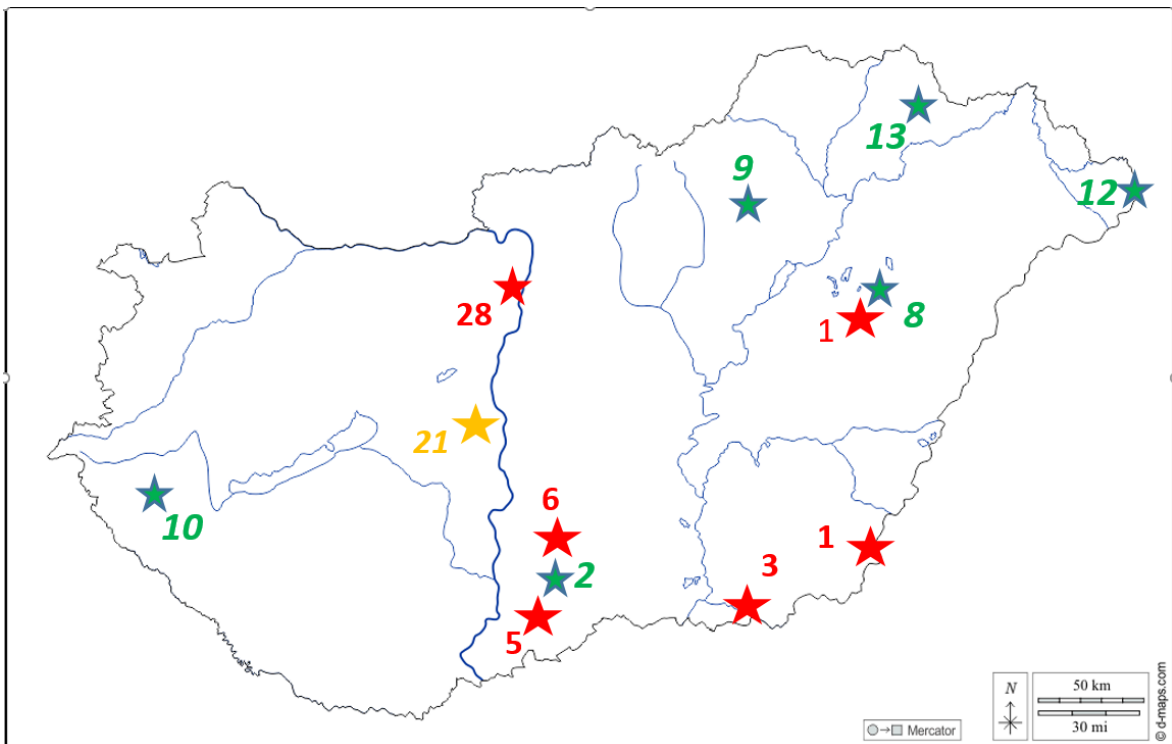
Célkitűzéseink közé tartozik továbbá a kontroll régió alkalmazhatóságát vizsgálni a populációk elkülönítésére és a különböző egyedek régiókhöz való rendelésére

Mindezek érdekében szeretnénk meghatározni a hazai őzpopulációk anyai leszármazási vonalainak változatosságát, amely felmérés megalapozza a módszer alkalmazhatóságát igazságügyi célú (pl. kizáráson alapuló) vizsgálatokban is.

4. Anyag és módszer

4.1 Mintagyűjtés

Összesen 44 őzmintát gyűjtöttünk Magyarország különböző vadászterületeiről: Pilis, Hortobágy, Duna-Tisza köze (Sükösd, Homokmégy) és a Viharsarok (Kiszombor, Lőkősháza, Makó, Maroslele) (4. ábra). A mintákat (szőrös bőr és izom) regisztrált kilövésekből kaptuk hivatásos vadászoktól, a kutatás érdekében állat elejtése nem történt. A mintákat fagyasztva -20°C -on tároltuk későbbi felhasználásig az Állatorvostudományi Egyetem Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézetében.



4. ábra: Gyűjtött őzminták száma származási helyenként: piros - saját minták, sárga - Németh. A. (2015) [71], zöld - Plis és mtsai. (2022) [31]

4.2 Minták feldolgozása és DNS preparáció

A kapott szövetmintáinkból kb. 25 mg tömegű szövetet metszettünk ki steril szike segítségével mikrocentrifuga csövekbe, ügyelve arra, hogy a kivágott rész a minta közepéből származzon, elkerülve az esetleges minták közötti kontaminációt. A DNS kinyerés a gyártó által leírt protokoll szerint történt a FAVORGEN FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit segítségével.

A DNS preparáció sikerességét agarózgél elektroforézis segítségével ellenőriztük, interkaláló DNS-festéket (GR Safe) tartalmazó 2%-os agarózgélben, 40 perc futási idővel,

230 V feszültség mellett. Minden DNS mintából 5 µl-t vittünk fel a gél egy-egy zsebébe. A kész gélről UV-szkenneléssel digitális felvételeket készítettünk a DNS kinyerés sikerességének értékeléséhez.

4.3 PCR reakció és szekvenálás

A tisztított DNS-t ezt követően PCR reakcióhoz használtuk fel. A reakció során szükséges anyagokat 25 µl (mikroliter) végtérfogatra számítva mértük össze. Ez 2,5 µl (5 mM) CaprL00002/ CaprH00913 primert tartalmazott [71], 13 µl vizet (Ultra Pure Water) és 5 µl DreamTaq PCR Master mixet (ami nukleotidokat, DNS polimerázt, 4 mM MgCl₂-t és puffert tartalmaz). Négy µl 0,5-5 ng/µl koncentrációjú őz DNS-t és 0,5 µl 20 mg/ml BSA-t is hozzámértünk, ami növeli a reakció hatékonyságát (többek között az esetleges PCR inhibitorok gátlásával). A DNS-t tartalmazó elegyek mellett PCR összemérésenként reagens kontrollt is teszteltünk (amibe nem mértük DNS mintát), a lehetséges kontamináció kimutatása céljából. A PCR programot az alábbi paraméterekkel állítottuk be:

- Kezdeti denaturáció: 94°C - 1 perc
- 32 ciklusszámban ismétlődő három szakasz:
 - o Denaturáció: 94°C - 40 másodperc
 - o Anelláció: 56°C - 40 másodperc
 - o Elongáció: 72°C - 80 másodperc
- Végző elongáció: 72°C - 2 perc

A PCR termékeket egy újabb agarózgél elektroforézis során ellenőriztük, az előző fejezetben leírt elektroforézis folyamatának megfelelően, vizsgálva a PCR reakció sikerességét (100 bázispáros DNS-létra alkalmazása mellett a megfelelő ampikon méret ellenőrzése céljából).

A sikeresen sokszorosított mitokondriális kontroll régiókat ezután tisztítottuk a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit segítségével (a gyártó leírása alapján), és szekvenáltuk a BIOMI Biotechnológiai Szolgáltató Kft. közreműködésével. A kész szekvenciákat ezek után ellenőriztük annak érdekében, hogy nem-, vagy hibásan azonosított nukleotidokat kijavítsuk, illetve a nem megfelelően szekvenált végeket levágjuk. Ehhez a Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp) szoftvert használtuk és ennek segítségével hoztuk létre a forward és reverz irányból szekvenált mintákból a konszenzus szekvenciákat.

4.4 DNS-szekvenciák keresése az NCBI GenBank adatbázisában

A releváns területekről származó őzek mitokondriális kontroll régiójának szekvenciáit az NCBI GenBank adatbázisából (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) nyertük. A hazai feltérképezéshez, az összes GenBankban elérhető, megfelelő hosszúságú és ismert származási helyű szekvenciát felhasználtuk. A Közép-Dunántúlról származó 21 őzszekvenciát Németh A. (2015) [71] munkája alapján töltöttük le. Plis és mtsai [31] munkája alapján 54 magyar szekvencia adataihoz sikerült hozzáférnünk az adatbázisból, ezek a szekvenciák az ország több területéről származnak (Zemplén környéke, Hortobágy, Göcsej, Bükk, Kelet Szatmár-Bereg és Duna-Tisza köze) (4. ábra). Az őzszekvenciák megtalálhatóak az egyes kutatásoknak megfelelő azonosítószámok alatt. Ilyen módon összesen 75 magyarországi szekvenciával tudunk dolgozni a sajátokon kívül.

A hazai őzállomány európai és ázsiai populációkhoz való kapcsolatának vizsgálatához felhasználtuk a saját (n=43), és az összes elérhető (n=1897), megfelelő minőségű és hosszúságú szekvenciát (1. táblázat).

1. táblázat: A GenBankból letöltött európai őzszekvenciák (*Capreolus capreolus*) száma országoként

Ország	Szekvenciák száma (db)	Referencia
Ausztria	6	[2]
Dánia	18	[2] [30]
Franciaország	24	[2] [30]
Görögország	95	[2] [30] [72]
Lengyelország	14	[2] [30] [73]
Litvánia	10	[2] [30]
Magyarország	75	[31][71]
Nagy-Britannia	313	[74]
Németország	15	[30]
Olaszország	761	[2] [5][30] [75] [76]
Oroszország	36	[2] [77]
Portugália	23	[30]
Románia	10	[2]
Spanyolország	251	[2] [30] [78]
Svájc	53	[29]
Svédország	9	[2] [30]
Szerbia	184	[30]
Összesen:	1897	

Továbbá minden elérhető (n=125), megfelelő minőségű és hosszúságú szibériai őzszekvenciát is letöltöttünk, az introgresszió vizsgálata céljából (2. táblázat). Így összesen 2065 (1940 európai őz és 125 szibériai őz) szekvenciát használtunk fel.

2. táblázat: A GenBankból letöltött szibériai őzszekvenciák (*Capreolus pygargus*) száma országonként

Ország	Szekvenciák száma (db)	Referencia
Korea	11	[79] [80]
Kirgizisztán	1	[2]
Kína	24	[81] [80] [2]
Lengyelország	6	[2]
Litvánia	3	[2]
Mongólia	19	[80]
Oroszország	61	[77] [80] [2] [73] [82]
Összesen:	125	

4.5 Szekvenciák illesztése a MEGA programmal

A GenBankból letöltött és a saját szekvenálásból származó szekvenciák illesztését és vágását a Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 11.0.13) [83] számítógépes szoftverrel végeztük. A szekvenált szakaszokból egy nem bizonyult megfelelő hosszúságúnak, így a kutatás további részében csak 43 mintát használtunk fel. A folyamat végeredményeként egy FASTA formátumú fájlt kaptunk, amit átkonvertáltunk RDF fájlra a „FAS to RDF Conversion” átalakító weboldalt [84] segítségével. Ezután a kapott RDF fájlt a Phylogenetic Network 10.2. programmal beolvastuk [85] (ez a program csak RDF formátumban képes felismerni a szekvenciák közötti báziseltéréseket).

4.6 Haplotípusok meghatározása, szekvenciák geográfiai eredetének és genetikai távolságának elemzése

A NETWORK szoftver segítségével vizuális elemzésnek vetettük alá szekvenciáinkat. A program használatával határoztuk meg a haplotípusokat, majd vizsgáltuk a geográfiai eredetüket és genetikai távolságukat. A program által *median joining* módszerrel alkotott gráf gócpontjai és az azok közötti összeköttetések reprezentálják az egyes haplotípusok összefüggéseit.

A hazai őzek genetikai alapú regionális elkülöníthetőségének vizsgálata az egyes populációpárok közötti statisztikai analíziseken is alapult. Ezt a Wright- féle F-statisztika módszerével végeztük a DNA Sequence Polymorphism szoftver [86] segítségével. A program mátrix formájában jeleníti meg a populációpárok között lévő genetikai távolságot. A kapott értékek nagysága korrelál a molekuláris eltérés mértékével. Az Fst érték a teljes

populációban előforduló genetikai variációk összegének és a szubpopulációkban előforduló összes variáció hányadosa. Az érték 0 és 0,05 között kis alacsony genetikai különbséget jelez. Szignifikáns genetikai differencia $F_{st}=0,15$ vagy magasabb értéknél mutatkozik, míg 0,25 fölött már nagyon nagy különbséget jelez.

5. Eredmények

5.1 A hazai őzek genetikai diverzitásának és struktúrájának vizsgálata

Első körben az általunk gyűjtött őzek haplotípus szekvenciáit vizsgáltuk meg 887 bp hosszú szakaszon. Egyes szekvenciák nem elégséges hossza miatt csak 41 szekvenciával dolgoztunk, ezek alapján összesen 31 haplotípust találtunk (3. táblázat). Ehhez adódott még a 32. haplotípus, ami egy rövidebb szakaszon (611 bp) történt összehasonlítás során adott eredményt (mivel ez a rövidebb szakasz alapján is elkülönült a többi haplotípustól, így nem hagytuk figyelmen kívül). A vizsgált szakaszon összesen 63 polimorf pozíció volt, amiből 49 szubsztitúció, 14 pedig inzerció/deléción (indel) polimorfizmus.

3. táblázat: Az általunk vizsgált hazai őzszekvenciák 887 bázispár hosszú illesztésén talált haplotípusok és a hozzájuk tartozó egyedek, csillaggal jelölve a rövidebb (611 bázispáros) szakasz illesztését.

Haplotípus	Egyedek azonosító kódja	Haplotípus	Egyedek azonosító kódja
hun1	Cc2, Cc9, Cc26, Cc35, Cc37, Cc40, Cc45	hun17	Cc36
hun2	Cc3, Cc24	hun18	Cc38
hun3	Cc4	hun19	Cc39
hun4	Cc5	hun20	Cc41
hun5	Cc6	hun21	Cc43
hun6	Cc8	hun22	Cc44
hun7	Cc19	hun23	Cc46, Cc50
hun8	Cc20	hun24	Cc47
hun9	Cc22	hun25	Cc48
hun10	Cc23	hun26	Cc49
hun11	Cc25	hun27	Cc51
hun12	Cc27, Cc32, Cc42	hun28	Cc52
hun13	Cc29	hun29	Cc53
hun14	Cc31	hun30	Cc54
hun15	Cc33	hun31	Cc55
hun16	Cc34	hun32*	Cc7

Ezt követően a saját szekvenciáinkat illesztettük a GenBank-ból letöltött többi, Magyarországi populációkból származó őzszekvenciával. Így 118 egyed mintáira összesen 39 haplotípust kaptunk egy 611 bp hosszú szakaszon. Több, a hosszabb illesztésnél talált, elkülönülő haplotípus itt egy haplotípusba sorolódott. A legtöbb általunk talált haplotípus egyezést mutatott korábban hazánkból vagy más országból leírt haplotípusokkal (4. táblázat).

4. táblázat: A hazai haplotípusok és egyezésük már Magyarországról vagy más országokból leírt haplotípusokkal. Továbbá az általunk a 887 bp illesztésnél talált haplotípusok egyezése egymással a rövidebb, 611 bp hosszú illesztésnél. Felső indexek a forráspublikációkat jelzik: 1. [31]; 2. [30]; 3. [73]; 4. [2]; 5. [75]; 6. [72]; 7. [77]

saját vizsgálat	Magyarországon kimutatott haplotípusok		Más országokból korábban leírt, velük egyező haplotípusok
	Németh A. (2015) [71]	Plis és mtsai. (2022) [31]	
hun1	hu09		CCH48 ¹
hun2, hun24			
hun3, hun8, hun21	hu10	CCH64	CcH104 ²
hun4			CcH153 ²
hun5, hun25, hun27, hun29		CCH65	CcH150 ² , CcH140 ²
hun6, hun12, hun19	hu01, hu02	CCH182	CcH30 ²
hun7			
hun9			
hun10			
hun11			
hun13	hu04	CCH162	Cc7h ³
hun14, hun15		CCH180	CcH89 ²
hun16			
hun17			
hun18, hun20			CCH43 ¹
hun22			
hun23			CCH108 ¹ , CcH80 ²
hun26, hun31		CCH177	CcH84 ²
hun28	hu08	CCH167	CcH85 ² , Cc25 ⁴
hun30			
hun32*	hu03	CCH188	Cc9 ⁴ , L20 ⁵ , CcH23 ²
	hu05		
	hu06		
	hu07	CCh176	CcH86 ²
	hu11	CCH186	
		CCH164	CcH38 ²
		CCH166	CcH152 ² , Cc36 ⁴ , L004 ⁶ , L008 ⁶ , L009 ⁶
		CCH168	CcH54 ²
		CCH174	
		CCH175	CcH81 ²
		CCH178	
		CCH181	CcH107 ²
		CCH183	
		CCH184	L24 ⁵
		CCH185	
		CCH187	CcH14 ² , L7 ⁵
		CPH19	2509 ⁷ , 2761 ⁷ , Cp39 ⁴ , Cp41 ⁴ , Cp3h ³
		CPH26	Cp4h ³

A saját vizsgálatokból kimutatott haplotípusok közül 13 Magyarországon még mások által le nem írt haplotípus volt, tíz pedig újnak, a fajnál eddig le nem írt haplotípusnak bizonyult.

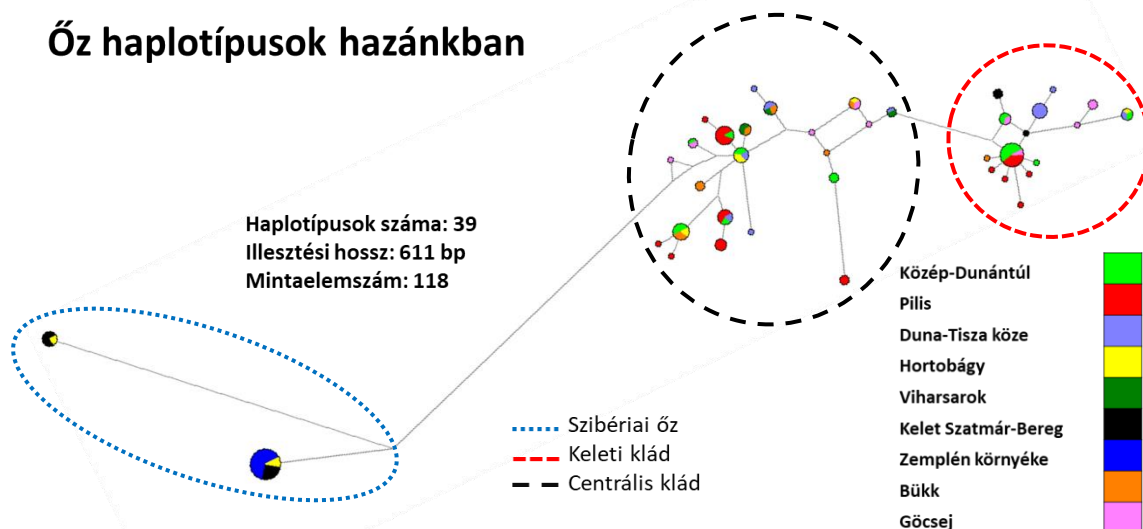
Ennek a tíz új haplotípusnak a polimorf pozícióit egy táblázatban jelenítettük meg (5. táblázat). A szekvenciák összesen 24 polimorf pozícióban mutattak eltérést a referencia szekvenciához képest.

5. táblázat: A tíz új haplotípusok polimorf pontjai. A táblázat tetején a számok a polimorf pontok referencia szekvenciában (GenBank azonosító: Z70318) elhelyezkedő pozícióját mutatják. A pontozott részek a referenciaszekvenciával való megegyezést, a betűk pedig a báziseltérést mutatják.

Polimorf pozíciók	5	6	1	3	4	7	1	1	1	1	1	2	3	3	3	4	5	5	5	5	5	5	6	
Referencia	A	C	G	A	G	T	A	C	C	A	G	T	C	C	T	T	C	T	T	A	G	A	G	-
Hun2	T	G	C	G
Hun7	G	.	C	.	A	G	A	.	.	T	C	G	A	G	.	.
Hun9	G	.	.	G	C	C	.	.	.	G	.	.	A	.
Hun10	.	G	G	.	.	G	C	C	.	G	.	G	.	.	A	.
Hun11	.	.	.	C	A	G	A	.	.	T	C	.	A	.	.	G	A	G	.	.
Hun16	A	G	A	.	.	T	C	.	.	.	G	G	A	G	.	.
Hun17	T	.	G	G	.	G	A	.
Hun22	A	G	A	.	.	T	C	G	A	G	A	A
Hun30	.	.	A	T	.	G	.	C	T	G	A	.	A	.
Hun32	.	.	A	.	.	G	.	T	.	G	G	.	.	A	.

A NETWORK szoftver által kapott gráfon a haplotípusok három egymástól jól elkülöníthető csoportot alkottak, ezek közül az egyik, két haplotípust tartalmazó csoport a többi haplotípustól kifejezetten nagy genetikai távolságot mutatott. Az elkülönülő csoportban szibériai őz haplotípusok voltak, míg a másik két csoport a keleti és centrális klád őzhaplotípusait foglalja magában (5. ábra).

Őz haplotípusok hazánkban



5. ábra: Magyarországi európai őzeknél kimutatott haplotípusok és csoportosításuk. A haplotípusokat ábrázoló gócpontok színekkel vannak jelölve, méretük egyenesen arányos a hozzájuk tartozó egyedek számával. A gócpontok színek a minták származási helyét ábrázolják, egy gócponton belül előforduló több szín esetén azok arányosak a mintaszámmal. A haplotípusok közötti összeköttetések hosszai pedig a haplotípusok közötti genetikai távolságot szimbolizálják.

A két szibériai haplotípussal három populáció egyedei rendelkeznek, ezek a Zemplén környéke, ahol az összes vizsgált egyed egy szibériai haplotípushoz tartozott, illetve Kelet Szatmár-Bereg és a Hortobágy térségek, amelyek populációiban mindkét szibériai haplotípus jelen volt, az előbbiben két európai, az utóbbiban négy európai haplotípus mellett. A vizsgálataink alapján tehát a szibériai haplotípus az ország keleti régióiban fordul elő. Az európai őzek haplotípusainál a szibériaival szemben nem tapasztaltunk geográfiai elkülönülést, egy populáció több európai haplotípussal is rendelkezik, illetve az egyes haplotípusok az ország több régiójában is előfordultak.

6. táblázat: A magyarországi populációpárok F_{st} értékei. Kékkel a szignifikáns különbség ($>0,15$), pirossal a nagyon nagy szignifikáns különbséget ($>0,25$), mutató F_{st} értékek. A populációk rövidítései: KD (Közép-Dunántúl), P (Pilis), DTK (Duna-Tisza köze), V (Viharsarok), H (Hortobágy), KSzB (Kelet Szatmár-Bereg), Z (Zemplén környéke), B (Bükk), G (Göcsej).

	KD	P	DTK	VS	H	KSZB	Z	B
P	0,00625							
DTK	0,02072	0,07134						
VS	0,18047	0,15837	0,13415					
H	0,11740	0,12388	0,11729	0,17778				
KSZB	0,46127	0,47665	0,44933	0,54087	0,11326			
Z	0,87594	0,88169	0,85893	0,91579	0,54012	0,36002		
B	0,09177	0,06304	0,11517	-0,00595	0,11830	0,49861	0,88561	
G	-0,03289	0,04374	0,00918	0,17506	0,08234	0,42482	0,84636	0,09326

A populációk egymáshoz viszonyított genetikai távolságának felméréséhez F_{st} értékeket számoltunk az egyes populáció párok között (6. táblázat). A 0,15 feletti érték már szignifikáns különbséget, a 0,25 feletti pedig nagyon nagy különbséget jelent az adott két populáció genetikai állománya között a haplotípusok alapján. Nagyon magas értékeket az országnak a keleti régióival, azaz Kelet Szatmár-Bereg és Zemplén környéke régióival párba állított populációk esetében kaptunk, míg szignifikáns különbséget a Viharsarok régiótól a Dunától nyugatra eső Pilis, Közép-Dunántúl és Göcsej régiók mutattak. Zemplén környéke az összes populációval 0,25 feletti értéket mutatott. Kelet Szatmár-Bereg esetében hasonlóan az előbbihez majdnem minden populációval 0,25 feletti különbség jelentkezett, kivéve Hortobágyi populációt. Ez alátámasztja a már fentebb említett NETWORK ábra eredményét, ahol ezen elkülönült populációkban fordult elő leggyakrabban a szibériai őz haplotípus. A többi populációpár nem mutatott 0,15 feletti értéket, így ebből azt állapítottuk meg, hogy ezen régiók populációi között a vizsgált egyedek haplotípusai alapján nincs szignifikáns különbség.

7. táblázat: A magyarországi populációk statisztikai adatai: egyedszám, polimorf helyek száma, haplotípusok száma, haplotípus diverzitás és különbségek átlagos száma. A populációk rövidítései: KD (Közép-Dunántúl), P (Pilis), DTK (Duna-Tisza köze), V (Viharsarok), H (Hortobágy), KSzB (Kelet Szatmár-Bereg), Z (Zemplén környéke), B (Bükk), G (Göcsej).

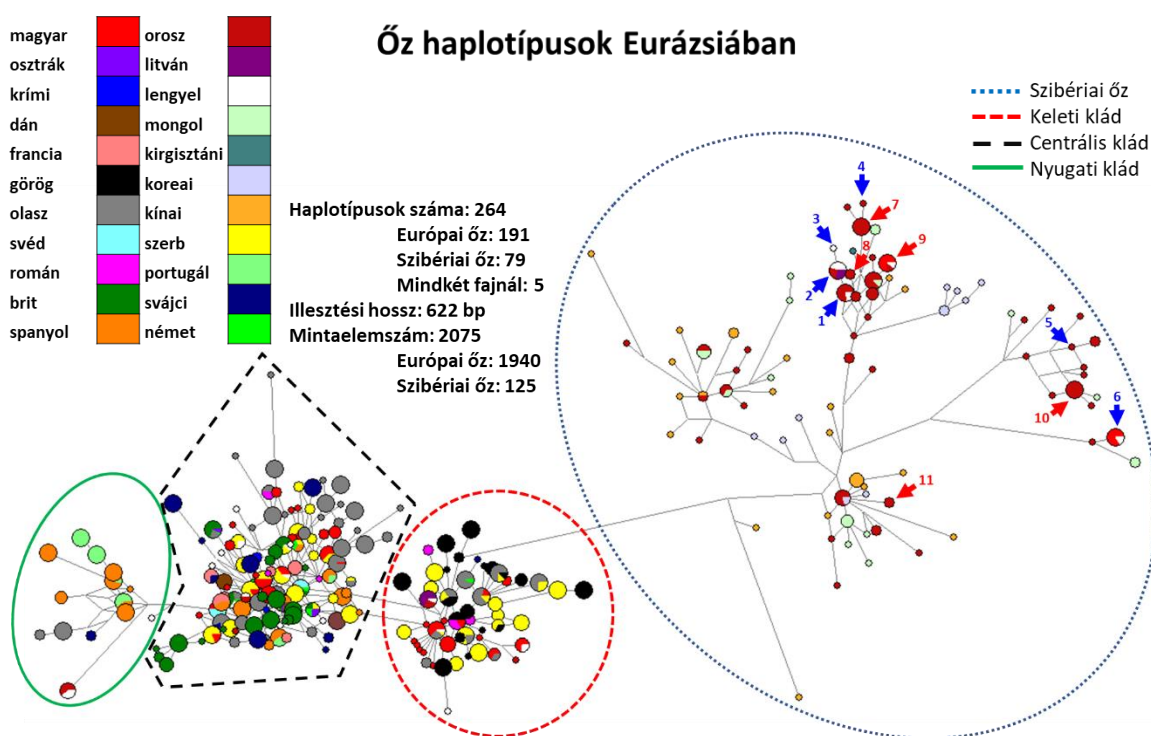
	KD	P	DTK	V	H	KSzB	Z	B	G	Összes
egyedszám	21	27	13	4	9	12	13	9	10	118
polimorf helyek száma	19	22	16	7	40	35	0	14	17	55
haplotípusok száma	10	12	8	3	6	4	1	7	9	39
haplotípus diverzitás	0,871	0,892	0,859	0,833	0,917	0,742	0,000	0,944	0,978	0,945
különbségek átlagos száma	5,990	5,538	6,923	4,000	16,556	16,106	0,000	5,389	7,467	12,50

A 7. táblázat a populációk belső genetikai struktúrájának statisztikai analízisét foglalja össze. Az egyes populációk egyedszámát és a populációkból kimutatott haplotípusok számát mutatja. A polimorf helyek száma az egy populáción belül előforduló összes haplotípusban fellelhető összes nukleotid eltérést mutatja. Ez Kelet Szatmár-Bereg és Hortobágy populációkban magas, ahol 35 és 40 eltérést mutatott. A csupán négy egyedet számláló Viharsarok populáció alacsony értéket mutatott, csupán hét polimorf pozíció volt. Zemplén környéke régióban ez az érték nulla volt, mivel az összes vizsgált egyed ugyanazzal a szibériai őz haplotípussal rendelkezett, ezért itt a haplotípusok száma is mindössze egy volt. A legtöbb haplotípust a Pilis és Közép-Dunántúl populációknál mutattuk ki, azonban a

haplotípus diverzitás nem ezeknél volt a legnagyobb. A maga 0,978 értékével a Göcsej populáció bizonyult vizsgálatunkban a legdiverzebbnek, tekintve, hogy az ott található tíz egyed kilenc haplotípussal rendelkezett. Magas, 0,9 feletti értékeket mutattak még a Bükk és Hortobágy populációk is. A különbségek átlagos számának értéke megadja egy populáción belül minden haplotípus pár között előforduló nukleotid különbségek átlagos számát. Ez az érték Hortobágy populációban a legnagyobb, a populáció bármelyik két szekvenciáját összehasonlítva azok átlagosan 16-17 nukleotidban különböznek egymástól. Hasonlóan magas értéket mutatott Kelet Szatmár-Bereg populáció is, ahol ez átlagosan 16 nukleotid. Kiugróan magas értéket más populáció nem mutatott. Zemplén környéke populációban ez az érték nulla volt.

5.2 A hazai őzek és a többi európai és ázsiai ország őzeinek viszonya

Az európai viszonylatban végzett összevetést saját szekvenciáinkkal együtt 1940 db európai őzszekvenciával és 126 db szibériai őzszekvenciával végeztük 622 bázispár illesztési hosszúságon. Ez a szakasz megegyezett a hazai illesztésnél használt 611 bázispár hosszú szakasszal, azonban több szekvencia inzerciókat tartalmazott. A NETWORK szoftver által alkotott gráfban (6. ábra) az európai őz haplotípusok a korábban már Randi és mtsai. (2004) által leírt elkülönülést mutatták, tehát a nyugati, centrális és keleti kládokba rendeződtek.



6. ábra: A saját és más hazai haplotípusok összevetése más európai és szibériai őz haplotípusokkal. Azokat a szibériai őzhez sorolódó haplotípusokat, amelyekkel csak európai őzek rendelkeztek késsel, amelyekkel szibériai és európai őzek is egyaránt mutattak pirossal jelöltük. A haplotípusokat ábrázoló gócpontok színkóddal vannak jelölve, méretük egyenesen arányos a hozzájuk tartozó egyedek számával. A gócpontok színkódjai a minták származási helyét ábrázolják, egy gócponton belül előforduló több szín esetén azok arányosak a mintaszámmal. A haplotípusok közötti összeköttetések hossza pedig a haplotípusok közötti genetikai távolságot szimbolizálják.

Akárcsak a hazai összevetésben, a szibériai őz haplotípussal rendelkező őzek (6. ábra: kék nyíllal a csak európai őzből kimutatott haplotípusok, piros nyíllal az európai és szibériai őzből egyaránt kimutatott haplotípusok) itt is elkülönültek az európai őzektől és a szibériai őzek haplotípusaival alkottak egy csoportot, szignifikáns távolságot mutatva az európai őz kládok egymáshoz viszonyított genetikai távolságához képest. A szibériai őz csoport a legszorosabb rokonságot a keleti klád haplotípusaival mutatta, és egyaránt tartalmazott

szibériai őzeket és szibériai mtDNS-el rendelkező európai őzeket is. Ez lényeges különbség a hazai összevetéshez képest, ahol a szibériai csoport a centrális kláddal mutatott legszorosabb rokonságot. Európai őz mtDNS-el rendelkező szibériai őz haplotípus nem fordult elő a kutatásunkban, így az európai őz kládok csak a faj haplotípusait tartalmazták. A legtöbb haplotípust mutató klád a centrális, míg a legkevesebbet mutató a nyugati volt. A vizsgált haplotípusok közül a hazai őzállomány a legszorosabb rokonságot a szerbiai őzállománnyal mutatja, de genetikai közelséget mutat olasz haplotípusokkal is.

A magyarországi egyedek európai őznek megfelelő haplotípusai (az ábrán piros színnel jelölt gócpontok) a centrális és a keleti kládba, tartoznak, a nyugatiban nem fordultak elő. Az összes vizsgált őzszekvencia közül 264 haplotípust azonosítottunk, azon belül 194 európai és 79 szibériai haplotípust. Ezek közül öt haplotípus az, amiket kimutattunk mind európai, mind szibériai őzekből (8. táblázat). A hazai populációkban, azon belül is Zemplén környéke és Kelet Szatmár-Bereg populációban élő szibériai mtDNS haplotípussal rendelkező európai őzek Lengyelországban, valamint Oroszország nyugati és Szamara régióiban élő őzek egy része közös haplotípussal rendelkezett (6. ábra: 9-es számú piros nyíl) a nagy földrajzi távolság ellenére.

8. táblázat: A 6. ábra piros nyilakkal jelölt szibériai őz haplotípussal rendelkező egyedeinek származási helyei a két vizsgált faj, az európai őz és szibériai őz szerint csoportosítva

NYÍL SZÁMA	EURÓPAI ŐZ	SZIBÉRIAI ŐZ
7	Oroszország, Moszkva régió	Oroszország, Altaj régió, Szamara régió
8	Oroszország, nyugati régió	Oroszország, Tuva régió
9	Magyarország, Zemplén környéke, Kelet Szatmár-Bereg; Lengyelország, Przemyśl	Oroszország, nyugati régió, Szamara régió
10	Oroszország, Moszkva régió	Oroszország, Szamara régió, Kurgán régió
11	Oroszország, Moszkva régió	Oroszország, nyugati régió

6. Konklúzió és diszkusszió

Az európai őz jelenlegi geográfiai és genetikai mintázata magában hordozza a jégkorszakok glaciálisainak és interglaciálisainak hatását a faj korábbi terjeszkedésére [30], illetve rokon fájával a szibériai őzzel való introgressziójának hatását is [5]. Ez a már korábban mások által [30][31] leírt kládokba való betagozódás formájában jelenik meg. Ezek a keleti, a centrális és a nyugati klád. Ezt a kládrendszerrel először tárgyaló cikk a nyugati kládba egy különálló, kizárólag az Ibériai-félszigeten élő őzek csoportját sorolta [30], ám ezt Plis és mtsai (2022) [31] tanulmánya kibővítette Közép- és Kelet-Európában talált nyugati kládba tartozó haplotípusok leírásával, ezzel egy megszakított elterjedésű klád képét adva. Ezt a saját kutatásunkba bevont szekvenciákból kapott eredmények is megerősítették, ahol az európai és szibériai őzekkel való összevetése során a nyugati kládba sorolhatók olasz, svájci, lengyel és orosz európai őzekből nyert haplotípusok is (6. ábra).

Az európai őzek rokon fajukkal, a szibériai őzzel való introgressziójuknak köszönhetően számos európai őz rendelkezik szibériai őz mitokondriális DNS-el. Ennek a jelenségnek köszönhetően kapcsolódik ebbe a kládrendszerbe a szibériai őz is. Az említett Plis és mtsai. [31] által leírt tanulmány szerint a szibériai őzek csoportja a centrális kláddal mutatott legszorosabb rokonságot, de kutatásunk ezzel ellentétesen a keleti kládhoz kapcsolta őket, azon belül is egy görög haplotípushoz álltak a legközelebb. Ez a jelenség feltételezhetően a két kutatás által felhasznált szekvenciák eltérése miatt adódott, valamint abból kifolyólag, hogy mi a rokoni kapcsolat jobb felderítésére felhasználtunk minél több szibériai őzhez tartozó kontroll régió szekvenciát is. A két faj összevetésénél az is megmutatkozott, hogy míg nem kevés európai őz hordozott szibériai őz mtDNS-t, addig nem találtunk olyan szibériai őzet, ami a kontroll régió alapján az európai őzekhez tartozna. Ennek két lehetséges oka lehet. Az egyik, hogy a nagy számú európai őz szekvenciával ellentétben viszonylag kis számú szibériai őz szekvenciához férünk hozzá, és annak is egy jó része olyan távoli országokból származott, mint Korea vagy Kína. A másik lehetséges, és más kutatások [87] [88] által valószínűsített magyarázat, hogy a két faj eltérő mérete és viselkedése miatt az európai nőstények vagy nem párzanak szibériai hímekekkel, vagy képtelenek a nagyobb méretű hibrid utódokat világra hozni, esetleg a hibrid borjak holtan jönnek a világra, illetve az F1 generáció bakjai infertilisek. Ebből kifolyólag egy aszimmetrikus hibridizáció fordul elő a két faj között, ahol gyakoribb az európai hím és a szibériai nőstény közötti sikeres

utódnemzés [4]. Ezt a múltbeli hibridizációt számos tanulmány alátámasztotta [4][5][31], de találtak példát recens hibridizációra is [3].

A hazai őzek esetében először egy hosszabb szakaszon, 877 bázispáron illesztettük a saját szekvenciáinkat, aminek elemzésével összesen 31 haplotípust találtunk, amihez hozzáadódott egy 32. rövidebb illesztésen is jól elkülönülő haplotípus, ami a hosszabb illesztés vizsgálatából a rövidege miatt kimaradt. Erre a vizsgálatra azért volt szükség, mert az összehasonlításra felhasznált kutatások jelentős többségében a kontroll régió egy jóval rövidebb szakaszát szaporították fel. A rövidebb vizsgált szakasz pedig általában kevesebb variábilis pozíciót, így kevesebb haplotípust is jelent. Ez jól látszik abból, hogy a 611 bp hosszú illesztésnél már csak 21 haplotípus került elő az általunk szekvenált őzekből, mivel sok szekvenciánál a haplotípusokat elválasztó variábilis szakasz levágódott. A rövid illesztésen összesen 39 haplotípust találtunk, amiből 13 újnak számított hazánkra nézve, tíz pedig előtte még le nem írt haplotípus volt.

Magyarország földrajzi elhelyezkedése alapján átmenetet képez Közép- és Kelet-Európa között, ennek megfelelően a NETWORK szoftver által alkotott gráfok a hazai állomány mitokondriálisan európai őzekhez tartozó részét a centrális és a keleti kládokba sorolta (5. ábra). A hazai vizsgált őzek többsége a centrális kládba tartozott, kevesebb egyed lett a keleti kládhoz rendelve, a két klád még sem mutat radikális regionális elkülönülést. Az egyes haplotípusok több, akár egymástól relatívan távol elhelyezkedő populációban is előfordultak.

A vizsgált őzek egy része a szibériai őznek megfelelő haplotípust mutatott. Ezek az őzek az általunk vizsgált populációk alapján gyakrabban fordultak elő az ország keleti részében, akárcsak a nagy Eurázsiai összevetésben, ahol inkább keleti irányba nő a gyakoriságuk, közeledve a szibériai őz mai elterjedéséhez. Ez a korábban Plis és mtsai. [31] által leírt tanulmányban feltételezett terjedésüket támasztja alá, miszerint az eredetileg Ázsiában előforduló szibériai őz nyugat felé irányuló kolonizációja miatt jelent meg a szibériai haplotípus. Feltételezhetően a szibériai őzek, vagy a szibériai haplotípussal rendelkező európai őzek terjedésében a természetes akadályok, mint a folyók, hegyek nem feltétlen jelentenek akadályt, ugyanis egyes szibériai haplotípusok olyan európai és szibériai őzekben voltak egyaránt megtalálhatóak, melyek között nagy volt a földrajzi távolság. Ez a 8. táblázatban látható adatokból jól látszik, hiszen például kelet Magyarországon és Lengyelországban előforduló szibériai mtDNS-el rendelkező európai őz haplotípus

előfordult Oroszország nyugati régiójában, valamint Szamara régióban élő szibériai őzekben.

Az európai őzek posztglaciális terjedését az említett Plis és mtsai. által írt tanulmány [31] szintén részletezi. A sikeres rekolonizáció egy változatos demográfiai képet eredményezett Európa szerte, ahol az egyes haplotípusok több országban is előfordulnak. Ez a kép hazánkra is jellemző, ahol nem mutatkozik az egyes haplotípusok regionális elkülönülése a legtöbb populációnál. Erősen szignifikáns különbséget a populációk között csak a Kelet Szatmár-Bereg és Zemplén környéke régiók és a többi populáció között, szignifikáns különbséget pedig a Viharsarok régió és a Duna nyugati oldalán lévő vizsgált régiók között mutattunk ki (6. táblázat). Az előbbi valószínűleg a szibériai haplotípus keletfelé növekvő előfordulása miatt alakult ki, valamint mert a Zemplén környéki populáció csupán egy haplotípussal rendelkezett (7. táblázat). Az utóbbi esetben (Viharsarok régió) a különbség adódhat a geográfiai akadályok miatt fellépő valós izolációs hatásból – eme populáció esetében ugyanis a Duna és Tisza is akadályként van jelen ellentétben a többi, szignifikáns különbséget nem mutató populációval -, de lehet akár a kis mintaelemszám műterméke is.

A legtöbb populáció közötti alacsony különbség adódhat az őzek rendkívüli adaptációs képességéből [17] és a természetes akadályok leküzdéséből a terjeszkedésük során. A vizsgált hazai haplotípusok között csak a szibériai haplotípusokban található keleti orientációjú elkülönülés, amit egyfelől magyarázhat a már említett szibériai haplotípus európai őzekben való előfordulásának növekedése nyugatról kelet felé haladva, ám eredhet abból kifolyólag is, hogy viszonylag alacsony mintaelemszámmal dolgoztunk.

Mindezek alapján igazságügyi peres esetekben, mint az orvvadászat, a vadgázolás, a trófeákkal való visszaélés során talált állati maradványok geográfiai beazonosítása és populációkba való rendelése kizárólag a kontroll régió alapuló módszerrel nem lehetséges. A kutatásunkban azonban megmutatkozott az őzpopulációk nagyfokú haplotípus diverzitása. A Magyarországi őzek összesített haplotípus diverzitása 0,945-nek adódott. Összehasonlításképpen Olano-Marin és mtsai. (2014) [5] munkájában a lengyelországi őzek 0,714 és 0,844 közötti haplotípus diverzitása már magasnak számított, egy olasz populációkkal foglalkozó kutatásban [76] ez az érték 0,404 és 0,935 között váltakozott, míg egy egész Európát felölelő vizsgálatban [30] a haplotípus diverzitása 0,280 és 0,970 között mozgott. A hazai gímszarvasoknál Skog és mtsai. (2009) [89] által talált haplotípus diverzitás mindössze 0,23 volt, ellentétben a teljes európai populáció együttes vizsgálatánál

kapott magas, 0,96 értékkel. Mindezekből látszik, hogy a vizsgált kontroll régió alapján a hazai őzpopuláció kifejezetten változatosnak mondható a Zemplén környéki populáció kivételével. Az eredmények arra mutatnak, hogy a kontroll régió alkalmas lehet kizárásos vizsgálatokra, így egy értékes kiegészítő marker lehet a bűnügyi nyomozás során. Különösen olyan esetekben, ahol a helyszínről származó állati szövetek és maradványok degradálódtak, vagy csak kis mennyiségben állnak rendelkezésre, így más módszerek kevésbé vagy egyáltalán nem vezetnek eredményre (pl. nukleáris DNS vizsgálatok).

A kutatás nagyobb mintaszámmal való folytatása és több régióból származó minta gyűjtése egy még részletesebb képet mutatna a hazai őzállomány genetikai összetételéről és annak különböző kutatásokban való hasznosíthatóságáról.

7. Összefoglaló

Az európai őz (*Capreolus capreolus*) széles körben elterjedt, Magyarországon is nagy számban élő faj, amely számos esetben esik vadgázolás, orvvadászok által elkövetett illegális elejtés és trófeával való visszaélés áldozatává, illetve közlekedési balesetek okozójává, aminek bizonyítása sokszor csak genetikai módszerekkel lehetséges.

Mivel a hazánkban élő őzekről jelenleg csak korlátozott genetikai információ áll rendelkezésre, célunk egy szélesebb körű hazai feltérképezés volt a mitokondriális genom (mitogenom) kontroll régiójának segítségével. Vizsgáltuk emellett a hazai őzállomány genetikai kapcsolatát a többi európai populációéval, figyelembe véve a faj közeli rokonával, a szibériai őzzel (*Capreolus pygargus*) való introgresszióját. Felmértük továbbá a kontroll régió alkalmazhatóságát a populációk elkülönítésére és az egyedek régiókhoz való rendelésére, valamint az anyai vonalak kizárásos vizsgálatokra való alkalmasságát.

Kutatásunk során hivatásos vadászok által az ország több régiójából származó, szakszerűen elejtett őzekből vett szövetmintákat (n=43) használtunk fel. A kivont DNS-t a mitogenom kontroll régiójára tervezett primerpár segítségével polimeráz láncreakcióban sokszorosítottuk, tisztítottuk majd szekvenáltuk. A kapott szekvenciákat a referenciagenomra illesztettük és meghatároztuk az egyes minták haplotípusát.

A saját szekvenciáinkat kiegészítettük a GenBank-ból letöltött, más hazai területekről származó egyedek szekvenciáival (n=75), így összesen 38 haplotípust találtunk a hazai őzeknél. Ezek közül 13 új volt hazánkra nézve, illetve tíz még eddig le nem írt haplotípus. Eddigi eredményeink alapján az egyes haplotípusok több, egymástól távol eső populációban is előfordulnak. Így a kontroll régió alapján nem lehet a populációkat elkülöníteni – amit statisztikai módszerrel (F statisztika) is alátámasztottunk – és az egyedek geográfiai meghatározása sem lehetséges.

Ugyanakkor, mivel az anyai vonalak nagy diverzitást mutatnak, a kontroll régió vizsgálata alkalmas lehet kizárásra, ezáltal pedig bizonyos, igazságügyi szempontból is releváns kérdések megválaszolására. A kutatás folytatásaként tervezzük a hazai őzállomány autoszómás genetikai markerekkel (mikroszatelliták) történő felmérését, amely az egyedi szintű azonosítás mellett az állományok régióként való megkülönböztetését is elősegítheti.

8. Summary

The European roe deer (*Capreolus capreolus*) is a widespread and abundant species in Hungary, which is frequently the victim of poaching and trophy abuse, as well as they may cause traffic accidents, which can often be proven only by genetic methods.

As recently only limited genetic information is available on roe deer in our country, our aim was to conduct a widespread mapping using the control region of the mitochondrial genome (mitogenome). In addition, the genetic relationship of the domestic deer population with populations in other European countries was investigated, taking into consideration the introgression of its relative species, the Siberian deer (*Capreolus pygargus*). We also aimed to assess the applicability of the control region for determining the population origin and assignment of individuals to certain regions, and the suitability of maternal lines for exclusion testing.

In our research, we used tissue samples (n=43) taken from legally harvested deer by professional hunters from several regions of the country. The extracted DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a primer pair designed for the whole control region of the mitogenome. PCR products were purified and sequenced and the obtained sequences were aligned to the reference genome and the haplotype of each sample was determined.

Our own sequences were supplemented with the sequences of individuals from other domestic areas (n=75) downloaded from GenBank, so a total of 38 haplotypes were found in the Hungarian roe deer populations. Among these haplotypes, 13 were newly detected in Hungary, of which ten have not been described before. Based on our results, the same haplotypes can occur in several populations far apart from each other. Hence, it is not possible to distinguish populations based on the mitochondrial control region alone, nor to determine individuals geographically, which was supported by statistical methods (F statistic) as well.

At the same time, since maternal lines show great diversity, investigation of the control region can be suitable for exclusion and thus for answering certain questions that are also relevant from legal point of view. As a continuation of this research, we plan to survey the domestic deer population with autosomal genetic markers (microsatellites), which, in addition to identification at the individual level, may also help to distinguish herds by geographic region.

9. Irodalomjegyzék

1. Wilson DonE, Reeder DM (2005) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference (3rd ed). Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland
2. Lorenzini R, Garofalo L, Qin X, Voloshina I, Lovari S (2014) Global phylogeography of the genus *Capreolus* (Artiodactyla: Cervidae), a Palaearctic meso-mammal: Phylogeography of *Capreolus*. *Zool J Linn Soc* 170:209–221. <https://doi.org/10.1111/zoj.12091>
3. Plakhina DA, Zvychnaynaya EYu, Kholodova MV, Danilkin AA (2014) Identification of European (*Capreolus capreolus* L.) and Siberian (*C. pygargus* Pall.) roe deer hybrids by microsatellite marker analysis. *Russ J Genet* 50:757–762. <https://doi.org/10.1134/S1022795414070151>
4. Matosiuk M, Borkowska A, Świsłocka M, Mirski P, Borowski Z, Krysiuk K, Danilkin AA, Zvychnaynaya EY, Saveljev AP, Ratkiewicz M (2014) Unexpected population genetic structure of European roe deer in Poland: an invasion of the mtDNA genome from Siberian roe deer. *Mol Ecol* 23:2559–2572. <https://doi.org/10.1111/mec.12745>
5. Olano-Marin J, Plis K, Sönnichsen L, Borowik T, Niedziałkowska M, Jędrzejewska B (2014) Weak Population Structure in European Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Evidence of Introgressive Hybridization with Siberian Roe Deer (*C. pygargus*) in Northeastern Poland. *PLoS ONE* 9:e109147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109147>
6. Siuda A, Żurowski W, Siuda H (1969) The food of the roe deer. *Acta Theriol (Warsz)* 14:247–262. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.69-18>
7. Mysterud A, Larsen PK, Ims RA, Østbye E (1999) Habitat selection by roe deer and sheep: does habitat ranking reflect resource availability? *77:8*. <https://doi.org/10.1139/cjz-77-5-776>
8. Dahl S-A, Hudler M, Windisch W, Bolduan C, Brugger D, König A (2020) High fibre selection by roe deer (*Capreolus capreolus*): evidence of ruminal microbiome adaption to seasonal and geographical differences in nutrient composition. *Anim Prod Sci* 60:1303. <https://doi.org/10.1071/AN19376>
9. Putman RJ, Moore NP (1998) Impact of deer in lowland Britain on agriculture, forestry and conservation habitats. *Mammal Rev* 28:141–164. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.1998.00031.x>
10. Biosia D, Grignolio S, Sica N, Pagon N, Scandura M, Apollonio M (2015) Do relatives like to stay closer? Spatial organization and genetic relatedness in a mountain roe deer population. *J Zool* 296:30–37. <https://doi.org/10.1111/jzo.12214>
11. (2022) Európai őz. In: Wikipédia. https://hu.wikipedia.org/w/index.php?title=Eur%C3%B3pai_%C5%91z&oldid=25171002. Accessed 13 Oct 2022
12. Pagon N, Grignolio S, Brivio F, Marcon A, Apollonio M (2017) Territorial behaviour of male roe deer: a telemetry study of spatial behaviour and activity levels. *Folia Zool* 66:267–276. <https://doi.org/10.25225/fozo.v66.i4.a9.2017>
13. San José C, Lovari S, Ferrari N (1997) Grouping in roe deer: an effect of habitat openness or cover distribution? *Acta Theriol (Warsz)* 42:235–239. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.97-25>

14. Kurt F, Hartl GB, Völk F (1993) Breeding strategies and genetic variation in European roe deer *Capreolus capreolus* populations. *Acta Theriol (Warsz)* 38:187–194. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.93-52>
15. IUCN (2015) *Capreolus capreolus*: Lovari, S., Herrero, J., Masseti, M., Ambarli, H., Lorenzini, R. & Giannatos, G.: The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T42395A22161386
16. Kaplan JO, Krumhardt KM, Zimmermann N (2009) The prehistoric and preindustrial deforestation of Europe. *Quat Sci Rev* 28:3016–3034. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.09.028>
17. Farkas D (2018) *Az őzállomány gondozása*. Vadászati Kulturális Egyesület, Budapest
18. Hewison AJM, Vincent JP, Joachim J, Angibault JM, Cargnelutti B, Cibien C (2001) The effects of woodland fragmentation and human activity on roe deer distribution in agricultural landscapes. 79:11. <https://doi.org/10.1139/cjz-79-4-679>
19. Millions DG, Swanson BJ (2007) Impact of Natural and Artificial Barriers to Dispersal on the Population Structure of Bobcats. *J Wildl Manag* 71:96–102. <https://doi.org/10.2193/2005-563>
20. Coleman RA, Gauffre B, Pavlova A, Beheregaray LB, Kearns J, Lyon J, Sasaki M, Leblois R, Sgro C, Sunnucks P (2018) Artificial barriers prevent genetic recovery of small isolated populations of a low-mobility freshwater fish. *Heredity* 120:515–532. <https://doi.org/10.1038/s41437-017-0008-3>
21. Coulon A, Cosson JF, Angibault JM, Cargnelutti B, Galan M, Morellet N, Petit E, Aulagnier S, Hewison AJM (2004) Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Mol Ecol* 13:2841–2850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02253.x>
22. Mihalik B, Kusza S, Stéger V, Wanjala G, Németh Z (2020) Effects of natural and artificial barriers on the genetic diversity of game species: a review. *Balk J Wildl Res* 5:. <https://doi.org/10.15679/bjwr.v5i1.61>
23. Ng SJ, Dole JW, Sauvajot RM, Riley SPD, Valone TJ (2004) Use of highway undercrossings by wildlife in southern California. *Biol Conserv* 115:499–507. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00166-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00166-6)
24. Coulon A, Guillot G, Cosson J-F, Angibault JMA, Aulagnier S, Cargnelutti B, Galan M, Hewison AJM (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population: LANDSCAPE AFFECTS ROE DEER GENETIC STRUCTURE. *Mol Ecol* 15:1669–1679. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02861.x>
25. Gortázar C, Herrero J, Villafuerte R, Marco J (2000) Historical examination of the status of large mammals in Aragon, Spain. *mamm* 64:411–422. <https://doi.org/10.1515/mamm.2000.64.4.411>
26. Jędrzejewska B, Jędrzejewski W, Bunevich AN, Miłkowski L, Kasiński ZA (1997) Factors shaping population densities and increase rates of ungulates in Białowieża Primeval Forest (Poland and Belarus) in the 19th and 20th centuries. *Acta Theriol (Warsz)* 42:399–451. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.97-39>

27. Burbaité L, Csányi S (2009) Roe deer population and harvest changes in Europe. *Est J Ecol* 58:169. <https://doi.org/10.3176/eco.2009.3.02>
28. Lorenzini R, José CS, Braza F, Aragón S (2003) Genetic differentiation and phylogeography of roe deer in Spain, as suggested by mitochondrial DNA and microsatellite analysis. *Ital J Zool* 70:89–99. <https://doi.org/10.1080/11250000309356500>
29. Vasiljevic N, Morf NV, Senn J, Pérez-Espona S, Mattucci F, Mucci N, Moore-Jones G, Pisano SRR, Kratzer A, Ogden R (2022) Phylogeography and population genetic structure of the European roe deer in Switzerland following recent recolonization. *Ecol Evol* 12:. <https://doi.org/10.1002/ece3.8626>
30. Randi E, Alves PC, Carranza J, Milošević-Zlatanović S, Sfougaris A, Mucci N (2004) Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics: PHYLOGEOGRAPHY OF ROE DEER POPULATIONS. *Mol Ecol* 13:3071–3083. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02279.x>
31. Plis K, Niedziałkowska M, Borowik T, Lang J, Heddergott M, Tiainen J, Bunevich AN, Šprem N, Paule L, Danilkin A, Kholodova M, Zvychnaynaya E, Kashinina N, Pokorný B, Flajšman K, Paulauskas A, Djan M, Ristić Z, Novák L, Kusza S, Miller C, Tsaparis D, Stoyanov S, Shkvyria M, Suchentrunk F, Kutal M, Lavadinović V, Šnjegota D, Krapal A-M, Dănilă G, Veeroja R, Dulko E, Jędrzejewska B (2022) Pan-European phylogeography of the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Ecol Evol* 11:14. <https://doi.org/10.1002/ece3.8931>
32. Lorenzini R, Lovari S (2006) Genetic diversity and phylogeography of the European roe deer: the refuge area theory revisited: GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGEOGRAPHY OF ROE DEER. *Biol J Linn Soc* 88:85–100. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2006.00606.x>
33. Hartl GB, Zachos F, Nadlinger K (2003) Genetic diversity in European red deer (*Cervus elaphus* L.): anthropogenic influences on natural populations. *C R Biol* 326:37–42. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00025-8)
34. Moura AE, Tsingarska E, Dąbrowski MJ, Czarnomska SD, Jędrzejewska B, Pilot M (2014) Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conserv Genet* 15:405–417. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0547-y>
35. Csányi S (szerk.) (2021) Vadgazdálkodási Adattár-2020/2021. vadászati év Országos Vadgazdálkodási Adattár, Gödöllő 77pp
36. Dr Barta T (2018) Vadászatszervezés, vadászati turizmus, vadászetika. Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Kar Állattudományi és Vadgazdálkodási Intézet
37. Majzinger I (2009) A magyarországi őzállomány létszámának meghatározása populáció-rekonstrukcióval. 13:11–23
38. Náhlik A, Tari T (2006) A gímszarvas és őz téli erdősítés-használatára és csemeterágására ható tényezők vizsgálata az erdei kár csökkentése céljából. *Gyepgazdálkodási közlemények* 75–79. <https://doi.org/10.55725/gygk/2006/4/1-2/10379>
39. Kapocsi G, Horváth S, László R (2020) Vadállomány vagyón-kezelésének elemzése az Országos Vadgazdálkodási Adattár állománybecslési és elejtési adatainak tükrében. *Soproni Egy* 91–102

40. Stewart CM (2011) Attitudes of Urban and suburban residents in Indiana on deer management. *Wildl Soc Bull* 35:316–322. <https://doi.org/10.1002/wsb.30>
41. Rooney TP, Waller DM (2003) Direct and indirect effects of white-tailed deer in forest ecosystems. *For Ecol Manag* 181:165–176. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(03\)00130-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(03)00130-0)
42. Ristić Z, Gabriela S, Simat K, Matejević M (2013) Comparative review of hunting tourism in the Czech Republic and Hungary. *Res Rev Dep Geogr Tour Hotel Manag* 205–220
43. Markolt F, Szemethy L, Lehoczki R, Heltai M (2012) Spatial and temporal evaluation of wildlife-vehicle collisions along the M3 Highway in Hungary. *North-West J Zool* 8:414–425
44. (1996) 1996. évi LV. törvény a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról
45. Dimitrijevic V, Stevanovic J, Savic M, Petrujkic B, Simeunovic P, Milosevic I, Stanimirovic Z (2013) Validation of 10 Microsatellite Loci for Their use in Parentage Verification and Individual Identification in the Yugoslavian Shepherd Dog Sharplanina / Walidacja 10 Loci Mikrosatelitarnych Do Kontroli Pochodzenia Oraz Identyfikacji Osobniczej Jugosłowiańskiego Psa Pasterskiego Z Szar Płaniny. *Ann Anim Sci* 13:715–722. <https://doi.org/10.2478/aoas-2013-0047>
46. Yoon D-H, Kong H-S, Oh J-D, Lee J-H, Cho B-W, Kim J-D, Jeon K-J, Jo C, Jeon G-J, Lee H (2005) Establishment of an Individual Identification System Based on Microsatellite Polymorphisms in Korean Cattle (Hanwoo). *Asian-Australas J Anim Sci* 18:762–766. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.762>
47. Radko A, Smołuca G, Koseniuk A (2021) Microsatellite DNA Analysis for Diversity Study, Individual Identification and Parentage Control in Pig Breeds in Poland. *Genes* 12:595. <https://doi.org/10.3390/genes12040595>
48. Rao MS, Chakraborty G, Murthy KS (2019) Market Drivers and Discovering Technologies in Meat Species Identification. *Food Anal Methods* 12:2416–2429. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01591-8>
49. Sanches A, Tokumoto PM, Peres WA, Nunes FL, Gotardi MS, Carvalho CS, Pelizzon C, Godoi TG, Galetti M (2012) Illegal hunting cases detected with molecular forensics in Brazil. *Investig Genet* 3:17. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-3-17>
50. Biedrzycka A, Solarz W, Okarma H (2012) Hybridization between native and introduced species of deer in Eastern Europe. *J Mammal* 93:1331–1341. <http://dx.doi.org/10.1644/11-MAMM-A-022.1>
51. Van Song N (2008) Wildlife Trading in Vietnam: Situation, Causes, and Solutions. *J Environ Dev* 17:145–165. <https://doi.org/10.1177/1070496508316220>
52. Challender DWS, MacMillan DC (2014) Poaching is more than an Enforcement Problem: Poaching is more than an enforcement problem. *Conserv Lett* 7:484–494. <https://doi.org/10.1111/conl.12082>
53. Šprem N, Duduković D, Keros T, Konjević D (2013) Wildlife-Vehicle Collisions in Croatia – A Hazard for Humans and Animals. *Coll Antropol* 37:531–535

54. Visszaadták az ellopott trófeát. <https://www.police.hu/hu/hirek-es-informaciok/legfrissebb-hireink/bunugyek/visszaadtak-az-ellopott-trofeat>. Accessed 6 Oct 2022
55. Pozio E (2015) *Trichinella* spp. imported with live animals and meat. *Vet Parasitol* 213:46–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.017>
56. (2021) „Inkább én egyem meg, mint a róka!”- ezt mondta a rendőröknek az elkövető, aki elütött egy őzet, a tetemét pedig eltulajdonította- a Nógrád Megyei Főügyészség sajtóközleménye. In: *Ügyészség*. <http://ugyeszseg.hu/inkabb-en-egyem-meg-mint-a-roka- ezt-mondta-a-rendoroknek-az-elkoveto-aki-elutott-egy-ozet-a-tetemet-pedig-eltulajdonította-a-nograd-megyei-fougyeszseg-sajtokozelemenye/>. Accessed 6 Oct 2022
57. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34:275. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>
58. Arif IA, Khan HA, Bahkali AH, Al Homaidan AA, Al Farhan AH, Al Sadoon M, Shobrak M (2011) DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi J Biol Sci* 18:219–225. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.03.002>
59. Norman JA, Moritz C, Limpus CJ Mitochondria1 DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. 11
60. Habib M, Lakra WS, Mohindra V, Khare P, Barman AS, Singh A, Lal KK, Punia P, Khan AA (2011) Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes). *Mol Biol Rep* 38:841–846. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0175-2>
61. Alberts B (2013) *Essential cell biology*, Fourth edition. Garland Science, New York, NY
62. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
63. Linacre A (2009) *Forensic Science in Wildlife Investigations*. CRC Press
64. Bonekamp NA, Larsson N-G (2018) SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell* 172:388–388.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.039>
65. McCord B, Opel K, Funes M, Zoppis S, Jantz LM (2011) An Investigation of the Effect of DNA Degradation and Inhibition on PCR Amplification of Single Source and Mixed Forensic Samples. *US Dep Justice* 66
66. Diegoli TM, Farr M, Cromartie C, Coble MD, Bille TW (2012) An optimized protocol for forensic application of the PreCR™ Repair Mix to multiplex STR amplification of UV-damaged DNA. *Forensic Sci Int Genet* 6:498–503. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.09.003>
67. Sirker M, Schneider PM, Gomes I (2016) A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *Int J Legal Med* 130:1431–1438. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1373-9>

68. Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A (2010) Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review. *Forensic Sci Int Genet* 4:148–157. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.007>
69. Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* 13:729–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>
70. Hutchison CA, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251:536–538. <https://doi.org/10.1038/251536a0>
71. Németh A (2015) Mitokondriális DNS kontroll régió szekvencia variabilitás a hazai őz (*Capreolus capreolus*) állományban. *Eötvös Lóránd Tudományegyetem*
72. Tsaparis D, Sotiropoulos K, Legakis A, Kotoulas G, Kasapidis P (2019) New phylogeographic insights support the distinctiveness and conservation value of the little-known Greek roe deer populations. *Mamm Biol* 96:23–27. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2019.03.010>
73. Matosiuk M, Sheremetyeva IN, Sheremetyev IS, Saveljev AP, Borkowska A (2014) Evolutionary neutrality of mtDNA introgression: evidence from complete mitogenome analysis in roe deer. *J Evol Biol* 27:2483–2494. <https://doi.org/10.1111/jeb.12491>
74. Baker KH, Rus Hoelzel A (2013) Evolution of population genetic structure of the British roe deer by natural and anthropogenic processes (*Capreolus capreolus*). *Ecol Evol* 3:89–102. <https://doi.org/10.1002/ece3.430>
75. Gentile G, Vernesi C, Vicario S, Pecchioli E, Caccone A, Bertorelle G, Sbordoni V (2009) Mitochondrial DNA variation in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Italy: Evidence of admixture in one of the last *C. c. italicus* pure populations from central-southern Italy. *Ital J Zool* 76:16–27. <https://doi.org/10.1080/11250000802018725>
76. Biosa D, Scandura M, Tagliavini J, Luccarini S, Mattioli L, Apollonio M (2015) Patterns of genetic admixture between roe deer of different origin in central Italy. *J Mammal* 96:827–838. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyv098>
77. Zvychainaya EYu, Danilkin AA, Kholodova MV, Sipko TP, Berber AP (2011) Analysis of the variability of the control region and cytochrome b gene of mtDNA of *Capreolus pygargus* Pall. *Biol Bull* 38:434–439. <https://doi.org/10.1134/S1062359011050189>
78. Horcajada F, Alcaraz L, Barja I, Machordom A (2018) Phylogeographic patterns of *Capreolus capreolus* in the centre of the Iberian peninsula. *Anim Biodivers Conserv* 41:415–425. <https://doi.org/10.32800/abc.2018.41.0415>
79. Koh HS, Randi E (2001) Genetic distinction of roe deer (*Capreolus pygargus* Pallas) sampled in Korea. *Mamm Biol* 66:371–375
80. Bayarlkhagva D, Bayarlkhagva M, Batsuuri S (2013) Genetic Diversity of Mitochondrial DNA D-Loop Sequence of Siberian Roe Deer (*Capreolus Pygargus*) Inhabiting Mongolia. *Int J Sci* 105–108
81. Xiao C-T, Zhang M-H, Fu Y, Koh H-S (2007) Mitochondrial DNA Distinction of Northeastern China Roe Deer, Siberian Roe Deer, and European Roe Deer, to Clarify the Taxonomic Status of Northeastern China Roe Deer. *Biochem Genet* 45:93–102. <https://doi.org/10.1007/s10528-006-9052-z>

82. Douzery E, Randi E (1997) The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Mol Biol Evol* 14:1154–1166. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025725>
83. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
84. FAS to RDF Conversion Tool. <https://fas2rdf.herokuapp.com/>. Accessed 13 Oct 2022
85. Free Phylogenetic Network Software. <https://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>. Accessed 13 Oct 2022
86. (2019) Download DnaSP 6.12.03. In: softpedia. <https://www.softpedia.com/get/Science-CAD/DnaSP.shtml>. Accessed 13 Oct 2022
87. Hewison AJM, Danilkin A Evidence for separate specific Status of European (*Capreolus capreolus*) and Siberian (*C pygargus*) roe deer. 10
88. Sokolov VE, Gromov VS (1990) The contemporary ideas on roe deer (*Capreolus* Gray, 1821) systematization : morphological, ethological and hybridological analysis. *Mammalia* 54: . <https://doi.org/10.1515/mamm.1990.54.3.431>
89. Skog A, Zachos FE, Rueness EK, Feulner PGD, Mysterud A, Langvatn R, Lorenzini R, Hmwe SS, Lehoczky I, Hartl GB, Stenseth NC, Jakobsen KS (2009) Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *J Biogeogr* 36:66–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01986.x>

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Zenke Petrának és Zorkóczy Orsolyának, hogy belevontak a kutatásukba, illetve a rengeteg segítséget és hasznos tanácsot, amivel a munkámat segítették mind a laboratóriumi folyamatok során, mind a dolgozat megírásában. Köszönettel tartozom Dr. Gáspárdy Andrásnak, az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi tanszék vezetőjének, hogy részt vehettem a tanszék egyik kutatásában.

További köszönetet szeretnék mondani azoknak a hivatásos vadászoknak, akik a kutatáshoz felhasznált őzmintákkal segítettek a munkánkat. Köszönetet szeretnék mondani a számomra legfontosabb embereknek: a családomnak és a barátaimnak, akik mindvégig támogattak a munkámban és töretlenül bátorítottak. Nem utolsó sorban köszönetet szeretnék mondani Bartal Balázsnak, Mag Fátának és Ingeborg Marie Vatne barátaimnak, akik segítsége hozzájárult a TDK létrejöttéhez.

NYILATKOZAT

Alulírott PETES VALENTINA..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe
A MAGYARORSZÁGI ŐZPOPULÁCIÓK IGAZSÁGÜGYI CÉLÚ GENETIKAI VIZSGÁLATA
A MITOKONDRIALIS CONTROL RÉGIÓVAL..... tartalmi és formai
szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022..... évi TDK konferencián
szerepelt dolgozattal.

Budapest, 2023.10.20......

PETES VALENTINA..... 

a hallgató neve és aláírása

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Zenke Petra, Zorkóczy Orsolya, mint témavezető nyilatkozom, hogy Petes Valentina állatorvostan-hallgató „A magyarországi őzpopulációk igazságügyi célú genetikai vizsgálata a mitokondriális kontroll régióval” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2022. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2022.10.12.



témavezető



témavezető



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: PETES VALENTINA

Neptun-kódja: A70P3M

A témavezető neve és beosztása: DR. ZENKE PETRA TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS
ZORLÓCZY ORSOLYA TUDOMÁNYOS SEGÉDMUNKATÁRS

Tanszék: ÁLLATTENYÉSZTÉSI, TAKARMÁNYOZÁSTANI ÉS LABORÁLAT-TUDOMÁNY INTÉZET

A diplomadolgozat címe: A MAGYARORSZÁGI ÖZPOPULÁCIÓK LOVSNAGYI
LELVÉ GENETIKAI VIZSGÁLATA A MITOKONDRIAKIS
KONTROLL RÉGIÓVAL

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022 02 07	02	07.	isodalmi áttekintés	<i>[Signature]</i>
2.	2022 02 16	02	15.	működnevezés	<i>[Signature]</i>
3.	2022	03	16.	műtaggyűlés működne	<i>[Signature]</i>
4.	2022	04	03.	labormunka	<i>[Signature]</i>
5.	2022	04	06.	laborvizsgálatok	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy az első félév végén: jeles (5)

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	09	28	laborvizsgálatok	<i>[Signature]</i>
2.	2022	09 10	04.	TDK téma összefoglaló	<i>[Signature]</i>
3.	2022	10	17.	TDK dolgozat írás	<i>[Signature]</i>
4.	2022	10	25	TDK benyújtás fellelő	<i>[Signature]</i>
5.	2022	11	10.	TDK benyújtás ppt	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy a második félév végén: jeles (5)

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *P. L. V. V. V.*

.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: *[Signature]* Átvétel dátuma: *2022.11.10.*