

37. OTDK Biológia Szekció

Kutyavonyítással asszociálható gének feltárása

Készítette

LARIONOV TÜNDE AIDA

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológus BSc III. évfolyam

Témavezetők

Prof. Kubinyi Enikő

egyetemi tanár

Etológia tanszék

és

Dr. Faragó Tamás

tudományos főmunkatárs

Etológia tanszék



Tartalomjegyzék

Összefoglaló	3
Bevezető.....	4
Célkitűzés.....	8
Anyagok és módszerek.....	9
Fenotipizálás.....	9
Genotipizálás.....	11
DNS izolálás.....	11
PCR protokoll.....	11
Eredmények.....	14
Diskusszió.....	17
Szerzői hozzájárulás.....	18
Irodalomjegyzék	19

Összefoglaló

A domesztikáció jelentős változásokat eredményezett a fajok morfológiájában, fiziológiájában és viselkedésében. Ezek, az összefoglaló néven domesztikációs szindrómának nevezett változások a vokális viselkedésre is hatással voltak. Például a házasított japáni sirálykapintyeknél megfigyelték, hogy az énekük változatosabb lett a vadon élő rokonaikhoz képest. A kutyafélék ősi hangadása a vonyítás, viszont a kutya esetében fokozottabb varianciát mutat, mint a farkasokban. Korábbi eredmények arra utalnak, hogy a közös őstől való filogenetikai távolsággal degradálódik ez a viselkedés az egyes kutyafajták közt, viszont ennek a mechanizmusáról még keveset tudunk.

Teljes genom asszociáció vizsgálatok (GWAS) több genomi régióban találtak a vonyítással társítható egy pontos nukleotid polimorfizmusokat (SNP). A keletkezett mutációk a vonyítás eltűnését eredményezhetik, ezért feltételezzük, hogy a vad kutyafélék és a vonyításra hajlamos kutyák allélfrekvenciája eltér az erre a hangadásra nem hajlamos kutyákétól.

Munkám során - a korábban említett GWAS vizsgálatra alapozva - 10 vonyításra és 10, erre nem hajlamos kutya, 12 farkas és 3 sakál DNS-ét izoláltam, majd a releváns lókuszok közül négyet Sanger szekvenálással vizsgáltam, hogy validáljam az SNP-k jelenlétét. Mivel az egyik, a kutyaiban vonyítással társított régió az emberben is kapcsolatba hozható a beszédfejlődéssel, így a vokális repertoár változásainak mechanizmusait megértve közelebb kerülhetünk az emberi beszéd evolúciójának feltárásához.

Bevezető

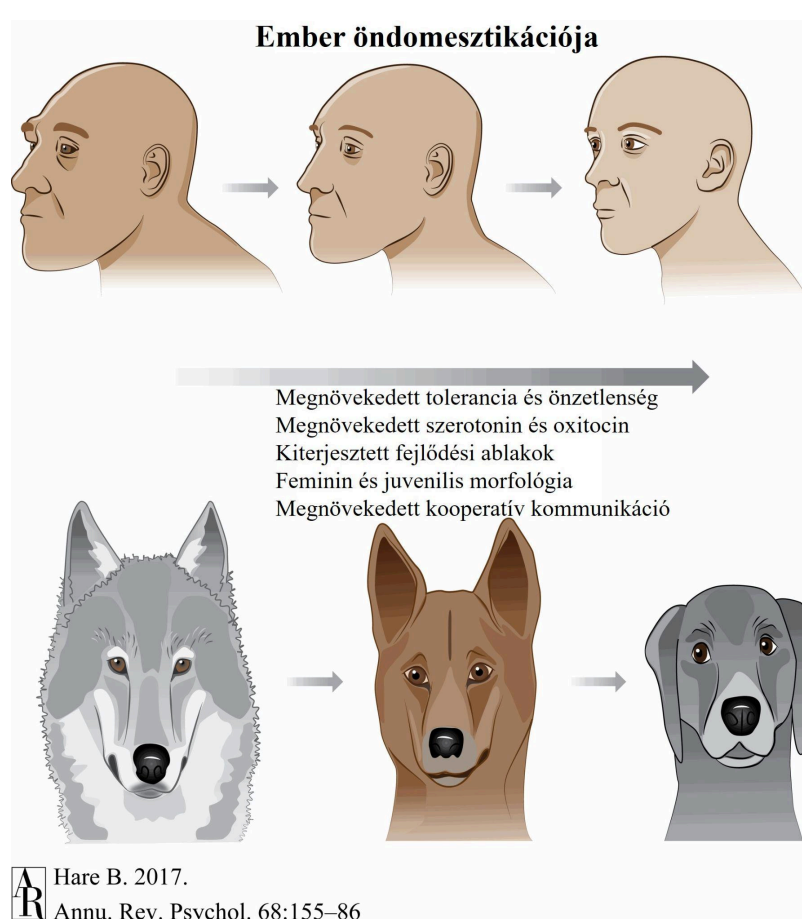
A domesztikáció során egy vadon élő faj genetikai változásokon megy keresztül, hogy minél jobban alkalmazkodjon az emberi környezethez és ez nem csupán szelídséget jelent. Ez egyfajta speciális mutualizmus, amelyben az ember irányítja a másik faj fitnesszét és szaporodását erőforrásért vagy szolgáltatásért cserébe. A fogalmat legtöbbször antropocentrikusan tárgyaljuk, ezzel kizárva a nem emberi házasítót, mint a hangyák és méhek, a nem tudatos szelekciót és azt a hipotézist, hogy az emberi faj öndomesztikáción ment keresztül, hiszen az ember tulajdonságok evolúciója nem egy másik faj szabályozásának köszönhető (Purugganan, 2022). A növények és az állatok házasítása az egyik legmeghatározóbb folyamat volt az emberiség történetében, amelynek kezdetét jelenleg is több ezer év különbséggel becsülik meg, attól függően, hogy milyen tudományos megközelítést alkalmaztak. Legkorábbi archeológiai bizonyíték egy kutyához hasonló csontlelet, amelynek becsült kora 35 ezer éves (Freedman és Wayne, 2017), bár ez vitatott (Morey, 2014), míg genomi vizsgálatok, mint a mitokondriális DNS (mtDNS) vagy Y kromoszómás vizsgálatok 18.800 és 32.100 évvel ezelőttre becsülik (Freedman és Wayne, 2017; Thalmann és mtsai., 2013; Vilà és mtsai., 1997).

Egy bizonyos, hogy a kutya volt az első házasított fajunk és jelenlegi tudásunk szerint egy eurázsiai, mára már kihalt farkas vonalból válhatott ki (Freedman és Wayne, 2017), amely elméletet a kutyák nukleáris genom elemzése haplotípus-megoszlás alapján szintén támogat (Wayne és vonHoldt, 2012).

A domesztikáció során a számunkra kívánatos tulajdonságok alapján szelektáljuk az állatokat, viszont ezen tulajdonságok mellett megjelentek nem szándékosan rögzített jellegek is a vadon élő őshöz képest. A házasítás az élőlények morfológiájára, fiziológiájára és viselkedésére is kihatott, ezeket összefoglaló néven domesztikációs szindrómának nevezzük (Price, 1984).

A morfológiára vonatkozó hatások például a megváltozott fül- és farokforma, rövidült pofa és redukálódott fog- és agyméret. Fiziológias változások közé tartozik a megváltozott reprodukciós ciklus, amely gyakran már nem szigorú szezonalitást mutat, hanem rövidebb időközönként ivarzanak a házasított fajok nőstényei. A szelekció az ember felé mutatott szelídségre és magasabb stressztoleranciára hatott, illetve azokra a génekre, amelyek a velőcső fejlődést befolyásolják, így az idegrendszer ezen változásai pedig hozzájárultak az agresszió csökkenéséhez, kooperativitáshoz és szociális kogníciós képességek fejlődéséhez (Wilkins és mtsai., 2014). A híres ezüstrókákon végzett kísérlet során, ahol a szelídségre szelektáltak, a kutatók felfigyeltek a vokális repertoár drámai megváltozására, különbség keletkezett a vokalizáció gyakoriságában és a komponenseiben (Gogoleva és mtsai., 2009).

Ezen jellegek közül sok megfigyelhető a modern emberen is, például a rövidült arckoponya, a fogak méretének változása vagy a fokozottabb termékenység. Már Darwin is felfigyelt a domesztikált állatok és az ember közötti párhuzamra, de a céltudatos szelekció hiánya miatt még elvetette a közvetlen összehasonlítást (Darwin, 1868). A jelenlegi öndomesztikáció-elmélet komparatív fejlődéstani, archeológiai és neurobiológiai eredményekre támaszkodva feltételezi, hogy a *Homo sapiens* azért tudta a *Homo* nemzetség többi faját túlélni, mert a csoporton belül szelekciós nyomás helyeződött a szociális toleranciára az agresszióval szemben (Hare, 2017; Wood és K. Boyle, 2016). Ezt megerősíti, hogy emberszabású majmokhoz hasonlítva csak az emberi csecsemők mutattak olyan kooperatív és kommunikatív készségeket, amelyek megkönnyítik a kulturális kogníciót és valamennyire a kutyák rendelkeznek ehhez hasonló készségekkel (Hare, 2017). Preszociális szelekciót végeztek rókákön (Belyaev és mtsai., 1985), amelyeknél szintén rugalmasabb lett az alkalmazkodás és az együttműködés képessége, és valószínűleg ezek a szelidségre szelektálás “melléktermékei” (Hare, 2017).



1. ábra: A *Homo sapiens* fejlődése a csoporton belüli fokozott önzetlen viselkedésre irányuló szelekció eredményeként ment végbe a Paleolitikum idején. Ez a folyamat különféle morfológiai, fiziológiai és kognitív változásokat eredményezett. Ehhez hasonló változások figyelhetők meg a domesztikált állatokban, mint a kutya (*Canis familiaris*). A kép forrása (Hare, 2017).

A kutyákban a domesztikációs szindróma jellegei szintén különféle módon nyilvánulnak meg. A farkas őshöz képest kisebb agymérettel rendelkeznek, morfológiában megjelent a lógó fül és eltérő fark típusok és redukálódott a fogméret is (Wilkins és mtsai., 2014). A reprodukciós ciklus is megváltozott, míg a farkas nőtények körülbelül 2 éves korukban lesznek ivarérettek, merev szezonálisban ivarzanak, a kutyák évente kétszer tüzelnek, a hímek egész évben termelnek spermiumokat, továbbá már 1 éves korukban ivarérettek (Rausch, 1967; Wynne, 2021).

A domesztikáció a viselkedésre is nagy hatást gyakorolt, nőtt az együttműködésre való hajlandóság, a szocio-kognitív képességek (Miklósi és Topál, 2013) és az agresszió mértéke is megváltozott (Marshall-Pescini és mtsai., 2017). A vokális viselkedést tekintve a farkasok védjegye a vonyítás, amelynek használata esszenciális a falkatagok lokalizálásához és segít elkerülni az ismeretlen egyedeket (Harrington és Mech, 1979). A kutyák vokális repertoárja jóval gazdagabb, különböző gyakoriságban és helyzetben használják, és azon belül többfélevonyítás típust tudunk elkülöníteni, viszont funkcióját veszítette, míg az ugatás feldúsult, és diverzifikálódott a farkashoz képest. (Kershenbaum és mtsai., 2016; Lehoczki és mtsai., 2023; Pongrácz, 2017; Tembrock, 1976).

A domesztikációs szindrómát a velősánc sejteket befolyásoló gének megváltozásához kapcsolták, miszerint ezen sejtek proliferációja és migrációja csökkent a domesztikáció korai szakaszában, ezáltal ennek egy kulcsfontosságú genetikai mechanizmusa lehet (Wilkins és mtsai., 2014). Ezek a multipotens őssejtek a gerinces embrióknál a velőcső dorzális részéből keletkeznek, majd a központi idegrendszerből kiterjedten vándorolnak el és alakítják ki a különböző sejt vonalakat, beleértve a melanocitákat, koponya- és arccsontot, a perifériás- és bélrendszeri neuronokat, valamint a simaizmot (Bronner és LeDouarin, 2012). Mivel a domesztikációs szindrómában ezen területek változtak meg, ezért lett ilyen népszerű hipotézis, bár megjelentek ezt a hipotézist elvető tanulmányok is (Johnsson és mtsai., 2021), sőt egyesek a domesztikációs szindróma elméletét is kétségbe vonják (Lord és mtsai., 2020; Wright és mtsai., 2020).

Egy biztos, ezen átalakulások kulcsa a kutyák genomját érintő változásokban keresendő. A különböző kutyafajták keresztezésével bizonyították, hogy kevés számú, de nagy hatású mutáció okozza a nagy fenotípusos változatosságot, amelyek különböző törzsvonalakban rögzültek (Wayne és vonHoldt, 2012). A farkas és kutyák pigmentációjában szembetűnő különbség van, ezek közül kiemelt a fekete szín, amelyet a *K* lókuszon található *β -defenzin* gén (*CBD103*) 3 bázisos deléziós mutációja okoz kutyákban (Candille és mtsai., 2007), emiatt a fekete szőrszínnel rendelkező farkasoknál feltételezték a hibridizációt kutyával (Caniglia és mtsai., 2013; Khosravi és mtsai., 2015). Genomi vizsgálatok során több gént találtak, amelyek pozitív szelekción mentek keresztül a háziasítás folyamán, ezek közül kiemelt az oxitocin-receptor gén polimorfizmusa, amely fontos szerepet játszik a társas kötődéshez és a kutyák emberek felé mutatott szociális viselkedésével (Kis és mtsai., 2014; Tonoike és mtsai., 2022; von Holdt és mtsai., 2010).

A vokalizációban is történtek változások, a farkastól való genetikai távolság befolyásolja a vonyításra adott válasz hosszát és a stresszes viselkedés megjelenését. Ezekből arra a következtetésre jutottak, hogy a domesztikáció során a *Canidae* család jellegzetes hangadása, a vonyítás, eltűnőben van a kutyák vokális repertoárjából, viszont még nem ismerjük ennek a háttérében álló géneket (Lehoczki és mtsai., 2023).

A kutyákat eleinte különböző funkciók betöltésére szelektálták, mint a vadászat, védelem vagy terelés. Ezzel szemben a mostani közel 400, valamely fajtaklub által elfogadott [pl. FCI (Fédération Cynologique Internationale); AKC (American Kennel Club)] kutya fajta nagy része a Viktoriánus kor (1800-as évek) szüleménye, ahol fontos szerepet kapott a fajtastandardban rögzített küllem, és már a vonalak tisztaságának megőrzése került előtérbe (Morrill és mtsai., 2022). Ennek köszönhetjük, hogy a kutya a ma élő legváltozatosabb faj (Wayne és vonHoldt, 2012). A speciális tenyésztési programnak köszönhetően nem csak küllemi tulajdonságokat rögzítettek, hanem különféle viselkedéssjegyeket is, mint a terelésre, vadászatra való hajlam vagy akár fajtársak felé mutatott agresszió. Ismert, hogy a fajták eltérnek a vonyításra való hajlamukban, de ennek nem ismerjük a genetikai háttérét.

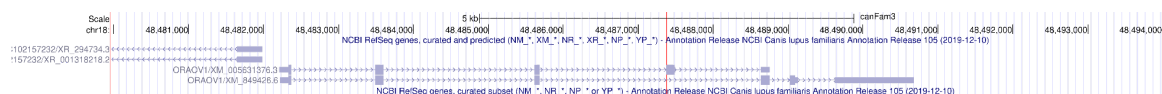
Morrill és munkatársai (2022) 2155 kutyamintán végeztek GWAS-t (teljesgenom-asszociációs vizsgálat) különféle küllemi és viselkedési fenotípusok vizsgálatára, hogy feltérképezzék a különböző kutya fajták közötti különbségek genetikai okait. Különböző viselkedések 11 lókusszal asszociáltak, ezeket egy pontos nukleotid polimorfizmusokkal (SNP) azonosították. A vonyítással kapcsolatban 1963 egyedet vizsgáltak 23 genomi régióra, ezek közül kettő kiemelkedően magas statisztikai szignifikanciát (2., 3. ábra) mutatott és még kettő szintén magasabbat a többihez képest (4., 5. ábra).

Az *ORAOVI* (*LTOI*) fehérjekódoló gén esetén egy guanin változott adeninre, amely egy Ser77Asn mutáció, míg egy intergenikus régióban az *SLC38A11* és *SCN3A* között, amely a beszéd és nyelv fejlődésében szerepet játszó feszültségfüggő nátrium csatornát kódol, egy citozin változott adeninra a referenciagenomhoz képest a gazdák szerint gyakran vonyító egyedekben.

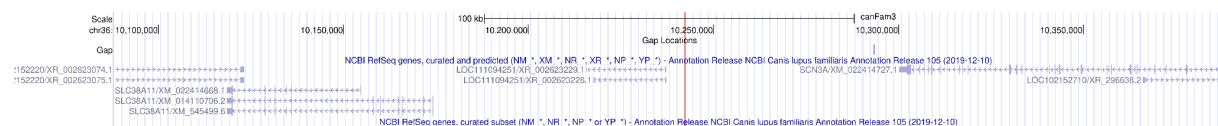
Célkitűzés

Kutatásomban a korábbi GWAS (Morill és mtsai, 2022) által identifikált négy lókuszt vizsgálok, amelyeken SNP-ket detektáltak (2., 3., 4., 5. ábra) és vonyítással asszociálhatóak voltak. PCR-t (polimeráz-láncreakció) használva a minták Sanger-szekvenálását teszem lehetővé, amely segítségével képes vagyok az SNP-k jelenlétét validálni és a minták allélfrekvenciáját összehasonlítani. A fajtákat a filogenetikai törzsfa alapján, minél több fajtacsoportot lefedve válogattam össze, mivel feltételezzük, hogy a távolság a farkassal való közös őstől hatással van a vokális repertoár diverzitására. Továbbá feltételezzük, hogy a vad kutyafélékben az ősi génszekvencia található meg, ezért farkas és sakál mintákat választottam az összehasonlításhoz. A korábban említett GWAS-ban a labrador retrieverek legalacsonyabb vonyítási hajlamára külön figyelmet fordítottam.

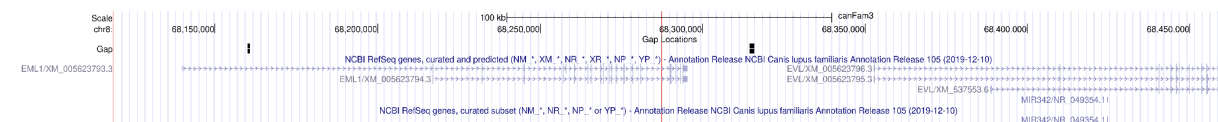
A vizsgált lókuszok közül a korábban említett intergenikus régió az *SLC38A11* és az *SCN3A* gének között szerepet játszik a beszéd és a nyelv fejlődésében emberek esetében. Hosszabb távú célom, hogy az eredmények által jobban megértsük a szelekciós nyomások jelentőségét, valamint közelebb kerüljünk a vokális tanulási képességek evolúciójának feltárásához, vagyis ahhoz, hogy milyen genetikai változásoknak kellett végbemenni a vokális tanulás képességéhez, amely az emberi beszéd kialakulásához elengedhetetlen.



2.ábra: SNP (piros vonal) lokalizációja az *ORAOF1* egyik exoniában található.



3. ábra: SNP (piros vonal) az *SLC38A11* és *SCN3A* intergenikus, nem kódoló részén található.



4.ábra: SNP (piros vonal) az *EML1* intronjában.

Kérdés	Típus
Általában véve mennyire vonyítós (tutulós) az Ön kutyája?	1-5 Likert skálán
Vonyít-e a kutyája, ha meghallja valamelyiket SZIRENÁZNI az alábbiak közül?	Többszörös választás
Milyen gyakran válaszol vonyítással a kutya a fenti szirénák hangjára?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutyája ZENE hallatán?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutya, ha a gazdája elmegy otthonról, és ő otthon marad?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutya, ha mindenki elmegy otthonról és ő egyedül marad?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutya, ha a gazda másik kutyával elmegy otthonról és ő otthon marad?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutya, ha másik ismerős kutya vonítását hallja?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutya, ha bármely más (nem ismerős) kutya vonítását hallja?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutya, ha bezárva marad idegen helyen?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutya, ha kikötve marad idegen helyen?	Gyakoriság
Vonyít-e a kutya látszólag indokolatlanul, felismerhető ok nélkül?	Gyakoriság
Előfordul-e, hogy a kutya előbb ugatni kezd, majd ez átmegy vonyításba?	Gyakoriság
Igaz-e Önökre az a helyzet, hogy Ön nem szokta hallani a kutyáját vonyítani, de mások, akik pl. otthon maradnak, vagy a szomszédok elárulják, hogy amikor Ön elmegy hazulról, a kutya vonyítani kezd?	Igen-Nem (Eldöntendő)

1.táblázat: A táblázatban zöld színnel jelölt kérdések válasza került számításba a vonyítóssági ponthoz, amely ezekre a kérdésekre adott válasz pontjainak átlagából tevődik össze. Ezek mind gyakoriság típusú kérdések voltak, amelyekre 0-4 pont volt kapható (soha - 0; ritkán - 1; általában - 2; gyakran - 3; mindig - 4, nem tudom - NA). Farkasok és sakál esetén a vonyítást vad fenotípusként kezeltem.

Genotipizálás

DNS izolálás

A szájnyalakból vett, szárított mintákból először is izolálni kellett a DNS-t, amelyeket a Thermo Fisher – Thermo Scientific™ GeneJET Genomic DNA Purification Kit (#K0722) segítségével csináltam. A gyártó külön szájjüregből vett kenetből készült protokollját követtem.

PCR használata

Az SNP-k feltárásához a PCR használatát választottam (6. ábra), mivel specifikus, nagy az érzékenysége és kis mennyiségű DNS-minta esetén is kiválóan működik, továbbá a downstream analízist is lehetővé teszi. Ehhez specifikus primereket terveztem (2. táblázat), amelyek közvetlenül az SNP-k környezetében amplifikálódnak. Ez egy molekuláris biológiai technológia, amit DNS enzim segítségével (a kópiák megsokszorozására) használhatók.

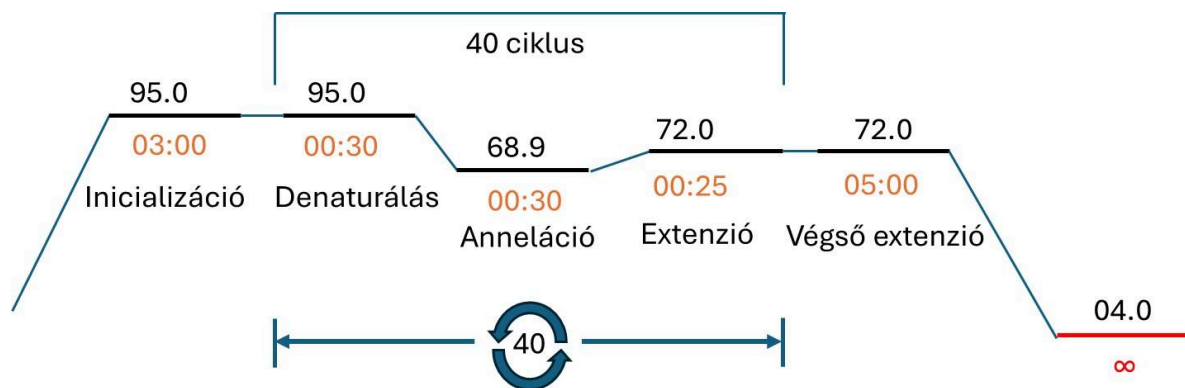
Az általam követett protokoll:

- 2,5 µL 10X DreamTaq puffer
- 0,5 µL dNTP (10 mM)
- 0,5 µL F+R primer (10 µM)
- 1 µL templát (genomi DNS)
- 0,3 µL DreamTaq DNS polimeráz
- 25 µL-ig H₂O (nukleáz-mentes)

A PCR reakció sikerességéhez mindegyik SNP környezetéhez két primer párt terveztem arra az esetre, ha nem tudna a primer bekötni egy esetleges SNP-k vagy indel miatt.

18:48487378 (ORAOV1) F	CGTACTGTGCATGGAGGGTCTCACACC
18:48487378 (ORAOV1) R	ACAGCCACCAAGCACTCAGTTTCCAGG
18:48487378 (ORAOV1) F2	AAGCTGTTACCCAGTCTGTCCCAGAGG
18:48487378 (ORAOV1) R2	GGTCCGTGAAGCTACTCAGAACACACC
36:10238073 (SLC38A11) F2	AGCATGGGAAGATTATATCTCGTTTGG
36:10238073 (SLC38A11) R2	GAGCTTCAGAGGAGAGTATCTGTATCC
8:68289790 (EML1) F	TTCCTTCCCAGTGTATCCTGGATCTCC
8:68289790 (EML1) R	TGTCGCTGACTCCATAGATGTAGATGC
2:69386312 (SERINC2) F	ATTCAGTGCCTCCTTTGCGGTGACTGG
2:69386312 (SERINC2) R	CAACGGTGTCTGAGCTGTGACTCCTGC

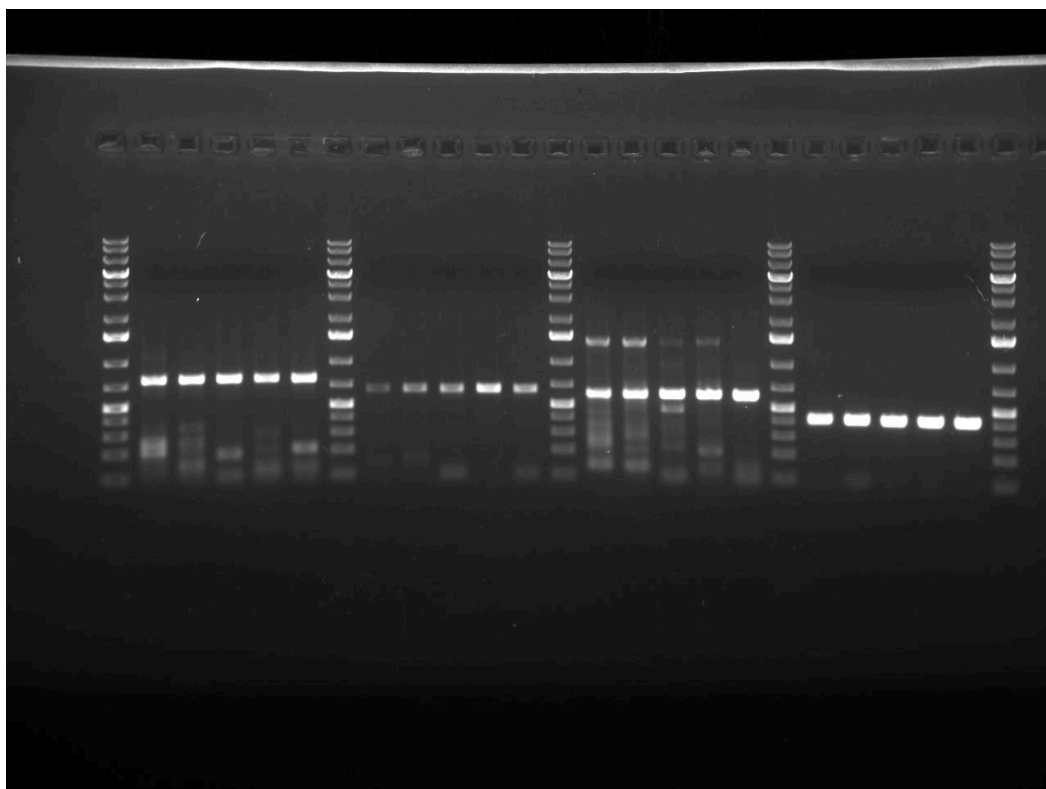
2.táblázat: A használt primerek. Az *ORAOV1* esetén mindkét párt használtam, de 6 egyednél így sem jött fel termék. Az *SLC38A11* esetében szennyezés miatt a második pár primert használtam.



6.ábra: A használt PCR program. A SNP-k nagy részét ezen a programon sikerült felamplifikálni, viszont egyes primerek esetében eltértem ettől (maximum -2,9°C fokot)

A kapott PCR termékeket Thermo Fisher – Thermo Scientific™ GeneJET PCR Purification Kit (#K0702) használatával tisztítottam (a gyártó protokollját követtem).

A PCR sikerességét a termékek gélelektroforézissel történő futtatásával vizsgáltam (7.ábra). Ennek segítségével ellenőriztem, hogy megfelelő termékek keletkeztek és ha volt aspecifikus termék, akkor gélizólálást végeztem Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (#K0692) használatával, amely esetén szintén a gyártó protokollját követtem.



7.ábra: Gélelektroforézis segítségével UV fényben látható a primerek sikeressége különböző hőfokokon. Létrának a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder használtam, amely 75 és 20.000 bázispár közötti tartományban használható. *ORAOV1*-; *EML1*-; *SERINC2*- és *SLC38A11*-re tervezett primerek 58°C; 60,1°C; 62,5°C; 63,7°C; 66°C-on

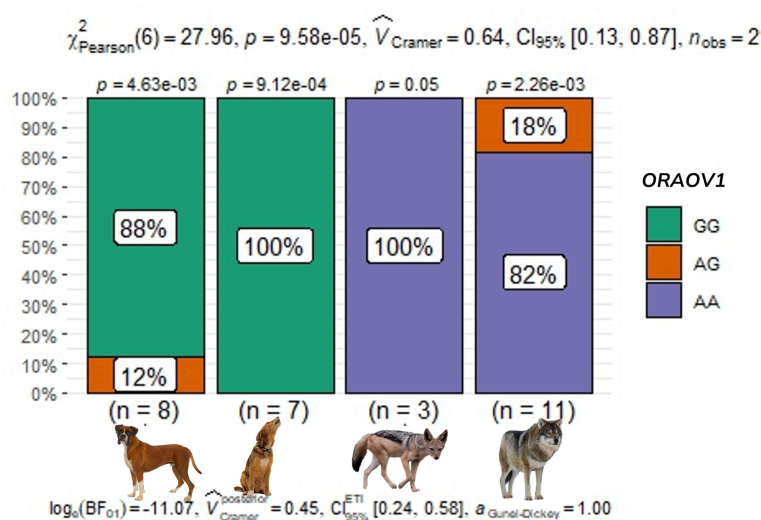
A tisztított PCR termékek DNS koncentrációját (ng/μL) NanoDrop spektrofotométerrel mértem, majd a szekvenáló cég (Eurofins Genomics) által meghatározott 5 ng/μL-ra hígítottam a mintákat nukleáz-mentes víz használatával (20 μL). Ehhez került hozzáadásra mintánként a használt 10 μM-os forward vagy reverse primerből 2 μL. A szekvenáláshoz a Broad Institute CanFam3.1 ID-vel rendelkező referencia genomot használtam.

Eredmények

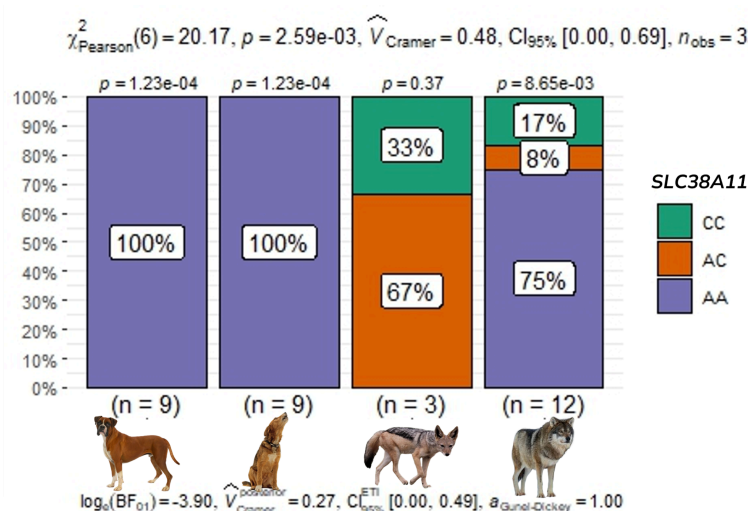
Az *ORAOV1* esetében hat mintát többszöri próbálkozásra sem sikerült felamplifikálni, *SLC38A11*-re kettőt, míg *EML1* és *SERINC2* esetén egyet-egyet, így összesen 100 mintát küldtem el Sanger szekvenálásra. Eleinte 20 egyedet 4 lókuszra vizsgáltam (1.függelék), de az *EML1* és *SERINC2* esetén nem találtunk polimorfizmust sem kutyák, sem farkasok esetében. Növelve a mintaszámot 15 másik egyedet vizsgáltam meg sakálakat is belevonva az *ORAOV1* és *SLC38A11* lókuszra.

Az *ORAOV1*-nél az “AA” allélfrekvencia a vad kutyafélékre mutatkozott gyakoribbnak, míg a “GG” a kutyákra. A jelölt annotáció (G>A) három egyedben mutatta a báziscserét, vonyításra nem hajlamos kutyáknál és farkasoknál volt megtalálható (8.ábra). A farkasoknál megfigyelhető volt delécia is, amely gélképen is jellegzetesen megfigyelhető.

Az *SLC38A11* lókuszon a “CC” genotípus ritkának bizonyult mind kutyákban, mind vad kutyafélékben (9. ábra).



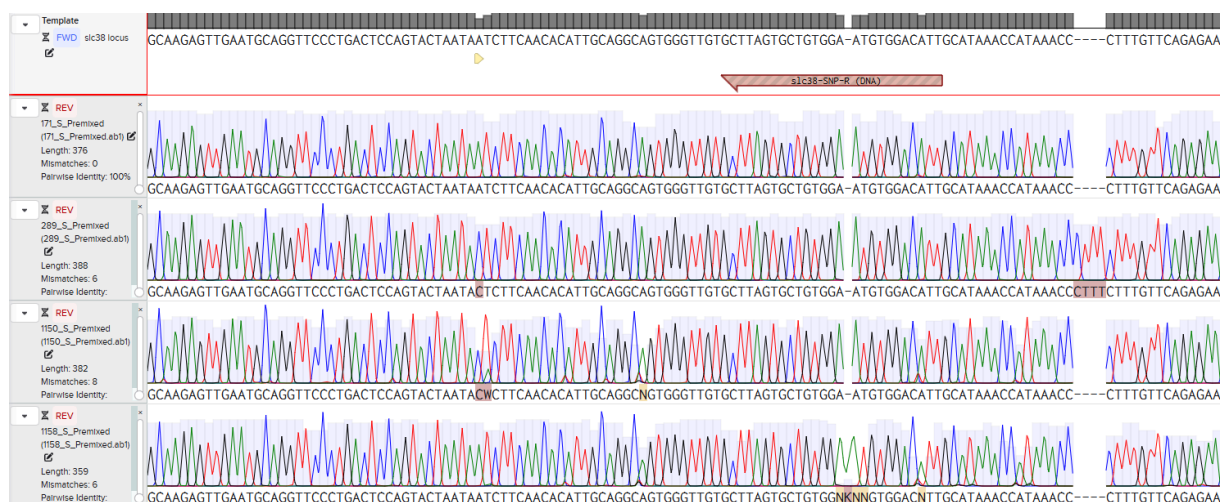
8. ábra: Az *ORAOV1* genotípusos megoszlása



9. ábra: Az *SLC28A11* genotípusos megoszlása



8.ábra: *ORAOV1* lókuszt esetében a referenciagenomhoz illesztett 2 farkas, basenji és vonyítós angol cocker spániel szekvenálás. A jelölt annotáció három helyen mutatta a cikk szerinti báziscserét (G>A). A sárga fektetett háromszög az SNP-t jelöli.



9.ábra: *SLC38A11* lókuszt esetében a referenciagenomhoz illesztett két farkasnál figyelhető meg SNP, az egyik heterozigóta, a másik homozigóta formában hordozza ezt az SNP-t. A sárga fektetett háromszög az SNP-t jelöli.

Diszkusszió

A négy, korábban Morrill és mtsai. (2022) által azonosított SNP közül az *EMLI* és *SERINC2* esetében egyáltalán nem volt jelen sem farkasban, sem kutyában, míg az *ORAOVI* és *SLC38A11* illetően különbségek adódtak a kutyák és vad kutyafélék között. Az aranyakál genetikailag távolabb áll a kutyáktól a farkashoz képest, ezért is lehet hogy az *SLC38A11*-en az “A” allél az aranyakállokra nem volt jellemző, a farkasokban már gyakori volt, míg a kutyák homozigóták voltak erre az allélra. Ez alapján nem sikerült megerősíteni Morrill és mtsai. (2022) eredményeit a vonyítással kapcsolatban, hiszen a fenotípus nem kapcsolódott az azonosított SNP-k jelenlétéhez. A publikációból nem derült ki, hogy milyen fajta kutyákban találták az SNP-ket, továbbá nem különítették el a szociális és a szeparációs vonyítást. Ez alapján nem állíthatom, hogy ez a négy lókuszt kapcsolódik a vonyításhoz, viszont az *ORAOVI* és *SLC38A11* allélfrekvenciája megváltozott a házasítás során.

A kutyafajták közti varianciát sem sikerült bizonyítanom. A cikkben említett vonyításra hajlamos kutyák “A” allélt hordoztak “G” helyett az *ORAOVI*-nél, ez adódhat abból is, hogy bizonyos ősi típusú kutyafajták vagy egyedek közelebb állnak a farkashoz genetikailag, hiszen a domesztikáció és fajtaszelekció későbbi időszakában is géntranszfert mutattak farkasokkal. Referencia genomnak egy boxerét használták, amely a fajták közül a legtávolabb áll a farkastól (Dutrow és mtsai., 2022).

Lehetséges, hogy ezek a lókusztok nem, vagy csak kis kapcsolatot mutatnak a vonyítással, amely minden bizonnyal poligénes jelleg, így több mutáció együttes jelenléte kell ahhoz, hogy eltűnjön a vokális repertoárból. Míg a farkas esetében ha nem vonyít, rosszabb a túlélési esélye, kutyáknál nincs szelekciós nyomás a vonyítás fennmaradására, ezen mutációk kiszelektálódhatnak, sőt akár hathatott rá negatív szelekció is, ha az ember aktívan kiszelektálta a vonyításra hajlamos egyedeket, mert azok hangosak, zavaróak voltak, és felhívták magukra a figyelmet, amely egy vadászó-gyűjtögető csoport esetén negatív következménnyel járhatott.

A várt eredmény két okból maradhatott el. Az egyik, hogy kis mintaszámmal dolgoztam, ezért érdemes lehet megvizsgálni a két szignifikáns (*ORAOVI* és *SLC38A11*) lókuszt több kutyafajtával és nagyobb mennyiségű vad kutyaféle mintával, hogy pontosabb képet kapjunk. A másik lehetséges ok, hogy egy GWAS-hoz elengedhetetlen a megfelelő kontrollok használata és a jól kiválasztott vizsgálni kívánt fenotípus, amely az általam felhasznált cikk esetében nem feltétlen történt meg (Pongrácz, 2017).

A jövőben tervezzük bioinformatikai módszerekkel meglévő adatbázisokból elemezni ezen SNP-k gyakoriságát, további mintákat gyűjteni és a vizsgálatokba bevonni más vad kutyaféléket, mint például rókákat is.

Szerzői hozzájárulás

Alulírott Larionov Tünde Aida a dolgozatban szereplő munkafolyamatok közül a

- Minták kiválasztását
- DNS-k izolációját
- SNP-k amplifikációját

végeztem el.

Ezúton nyilatkozom, hogy TDK konferencián korábban nem értem el helyezést. Ha a jelen BTDK Konferencia előtt másik TDK konferencián helyezést érek el, arról a BTDK szervezőit még a konferencia előtt értesítem, a nyertes pályamunkát eljuttatom hozzájuk.

Budapest, 2024.11.07.

A handwritten signature in blue ink, reading "Larionov Tünde Aida", written over a horizontal line.

a hallgató aláírása

Irodalomjegyzék

- Belyaev, D.K., Plyusnina, I.Z., Trut, L.N., 1985. Domestication in the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm): Changes in physiological boundaries of the sensitive period of primary socialization. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 13, 359–370. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(85\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0168-1591(85)90015-2)
- Bronner, M.E., LeDouarin, N.M., 2012. Development and evolution of the neural crest: An overview. *Dev. Biol., Neural Crest* 366, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.042>
- Candille, S.I., Kaelin, C.B., Cattanaach, B.M., Yu, B., Thompson, D.A., Nix, M.A., Kerns, J.A., Schmutz, S.M., Millhauser, G.L., Barsh, G.S., 2007. A β -Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs. *Science* 318, 1418–1423. <https://doi.org/10.1126/science.1147880>
- Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Galaverni, M., Manghi, L., Boitani, L., Sforzi, A., Randi, E., 2013. Black coats in an admixed wolf $\times$ dog pack is melanism an indicator of hybridization in wolves? *Eur. J. Wildl. Res.* 59, 543–555. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0703-1>
- Darwin, C., 1868. *The Variation of Animals and Plants Under Domestication*. John Murray.
- Dutrow, E.V., Serpell, J.A., Ostrander, E.A., 2022. Domestic dog lineages reveal genetic drivers of behavioral diversification. *Cell* 185, 4737–4755.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.003>
- Freedman, A.H., Wayne, R.K., 2017. Deciphering the Origin of Dogs: From Fossils to Genomes. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 5, 281–307. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110937>
- Gogoleva, S.S., Volodin, I.A., Volodina, E.V., Kharlamova, A.V., Trut, L.N., 2009. Kind granddaughters of angry grandmothers: The effect of domestication on vocalization in cross-bred silver foxes. *Behav. Processes, Canine Behaviour and Cognition* 81, 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2009.03.012>
- Hare, B., 2017. Survival of the Friendliest: *Homo sapiens* Evolved via Selection for Prosociality. *Annu. Rev. Psychol.* 68, 155–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010416-044201>
- Harrington, F.H., Mech, L.D., 1979. Wolf Howling and Its Role in Territory Maintenance. <https://doi.org/10.1163/156853979X00322>
- Johnsson, M., Henriksen, R., Wright, D., 2021. The neural crest cell hypothesis: no unified explanation for domestication. *Genetics* 219, iyab097. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab097>
- Kershenbaum, A., Root-Gutteridge, H., Habib, B., Koler-Matznick, J., Mitchell, B., Palacios, V., Waller, S., 2016. Disentangling canid howls across multiple species and subspecies: Structure in a complex communication channel. *Behav. Processes* 124, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.01.006>
- Khosravi, R., Asadi Aghbolaghi, M., Rezaei, H.R., Nourani, E., Kaboli, M., 2015. Is black coat color in wolves of Iran an evidence of admixed ancestry with dogs? *J. Appl. Genet.* 56, 97–105. <https://doi.org/10.1007/s13353-014-0237-6>
- Kis, A., Bence, M., Lakatos, G., Pergel, E., Turcsán, B., Pluijmakers, J., Vas, J., Elek, Z., Brúder, I., Földi, L., Sasvári-Székely, M., Miklósi, Á., Rónai, Z., Kubinyi, E., 2014. Oxytocin Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Human Directed Social Behavior in Dogs (*Canis familiaris*). *PLOS ONE* 9, e83993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083993>
- Lehoczki, F., Andics, A., Kershenbaum, A., Kubinyi, E., Passilongo, D., Root-Gutteridge, H., Range, F., Sánchez, V.P., Schmidt, L., Townsend, S.W., Watson, S.K., Faragó, T., 2023. Genetic distance from wolves affects family dogs' reactions towards howls. *Commun. Biol.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04450-9>
- Lord, K.A., Larson, G., Karlsson, E.K., 2020. Reply to Zeder and Trut et al.: An Attractive Hypothesis in Need of Evidence. *Trends Ecol. Evol.* 35, 651–652. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.05.008>
- Marshall-Pescini, S., Schwarz, J.F.L., Kostelnik, I., Virányi, Z., Range, F., 2017. Importance of a species' socioecology: Wolves outperform dogs in a conspecific cooperation task. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 11793–11798. <https://doi.org/10.1073/pnas.1709027114>
- Miklósi, Á., Topál, J., 2013. What does it take to become 'best friends'? Evolutionary changes in canine social competence. *Trends Cogn. Sci.* 17, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.04.005>
- Morey, D.F., 2014. In search of Paleolithic dogs: a quest with mixed results. *J. Archaeol. Sci.* 52,

- 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.08.015>
- Morrill, K., Hekman, J., Li, X., McClure, J., Logan, B., Goodman, L., Gao, M., Dong, Y., Alonso, M., Carmichael, E., Snyder-Mackler, N., Alonso, J., Noh, H.J., Johnson, J., Koltoukian, M., Lieu, C., Megquier, K., Swofford, R., Turner-Maier, J., White, M.E., Weng, Z., Colubri, A., Genereux, D.P., Lord, K.A., Karlsson, E.K., 2022. Ancestry-inclusive dog genomics challenges popular breed stereotypes. *Science* 376, eabk0639. <https://doi.org/10.1126/science.abk0639>
- Pongrácz, P., 2017. Modeling Evolutionary Changes in Information Transfer. *Eur. Psychol.* 22, 219–232. <https://doi.org/10.1027/1016-9040/a000300>
- Price, E.O., 1984. Behavioral Aspects of Animal Domestication. *Q. Rev. Biol.* 59, 1–32. <https://doi.org/10.1086/413673>
- Purugganan, M.D., 2022. What is domestication? *Trends Ecol. Evol.* 37, 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.04.006>
- RAUSCH, R.A., 1967. Some Aspects of the Population Ecology of Wolves, Alaska. *Am. Zool.* 7, 253–265. <https://doi.org/10.1093/icb/7.2.253>
- Tembrock, G., 1976. Canid vocalizations. *Behav. Processes* 1, 57–75. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(76\)90007-3](https://doi.org/10.1016/0376-6357(76)90007-3)
- Thalmann, O., Shapiro, B., Cui, P., Schuenemann, V.J., Sawyer, S.K., Greenfield, D.L., Germonpré, M.B., Sablin, M.V., López-Giráldez, F., Domingo-Roura, X., Napierala, H., Uerpmann, H.-P., Loponte, D.M., Acosta, A.A., Giemsch, L., Schmitz, R.W., Worthington, B., Buikstra, J.E., Druzhkova, A., Graphodatsky, A.S., Ovodov, N.D., Wahlberg, N., Freedman, A.H., Schweizer, R.M., Koepfli, K.-P., Leonard, J.A., Meyer, M., Krause, J., Pääbo, S., Green, R.E., Wayne, R.K., 2013. Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs. *Science* 342, 871–874. <https://doi.org/10.1126/science.1243650>
- Tomasello, M., Hare, B., Lehmann, H., Call, J., 2007. Reliance on head versus eyes in the gaze following of great apes and human infants: the cooperative eye hypothesis. *J. Hum. Evol.* 52, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2006.10.001>
- Tonoike, A., Otaki, K., Terauchi, G., Ogawa, M., Katayama, M., Sakata, H., Miyasako, F., Mogi, K., Kikusui, T., Nagasawa, M., 2022. Identification of genes associated with human-canine communication in canine evolution. *Sci. Rep.* 12, 6950. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11130-x>
- Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J.E., Amorim, I.R., Rice, J.E., Honeycutt, R.L., Crandall, K.A., Lundeberg, J., Wayne, R.K., 1997. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science* 276, 1687–1689. <https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1687>
- vonHoldt, B.M., Pollinger, J.P., Lohmueller, K.E., Han, E., Parker, H.G., Quignon, P., Degenhardt, J.D., Boyko, A.R., Earl, D.A., Auton, A., Reynolds, A., Bryc, K., Brisbin, A., Knowles, J.C., Mosher, D.S., Spady, T.C., Elkahoul, A., Geffen, E., Pilot, M., Jedrzejewski, W., Greco, C., Randi, E., Bannasch, D., Wilton, A., Shearman, J., Musiani, M., Cargill, M., Jones, P.G., Qian, Z., Huang, W., Ding, Z.-L., Zhang, Y., Bustamante, C.D., Ostrander, E.A., Novembre, J., Wayne, R.K., 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 464, 898–902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>
- Wayne, R.K., vonHoldt, B.M., 2012. Evolutionary genomics of dog domestication. *Mamm. Genome* 23, 3–18. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9386-7>
- Wilkins, A.S., Wrangham, R.W., Fitch, W.T., 2014. The “Domestication Syndrome” in Mammals: A Unified Explanation Based on Neural Crest Cell Behavior and Genetics. *Genetics* 197, 795–808. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.165423>
- Wood, B., K. Boyle, E., 2016. Hominin taxic diversity: Fact or fantasy? *Am. J. Phys. Anthropol.* 159, 37–78. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22902>
- Wright, D., Henriksen, R., Johnsson, M., 2020. Defining the Domestication Syndrome: Comment on Lord et al. 2020. *Trends Ecol. Evol.* 35, 1059–1060. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.08.009>
- Wynne, C.D.L., 2021. The Indispensable Dog. *Front. Psychol.* 12, 656529. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.656529>

Függelék

Faj	Fajta	Kor	Ivar	Vonyítás	Információ a vonyításról	ID 18:48487378:G:A (<i>ORAOV-1</i>)	ID 36:10238073:A:C (<i>SLC38</i>)	ID 8:68289790:G:A (<i>EML1</i>)	ID 2:69386312:G:A (<i>SERINC2</i>)
eurázsiai farkas		1	kan	igen	faji jelleg	AA	AA	GG	GG
eurázsiai farkas		2	szuka	igen	faji jelleg	NA	CC	GG	GG
eurázsiai farkas		NA	kan	igen	faji jelleg	AA	CC	GG	GG
eurázsiai farkas		NA	kan	igen	faji jelleg	NA	AA	GG	GG
timber farkas		NA	szuka	igen	faji jelleg	AA	AA	GG	GG
kutya-farkas hibrid		2	ivartalan kan	igen	teszt	GG	AA	GG	GG
kutya	Szibériai husky	5	ivartalan szuka	igen	kérdőív (1,8)	NA	AA	GG	NA
kutya	Angol cocker spániel	3	ivartalan kan	igen	teszt	GG	NA	GG	GG
kutya	Labrador retriever	1	ivartalan kan	igen	teszt	NA	AA	GG	GG
kutya	Szibériai husky	10	ivartalan szuka	igen	teszt	GG	AA	GG	GG

Faj	Fajta	Kor	Ivar	Vonyítás	Információ a vonyításról	ID 18:48487378:G:A (<i>ORAOV-1</i>)	ID 36:10238073:A:C (<i>SLC38</i>)	ID 8:68289790:G:A (<i>EML1</i>)	ID 2:69386312:G:A (<i>SERINC2</i>)
kutya	Német spicc jellegű	15	szuka	nem	kérdőív	GG	AA	NA	GG
kutya	Agár-labrador keverék	2	ivartalan kan	nem	kérdőív	GG	AA	GG	GG
kutya	Beagle	6	ivartalan szuka	nem	kérdőív	GG	AA	GG	GG
kutya	Labrador retriever	8	kan	nem	kérdőív	GG	AA	GG	GG
kutya	Border collie	3	kan	nem	kérdőív	GG	AA	GG	GG
kutya	Basenji	1	kan	nem	kérdőív	GA	AA	GG	GG
kutya	Amerikai pit bull terrier	9	ivartalan szuka	nem	kérdőív	GG	AA	GG	GG
kutya	Máltai selyemkutya	2	ivartalan kan	nem	kérdőív	GG	AA	GG	GG
kutya	Ír terrier	1	kan	nem	kérdőív	GG	AA	GG	GG
kutya	Jack Russel terrier	14	ivartalan szuka	nem	kérdőív	GG	NA	GG	GG

1. függelék: A megszekvenált egyedek faja, fajtája, kora és ivara. Az ID az SNP-k helyét jelöli, melyik kromoszómán, hányadik bázisban és milyen báziscsere történt