

OTDK-dolgozat

Szives András László

2022.

36. OTDK Biológia Szekció

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

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
ÁLLATTENYÉSZTÉSI, TAKARMÁNYOZÁSTANI ÉS LABORÁLLAT-TUDOMÁNYI
INTÉZET

Készítette: Szives András László

Biológia BSc hallgató III. évfolyam

(abszolutóriumot szerzett)

Témavezető: Dr. Zenke Petra

Tudományos főmunkatárs

2022.

Tartalomjegyzék

Idegen szavak és rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Farkasok elterjedése.....	6
A farkasok domesztikációja és a hibridizáció kérdése.....	6
A taxonómiai- és hibridazonosításban alkalmazott markerek.....	8
Morfológia alapján	8
Uniparentális markerek.....	8
Biparentális markerek	9
Genetikai vizsgálatok a kutyák és farkasok elkülönítésére	10
Igazságügyi vadvilág genetika	11
Farkasok érintettsége törvényszéki esetekben	12
Állattámadás és gazdasági károkozás.....	12
Orvvadászat és illegális kereskedelem.....	14
A magyar farkasállománnyal kapcsolatos esetek.....	14
Célkitűzés	15
Anyag és módszer	16
Mintagyűjtés	16
Elővizsgálatok, DNS izolálás és kvantifikálás	17
DNS markerek PCR amplifikálása, detektálása és kiértékelése	19
Terepről gyűjtött minták előzetes tesztelése	19
Mitokondriális kontroll régió vizsgálatok	19
Biparentális mikroszatellita vizsgálatok.....	20
Y-kromoszómás STR vizsgálatok	20
Genetikai adatbázisok kialakítása és statisztikai analízis.....	21
Mitokondriális kontroll régió	21
Mikroszatellita elemzések	21
Eredmények	22
Mikroszkópos vizsgálatok és DNS izolálás eredménye	22
DNS markerek PCR amplifikálása és kimutatása	22
Kétmarkeres előtesztelések eredménye	22
Mitokondriális vizsgálatok eredménye.....	22
Biparentális mikroszatellita vizsgálatok eredménye	22
Y-kromoszómás mikroszatellita vizsgálatok eredménye	23

Statisztikai elemzések eredménye	24
Mitokondriális haplotípusok csoportosítása	24
Mikroszatellita allélek eloszlása Structure analízissel	25
Diskusszió	25
Összefoglalás	28
Summary	29
Irodalomjegyzék	30
Köszönetnyilvánítás.....	38

Idegen szavak és rövidítések jegyzéke

ÁTE: Állatorvostudományi Egyetem

bp: bázispár

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

EVMA: Európa Vadvilágának Megmentéséért Alapítvány

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

indel: inszerció/delécio

ISAG: International Society for Animal Genetics – Nemzetközi Állatgenetikai Társaság

K: klaszter, csoport

KR: kontroll régió

LnP(D): natural log posterior probability of the data – az adatok valószínűségének természetes alapú logaritmus

MCMC: Markov Chain Monte Carlo – Markov lánc Monte Carlo

mp: másodperc

mtDNS: mitokondriális DNS

MTM: Magyar Természettudományi Múzeum

PCR: Polymerase Chain Reaction – polimeráz láncreakció

PopART: Population Analysis with Reticulate Trees

SNP: Single Nucleotide Polymorphism – egynukleotidos polimorfizmus, pontmutáció

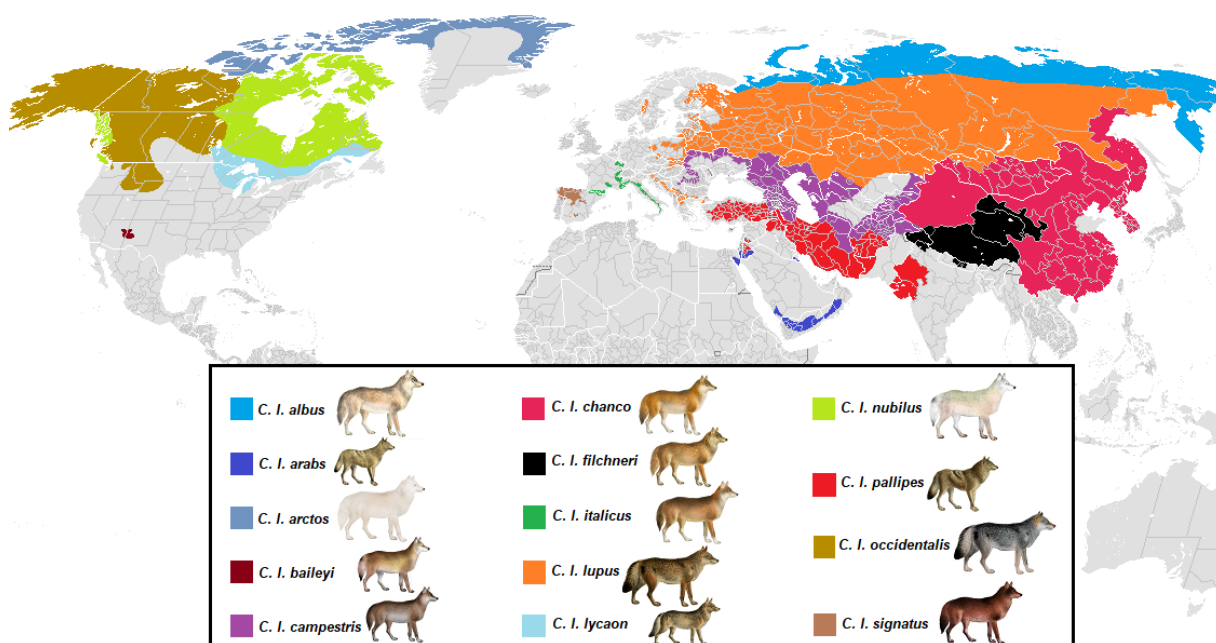
STR: Short Tandem Repeat – rövid tandem ismétlődés

VUW: Veterinärmedizinische Universität Wien – Bécsi Állatorvostudományi Egyetem

Bevezetés

A szürke farkas (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) a legnagyobb testű szárazföldi ragadozó a *Canidae* családban. Nagyon mozgékony faj, hatalmas területeket képes bejárni és magas adaptációs képességének köszönhetően az északi féltekének szinte minden életközösségében megtelepedett [1].

A késő miocénig a *Canis* nemzetség csupán az Észak-Amerikai kontinensen volt jelen [2], Eurázsiai térhódításukat a késő neogénben kezdték meg [3,4]. Nagyjából 2,6 millió évvel ezelőtt a *Canis* genus elterjedésében történt egy hirtelen, nagymértékű robbanás, amit „wolf event”-nek nevezett el Azzaroli [5]. Ezen esemény vezetett ahhoz, hogy a csoport eljusson a nyugat-európai területekig és ezzel egész Euráziát kolonizálta [5,6,7]. Az erőteljes expanzió a nemzetség nagymértékű változatosságát alakította ki, mely a fosszilis leletek alapján igazolt [2]. Az erőteljes diverzifikációnak köszönhetően jelentek meg a morfológiailag modern farkasok Észak-Amerikában, Ázsiában és Európában [2], és ugyanebben az időszakban jelent meg a szürke farkas is [3,6,7]. Jelenleg a szürke farkas evolúcióját illetően a *Canis etruscus* → *C. mosbachensis* → *C. lupus* leszármazás az elfogadott [2,4]. A nagy ökológiai rugalmasságának köszönhetően a szürke farkas a negyedidőszak végére az egész északi féltekén elterjedté vált [6] és a különböző adottságú területekhez alkalmazkodva számos alfaj jött létre [7] (1. ábra).



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/16/Present_distribution_of_gray_wolf_%28canis_lupus%29_subspecies.png

1. Ábra A *Canis lupus* alfajainak elterjedése az északi féltekén. A farkasok az Egyesült Királyság kivételével egykor egész Európában jelen voltak, de mára csak eredeti állományaikból kisebb foltok maradtak fenn.

Farkasok elterjedése

Az elmúlt két évszázadban drasztikusan csökkent a farkas populáció világszinten [8], ami számos európai ország farkas állományának eltűnéséhez vezetett. Ez főleg a vadászatoknak és a fokozott emberi jelenlétnek a következménye [9]. Európában a 20. század elején erős degradáció volt megfigyelhető a farkas populációkban, aminek következtében Nyugat-Európán belül Olaszországban és az Ibériai-félszigeten, továbbá a Balkánon és más Kelet-Európai területeken maradtak fenn populációk [10]. A ma már CITES listán szereplő, védett státuszt élvező faj a vad patások expanziója és az ellenük indított vadászatok hiánya következtében stabilizálni tudta megmaradt populációit, és rekolonizálni kezdte hajdani területeit [10,11]. Napjainkban Európában 12000-13000 példányra becsülik a kontinens farkas állományát [10,12], mely lassan növekvő tendenciát mutat. Kilenc állam kivételével Európában védett, illetve fokozottan védett állatként van nyilvántartva [12].

Európa többi államához hasonlóan, a 19. század végére Magyarországon is erősen megcsappant a farkasállomány [13]. Közel egy évszázad után, 1966-ban az Aggteleki Nemzeti Parkban észleltek egy farkast, majd az 1980-as és 90-es években újra [14]. Az 1990-es évektől a hazánkban tartózkodó farkasok száma lassan emelkedni kezdett és 1993-ban megkapták a védett státuszt, majd 2001-ben a fokozottan védett státuszt [12,13]. A Bükki Nemzeti Park területén 2010-től észlelik az újonnan visszatérő farkasokat és ettől az évtől egy állandó farkas populáció figyelhető meg hazánkban [13]. A hazai vadon élő állományt 50 egyedre becsülik, amely főleg az Aggteleki Nemzeti Parkban, illetve kisebb csoportjuk a Bükkben fordul elő [12].

A farkasok domesztikációja és a hibridizáció kérdése

A sok növény és állatfaj közül a kutyát (*Canis lupus familiaris*) házasították először az emberek [15]. Feltételezhetően már 30-35 ezer évvel ezelőtt kezdett kialakulni a kutya és ember szorosabb kapcsolata, amit leletek is alátámasztanak. A Goyet-i barlangban (Belgium) talált kutya koponya számít a legidősebbnek, amit 31700 évesnek datáltak [16]. Ekkor még nem volt elterjedt az emberi törzseknél a farkas szelídítése, azok jelenlétét inkább az emberi települések által biztosított táplálékforrás váltotta ki [17]. A valódi domesztikáció 14-15 ezer évvel ezelőtt kezdődhetett az ősi Kínában és Közel-Keleten, illetve nagyjából 12 ezer évvel ezelőtt Amerikában [17,18], melynek eredményeként létrejött a *Canis lupus familiaris*, mely az általánosan elfogadott nézet szerint a farkas egyik alfajának tekinthető [17].

Hibridizációnak nevezzük azt a jelenséget, amikor két rokonságban álló taxon (faj, alfaj) kereszteződik. A természetes hibridizáció kiváltó oka a két taxon által birtokolt területhatárok

közelsége. A kereszteződésből hibridek születnek, melyek vagy fertilisek (pl. farkas-kutya hibrid) vagy sterilek (pl. öszvér), és mindkét szülő (azaz mindkét taxon) genetikai állományát hordozzák. A természetes körülmények között lezajló hibridizáció szignifikáns szerepet tölt be az új fajok kialakulásában és a genetikai diverzitás fenntartásában [19], ezzel szemben az emberi hatásra történő, a domesztikáció miatt kialakult antropogén allélok introgressziója veszélyezteti a genetikai integritását az érintett fajoknak [20,21], és növeli a genetikai homogenitást, ami az adott faj genetikai úton való kihalásához vezethet [22]. Bizonyos esetekben, mikor a hibridizáció gyakorisága szignifikánsan megemelkedik, az erőszakosabb hibridek az eredeti fajt kiszoríthatják életterükről és átvehetik a helyüket [23].

Főleg igaz ez a *Canis* nemzetség tagjaira, melyek könnyen képesek fertilis utódokat létrehozni egymással a nagyfokú genetikai hasonlóság miatt [24,25,26]. A domesztikációból származó allélekkel történő introgresszió „beszennyezheti” a farkasok génállományát a hibridek révén, ezért különböző stratégiákat találtak ki ennek kiküszöbölésére (például ezen egyedek eliminálása a populációból). A farkas-kutya kereszteződés tartósabb együttélés során történhet meg. A két taxon kereszteződése sok tényezőtől függ: a farkasok egyedszámától [27,28], a kóbor kutyák jelenlététől és mennyiségétől [29], a terjeszkedő fázisban lévő farkaspopulációtól, illetve a szexuális interakcióktól, ha van átfedés farkas és kutya populációk között egy területen [22]. Európa szerte különböző mértékben kimutatott a hibridizáció farkasok és kutyák között. Legritkábban Olaszországban [30,31], a Skandináv térségben [32] és az Ibériai-félszigeten [22] fordul elő, míg Észtországban, Lettországon és Bulgáriában magasabb fokú introgresszió jellemző [33,34,35]. Ennek oka, hogy ezeken a területeken több a kóborló kutya, így a helyi, alacsony létszámú farkasállomány – melyet a védett státusz híján vadásznak is – könnyebben kerülhet kapcsolatba kutyákkal [35].

A felsorolt tényezőkön kívül, bizonyos területeken szándékosan tenyésztene ki hibrid állatokat annak érdekében, hogy őrkutya fajtákat hozzanak létre [36]. Ilyen célból hozták létre a csehszlovák farkaskutyát is, amit határőrzésre használtak [37]. A hibridizáció potenciálisan megváltoztatja a morfológiát, fiziológiát és viselkedését, így a kutya-farkas hibridek nem tartanak úgy az embertől, mint a farkasok, ugyanakkor nehezebben kezelhetők [38]. A hibridek szinantrop (ember közelében élő) magatartása miatt, a közelükben lévő emberekre és a helyi állatállományokra veszélyt jelentenek, mert bátran bemerészkednek a településekre és konfliktusba kerülhetnek az ott élőkkel [39].

A taxonómiai- és hibridazonosításban alkalmazott markerek

Morfológia alapján

Nincs konkrétan bizonyítva, hogy olyan mértékű kapcsolat lenne a genetikai és a morfológiai bélyegek között, hogy csupán a küllem alapján kijelenthessük egy egyedről, hogy hibrid. Ennek ellenére farkasok esetén általánosságban négy fő külső bélyeg alapján már feltételes hibridnek tekintik a vizsgált állatot [40]. Ezen négy tulajdonság az (i) atipikus bunda, annak színe (pl. fekete), mintázata (pl. foltos), és a szőr formája (pl. göndör), (ii) testi arányok (végtagok hossza, koponya méretei), (iii) farkaskarom megléte és a (iv) fehér karomszín [41,42].

A kamera-csapdás módszer egy lehetséges megoldás a farkasok és kóborló kutyák, illetve hibridjeik megkülönböztetésére. Ilyen esetekben a fentebb említett bélyegek alapján (bunda színe, testi arányok megfigyelése) meg lehet becsülni, hogy a lencsevégre kapott állatok közül melyik farkas, kutya vagy hibrid. Ezen kívül még a viselkedés mintázatok is segíthetnek az ivar és a taxon azonosításban [43,44].

Mivel sok esetben (pl. igazságügyi alkalmazás) nem állnak rendelkezésre morfológiai adatok, ilyenkor, illetve a küllemi adatok megerősítése és a megbízhatóbb eredmények elérése érdekében a genetikai vizsgálatokhoz kell fordulni. Két faj, illetve hibridjeik megkülönböztetésére többféle genetikai markert is használhatunk, melyek lehetnek uni- vagy biparentálisak [34,45].

Uniparentális markerek

A mitokondriális DNS-re (mtDNS) és az ivari Y-kromoszómára uniparentális öröklődés jellemző, azaz előbbi csak anyai ágon, míg utóbbi csak apai ágon öröklődik. A rekombináció hiánya miatt így megfelelő tulajdonsággal bírnak, hogy nyomon követhessük a fajspecifikus allélek átadódását a jelölt hibridekbe. A mtDNS polimorf régióit az elmúlt évtizedekben sikeresen alkalmazták közeli rokonságban álló fajok különböző populációi közötti kapcsolatainak feltárására, így kutyák és farkasok esetében is [46].

A mtDNS vizsgálatok egyaránt alkalmasak a minimális mennyiségű és degradált minták vizsgálatához, mivel a mitokondriumok száma a különböző sejttípusokban 100 és 1000 között van, egy mitokondriumban pedig a cirkuláris genom 9-12 kópiaszámban van jelen. A cirkuláris genom és a mitokondriumot körülvevő fehérjeburok további védelmet jelent a környezeti hatásokkal szemben, ezért ahol a nukleáris DNS sérült és vizsgálatra alkalmatlan, ott a mtDNS-ből nagy valószínűséggel még megfelelő mennyiségű és minőségű kópia található [47]. Populáció-, evolúció- és igazságügyi genetikai kutatásokhoz a mtDNS kontroll régiójának (KR)

hipervariábilis régióira (HVI és HVII) helyezik a hangsúlyt, mivel ezen nem kódoló szakaszokra jellemző a nagymértékű polimorfizmus, mely a nukleáris genomhoz képest 10-szer nagyobb mutációs rátával rendelkezik, mint a nukleáris genom [48]. A mutációk fajtái leggyakrabban szubsztitúciós, inszerció/delécio típusúak, de általában egyetlen nukleotid kicserélődésével járó pontmutációk, melyeket fixálódásuk után SNP-nek (Single Nucleotide Polymorphism) nevezünk [49]. A kutyában beltenyésztésük miatt gyakran azonos lokuszokban azonos mutációk figyelhetők meg, emiatt egy haplotípushoz több egyedet lehet hozzárendelni [50], míg farkasoknál diverzebb képet kapunk a mtDNS mutációiról [51].

A mtDNS-hez hasonlóképpen, az Y kromoszómás markereket is öröklődési mechanizmusok felderítésére, fajok meghatározására és egyedek elkülönítésére alkalmazhatják. Az Y kromoszómával az apai ágon öröklődő genetikai állomány öröklődését lehet követni, ezzel kiegészítve az anyai öröklődést monitorozó mtDNS vizsgálatokat [52]. Ez a gonoszóma szinte kifogyhatatlan forrása a polimorfizmusoknak, amit a mtDNS-hez viszonyított nagy mérete magyaráz, továbbá a kromoszóma nagy része nem kódoló régiókból áll és nem rekombinálódik, így kifejezetten alkalmas bizonyos populáció genetikai analízisekhez [52].

Biparentális markerek

Biparentális genetikai markereknek nevezzük azokat a tulajdonságokat, amelyeket mindkét szülő tovább örökít az utódoka. Mendeli öröklődés jellemző rájuk és megtalálhatóak a kódoló és nem kódoló régiókban egyaránt.

Bűnügyi nyomozások során egyik leggyakoribb kérdés az egyed azonosítása, ehhez a helyszínen talált biológiai mintákból (vér, nyál, szőr stb.) határozzák meg az elkövető DNS profilját. Ezen vizsgálatok a mikroszatelliták tipizálásán alapulnak, melyek rövid tandemszerűen ismétlődő egységek (STRs, Short Tandem Repeats). A genomban ezek a régiók 2-6 bázispárnyi (bp) szekvencia ismétlődéséből állnak, és az ismétlődések száma nagyon változatos lehet az egyedek között. Emiatt ezekből a hosszpolimorfizmussal rendelkező, változatos méretű szakaszokból egyedi kombinációjú DNS profilt lehet nyerni. Mivel mindkét szülő tovább örökíti génállományával a rá jellemző mikroszatellita alléleket, nem csak egyedazonosításra, de rokonsági viszonyok feltárására is alkalmasak [53].

Diverzitásuk és megbízható tipizálásuk miatt, gyakran használják ezeket a mikroszatellitákat fajok, alfajok elkülönítésére is. Ito és munkatársai 28 mikroszatellita marker segítségével képesek voltak megkülönböztetni három zebra fajt (*Equus quagga*, *E. grevyi*, *E. zebra*) illetve hibridjeiket a genetikai profilok alléleloszlási gyakoriságainak alapján [54]. Dang és munkatársai az ISAG (International Society for Animal Genetics) által ajánlott 13 STR-t

használták a ló és szamár hibridjeinek azonosítására [55]. Lorenzini és munkatársai [56] sikeresen kifejlesztettek egy módszert a vaddisznók (*Sus scrofa*) és a házi sertések (*S. s. domesticus*), valamint hibridjeik elkülönítésére. Ehhez 20 STR markert használtak és kiegészítették nukleáris SNP vizsgálatokkal is, amiket a NR6A1 és MC1R génekben vizsgáltak. Hazánkban Kemenszky és munkatársai [57] aranysakálók (*Canis aureus*) két populációját (magyarországi, romániai) tudta sikeresen elkülöníteni 22 kutya STR markert használatával. A mikroszatellita vizsgálatokat inzerciós-deléciós (indel) markerekkel kiegészítve a húskészítmények összetételét (pl. házi sertésből vagy vaddisznóból származik) is nyomon lehet követni [58].

Genetikai vizsgálatok a kutyák és farkasok elkülönítésére

A farkasok és kutyák első, filogenetikai irányú analízise már csaknem 25 évvel ezelőtt kezdődött a mitokondriális kontroll régió vizsgálatával [46], amit gyorsan követtek további genetikai tesztek filogeográfiai, igazságügyi és hibridizáció azonosítás, valamint a genetikai diverzitás felmérése céljából [33,59,60,61,62,63,64,65]. Bár a mtDNS csak anyai ágon öröklődik, így egyedüli alkalmazása nem ad teljes képet hibridizációs kérdésekben, a kontroll régió vizsgálata mégis hasznos módszernek bizonyult későbbi kutatásokban világszerte, például Japánban és Európa számos országában is [14,66,67,68]. Az apai öröklődésű Y-kromoszómás markereket 2001-től kezdték el alkalmazni, először Skandináv farkasok haplotipizálására [52], majd kutyáknál is elvégeztek hasonló irányú kutatást, és a kontroll régióval kiegészítve hibridizáció felmérésében is használták [23,69]. Ezt követően a biparentális mikroszatelliták vizsgálatára tértek át a kutatók, melyeket vagy önmagukban [1,22,41], vagy uniparentális markerekkel kiegészítve alkalmaztak [10,70]. A korábbiaknál megbízhatóbb és pontosabb eredményt adó, egymás kiegészítésére használt két markertípus használata manapság is javasolt a kutyák és farkasok közti hibridizáció vizsgálatában [32,34,35,36,45,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86].

Nagyjából egy évtizeddel ezelőtt kezdték el Amerikában a genom szinten, nagyszámban előforduló egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP-k, pontmutációk) tesztelését a kutyák farkastól való házasításának igazolására [87,88]. Ehhez hasonlóan Európában is vizsgálják több százezer SNP előfordulását a farkaspopulációk genetikai diverzitásának felmérésére [89], a csehszlovák farkaskutya genetikai összetételének igazolására [37], a domesztikáció hatására kialakult génmutációk feltárására [90], valamint a farkasok, kutyák és hibridjeik azonosítására [91]. Jiang és munkatársai 12 ún. ősi informatív (ancestral informative) SNP-ből álló panelt

hoztak létre és validáltak a farkasok és kutyák igazságügyi célú megkülönböztetésre [9]. A többi markerhez hasonlóan, a pontmutációkat is beemelik más típusú markerek mellé, a kutatási eredmények pontosítása céljából [92,93].

Szintén egy újabb eszköze a genetikai vizsgálatoknak a génekhez kapcsolódik, melynek során a két taxonban egyaránt megtalálható gének közti különbséget mutatják ki. Az SLC5A1, AMY2B és MGAM gének például a szénhidrát bontáshoz és vércukorszint szabályozásához szükséges fehérjét kódoló szalaszok. A kutyák domesztikációjuk során több szénhidrátdús élelemhez jutottak, mint farkas őseik, így a szénhidrátok lebontásában és felvételében szerepet játszó fehérjéket kódoló génjeik változáson estek át (aktívabban működnek). A domesztikáció kezdete óta történt mutációs változások így segítenek a két taxon elkülönítésében, például az AMY2B gén kópiaszáma a kutyákban a domesztikáció folyamán felsokszorozódott 4-36 másolatra, míg a farkasokban maradt az eredeti 2-8 kópiaszám [94,95].

Rövid deléciós-inzerciós változások (néhány bázispár kiesése, illetve beépülése) egy génen belül is alkalmasak lehetnek a kutyák és farkasok, illetve hibridjeik azonosítására [93]. Egy három bázispáros deléció kiesése a β -defensin CBD103 génben – ami a bunda színének kialakításáért felel – alkalmas lehet a farkasok és kutyák elkülönítésére [72,86]. A funkcionális deléció szokatlanul sötét, akár fekete bundaszínt alakít ki. Mivel a farkasokra nem jellemző a közel fekete bundaszín, emiatt az ilyen bundájú egyedek nagy valószínűséggel hibridek. A KITLG génben (KIT ligand gene) találtak egy öt bázispáros deléciót, mely gén szintén a bunda/bőr színének kialakításáért (melanogenezis) felel a kutya-félekben, és a deléció alkalmas lehet a kutya-farkas elkülönítésére. A KITLG másik tulajdonsága – amit szintén a két taxon megkülönböztetésére lehet használni –, hogy a kutyákban ez a gén is nagyobb kópiaszámban fordul elő, mint a farkasokban [84,92,96].

Igazságügyi vadvilág genetika

A vadon élő állatok igazságügyi vizsgálata számos tudományág – pl. genetika, morfológia, kémia, patológia, állatorvosi tudományok – alkalmazása az állati eredetű nyomot, mint bizonyítékot tartalmazó jogsértésekben, úgymint az illegális kereskedelem, orvvadászat, embereket érintő bűncselekmények stb. A genetikai vizsgálatokat már régóta alkalmazzák bűnügyi esetek megoldására humán területen sikeresen, és bár a humán és nem-humán alkalmazás kérdésfelvetése más – előbbinél legtöbbször a kérdés, hogy ki volt az elkövető, áldozat stb., míg utóbbinál, hogy történt-e egyáltalán bűncselekmény – az alkalmazott eszközök hasonlóak. Az igazságügyi genetika széleskörű alkalmazásai között a taxonómiai azonosítás az

egyik leggyakoribb kihívás. A vadvilágot érintő bűncselekmények elleni harc során szükséges a védett fajok, illetve azok származékainak azonosítása (pl. orvvadászat, mérgezéses esetek, illegális tartás és kereskedelem), fogyasztóvédelmi és élelmiszerbiztonsági szempontból a termék összetételének meghatározása, állattámadás és gazdasági károkozás esetén pedig az elkövető állat faji (olykor alfaj, fajta) azonosítása szükséges.

A konzervációbiológia már régóta használ genetikai markereket különböző állatfajoknál, köztük a farkasoknál is a populáció diverzitásának, illetve az egyedek megkülönböztetése céljából. Ezek a módszerek, bár jó alapot nyújtanak, nem minden esetben felelnek meg a törvényszéki genetikai alkalmazás kritériumainak. Ezért adott fajra és adott populációra az igazságügyi felhasználás igényeinek megfelelően validált markerkészlet tesztelése, illetve fejlesztése indokolt [97]. A hatósági felhasználás követelményeit a jogszabályokon kívül nemzetközi standardok és szakmai ajánlások határozzák meg [98]. Így javasolják mikroszatelliták esetén a tetra-, ill. pentamer ismétlődésű szerkezetet (a megbízhatóbb genotipizálás miatt), és az átfogó validálást az alkalmazott módszerek, markerek érzékenységre, specificitására, reprodukálhatóságára és megbízhatóságára vonatkozóan, valamint a vizsgálható mintatípusok vonatkozásában.

Mindamellet, hogy számos vadon élő állat genetikai vizsgálata Magyarországon is megkezdődött, az igazságügyi célú, a hazai és nemzetközi jogviták rendezésére szolgáló vizsgálómódszerek csupán részben állnak a hatóságok, illetve a jogi- vagy természetes személyek rendelkezésére [99,100,101,102]. A hazai vadállománnyal kapcsolatos adatokkal külföldi források nemigen rendelkeznek, az igazságügyi szempontrendszernek megfelelő genetikai markerek pedig számos Magyarországon élő fajra nézve kidolgozatlanok.

Farkasok érintettsége törvényszéki esetekben

Állattámadás és gazdasági károkozás

Az ember terjeszkedésével és az egyre nagyobb területeken történő osztozkodással mind a farkasok, mind az emberek megtapasztalják a szomszédság hátrányait. A farkas közeli jelenléte a háztáji állatállományra és a tenyésztett nagytestű haszonállatokra is negatív hatással lehet [13,75]. Főleg igaz ez azon területekre, ahol még gyakorolják a hagyományos állatlegeltetést/állattartást. Az ember és a vadak közötti konfliktus szempontjából a farkasokat tekintik a „legproblémásabb” állatoknak, mivel pusztítják az állatállományokat, főként a gyakran felügyelet nélkül hagyottakat [103]. Emellett azon területeken, ahol a farkasok hosszú távollét után kezdenek visszatérni, félelem támad az emberekben a lehetséges farkastámadások

miatt [104]. Az elmúlt évtizedekben, a farkasok rekolonizációs tevékenysége miatt, Európában egyre több helyen lehet találkozni velük, mint más nagyragadozókkal. Ennek következménye, hogy a farkastámadások médiában való megjelenése többszöröse lehet más nagyragadozókhöz képest, és gyakran a farkasokat teszik felelőssé a nagyobb károkért, még akkor is, ha az objektív elemzés mást bizonyít [105,106]. Lengyelországban, 2018-ban, két esetet jegyeztek fel, öt ember elleni farkas támadásokról. Nowak és munkatársai írják le esettanulmányukban a támadások körülményeit és előzményeit. A támadások falvakban, falvak és erdők határán történtek, amiket fiatal farkasok követtek el. A támadások előtt sokszor látták a falvak közelében vagy a falvak utcáin járni a farkasokat, ezzel igazolva a feltételezést, hogy a fiatal példányok nem féltek az emberek közelébe menni. Általában a farkasok elkerülik az embert és a településeket, mert félnek az emberektől, nem megszokott számukra az ember közelsége. Ezzel szemben az újabb farkas generációk, akik már falvak melletti falkákba születtek, hamar hozzászoknak az ember jelenlétéhez, bemerészkednek a településekre, és nem csak a haszonállatokat, de a lakosokat is megtámadják [107].

Állattámadás és gazdasági károkozás esetén a felelősnek feltételezett kutyatartók megkísérelhetik elkerülni a jogi lépéseket azzal az állítással, hogy az elkövető fajt farkasként nevezik meg, megkerülve így az emberi mulasztás miatt történő felelősségre vonást. Caniglia és munkatársai több olyan esetről is beszámolnak Olaszországban, ahol háziállatokat, illetve embert farkasnak feltételezett állat támadott meg [75,76]. A taxonómiai azonosításhoz polimorf molekuláris genetikai markereket alkalmaztak, és a DNS tipizálás eredményeként bizonyossággal kijelenthették, hogy a támadó állat nem minden esetben farkas volt, még csak nem is hibrid, hanem egy őrzőkutya. Az eredmények tükrében ezután a támadást szenvedett sértett is alátámasztotta a vizsgálatok megállapítását, elmondása szerint csak a kutyát akarta védeni, hogy ne altassák el az agresszív viselkedése miatt. Schley és munkatársai munkájukban a közel 40 év után Luxemburgba visszatérő farkasok jelenlétét bizonyítják. Bizonyítékul a megtámadott haszonállatok tetemeiből vett nyálminták és a tetemek közelében talált egyéb genetikai nyomok szolgáltak [108]. Meg kell említeni azt is, hogy a mai, urbanizálódó világban, egyre kisebb jelentőséget tulajdonítanak a földműveléssel, állattenyésztéssel foglalkozó vidéki területeknek, ezért a helyi gazdák beszámolóit az ember-farkas konfliktusról, hogy felkeltsék magukra a figyelmet, akár túlzóak is lehetnek [104].

Orvvadászat és illegális kereskedelem

A vadonélő állatokkal kapcsolatos bűncselekmények hatóköre széles és számos olyan illegális aktivitást foglal magába, mint az emlősök, madarak és hüllők illegális vadászata [109,110,111], valamint az állati származékok felhasználása a tradicionális orvoslásban [112]. Az Interpol felmérései szerint a vadvilágot súlytó illegális tevékenységek a második legnagyobb hasznot hozó bűncselekmények a kábítószer- és fegyverkereskedelem után [113]. A vadvilág illegális kereskedelméből származó hasznot évi húsz milliárd dollárra becsülik [113,114]. A hasonló aktivitások a relatív alacsony büntetések és potenciálisan nagy haszon miatt maradhatnak fenn [115]. Bár a farkas is védett faj, világszinten mégis gyakran előfordul orvvadászata, illetve a termékeivel történő kereskedelem [76]. Ilyen bűncselekmények gyanúja esetén az érintettek azzal az állítással próbálhatják meg elkerülni a jogi lépéseket, hogy az érintett állatokat kutyaként nevezik meg.

A fent bemutatott esetekre való hatékony reagáláshoz a bűnüldöző szerveknek az adott területen élő kutya- és farkaspopulációk genetikai adatbázisára, valamint megbízható és robusztus módszerekre van szüksége a megkülönböztetéshez.

A magyar farkasállománnyal kapcsolatos esetek

A farkas hazánkban is őshonos nagyragadozó, legjellemzőbb hazai előfordulási területe az Északi-középhegység, de az Alföldön és a Dunántúl területén is felbukkannak. A hazai állományt leginkább az illegális elejtések és a kóbor kutyák betegségei veszélyeztetik. Mivel a farkas fokozottan védett [116] és kiemelt közösségi jelentőségű faj [117], engedély nélküli elejtése bűncselekmény. A kóbor kutya viszont az egyik legtöbb gondot okozó állat a vadászterületen, így dúvadnak minősül. „A vadász a vadállomány védelme érdekében elfoghatja vagy elejtheti a vadat űző vagy a vadat elejtő kutyát... ha a vad sérelme másként nem hárítható el... valamint akár meg is ölheti fertőzés továbbterjedése... vagy másként el nem hárítható támadás megakadályozása céljából a kutyát (vagy a macskát).” Továbbá „...ha az állat tulajdonosának felderítésére nincs közvetlen lehetőség.” (1996. évi LV. törvény a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról; 37.§ 4. bekezdés) [118]. Mivel a vadász kizárólag a morfológia alapján ítéli meg az adott egyed taxonómiai besorolását, már Magyarországon is több esetben szükségessé vált a kilőtt állat genetikai vizsgálatokkal történő azonosítása.

Célkitűzés

Magyarországon már több, mint egy évtizede igazolt az állandó farkaspopuláció, ezért hazánkban is előfordulhatnak olyan esetek, melyek világszerte konfliktusokhoz vezetnek farkasok és emberek, illetve háziállataink között.

Mivel jelenleg nem áll rendelkezésre hazánkban olyan, a nemzetközi ajánlásoknak is megfelelő marker- és vizsgálati rendszer, amely lehetővé tenné a két taxon, illetve hibridjeik hiteles azonosítását, munkánk célja ezen módszertani tesztelések megkezdése volt.

Ehhez olyan bi- és uniparentális (auto- és Y-kromoszómás, valamint mitokondriális) markerek (SNP-k és mikroszatelliták) tesztelését terveztük a magyar, illetve szomszédos országokból gyűjtött farkas- illetve kutyamintákon, melyeket a szakirodalom alapján a leggyakrabban használnak, akár bűnügyi esetekben is.

Különböző minőségű biológiai mintákon terveztük felmérni a genetikai markerek alkalmasságát, főleg az érzékenység és reprodukálhatóság tekintetében.

További célunk volt megkezdeni egy olyan genetikai adatbázis felállítását farkasokban és kutyákban, melyek jó alapul szolgálhatnak a későbbi összehasonlító vizsgálatok során.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés

A vizsgálatokhoz szükséges biológiai mintákat hazai, túlnyomórészt fogságban (állatkertek, vadasparkok, farkastenyésztők) tartott farkasokból, kutya-ból, illetve kutya-farkas hibridekből vettük, nem invazív módon, az állattartók beleegyezésével. Az Állatorvostudományi Egyetem mellett több intézmény is, mint a Magyar Természettudományi Múzeum, az Európa Vadvilágának Megmentéséért Alapítvány és a Bécsi Állatorvostudományi Egyetem biztosította számunkra a mintavételt, illetve küldött nekünk mintákat. Összesen így 35 farkas és 35 kutya mintán kezdtük meg a vizsgálatokat (1. táblázat).

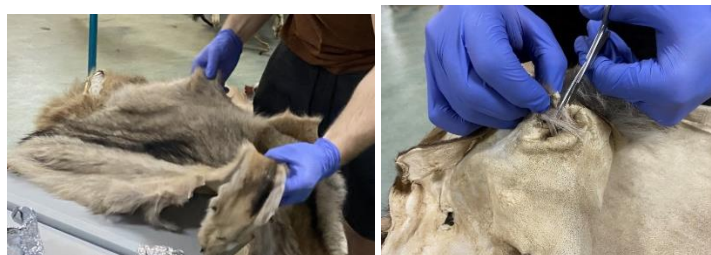


2. Ábra Kifutó a Miskolci Állatkert farkasai számára (a); szőrszálak (b) és ürülék minta (c) a helyszínen

A Gödöllőn tartott farkasoktól sikerült közvetlenül szőrmintát vennünk, Horkai Zoltán, Európa Vadvilágának Megmentéséért Alapítvány vezetőjének segítségével (<https://horkai.com/hu/>). A többi szőrmintát az állatok környezetéből, fakéregre, földről és ketregrácsról gyűjtöttük be (2. ábra). A szőroket szobahőmérsékleten, száraz környezetben szállítottuk és tároltuk a további felhasználásig. Az ürülékek gyűjtésénél figyelembe vettük azok frissességét és állagát, gyűjtés után fagyasztva (-20°C) szállítottuk, illetve tároltuk.

A Magyar Természettudományi Múzeum engedélyezte számunkra a kikészített farkasbőrökből történő roncsolásos mintavételt. Ebben az esetben arra is figyelniünk kellett, hogy a mintavétel során ne okozzunk feltűnően látható kárt a kiállítási tárgyban. Igyekeztünk a

bőrökből olyan területeket kivágni, amik viszonylag védve maradtak, így esetleg használható minőségű és mennyiségű örökítőanyagot tartalmaznak (3. ábra).



3. Ábra Mintavétel a Magyar Természettudományi Múzeum által biztosított farkasbőrökből.

Elővizsgálatok, DNS izolálás és kvantifikálás

Szörminták esetén trinokuláris fénymikroszkóppal ellenőriztük, hogy azok tartalmaznak-e elegendő mennyiségű gyökérhüvelyi sejtet, azaz, hogy alkalmasak-e nukleáris DNS vizsgálatra. Majd a szörhagymák gyökér részének kb. 0,5-1 cm hosszú részét steril olló és csipesz segítségével 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe vágtuk be. A DNS kivonásához a QIAamp® DNA Mini Kit-et használtuk a gyártó által írt protokoll szerint.

A fagyott bélsár minták felszínéről steril szikével lekapargattunk kb. 20-25 mg-ot, melyet 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe helyeztünk. A QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit-et alkalmaztunk a DNS kinyeréséhez, melyet a gyártó által készített protokoll alapján végeztünk el. A szájnyálka-hártya törletből a DNS kivonásához a QIAamp® DNeasy Blood and Tissue Kit-et alkalmaztunk és a gyártó által ajánlott protokoll szerint jártunk el.

A Magyar Természettudományi Múzeumból kapott kikészített, szőrös bőrmintákat 2 ml-es mikrocentrifuga csövekbe vágtuk be, majd azokat többször 70%-os etanollal, illetve steril bideszt vízzel mostuk, hogy csökkentsük a kontaminációt. A FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit segítségével izoláltuk a DNS-t a gyártó útmutatásai szerint.

A DNS tisztítás sikerességét minden esetben agarózgél elektroforézissel (minőségi és szemikvantitatív meghatározás) ellenőriztük le. Ehhez 1,5%-os agaróz gélt öntöttünk, amely interkaláló DNS-festéket (GR Safe) tartalmazott. Mintánként 5 µl-t vittünk fel a gél egy-egy zsebébe és 40 perc futási idő elteltével kék fénnel történő detektálás során digitális felvételeket készítettünk. Az érzékeny és pontos mennyiségi meghatározás érdekében Qubit fluorométerrel (dsDNA High Sensitivity Kit) is kvantáltuk a tisztított DNS-t, ebben az esetben is 5 µl-t használtunk mintánként a méréshez.

1. Táblázat: A genetikai vizsgálatokhoz használt farkas és kutyaminták típusa, származási helye és taxonómiai besorolása. Rövidítések; VUW: Vet. Med. Universitt Wien, MTM: Magyar Természettudományi Múzeum, TE: Állatorvostudományi Egyetem, EVMA: Európa Vadvilágának Megmentéséért Alapítvány, Bkeszi VP: Budakeszi Vadaspark, Miskolci K: Miskolci llatkert és Kultúrpark, felt.: feltételezett f.: farkas

FARKAS				KUTYA			
Minta kód	Minta típus	Származási hely	Alfaj	Minta-kód	Minta típus	Szárm. hely	Fajta
W1	szőr	EVMA	európai f.	D1	nyál	TE	Csehszlovák farkaskutya
W2	szőr	EVMA	európai f.	D2	DNS	TE	Berni pásztorkutya
W3	szőr	EVMA	európai f.	D3	DNS	TE	Bordeaux-i dog
W4	szőr	EVMA	felt. hibrid	D4	DNS	TE	Golden retriever
W5	szőr	EVMA	felt. hibrid	D5	DNS	TE	Rövidsz. német vizsla
W6	szőr	EVMA	felt. hibrid	D6	DNS	TE	Kaukázusi juhászkutya
W7	szőr	EVMA	felt. hibrid	D7	DNS	TE	Am. staffordshire terrier
W8	szőr	EVMA	felt. hibrid	D8	DNS	TE	Szibériai husky
W9	szőr	EVMA	felt. hibrid	D9	DNS	TE	Dobermann
W10	szőr	EVMA	felt. hibrid	D10	DNS	TE	Puli
W11	szőr	EVMA	felt. hibrid	D11	DNS	TE	Óangol juhászkutya
W12	bőr	EVMA	felt. hibrid	D12	DNS	TE	Nápolyi masztiff
W13	bőr	EVMA	felt. hibrid	D13	DNS	TE	Komondor
W14	bőr	EVMA	felt. hibrid	D14	DNS	TE	Német dog
W15	bőr	EVMA	felt. hibrid	D15	DNS	TE	Labrador retriever
W16	szőr	EVMA	felt. hibrid	D16	DNS	TE	Berni pásztorkutya
W17	bélsár	Bkeszi VP	európai f.	D17	DNS	TE	Mudi
W18	bélsár	Bkeszi VP	európai f.	D18	DNS	TE	Rövidsz. német vizsla
W19	szőr	Bkeszi VP	európai f.	D19	DNS	TE	Ír szetter
W20	bélsár	Miskolci K	európai f.	D20	DNS	TE	Brie-i juhászkutya
W21	bélsár	Miskolci K	európai f.	D21	DNS	TE	Weimari vizsla
W22	bélsár	Miskolci K	európai f.	D22	DNS	TE	Német dog
W23	bélsár	Miskolci K	európai f.	D23	DNS	TE	Sarplaninai juhászkutya
W24	bélsár	Miskolci K	európai f.	D24	DNS	TE	Magyar agár
W25	bőr	MTM	európai f.	D25	DNS	TE	Hovawart
W26	bőr	MTM	európai f.	D26	DNS	TE	Leonbergi
W27	bőr	MTM	európai f.	D27	DNS	TE	Moszkvai őrkutya
W28	bőr	MTM.	európai f.	D28	DNS	TE	Hannoveri véreb
W29	szőr	Nógrád megye	európai f.	D29	DNS	TE	Szibériai husky
W30	DNS	VUW	európai f.	D30	DNS	TE	Szamojéd
W31	DNS	VUW	olasz f.	D31	DNS	TE	Csau csau
W32	DNS	VUW	olasz f.	D32	DNS	TE	Kuvasz
W33	DNS	VUW	európai f.	D33	DNS	TE	Kaukázusi juhászkutya
W34	DNS	VUW	európai f.	D34	DNS	TE	Csau csau
W35	DNS	VUW	olasz f.	D35	DNS	TE	Fox terrier

A minták további vizsgálatát az Állatorvostudományi Egyetem Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézetének Genetikai laboratóriumában végeztük.

DNS markerek PCR amplifikálása, detektálása és kiértékelése

Terepről gyűjtött minták előzetes tesztelése

A terepről gyűjtött minták (n=10, W20-29) esetén, ahol nem tudni, hogy azok melyik fajhoz, egyedhez, illetve milyen ivarú állathoz tartoznak, egy előzetes genetikai tesztelést alkalmaztunk a kérdések megválaszolására. A hiperpolimorf, kutyafélékre specifikus, ill. az egyedek megkülönböztetésére is alkalmas WILMS-TF mikroszatellita markert [119] és az ivar detektálásra megfelelő SRY markert amplifikáltuk duplex PCR reakcióban a leírt protokoll alapján [120].

Mitokondriális kontroll régió vizsgálatok

A mitokondriális DNS vizsgálatokat 18 farkas (az adatok alapján eltérő anyai leszármazási vonalak) és 15 kutya mintán végeztük el. Mivel a legtöbb pontmutáció (SNP) a mitokondriális kontroll régió (KR) első hipervariábilis részén (HVI; 15458–16130 bázis pozíciók között) található, ezt a szakaszt sokszorosítottuk fel polimeráz láncreakcióval az F15406 és R16147 primerek segítségével (a számok a bekötési bázispozíciót jelölik) [118]. Erősen sérült, rossz minőségű és alacsony kópiaszámú mintáknál ezt a régiót (672 bp) felosztottuk két rövidebb, egymást átfedő szakaszra HVI/1 (393bp) és HVI/2 (462 bp) és két reakcióban sokszorosítottuk a F15406-R15799 primereket a F15685-R16147 primer párokkal [121].

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

A kontroll régió HVI szakaszának bázissorrend meghatározását a mórachalmi Seqomics Biotechnológiai Kft. végezte. Az eredmények elemzéséhez a kapott szekvencia adatokat a Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corp) programmal értékeltük ki és a következő paramétereket állapítottuk meg: a referencia szekvenciához (Acc. Number: NC_002008) viszonyított megfigyelt összes polimorf nukleotid pozíció és a populációban megfigyelt összes eltérő haplotípus.

Biparentális mikroszatellita vizsgálatok

A biparentális vizsgálatokhoz az igazságügyi felhasználásra is alkalmas StockMarks™ for Dogs Genotyping Kit (Thermo Fisher) segítségével kilenc tetramer és egy trimer szerkezetű mikroszatellitát sokszorosítottunk fel a farkasmintákon – követve a vizsgálati protokoll előírásait –, kutyákból ezek a genotípus adatok rendelkezésre álltak [122]. Annak érdekében, hogy minél több alléleloszlási adat álljon rendelkezésünkre a két taxon elválasztásához, további négy polimorf, tetra- illetve pentamer szerkezetű STR lokusz (PEZ21, PEZ16, REN124, WILMS-TF) vizsgálatával egészítettük ki a markerkészletünket. Az amplifikálási reakciókat és PCR programokat a leírt módszer alapján állítottuk be [120].

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

Y-kromoszómás STR vizsgálatok

Az ismert, illetve az előzetes tesztelések (WILMS-TF/SRY) eredményei alapján meghatározott, hím ivarú állatoktól származó mintákon négy (MS34A, MS34B, MS41A és MS41B) dimer szerkezetű, számos nemzetközi kutatásban alkalmazott Y-kromoszómás mikroszatellita tesztelését is elvégeztük. Több, különböző PCR protokoll kipróbálása után az Aghbolaghi és munkatársai [36] által kifejlesztett programot alkalmaztuk kutya és farkas DNS mintákon (összesen n=22).

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

Genetikai adatbázisok kialakítása és statisztikai analízis

Mitokondriális kontroll régió

Farkas adatbázisunkat összesen 18 saját vizsgálatból származó, anyai leszármazás szempontjából független egyed (W1-5, W7, W12, W17, W20, W25, W27-35) szekvenciájából, illetve 14 darab GenBank-ból letöltött, Európából származó farkas szekvenciából állítottuk össze (Acc. No.: KF661042, KF661053, JN182087, JN182046, KY550005, JN182060, JN182074, KU644666, KU644669, KU696391, DQ480504, KP665915, KP665919, KP665921). Mitokondriális kutya haplotípus adatbázisunk 15 db saját vizsgálatból származó szekvenciából és 16 db letöltött, közepes-nagyméretű fajtákból nyert szekvenciákból állt (GenBank Acc. No.: KP665906-KP665912, KP665916-KP665918, KP665920, KP665923, KP665930, KP665932, KP665934, KP665935).

A minták SNP mutációin alapuló összehasonlítását, illetve csoportosítást a PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) programmal [123] végeztük. A PopART számos filogenetikai hálózat készítő módszert tartalmaz (pl. Median joining network, Minimum spanning network), melyek segítségével a vizsgált szekvenciák alapján genetikai kapcsolatokat lehet ábrázolni. Az adatok analíziséhez a Minimum spanning network módszert alkalmaztunk.

Mikroszatellita elemzések

Egy, már meglévő kutya adatbázisból választottunk ki DNS profilokat olyan fajtájú kutyáktól (n=35), melyek méretükből és életkörülményükből adódóan képesek lehetnek farkasokkal kereszteződni. A kutya profilokat a Structure 2.3.4 program [124] alkalmazásával hasonlítottuk össze az általunk eredményes genotípust adó, egymással közeli rokonságban nem álló farkasok (n=15) profiljaival. A Structure a mikroszatellitákból készített profilokat hasonlítja össze és a bayesi csoport analízissel egy csoportba rendeli a hasonló genotípusú egyedeket, így elkülönítve egymástól a taxonokat. A programban az elemzéshez az admixture és a független allél frekvencia (Admixture model, Allele frequency independent model) modelleket használtuk. A Structure-t 10^4 Burn-in periódussal és 10^5 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) iterációval futtattuk, minden K=1-10-re ötször. Az elemzés után az eredmények közül a megfelelő K értéket a Structure Harvester v0.6.94 [125] webes szoftverrel választottuk ki.

Eredmények

Mikroszkópos vizsgálatok és DNS izolálás eredménye

A begyűjtött szőrszálak többsége megfelelt a nukleáris DNS vizsgálatokhoz szükséges elvárásoknak, a kevesebb gyökérhüvelyi sejtet tartalmazó mintáknál a bevágott szőrszálak számának emelésével növeltük meg a kinyerhető genetikai anyag mennyiségét. A 29 begyűjtött farkas minta közül 25-ből (szőr, bélsár, cserzett bőr) sikerült használható genetikai anyagot kinyerni.

DNS markerek PCR amplifikálása és kimutatása

Kétmarkeres előtesztelések eredménye

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

Mitokondriális vizsgálatok eredménye

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

Biparentális mikroszatellita vizsgálatok eredménye

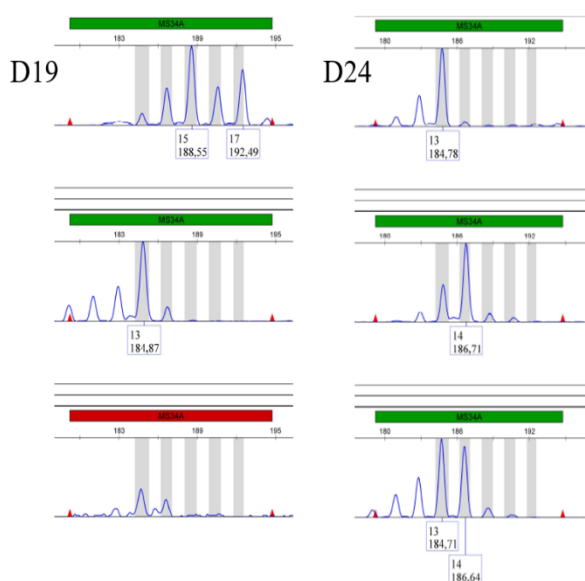
A farkas mintáink egy részénél (W17, W19-20, W22-29) a sejtmagi génállomány annyira sérült volt, hogy a nukleáris markerekkel nem tudtunk genetikai profilt megállapítani. Az összesen rendelkezésre álló 35 farkas mintából 24-nél tudtunk kinyerni teljes, vagy részleges, de még használható genetikai profilt.

Y-kromoszómás mikroszatellita vizsgálatok eredménye

Az MSY markerekkel megvizsgált hím ivarú farkas és kutya minták több, mint felénél (n=14) sikerült csak teljes, értékelhető profilt alkotni. nyolc minta esetén részleges, illetve bizonytalan eredményeket kaptunk – több lehetséges allél egy lokuszon, ill. az ismételt vizsgálatok eredményei más-más alléltípust adtak (2. táblázat, 4. ábra).

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

Minta	MS34A	MS34B	MS41A	MS41B
D2	12	-	-	30
D3	13	18	-	30
D4	13	-	-	30
D7	17	15	17	32
D9	13	15/17	-	30
D14	14	17	17	27
D17	13	15	-	30
D18	13	14/15	-	30
D19	13/15/17	17	17	23
D22	13	-	-	30
D24	13/14	16	17	31
D27	14	17	17	28
D28	14	18	17	30
D33	14	17	17	28
D35	17	15	17	33
W1	14	16	17	24
W2	13	18	17	24
W4	13	17	17	24
W7	13	17	17	30
W16	13	18	17	26
W18	13	18	17	24
W23	13	15	17	17



4. Ábra Jobb oldalon két kutyaminta (D19 és D24) MS34A lokuszon kimutatott alléljeinek kapilláris elektroferogram eredménye látható háromszori PCR sokszorozás után (mintánként egymás alatt, 3-3 sorban), ambivalens eredményekkel.

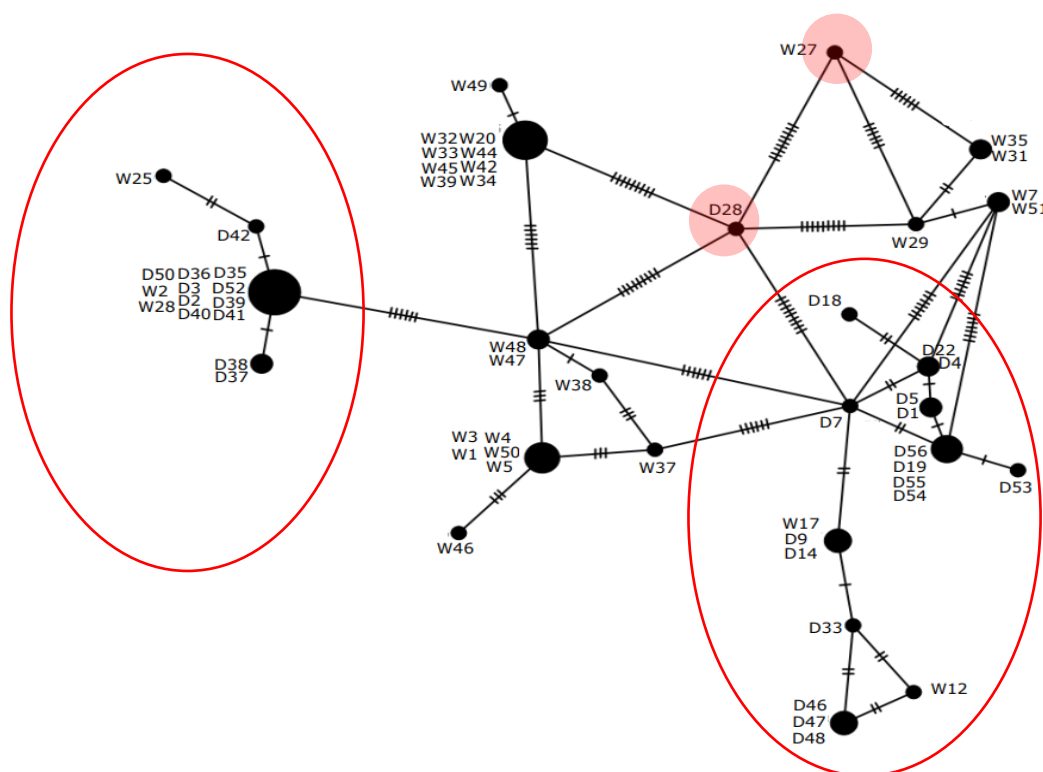
A vizsgálatok során kapott eredmények bizonytalansága, illetve csekély polimorfizmus (MS41A lokusz) miatt a tesztelést nem végeztük el minden rendelkezésre álló hím ivarú kutya, illetve farkas mintán és a statisztikai elemzésbe sem vettük bele az Y-kromoszómás alléleket.

Vizsgálataink folytatásához a begyűjtött minták közül tizenhármát ki kellett vennünk a statisztikai értékelésből, mert közeli rokoni kapcsolatban álltak egymással (W6, W8, W9, W10, W11, W13, W14, W15), vagy nem tudunk használható genetikai anyagot kinyerni a teljes vizsgálathoz belőlük (W19, W23, W24, W26), vagy az elővizsgálatok eredményei alapján más mintákkal azonosnak bizonyultak – egy állattól lett begyűjtve a két minta (W22, W24). Ezen felül a W20-21 és W17-18 minták szintén azonos egyedektől származnak, ezek közül csak az egyik mintát vontuk be a további vizsgálatokba.

Statisztikai elemzések eredménye

Mitokondriális haplotípusok csoportosítása

A kimutatott szekvenciális különbségek (pontmutációk) alapján a PopART program segítségével gráffal vizualizáltuk a kapcsolatokat és azok erősségét a minták között (5. ábra). A gráf pontjainak mérete annál nagyobb, minél több mintát sorol hozzá a program. Az élek a hasonló szekvenciájú mintákat kötik össze, amiken a kereszt vonalak száma jelöli a pontmutációk számát a két szekvencia között.

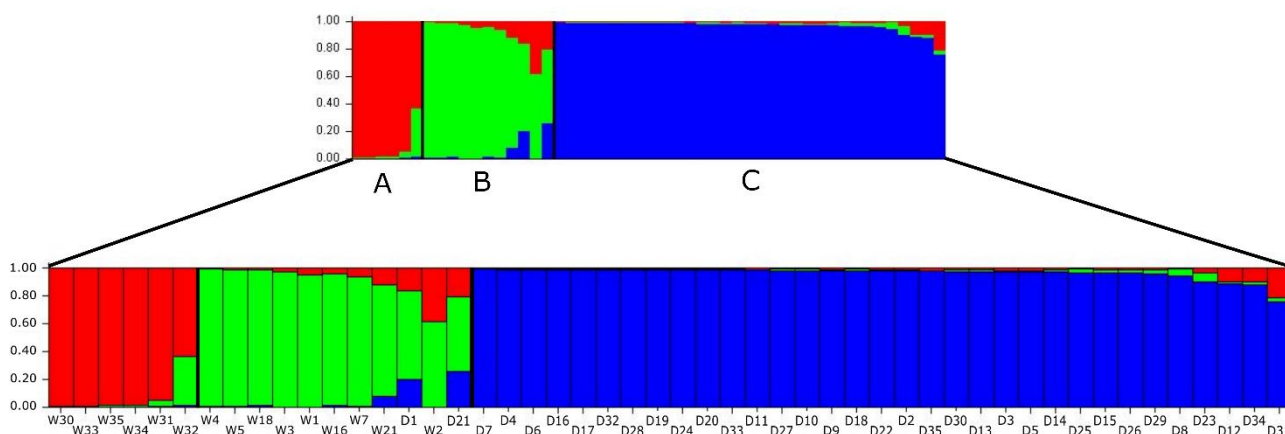


5. Ábra Farkas- (W) és kutyaminták (D) csoportosítása, illetve hálózatos elrendezése a mitokondriális kontroll régió HVI szakaszán kimutatott szekvenciális hasonlóságok és pontmutációs különbségek alapján PopArt programmal.

A kutya mintákat többnyire két nagyobb halmazba (pirossal bekarikázva) osztotta a program, mely halmazon belül az 1-2 pontmutációs különbségek vannak feltüntetve. Ezzel szemben a farkasokat jobban szétszórta és gyakoribb a farkas szekvenciák között a kettőnél több pontmutációs eltérés. Öt farkas mintát osztott be a program valamely kutya csoportba (W2, W17, W28), illetve kapcsolt kutya mintákhoz a nagyfokú hasonlóság miatt (W12, W25). A rendkívül sok eltérés miatt a program egy kutya és egy farkas mintát (D28 és W27, halvány pirossal kiemelve) elkülönített a farkasoktól és kutyáktól (9, ill. 6-9 báziskülönbség).

Mikroszatellita allélek eloszlása Structure analízissel

A kutyák és farkasok csoportosításában az optimális csoportszám (K, klaszter) a K=3 bizonyult, ahol az adatok valószínűségének természetes alapú logaritmus $\ln P(D) = -2488.8$ volt. A három klaszter egy kutya és két farkas (Ausztriából kapott, illetve a hazai farkas minták) csoportból áll (6. ábra).



6. Ábra 14 STR marker alapján készített barplot (K=3) a Structure programmal. A (piros): VUW farkas minták, B (zöld): hazai farkas minták, C (kék): hazai kutya minták. Minden oszlop egy egyedet jelöl.

A klaszterek jól elkülönülnek egymástól, csak a két farkas csoport között van kismértékű átfedés két egyedben (W2, W32), melyek 40%-ban egyeztek meg a másik farkas klaszter genetikai profiljaival. Az elemzésbe beemelt feltételezett hibrideket (W1-5, W7, W16) a farkasok közé sorolta a program. A hazai farkas minták közül a W21-es minta hasonlít leginkább a kutyákhoz, de ez is mindössze 15%-ban. Ezzel szemben két kutyát is a hazai farkas csoportba sorolt, az egyik a Csehszlovák farkaskutya (D1), ami legalább 60%-ban megegyezik a hazai farkas mintákkal. A másik, farkasokhoz sorolt kutya egy weimári vizsla (D21), ami csaknem 60%-ban megegyezik a hazai farkas klaszterrel a kimutatott genetikai profilja alapján. A kutya csoporton belüli minták egymással nagyfokú egyezést mutatnak, csupán egyetlen egyednél tapasztaltunk 80%-nál kisebb hasonlóságot (D31, csau csau).

Diszkusszió

Az elmúlt két évtizedben Európában és világszinten is egyre jobban elterjedt a genetikai módszerek alkalmazása a hibridek detektálására és a fajok elkülönítésére [23,66,41]. Az eddigi módszerek fejlődésével és új technikák megjelenésével egyre megbízhatóbb eredményeket

sikerül felmutatni a hibridizáció és a farkas-kutya elkülönítés terén [9,93]. Európában eddig Spanyolországban, Olaszországban, a Skandináv és a kelet európai térségben foglalkoztak a farkasok elterjedésével és kutyákkal történő kereszteződésükkel [22,52,64,72]. A farkas állományok genetikai vizsgálata Európa más térségeiben, így hazánkban is korán megkezdődött [14]. Magyarország már 2010 óta rendelkezik egy kis létszámú, de növekvő farkas populációval [13], ezért minket is érint a faj védelme és a farkas-ember konfliktusok megelőzése, megoldása. Eddigi tapasztalatok alapján, ahol az emberi településekhez közeli farkaspopuláció növekszik, ott előbb-utóbb megjelenhet a haszonállatok megtizedelése [75,126,128], az emberek elleni vélt vagy valós támadások bejelentése [76,127] valamint a farkasok illegális vadászata és termékeikkel való kereskedelem [9,77]. Az ilyen igazságügyi esetek háttérének felderítéséhez általában különböző típusú molekuláris genetikai markereket, illetve ezek analíziseinek ötvözetét használják [9,60,75,76,77].

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

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

Az autoszómás mikroszatellita alléleloszlások alapján – más, hasonló számú STR lokuszt vizsgáló kutatásokhoz hasonlóan [1,41,70,85] – az alkalmazott statisztikai program egyértelműen el tudta különíteni a farkasokat a kutyáktól (7.ábra). A Csehszlovák farkaskutya (D1) farkasokhoz sorolása várható volt, mivel ezt a fajtát az '50-es években tenyésztették ki, így bőven tartalmazhat farkasokra jellemző allélokat [37]. Meglepőnek tűnhet viszont a weimári vizsla (W21) farkasokhoz csoportosítása, de a profilt alkotó allélek alapján nem kizárt, hogy valamelyik felmenője kereszteződhetett a múltban farkassal, ugyanis a fajtát eredetileg vadászathoz tenyésztették ki a 19. században [129], azaz volt alkalom introgresszióra. Mivel ezen a mintán nem végeztünk mitokondriális DNS vizsgálatot, így nem jelenthetjük ki biztosan a hibridizációt, csupán feltételezhetjük.

A mitokondriális kontroll régió HVI részének szekvencia eredményei azt mutatják, hogy csupán ezzel a módszerrel a kutyákat nem lehet minden esetben elkülöníteni a farkasoktól (6. ábra), amint ez a korábbi kutatások alapján várható volt [32, 33, 34]. A magyarországi kutyák mtDNS szekvenciái kevésbé diverznek bizonyultak – így kevésbé válnak el az agglomerátumokon belül egymástól – a farkasokhoz képest, amint ezt más kutatások is alátámasztják [45, 50, 51, 65]. Azon feltételezett hibridek közül – amiket az STR vizsgálatokba

is bevettünk (W1-5, W7) és a Structure farkasnak jelölt – csupán a W2 került a kutyákkal egy csoportba. Mitokondriális szekvencia alapján továbbá a W12, W17, W25, W28 minták kerültek a kutyákkal közös csoportba, ami azt mutatja – amennyiben a hibridizációs esemény kizárható –, hogy a mitokondriális HVI régió vizsgálata önmagában nem elegendő a megbízható eredményekhez [35].

Az apai ágon uniparentális MSY markereket végül nem vettük bele az STR alapú statisztikai vizsgálatokba, mert nem bizonyultak megfelelőnek az általunk kitűzött célokhoz, úgymint a vizsgált lokusz polimorfizmus foka, az eredmények megbízhatósága, illetve reprodukálhatósága. Ez egyrészt a dimer szerkezetű struktúrájuknak köszönhető (kevésbé megbízható módon azonosíthatók) [130]. Másrészt annak, hogy több kópiában is előfordulnak az Y-kromoszómán és a különböző kópiák PCR sokszorozásához használt primerek csak egy-egy bázisban térnek el egymástól [52]. Egyéb kutatásokban az MSY 41 A/B marker szintén nem bizonyult kellőképpen diverznek [69], ezért a jövőben más Y-kromoszómás lokuszok tesztelését tervezzük.

Összegezve kijelenthetjük, hogy a tesztelt 14 autoszómás STR markerünk és a mtDNS HVI régió együttes vizsgálata többnyire alkalmas volt a farkasok és kutyák helyes besorolására. A kérdéses mintáknál azonban szükségesnek látjuk további uni-, és biparentális markerek, a megkülönböztetést lehetővé tevő gének [72, 94], illetve az ún. SNaPshot eljárás [9] bevonását a kutatásba. A magyarországi farkas és kutyapopuláció megkülönböztetéséhez szükséges genetikai adatbázisok létrehozása során azonban szükségesnek tartjuk a releváns minták számának növelése mellett olyan további lokuszok vizsgálatát, melyek a jövőben megfelelnek az igazságügyi alkalmazáshoz szükséges kritériumoknak [131], valamint lehetővé teszik az eredmények nemzetközi szintű összehasonlítását. Mivel a farkasok genetikai kutatásával világszinten igen intenzíven foglalkoznak, ezért számos mikroszatellita, mtDNS és nukleáris SNP vizsgálati módszert és markert alkalmaznak [131]. Egy nemzetközileg elfogadott és harmonizált marker készlettel és módszertannal, így eredményeink összevethetőségével segíteni tudjuk a kontinensen, illetve a hazánkban is zajló farkasgenetikai kutatásokat mind a konzervációbiológia, mind pedig az igazságügyi alkalmazás területén.

Összefoglalás

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

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

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

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

Summary

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

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

The mitochondrial control region (HV1) haplotypes were successfully determined from the examined samples, these sequences were uploaded to the GenBank database. We did not find similar point mutation pattern between wolves and dogs. In contrary, the analysis of nuclear markers was not always successful. This is partially because in some cases only a little amount of degraded biological samples were available, and because of the suboptimal nature of the investigative method regarding the Y-chromosomal markers. However, based on the detected microsatellite allele distribution difference was shown between wolf and dog groups, further markers and more wolf samples should be involved.

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

Irodalomjegyzék

- [1] Korbalev MP, Korablev NP, Korablev PN (2020) Genetic diversity and population structure of the grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) and evidence of wolf×dog hybridisation in the centre of European Russia. *Mamm. biol.* 101:91-104 <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00074-2>
- [2] Luccenti SB, Bukhsianidze M, Martínez-Navarro B, Lordkipanidze D (2020) The wolf from Dmanisi and Augmented Reality: review, implications and opportunities. *Front. Earth Sci.* 8:131 <https://doi.org/10.3389/feart.2020.00131>
- [3] Stonikova M, Rook L (2010) Dispersal of the Canini (*Mammalia, Canidae: Caninae*) across Eurasia during the Late Miocene to Early Pleistocene. *Quaternary International* 212:86-97 <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2009.06.008>
- [4] Sardella R, Palombo MR (2007) The Pliocene-Pleistocene boundary: which significance for the so called “Wolf Event”? Evidences from Western Europe. *QUATERNAIRE* 18:65-71 <https://doi.org/10.4000/quaternaire.969>
- [5] Azzaroli A (1983) Quaternary mammals and the "end-Villafranchian" dispersal event - a turning point in the history of Eurasia. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 44:117-139 [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(83\)90008-1](https://doi.org/10.1016/0031-0182(83)90008-1)
- [6] Ersmark E, Klütsch CFC, Chan YL, Sinding MS, Fain SR, Illarionova NA, Oskarsson M, Uhlén M, Zhang Y, Dalé L, Savolainen P (2016) From the Past to the Present: Wolf Phylogeography and Demographic History Based on the Mitochondrial Control Region. *Front. Ecol. Evol.* 4:134 <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00134>
- [7] Sardella R, Bertè D, Iurino DA, Cherin M, Tagliacozzo A (2014) The wolf from Grotta Romanelli (Apulia, Italy) and its implications in the evolutionary history of *Canis lupus* in the Late Pleistocene of Southern Italy. *Quaternary International* 328-329:179-195 <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2013.11.016>
- [8] Leonard JA, Vilá C, Wayne RK (2005) FAST TRACK: Legacy lost: genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). *Molecular Ecology* 14:9-17 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02389.x>
- [9] Jiang HH, Li B, Ma Y, Bai SY, Dahmer TD, Linacre A, Xu YC (2020) Forensic validation of a panel of 12 SNPs for identification of Mongolian wolf and dog. *Sci. Rep.* 10:13249 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70225-5>
- [10] Đana M, Šnjegotab D, Veličkovića N, Stefanovića M, Vidakovića DO, Ćirović D (2016) Genetic Variability and Population Structure of Grey Wolf (*Canis lupus*) in Serbia. *Russ. J. of Genet.* 52:821-827 <https://doi.org/10.1134/S1022795416080044>
- [11] Chapron G, López-Bao JV (2014) Conserving Carnivores: Politics in Play. *Science* 343:1199-1200 <https://doi.org/10.1126/science.343.6176.1199-b>
- [12] International Wolf Center <https://wolf.org/wow/europe/>. Látogatva: 2021.04.16
- [13] Anthony BP, Tarr K (2019) The wolves are back! Local attitudes towards the recently re-populated grey wolf and wolf management, in Bükk National Park, Hungary. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 65:195–214 <https://doi.org/10.17109/AZH.65.2.195.2019>
- [14] Hausknecht R, Szabó Á, Firmánszky G, Gula R, Kuehn R (2010) Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring. *Mamm. biol.* 75:348–352 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2009.10.001>
- [15] Ardalan A, Kluetsch CFC, Zhang A, Erdogan M, Uhlén M, Houshmand M, Tepeli C, Ashtiani SRM, Savolainen P (2011) Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but implies dog–wolf hybridization. *Eco. and Evol.* 1:373-385 <https://doi.org/10.1002/ece3.35>
- [16] Germonpré M, Sablin MV, Stevens RE, Hedges REM, Hofreiter M, Stiller M, Després VR (2009) Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Jour. of Arch. Sci.* 36:473-490 <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.09.033>
- [17] Galibert F, Quignon P, Hitte C, André C (2011) Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *Compt. Rend. Biol.* 334:190-196 <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.011>

- [18] Zöldág L (2008) Állatorvosi genetika és állattenyésztés. Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar, Budapest
- [19] Avise JC, (2004) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland
- [20] Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. Trends Ecol. Evol. 16:613–622 [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X)
- [21] Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. Trends Ecol. Evol. 20:229–237 <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.010>
- [22] Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes S, Álvares F, García EJ, Palacios V, Cortés Y, Talegón J, Ferrand N (2011) Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. Mol. Ecol. 20:5154–5166 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05345.x>
- [23] Hailer F, Leonard JA (2008) Hybridization among Three Native North American *Canis* Species in a Region of Natural Sympatry. PLOS ONE 3(10) e3333 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003333>
- [24] Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD, Roy MS, Girman DJ, Garcia-Moreno J, Ostrander EA, Wayne RK (1994) Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. Mol. Ecol. 3:301–312 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00070.x>
- [25] Wayne RK, Brown DM (2001) Hybridization and conservation of carnivores. In: Gittleman, JL, Funk S, Macdonald DW, Wayne RK (Eds.) Carnivore Conservation. Cambridge University Press, Cambridge, 145–162
- [26] Adams JR, Kelly BT, Waits LP (2003) Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*). Mol. Ecol. 12:2175–2186 <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01895.x>
- [27] Boitani L (1992) Wolf research and conservation in Italy. Biol. Conserv. 61:125–132 [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91102-X](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91102-X)
- [28] Boitani L (2003) Wolf conservation and recovery. In: Mech LD, Boitani L (Eds.) Wolves: Behaviour, Ecology and Conservation. University of Chicago Press, Chicago, 317–340
- [29] Fico R, Verdone M, (1995) Lo studio delle popolazioni canine. Rapporti di Sanità Pubblica Veterinaria. Igiene Urbana Veterinaria, ISS/WHO/FAO-CC/IZSTe/95.25 (in Italian).
- [30] Randi E, Lucchini V (2002) Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. Conservation Genetics 3:31–45 <https://doi.org/10.1023/A:1014229610646>
- [31] Verardi A, Lucchini V, Randi E (2006) Detecting introgressive hybridisation between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. Mol. Ecol. 15:2845–2855 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x>
- [32] Vilá C, Walker C, Sundqvist A-K, Flagstad Ø, Andersone Z, Casulli A, Kojola I, Valdmann H, Halverson J, Ellegren H (2003) Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. Heredity 90:17–24 <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800175>
- [33] Randi E, Lucchini V, Christensen MF, Mucci N, Funk SM, Dolf G, Loeschcke V (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. Conserv. Biol. 14:464–473 <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.98280.x>
- [34] Andersone Z, Lucchini V, Randi E, Ozolins J (2002) Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. Mamm. biol. 67:79–90 <https://doi.org/10.1078/1616-5047-00012>
- [35] Hindrikson M, Mannil P, Ozolins J, Krzywinski A, Saarma U (2012) Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves. PLOS ONE 7: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046465>
- [36] Aghbolaghi MA, Rezaei HR, Scandura M, Kaboli M (2014) Low gene flow between Iranian Grey Wolves (*Canis lupus*) and dogs documented using uniparental genetic markers. Zoology in the Middle East 60:95–106 <http://dx.doi.org/10.1080/09397140.2014.914708>

- [37] Caniglia R, Fabbri E, Hulva P, Bolfíková BC, Jindřichová M, Stronen AV, Dykyy I, Camatta A, Carnier P, Randi E, Galaverni M (2018) Wolf outside, dog inside? The genomic make-up of the Czechoslovakian Wolfdog. *BMC Genomics* 19:533 <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4916-2>
- [38] Bibikov DI, Ovsyannikov NG, Filimonov AN (1985) The status and management of the wolf populations in the USSR. *Acta Zool Fennica* 174: 269–271
- [39] Khosravi R, Rezaei HR, Kaboli M (2013) Detecting Hybridization between Iranian Wild Wolf (*Canis Lupus Pallipes*) and Free-Ranging Domestic Dog (*Canis familiaris*) by Analysis of Microsatellite Markers. *Zoological Science* 30:27-34 <https://doi.org/10.2108/zsj.30.27>
- [40] Ciucci P, Lucchini V, Boitani L, Randi E (2003) Dewclaws in wolves as evidence of admixed ancestry with dogs. *Can. J. Zool.* 81:2077-2081 <https://doi.org/10.1139/Z03-183>
- [41] Lorenzini R, Fanelli R, Grifoni G, Scholl F, Fico R (2013) Wolf–dog crossbreeding: “Smelling” a hybrid may not be easy. *Mam. Biol.* 79:149-156 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2013.07.080>
- [42] Boitani L (1983) Wolf and dog competition in Italy. *Acta Zool. Fenn.* 174:259–264
- [43] Popova E, Zlatanova D (2019) Living a dog’s life: a putative gray wolf in a feral dog group. *Mamm.* 84:115-120 <https://doi.org/10.1515/mammalia-2019-0010>
- [44] Crispino F, Costanzo M, Lucia A, Gervasio G (2021) Early and double breeding in a pack of hybrid wolves in Calabria (Southern Italy). *Biodiversity Journal* 12:379-384 <https://doi.org/10.31396/Biodiv.Jour.2021.12.2.379.384>
- [45] Kusak J, Fabbri E, Galov A, Gomerčić T, Arbanasić H, Caniglia R, Galaverni M, Reljić S, Huber D, Randi E (2018) Wolf-dog hybridization in Croatia. *Veterinarski arhiv* 88:375-395 <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.170314>
- [46] Tsuda K, Kikkawa Y, Yonekawa H, Tanabe Y (1997) Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: Evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. *Genes Genet. Syst.* 72:229-238 <https://doi.org/10.1266/ggs.72.229>
- [47] Just RS, Irwin JA, O’Callaghan JE, Saunier JL, Coble MD, Vallone PM, Butler JM, Barritt SM, Parsons TJ (2004) Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Sci. Int.* 146:147–149 <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.045>
- [48] Kim KS, Lee SE, Jeong HW, Ha JH (1998) The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Molecular phylogenetics and evolution*, 10:210–220 <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0513>
- [49] Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gil P, Morling N, Parson W, Schneider P (2001) Considerations by the European DNA Profiling (EDNAP) Group on the Working Practices, Nomenclature and Interpretation of Mitochondrial DNA Profiles. *Forensic Sci. Int.* 124:83–91 [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00573-4](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00573-4)
- [50] Eichmann C, Parson W (2007) Molecular characterization of the canine mitochondrial DNA control region for forensic applications. *Int. J. Legal Med.* 121:411–6 <https://doi.org/10.1007/s00414-006-0143-5>
- [51] Sindičić, M. et al., 2011. Mitochondrial DNA control region as a tool for species identification and distinction between wolves and dogs from Croatia. *Verterinarski Arhiv* 81:249–258 <https://doi.org/10.1093/molbev/msi248>
- [52] Sundqvist A-K, Ellegren H, Oliver M, Vilá C (2001) Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 10:1959-1966 <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01326.x>
- [53] Eichmann C, Berger B, Reinhold M, Lutz M, Parson W (2004) Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *Int. J. Legal Med.* 118:337–42 <https://doi.org/10.1007/s00414-004-0479-7>
- [54] Ito H, Langenhorst T, Ogden R, Inoue-Murayama M (2015) Population genetic diversity and hybrid detection in captive zebras. *Sci. Rep.* 5:13171 <https://doi.org/10.1038/srep13171>
- [55] Dang W, Shang S, Zhang X, Yu Y, Irwin DM, Wang Z, Zhang S (2019) A novel 13-plex STR typing system for individual identification and parentage testing of donkeys (*Equus asinus*). *Equine Vet. J.* 0:1-8 <https://doi.org/10.1111/evj.13158>

- [56] Lorenzini R, Fanelli R, Tancredi F, Siclari A, Garofalo L (2020) Matching STR and SNP genotyping to discriminate between wild boar, domestic pigs and their recent hybrids for forensic purposes. *Sci. Rep.* 10:3188 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59644-6>
- [57] Kemenszky P, Fehér P, Farkas A, Jánoska F, Frank K, Bedő P, Barta E, Varga L, Szemethy L, Stéger V (2020) Genetic differentiation of the Golden Jackal (*Canis aureus*) populations in southern Hungary and southern Romania as revealed by microsatellite data analysis North-West. *J. of Zool.* 17:111-116
- [58] Szemethy D, Mihalik B, Frank K, Nagy T, Újváry D, Kusza Sz, Szemethy L, Barta E, Stéger V (2021) Development of Wild Boar Species-Specific DNA Markers for a Potential Quality Control and Traceability Method in Meat Products. *Food Analytical Methods* 14:18-27 <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01840-1>
- [59] Vilá C, Maldonado J, Wayne R, (1999) Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *J. Hered.* 90:71–77 <https://doi.org/10.1093/jhered/90.1.71>
- [60] Savolainen P, Lundeberg J. (1999) Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs. *J Forensic Sci.* 44:77-81
- [61] Savolainen P, Zhang Y, Luo J, Lundeberg J, Leitner T (2002) Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* 298:1610–1613 <https://doi.org/10.1126/science.1073906>
- [62] Leonard JA, Wayne RK, Wheeler J, Valadez R, Guillén S, Vilá C (2002) Ancient DNA Evidence for Old World Origin of New World Dogs. *Science* 298:1613-1616 <https://doi.org/10.1126/science.1076980>
- [63] Valière N, Fumagalli L, Gielly L, Miquel C, Lequette B, Poulle M-L, Weber J-M, Arlettaz R, Taberlet P (2003) Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation* 6:83-92 <https://doi.org/10.1017/S1367943003003111>
- [64] Verginelli F, Capelli C, Coia V, Musiani M, Falchetti M, Ottini L, Palmirota R, Tagliacozzo A, De Grossi Mazzorin I, Mariani-Costantini R (2005) Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and South-East European wolves. *Mol Biol Evol.* 22:2541-2551. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi248>
- [65] Ryabinina OM (2006) Mitochondrial DNA variation in Asian Shepherd Dogs. *Russ. J. Genet.* 42:748–751 <https://doi.org/10.1134/S1022795406070088>
- [66] Ishiguro N, Inoshima Y, Shigehara N. (2009) Mitochondrial DNA analysis of the Japanese wolf (*Canis lupus hodophilax* Temminck, 1839) and comparison with representative wolf and domestic dog haplotypes. *Zoolog Sci.* 26:765-770 <https://doi.org/10.2108/zsj.26.765>
- [67] Pilot M, Branicki W, Jędrzejewski W, Goszczyński J, Jędrzejewska B, Dykyy I, Shkvryra M, Tsingarska E (2010) Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evol. Biol.* 10:104 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-104>
- [68] Djan M, Maletić V, Trbojević I, Popović D, Veličković N, Burazerović J, Čirović D (2014) Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation. *Mam. Biol.* 79:277-282 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2014.03.001>
- [69] Bannasch DL, Bannasch MJ, Ryun JR, Famula TR, Pedersen NC (2005) Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mamm Genome.* 16:273-80. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-2435-8>
- [70] van Asch B, Alves C, Santos L, Pinheiro R, Pereira F, Gusmão L, Amorim A (2010) Genetic profiles and sex identification of found-dead wolves determined by the use of an 11-loci PCR multiplex. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4:68-72. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.05.003>
- [71] Randi E (2008) Blackwell Publishing Ltd Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Mol. Ecol.* 17:285-293 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03417.x>
- [72] Randi E, Hulva P, Fabbri E, Galaverni M, Galov A, Kusak J, Bigi D, Bolfíková BC, Smetanová M, Caniglia R (2014) Multilocus Detection of Wolf x Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection. *PLOS ONE* 9(3) e86409 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086409>
- [73] Kobl Müller S, Nord M, Wayne RK, Leonard JA (2009) Origin and status of the Great Lakes wolf. *Mol Ecol.* 18:2313-2326 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04176.x>

- [74] Munoz-Fuentes V, Darimont CT, Paquet PC, Leonard JA (2010) The genetic legacy of extirpation and re-colonization in Vancouver Island wolves. *Conserv. Genet.* 11:547–556 <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9974-1>
- [75] Caniglia R, Fabbri E, Mastrogiuseppe L, Randi E (2013) Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7:397-404 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.11.001>
- [76] Caniglia R, Galaverni M, Delogu M, Fabbri E, Musto C, Randi E (2016) Big bad wolf or man's best friend? Unmasking a false wolf aggression on humans. *Forensic Sci. Int. Genet.* 24 E4-E6 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.06.009>
- [77] Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, Randi E (2010) Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4:334-338 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.012>
- [78] Iacolina L, Scandura M, Gazzola A, Cappai N, Capitani C, Mattili L, Vercillo F, Apollonio, M (2010) Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: A contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. *Mam. Biol.* 75:341-347 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.02.004>
- [79] Wesselink M, Kuiper I (2011) Individual identification of fox (*Vulpes vulpes*) in forensic wildlife investigations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 3:214-215 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.107>
- [80] Kopaliani N, Shakarashvili M, Gurielidze Z, Qurkhuli T, Tarkhnishvili D (2014) Gene Flow between Wolf and Shepherd Dog Populations in Georgia (Caucasus). *J. Hered.* 105:345-353 <https://doi.org/10.1093/jhered/esu014>
- [81] Fabbri E, Caniglia R, Kusak J, Galov A, Gomerčić T, Arbanasić H, Huber D, Randi E (2014) Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. *Mam. Biol.* 79:138-148
- [82] Torres RT, Ferreria E, Rocha RG, Fonseca C (2017) Hybridization between wolf and domestic dog: First evidence from an endangered population in central Portugal. *Mam. Biol.* 86:70-74 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.05.001>
- [83] Bassi E, Canu A, Firmo I, Mattioli L, Scandura M, Apollonio M (2017) Trophic overlap between wolves and free-ranging wolf x dog hybrids in the Apennine Mountains, Italy. *Global Ecol. Conserv.* 9:39-49 <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.11.002>
- [84] Pacheco C, López-Bao JV, García EJ, Lema FJ, Llaneza L, Palacios V, Godinho R (2017) Spatial assessment of wolf-dog hybridization in a single breeding period. *Sci. Rep.* 7:42475 <https://doi.org/10.1038/srep42475>
- [85] Dufrenes C, Remollino N, Stoffel C, Manz R, Weber J-M, Fumagalli L (2018) Two decades of non-invasive genetic monitoring of the grey wolves recolonizing the Alps support very limited dog introgression. *Sci. Rep.* 9:148 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37331-x>
- [86] Santostasi NL, Gimenez O, Caniglia R, Fabbri E, Molinari L, Reggioni W, Ciucci P (2021) Estimating Admixture at the Population Scale: Taking Imperfect Detectability and Uncertainty in Hybrid Classification Seriously. *The Journal of Wildlife Management* 85:1031-1046 <https://doi.org/10.1002/jwmg.22038>
- [87] von Holdt BM, Pollinger JP, Lohmueller KE, Han E, Parker HG, Quignon P, Degenhardt JD, Boyko AR, Earl DA, Auton A, Reynolds A, Bryc K, Brisbin A, Knowles JC, Mosher DS, Spady TC, Elkahouloun A, Geffen E, Pilot M, Jedrzejewski W, Greco C, Randi E, Bannasch D, Wilton A, Shearman J, Musiani M, Cargill M, Jones PG, Qian Z, Huang W et al. (2010) Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature.* 464:898-902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>
- [88] Mozón J, Kays R, Dykhuizen DE (2014) Assessment of coyote-wolf-dog admixture using ancestry-informative diagnostic SNPs. *Mol. Ecol.* 23:182-197 <https://doi.org/10.1111/mec.12570>
- [89] Stronen AV, Jędrzejewska B, Pertoldi C, Demontis D, Randi E, Niedziałkowska M, Pilot M, Sidorovich VE, Dykyy I, Kusak J, Tsingarska E, Kojola I, Karamanlidis AA, Ornicans A, Lobkov VA, Durmenko V, Czarnomska SD (2013) North-South Differentiation and a Region of High Diversity in European Wolves (*Canis lupus*). *PLOS ONE* 8(10) e76454 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076454>

- [90] Pendleton AL, Shen F, Taravella AM, Emery S, Veeramah KR, Boyko AR, Kidd JM (2018) Comparison of village dog and wolf genomes highlights the role of the neural crest in dog domestication. *BMC Biol.* 16(1) 64 <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0535-2>
- [91] Harmoinen J, von Thaden A, Aspi J, Kvist L, Cocchiararo B, Jarausch A, Gazzola A, Sin T, Lohi H, Hytönen M, Kojola I, Stronen AV, Caniglia R, Mattucci F, Galaverni M, Godinho R, Ruiz-González A, Randi E, Muñoz-Fuentes V, Nowak C (2021) Reliable wolf-dog hybrid detection in Europe using a reduced SNP panel developed for non-invasively collected samples. *BMC Genomics* 22:473 <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07761-5>
- [92] Godinho R, López-Bao JV, Castro D, Llaneza L, Lopes S, Silva P, Ferrand N (2014) Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining noninvasive samples with ancestry informative markers. *Mol Ecol Resour.* 15:317-28 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12313>
- [93] Ghanatsaman ZA, Wang G-D, Nanaei HA, Fozi MA, Peng M-S, Esmailizadeh A, Zhang Y (2020) Whole genome resequencing of the Iranian native dogs and wolves to unravel variome during dog domestication. *BMC Genomics* 21:207 <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6619-8>
- [94] Axelsson E, Ratnakumar A, Arendt M, Maqbool K, Webster MT, Perloski M, Liberg O, Arnemo JM, Hedhammar Å, Lindblad-Toh K (2013) The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495:360-364 <https://doi.org/10.1038/nature11837>
- [95] Ollivier M, Tresset A., Bastian F, Lagoutte L, Axelsson E, Arendt M-L, Bălăşescu A, Marshour M, Sablin MV, Salanova L, Vigne J-D, Hitte C, Hänni C (2016) Amy2B copy number variation reveals starch diet adaptations in ancient European dogs. *R. Soc. open sci.* 3:160449 <http://doi.org/10.1098/rsos.160449>
- [96] Weich K, Affolter V, York D, Rebhun R, Grahn R, Kallenberg A, Bannasch D (2020) Pigment Intensity in Dogs is Associated with a Copy Number Variant Upstream of KITLG. *Genes* 11(1) 75 <https://doi.org/10.3390/genes11010075>
- [97] Linacre A (2021) Animal Forensic Genetics. *Genes* 12(4) 515 <https://doi.org/10.3390/genes12040515>
- [98] Linacre A, Gusmao L, Hecht W, Hellmann AP, Mayr WR, Parson W, Prinz M, Schneider PM, Morling N (2011) ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5:501-505
- [99] Szabolcsi Z, Egyed B, Zenke P, Pádár Zs, Borsy A, Stéger V, Páasztor E, Csányi S, Búzás Zs, Orosz L (2014) Constructing STR Multiplexes for Individual Identification of Hungarian Red Deer. *J. Forensic Sci.* 59:1090-1099 <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12403>
- [100] Zenke P, Egyed B, Padar Zs, Kovacs G (2015) Increasing relevance of non-human genetics in Hungarian forensic practice. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 5:250–252 <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.100>
- [101] Zenke P, Egyed B, Pádár Zs (2017) A vadászható fajok védelme: az orvvadászat bizonyíthatósága az igazságügyi genetika segítségével. *Magyar Állatorvosok Lapja* 139:631-639
- [102] Zenke P, Egyed B, Kovács G, Pádár Zs (2019) Implementation of genetic based individualization of White stork (*Ciconia ciconia*) in forensic casework. *Forensic Sci, Int. Genet.* 40:245-247 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.02.001>
- [103] Russo C, Mattiello S, Bibbiani C, Baglini A, Bonghi P, Facchini C (2016) Impact of wolf (*Canis lupus*) on animal husbandry in an Apennine Province. *Italian Journal of Animal Science* 13:3303 <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3303>
- [104] Linnell JDC (2013) From conflict to coexistence? Insights from multi-disciplinary research into the relationships between people, large carnivores and institutions. European Commission, Brussels, 56
- [105] Rigg R, Findo S, Wechselberger M, Gorman ML, Sillero-Zubiri C, Macdonald DW (2011) Mitigating carnivore–livestock conflict in Europe: Lessons from Slovakia. *Oryx* 45:272–280 <https://doi.org/10.1017/s0030605310000074>
- [106] Fernández-Gil A, Naves J, Ordiz A, Quevedo M, Revilla E, Delibes M (2016) Conflict Misleads Large Carnivore Management and Conservation: Brown Bears and Wolves in Spain. *PLOS ONE* 11(3) e0151541 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151541>

- [107] Nowak S, Szewczyk M, Tomczak P, Całus I, Figura M, Mysłajek RW (2021) Social and environmental factors influencing contemporary cases of wolf aggression towards people in Poland. *Eur. J. Wildl. Res.* 67: 69 <https://doi.org/10.1007/s10344-020-01455-1>
- [108] Schley L, Jacobs M, Collet S, Kristiansen A, Herr J (2021) First wolves in Luxembourg since 1893, originating from the Alpine and Central European populations. *Mamm.* 85:193-197 <https://doi.org/10.1515/mammalia-2020-0119>
- [109] van Hoppe MJC, Dy MAV, van den Einden M, Iyenga A (2016) SkydancerPlex: A novel STR multiplex validated for forensic use in the hen harrier (*Circus cyaneus*). *Forensic Sci. Int. Genet.* 22:100–109 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.02.003>
- [110] Ciavaglia S, Linacre A (2018) OzPythonPlex: An optimised forensic STR multiplex assay set for the Australasian carpet python (*Morelia spilota*). *Forensic Sci. Int. Genet.* 34:231–248 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.002>
- [111] Zhang H, Ades G, Miller MP, Yang F, Lai KW, Fischer GA (2020) Genetic identification of African pangolins and their origin in illegal trade. *Glob. Ecol. Conserv.* 23 e01119 <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01119>
- [112] Byard RW (2016) Traditional medicines and species extinction: Another side to forensic wildlife investigation. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 12 125–127 <https://doi.org/10.1007/s12024-016-9742-8>
- [113] Linacre A (2021) Wildlife crime in Australia. *Emerg. Top. Life Sci.* 5:487-494 <https://doi.org/10.1042/ETLS20200288>
- [114] Alacs E, Georges A (2008) Wildlife across our borders: A review of the illegal trade in Australia. *Aust. J. Forensic Sci.*, 40:147–160 <https://doi.org/10.1080/00450610802491382>
- [115] Linacre A, Ciavaglia SA (2017) Wildlife Forensic Science. In *Handbook of Forensic Genetics*; Amorin, A., Budowle, B., Eds.; World Scientific Publishing: London, UK, pp. 449–772
- [116] 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet a védett és a fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségben természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről
- [117] 275/2004. (X. 8.) Korm. rendelet az európai közösségi jelentőségű természetvédelmi rendeltetésű területekről
- [118] 1996. évi LV. törvény a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról
- [119] Zenke P, Maróti-Agóts Á, Pádár Zs, Zöldág L (2009) Characterization of the WILMS-TF microsatellite marker in Hungarian dog populations Short communication. *Acta Biol. Hun.* 60:329-332 <https://doi.org/10.1556/abiol.60.2009.3.10>
- [120] Zenke P. (2010) Mikroszatellita-polimorfizmusok vizsgálata kutya eredetű anyagmaradványokból. Phd értekezés, Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskola
- [121] Berger C, Berger B, Parson W (2012) Sequence Analysis of the Canine Mitochondrial DNA Control Region from Shed Hair Samples in Criminal Investigations. In: Alonso A (eds) *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 830. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2_23
- [122] Zenke P, Egyed B, Zöldág L, Pádár Zs (2011) Population genetic study in Hungarian canine populations using forensically informative STR loci. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5:31-36 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.03.013>
- [123] Leigh JW, Bryant D (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6:1110-1116 <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- [124] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-59. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- [125] Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4:359-361 <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

- [126] Rákaptak a borjúhúsról a zempléni farkasfalkák (videó) Kisalföld.hu 2020.10.18. <https://www.kisalfold.hu/egyperces/rakaptak-a-borjuhusra-a-zempleni-farkasfalkak-video-10364660/> (Látogatva: 2021.10.17.)
- [127] Brutális farkastámadások a megyénkben BOON A Borsod-Abaúj-Zemplén megyei hírportál 2021.03.01. <https://boon.hu/kozelet/helyi-kozelet/brutalis-farkastamadasok-a-megyenken-5242498/> (Látogatva: 2021.10.17.)
- [128] Véget kell vetni a farkasromantikának? Új szó 2021.10.17. <https://ujsoz.com/panorama/veget-kell-vetni-a-farkasromantikanak> (Látogatva: 2021.10.17.)
- [129] Kropatsh R, Streitberger K, Schulte-Middelmann T, Dekomien G, Epplen JT (2011) On ancestors of dog breeds with focus on Weimaraner hunting dogs. J. Anim. Breed. Genet. 128:64-72 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2010.00874.x>
- [130] Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. Nucleic Acid Res 24:2807-2812
- [131] de Groot A, Nowak C, Skrbinšek T, Asip J, Godinho R, Jansman HAH, Liberg O, Marucco F, Nowak S, Randi E, Śmietana W, Taberlet P, Muñoz-Fuentes V, Mysłajek RW, Pilot M, Reinhardt I, Szewczyk M, Vilá C (2015) Decades of population genetic research reveal the need for harmonization of molecular markers: The grey wolf *Canis lupus* as a case study. Mamm. Rev. 46:44-59 <https://doi.org/10.1111/mam.12052>

Köszönetnyilvánítás

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

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

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

Hálás vagyok még Zorkóczy Orsolya PhD hallgatónak, aki mindig örömmel segítette a munkánkat, és a nővéremnek Szives Lilla Virágnak.