



TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

ELTÉRÉSEK A HÁZI MACSKA (*FELIS CATUS*) ÉS VADMACSKA (*FELIS SILVESTRIS*) MITOKONDRIÁLIS 16S SZEKVENCIAJÁBAN

**Differences in the mitochondrial 16S sequence of domestic cats (*Felis catus*)
and wildcats (*Felis silvestris*)**

Készítette: **Hámor Fanni Zsófia**
Mezőgazdasági biotechnológus, mesterképzés
Genetika és Biotechnológia Intézet

Témavezetők: Dr. Stéger Viktor, tudományos főmunkatárs
Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Szent
István Campus, Genetika és Biotechnológia
Intézet, Genetika és Genomika Tanszék

Ninausz Nóra, tudományos segédmunkatárs,
Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Szent
István Campus, Genetika és Biotechnológia
Intézet, Genetika és Genomika Tanszék

**Gödöllő
2023.**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	3
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1 Taxonómiai áttekintés	4
2.2 Macskafélék ökológiai szerepe	5
2.3 Hibridizáció.....	8
2.4 A házi macska és vadmacska morfológiai eltérései	11
2.5 Molekuláris genetikai markerek	13
2.5.1 STR (Short Tandem Repeat).....	13
2.5.2. SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	14
2.6 Molekuláris genetikai módszerek	15
2.6.1 Sanger-szekvenálás.....	15
2.6.2 Kapilláris fragmentanalízis	16
2.6.3 Mitokondriális elemzés	17
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
3.1 Mintagyűjtés és tárolás	19
3.2 DNS-izolálás	19
3.3 Fajhatározás mikroszatellit markerekkel, és a fragmentek analízise.....	20
3.4 A mtDNS szakaszok felszaporítása és szekvenálás.....	22
3.5 Ivarhatározás amelogenin gén segítségével.....	23
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	24
4.1 Mikroszatellit lokuszok vizsgálata	24
4.2 Mitokondriális DNS vizsgálata.....	25
4.3 Ivarhatározás és rokonsági vizsgálat	29
4.4 Eredmények értékelése	29
5. ÖSSZEFOGLALÁS	32
6. IRODALOMJEGYZÉK	33
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	38
8. FÜGGELÉK	39

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

7PS	7 Pelage Score	7 bunda pontszám
ATP	adenosine triphosphate	adenozin-trifoszfát
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora	Egyezmény a veszélyeztetett vadon élő állat- és növényfajok nemzetközi kereskedelméről
cSNP	coding SNP	kódoló SNP
ddNTP	dideoxynucleotide	dideoxinukleotid
dNTP	deoxynucleotide	dezinukleotid
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxi-ribonukleinsav
Fc	<i>Felis catus</i>	házi macska
Fs	<i>Felis silvestris</i>	vadmacska
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources	Természetvédelmi Világszövetség
mtDNS	mitochondrial DNA	mitokondrionális DNS
ND5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 protein	NADH dehidrogenáz 5. alegység
ND6	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6 protein	NADH dehidrogenáz 6. alegység
PCR	Polimerase Chain Reaction	polimeráz-láncreakció
rpm	revolutions per minute	percenkénti fordulatszám
rRNS	ribosomal RNA	riboszomális RNS
SNP	Single Nukleotide Polymorphism	egyponos nukleotid-polimorfizmus
STR	Short Tandem Repeat	rövid tandem-ismétlődés
tRNS	transfer RNA	transzfer RNS

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

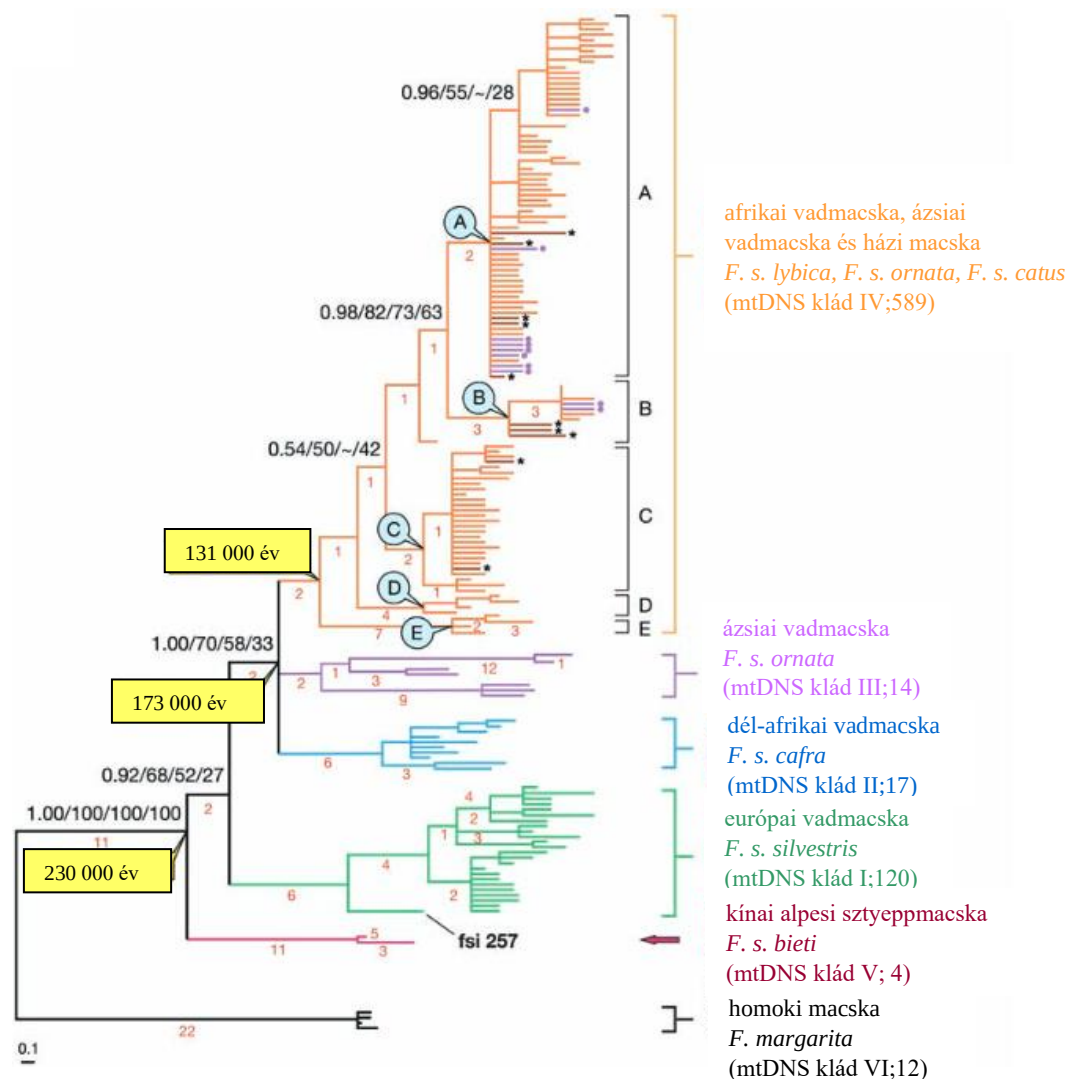
Az európai vadmacska (*Felis silvestris silvestris* [Schreber, 1777]) hazánkban fokozottan védett, őshonos ragadozófaj. Az elmúlt évszázad során az antropológiai hatások (illegális vadászat, erdőirtás, közúti gázolások) révén a faj egyedszáma jelentősen lecsökkent (Bastianelli et al., 2021). A vadmacskák konzervációját veszélyeztető tényező a házi macskákkal (*Felis silvestris catus* [Linnaeus, 1758]) való hibridizációja, amely a faj elterjedési területén belül a különböző régiókban eltérő mértékű. Hazánkban és Skóciában a házi macskákkal való intenzív hibridizációját tapasztalták, míg olasz és német populációkban a hibrid egyedek alacsony arányban fordultak elő (Lecis et al., 2005, Pierpaoli et al., 2003, Eckert et al., 2010). Annak érdekében, hogy minél hatékonyabban elkülöníthetők legyenek a két taxon és a hibridek egyedei, korábban is számos kutatás zajlott. Ezáltal került kidolgozásra morfológiai bélyegek alapján történő fajmeghatározás, illetve mikroszatellit markerek alkalmazásával történő elkülönítése a házi- és vadmacskáknak (French et al., 1988, Menotti-Raymond et al., 1999, Kitchenner et al., 2005). Bizonyos esetekben nem áll rendelkezésre egy teljes példány a morfológiai bélyegek alapján történő megbízható elkülönítéshez, illetve elegendő DNS minta a mikroszatellit alapú vizsgálatok elvégzéséhez, ilyen esetekben a mitokondriális DNS-ben (mtDNS) azonosított SNP markerek (Single Nucleotide Polymorphism, vagyis egy pontos nukleotid polimorfizmus) használata célszerű, ugyanis mitokondriumok egyetlen sejtben is nagy kópiaszámban találhatók, így ezen SNP markerek alkalmazásával, elvégezhető lehet a két csoport elkülönítése kismennyiségű rendelkezésre álló DNS minta esetén (Gustafsson et al., 2016). Ebben az esetben az állatkertekben, vadasparkokban élő példányok fajszerű szűrése elvégezhető állatorvosi beavatkozást nem igénylő szőrminta vagy székletminta gyűjtésével és vizsgálatával. Ez a módszer alkalmas lehet a vadon élő állomány felmérésére szőrscapdával gyűjtött mintákon keresztül is.

Kutatásunk célja volt a mitokondrium 16S riboszomális RNS (rRNS) szekvenciájában mitokondriális SNP markerek azonosítása olyan molekuláris genetikai módszerekkel, mint a PCR technológia és a DNS-szekvenálás. Ezek a markerek alkalmasak lehetnek a Magyarországon fokozottan védett európai vadmacska és a vele hibridizációra képes házi macska egyedeinek elkülönítésére. A vizsgált mintákon mikroszatellit markerek segítségével ellenőrizzük az egyes minták házi macskákhöz, vadmacskákhöz, illetve a hibridekhez való tartozását. A mtDNS 16S rRNS szekvenciákat specifikus primerek segítségével amplifikáljuk fel, majd a szekvenciákat bioinformatikai módszerek alkalmazásával elemezzük, valamint ivarhatározó PCR elvégzésével azonosítjuk a minták ivarát, annak érdekében, hogy rokonsági vizsgálatokat végezzünk a mintákon.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Taxonómiai áttekintés

A Carnivora (ragadozók) rend Felidae (macskafélék) családjába sorolt Felinae (macskaformák) alcsaládba tartozó tíz nem egyike a Felis. Filogenetikai kutatások alapján a Felis nemzettségbe olyan fajok tartoznak, mint a homoki macska (*Felis margarita* [Loche, 1858] és a vadmacska (*Felis silvestris* [Schreber, 1777]). A vadmacskákat polifiletikus csoportként tartják számon, mely további öt alfaji szintű taxonból áll. A vadmacska alfajai az európai vadmacska (*Felis silvestris silvestris* [Schreber, 1775]), a kínai alpesi sztyeppmacska (*Felis silvestris bieti* [Milne-Edwards, 1872]), az afrikai vadmacska (*Felis silvestris lybica* [Forster, 1780]), a dél-afrikai vadmacska (*Felis silvestris cafra* [Desmarest, 1822]) és az ázsiai vadmacska (*Felis silvestris ornata* [Gray, 1830]) (Driscoll et al., 2007). Modern molekuláris biológiai kutatások eredményeként a házi macska (*Felis silvestris catus* [Linnaeus, 1758]) a vadmacska egy további alfájának tekinthető, mivel a házi macska a mitokondriális DNS (mtDNS) alapján az afrikai vadmacskák kládjához esik legközelebb (Driscoll et al., 2007). Ezt a 742 db macska minta mtDNS-ének 2604 bp hosszú ND5 (NADH dehidrogenáz 5. alegység) és ND6 (NADH dehidrogenáz 6. alegység) szekvenciájának vizsgálatával Driscoll és munkatársai (2007) bizonyították, ezt mutatja az általuk készített filogenetikai fa, amely az 1. ábrán látható.



1. ábra. MtDNS szekvenciák Neighbour joining filogenetikai fája. (Driscoll et al., 2007). Az ágak alatta az egynukleotid eltérések száma pirossal van jelölve. A taxonok magyar és tudományos neve mellett zárójelben a kládok megnevezése, illetve a vizsgált egyedek száma látható. A buborékokban látható betűk (A-E) a IV. kládon belüli vonalakat jelölik.

2.2 Macskafélék ökológiai szerepe

Közelmúltbeli vizsgálatokkal sikerült megállapítani, hogy a macskák házasításának folyamata nagyjából 10 000 éve a Termékeny Félhold területén vette kezdetét (Krajcarz et al., 2022). Az elmúlt néhány évtized során a paleogenetikai módszerek fejlődése révén nyilvánvalóvá vált, hogy a mai házi macskák az afrikai vadmacska domesztikálásával alakultak ki (Driscoll et al., 2007, Ottoni et al., 2017). 3500 éves bizonyítékok származnak az ókori Egyiptomból, amely feltételezhetően évszázadokig a macska domesztikálásának központja lehetett (Ottoni et al., 2017). A mitokondriális DNS vizsgálatainak eredményeképpen derült fény arra, hogy az afrikai vadmacskára jellemző haplotípus már a késő Újkőkorszakban (i.e.

5300 - i.e. 4800) jelen volt Közép-Európában. Kelet-Európában a macskák megjelenése nagyjából egybeesett az egerek (*Mus musculus* [Linnaeus, 1758]) megjelenésével, így feltételezhető, hogy a macskák elterjedésében fontos szerepet játszottak a mezőgazdasági kártevők (Krajcarz et al., 2022).

Elterjedését tekintve az európai vadmacska széleskörűen előforduló faj, kelet-nyugati irányban az Ibériai-félszigettől Közép-Ázsiáig előfordulnak populációi. Észak-Európában is jelen van Skandinávia kivételével, délen a Mediterráneumban is előfordul. Az európai vadmacska előfordulása az 2. ábrán látható. Élőhelyüket tekintve hagyományosan, az elvadult házi macskákhoz hasonlóan, erdei fajként tartották számon, ezzel szemben több kutatási eredmény alátámasztotta már, hogy nem kizárólag fás területen élő fajról van szó. A macskák az olyan élettereket kedvelik, ahol a fás erdőfoltok mellett előfordulnak nyílt területek, például szántók is. Míg a fákkal borított területeken búvóhelyet keresnek, addig a nyílt területek a vadászat helyszínei (Lozano et al., 2003; Biró et al., 2004).



2. ábra. Az európai vadmacska elterjedése. Eurázsia térképén vörös színnel jelölve látható az európai vadmacska előfordulási területe (<http1>).

Magyarországi vizsgálatok kimutatták, hogy mind a visszavadult házi macskák, mind a vadmacskák esetén a kisméretű emlősfajok a legjelentősebb prédaállatok, viszont különböző madárfajok zsákmányolása is fontos szerepet játszik a táplálkozásukban (Biró et al., 2005). Ausztrál kutatók által elvadult házi macskákon végzett vizsgálat hasonló eredményeket adott: fő táplálékfajok az emlősök közül kerültek ki (Molsher et al., 1999). Magyarországon mind a vadmacskák, az elvadult házi macskák, illetve a vadmacska és házi macska hibridek is alacsony gyakorisággal fogyasztottak nyúlfeleket (Biró et al., 2005). A táplálék-fajok összetételét vizsgálva a vadmacska és házi macska hibridek niche, másnéven ökológiai fülkéje bizonyult a legszélesebbnek. Tehát ennél a két csoportnál széles az a tér, amelyet a környezeti tényezők határoznak meg, és amelyben a populáció fennmaradni képes. Ezzel szemben a vadmacskák a

táplálkozás szempontjából specialistának bizonyultak. Ez a különbség abból adódik, hogy az elvadult házi macskák háztartási élelmiszereket, illetve más házasított állatokat, például baromfit is fogyasztanak, a táplálkozásban ilyen módon előnyhöz jutva a vadmacskákhoz képest (Biró et al., 2005). Portugál vadmacskák táplálkozási szokásait vizsgálva azt tapasztalták, hogy rágcsálók tették ki az elfogyasztott biomassa több mint felét, és a nyúlféleik bizonyultak a második leggyakrabban zsákmányolt csoportnak (Sarmento, 1996). A macskafajok táplálkozási szokásaiban az évszakok között eltérést nem figyeltek meg, illetve egy év alatt alacsony változatosság figyelhető meg a táplálkozásukban (Tryjanowski et al., 2002). Szlovákiában a téli időszakban a vadmacskák gyomortartalmát vizsgálva, megerősítették a korábbi kutatások eredményeit, miszerint a táplálék legnagyobb részét rágcsálófajok teszik ki (Tryjanowski et al., 2002).

Az elvadult házi macskák általában kis területen töltik idejük nagy részét, ritka esetben vándorolnak nagy távolságra. A vándorlás távolságára pozitívan hat a magas hőmérséklet, viszont egyéb időjárási különbségek hatását nem mutatták ki a macskák migrációjára (Germain et al., 2008). Élőhelyük méretét -amely általában kisebb, mint a vadmacskáké és a hibridjeiké- nagyban befolyásolja az egyedek testmérete. A fajok közötti eltérő élőhelyméret lehetséges magyarázata, hogy míg a házi macskák az ember közelében egyszerűbben jutnak elegendő élelemhez, addig a vadmacskáknak és a hibrideknek alkalmazkodnia kell a különböző prédafajok szezonálisához, amely miatt a táplálkozás nagyobb területen valósítható meg. Azok az egyedek, amelyek nagyobb testtömegűek, általában nagyobb élőhelyet foglalnak el (Germain et al., 2008). A hímek és a nőstények élőhelyének méretében nem figyeltek meg jelentős eltérést, viszont az élőhely elhelyezkedése jellemzően eltér a két nem esetén. A nőstények általában jobb minőségű élőhelyeket választanak, nagyobb arányú növényborítottsággal, kedvezőbb élőhelyválasztásuk miatt kevesebb energiaráfordítással képesek zsákmányt szerezni, így a megtakarított energiát a szaporodásra képesek fordítani (Oliveira et al., 2018). Életmódjukat tekintve a házi- és vadmacskák, illetve a két taxon hibridjei is általában nagyobb aktivitást mutatnak éjszaka, viszont nem éjjeli állatok (Germain et al., 2008).

A vadmacskák és házi macskák viselkedési mintázata nagyon hasonló, közöttük a különbségek jelentős részét az ember-állat interakciók okozzák. A házi macskák és vadmacskák viselkedésében rejlő különbségek felderítését célzó kutatás során azt tapasztalták, hogy a fogságban élő vadmacskák az idejük közel felében virrasztottak, míg a házi macskák egyéni pihenéssel töltötték az idejük legnagyobb részét. Régóta ismert, hogy a macskafélék a

territóriumuk határát vizelettel és székletmintával jelölik. Ez a jelölő viselkedés intenzívebben nyilvánul meg a vadmacskánál, amelynek oka feltehetően a territórium nagyobb területe (Berteselli et al., 2017).

Az elmúlt évszázadban a vadmacskák egyedszáma jelentősen lecsökkent, amelynek legfőbb okai antropológiai eredetűek. Ilyen emberi tevékenységből származó közvetlen hatások a potenciális élőhelyeinek drasztikus csökkenése és fragmentálódása, amelynek révén kisebb, egymástól izolált élőhely területek alakulnak ki. Valamint az illegális vadászat és a közúti gázolások is jelentős mortalitást okoznak a vadmacska populációkban. Ezek a hatások együttesen a vadmacskák éves halálozásának nagyjából 83%-áért felelősek (Bastianelli et al., 2021). Továbbá olyan veszélyek fenyegetik a vadmacska populációk fennmaradását, mint a zsákmányállatok egyre csökkenő populációi, és a házi macskákkal való hibridizáció (Bastianelli et al., 2021). A 2000-es évek elején végzett felmérés szerint hazánkban a vadmacska az egyetlen olyan ragadozó faj, amelynek helyzete az ezredfordulót megelőző évtizedben jelentősen leromlott, ennek oka részben a házi macskák elszaporodása és a velük való hibridizáció (Heltai et al., 2006). Skóciában viszont a nyugati területeket leszámítva a 1980-as évek óta a vadmacskaállomány helyzete alig változott. A skóciai vadmacska állományt 115–314 példányból álló populációra becsülik (Breitenmoser et al., 2019). Egészséges populációi Franciaországban, Németországban, Olaszországban, az Ibériai-félszigeten, illetve a Kárpátok között találhatók még meg (Biró et al., 2005, Mattucci et al., 2013, Nieto-Blázquez et al., 2022). Az 1964-ben alapított Természetvédelmi Világszövetség, angolul röviden az IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) Vörös Listáján, amely a biodiverzitás állapotának fontos jelzője, nem fenyegetett státuszban található jelenleg (<http2>). A vadmacska nemzetközi kereskedelmét a CITES Egyezmény (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) II. függeléke szabályozza. Jelenleg nem fenyegeti a fajt a kihalás veszélye, de annak érdekében, hogy a fennmaradást veszélyeztető hasznosítás elkerülhető legyen, szükséges a faj kereskedelmét szabályozni. Az egyezményhez Magyarországnak 1985-ben csatlakozott, jelenleg 183 részes fele van, köztük az Európai Unió (<http3>). Hazánkban a vadmacska 1974 óta védett, fokozottan védetté 2012-ben nyilvánították, eszmei értéke 250 000 Ft (<http4>).

2.3 Hibridizáció

A hibridizációnak nagy szerepe van az evolúció menetében. Már a korai sejtek és élőlények kialakulását is egymástól addig különböző molekulák és organizmusok egyesülése alakította ki. Az ivartalanul szaporodó baktériumoknál is megfigyelhető egyfajta hibridizáció, a rokon

fajok homológ rekombináció vagy plazmidok révén történő génkicserélődésekor (Barton, 2008). Magasabb rendű fajoknál is gyakran előforduló jelenség a hibridizáció a természetben, ami két egymástól eltérő genetikai állományú egyedének sikeres párosodásával valósul meg. A folyamat jelentősége vitatott, mivel a természetes hibridizáció elősegítheti az evolúciót és az adaptációt, a heterozigotizáció növelése és új allélkombinációk létrejötte révén, ugyanakkor a hibrid, heterozigóta egyedek hátrányba kerülhetnek a szülői genotípusokhoz képest, amennyiben az új allélkombinációk negatívan hatnak az egyedek életképességére, szaporodására. A hibrid utódok és a szülői fajok fitnessének különbségére eltérő kutatási eredmények születtek korábban. Egyes tanulmányok alapján a hibridek alacsonyabb fitnesszel bírtak, mint a fajtiszta egyedek (Barton and Hewitt, 1985), míg más vizsgálat ennek az ellenkezőjét támasztotta alá (Arnold and Hodges, 1995). Az F1 hibrid populációk fitness növekedését a heterózis hatás eredményezheti, amely az F2 generációban a szegregáció révén már kevésbé érvényesül, így az F2 populáció fitnessze alacsonyabb az eredeti populációhoz viszonyítva (Barton, 2008). A hibridizáció a kisméretű, izolált populációkat, amelyek genetikai diverzitása alacsony megmentheti a beltenyésztéses leromlástól az új allélek bejuttatásával. Farkas (*Canis lupus* [Linnaeus, 1758]) populáción figyelték meg, hogy egy jelentősen beltenyésztett állomány szaporodási sikerét jelentősen növelik bevándorló egyedekkel történő kereszteződések (Åkesson et al., 2016). Ezzel szemben a hibridizáció negatív hatással is lehet egy faj vagy populáció fennmaradására, a kültenyésztéses leromlás (outbreeding depression) révén, ekkor a hibrid, heterozigóta egyedek fitnessze csökken a szülői fajkéhoz viszonyítva. Ez valószínűsíthetően abban az esetben történik, amikor korábban koadaptált gének válnak szét hibridizáció hatására, vagy negatív hatású allélkombinációk keletkeznek. A genetikai keveredés révén a folyamat szintén negatív következménye lehet az egyik szülői faj genetikai állományának eliminálódása az utódgenerációból (Roberts et al., 2009). Két eltérő fajt képviselő egyed egymással történő szaporodásakor interspecifikus hibridizációról beszélünk. Kutya (*Canis lupus familiaris* [Linnaeus, 1758]) és coyote (*Canis latrans* [Say, 1823]) kereszteződéséből létrejött hibrid egyedeket is vizsgáltak korábban. A hibrid egyedek fertilisek, de az F2 generációban az alomszám jelentős csökkenését figyelték meg, amelyet a termékenység csökkenése vagy születés előtti mortalitás eredményeként értékeltek (Mengel 1971). A macskafélék családjában a házi macska és a leopárdmacska (*Prionailurus bengalensis* [Kerr, 1792]) hibridizációjával alakult ki a bengáli macska fajta, illetve a házi macska és a mocsári macska (*Felis chaus* [Schreber, 1777]) keresztezésével alakították ki a Chausie macskafajtát (Li et al., 2016). Nagymacska fajok között is ismert jelenség a hibridizáció, a 19. századtól találhatók feljegyzések afrikai oroszlán (*Panthera leo* [(Linnaeus, 1758)]) hím és

nőstény tigris (*Panthera tigris* [(Linnaeus, 1758)]) hibridizációjából született liger, illetve hím tigris és nőstény oroszlán párosodásából születő tigon egyedekről. Ezek a hibrid egyedek általában nem termékenyek, ritka esetben fordulnak elő fertilis példányok (McKinnell and Wessel, 2012). Intraspecifikus hibridizáció két, ugyanahhoz a fajhoz, de elkülönült populációból származó egyedek, esetleg alfajok párosodását jelenti (Chan et al., 2019). Ilyen esemény a Skandináviában élő kisméretű, elszigetelt farkas populáció kereszteződése bevándorló egyedekkel (Åkesson et al., 2016), illetve alfajok közötti hibridizáció zajlik Ausztráliában a dingók (*Canis familiaris dingo* [Meyer, 1793]) és a házi kutyák (*Canis lupus familiaris* [Linnaeus, 1758]) között (Elledge et al., 2006).

Konzervációbiológiai szempontból is problémát jelent a hibrid egyedek státuszának megállapítása. A Természetvédelmi Világszövetség nem engedélyezi fajközötti hibridek felvételét a Vörös Listára. Továbbá egyes fajok határai nem egyértelműen megállapíthatóak, és jelenleg az ismereteink a fajok közötti génáramlás tekintetében sem teljeskörűek (Chan et al., 2019).

A házi macskák és vadmacskák kereszteződéséből származó hibrid példányok előfordulását eltérő arányban több európai országban kimutatták. Magyarországi szabadon élő macskaféle állomány felmérése alapján az egyedek megközelítőleg harmada bizonyult hibridnek (Lecis et al., 2005). Hazai és olaszországi macska minták vizsgálatának eredményei szerint Olaszországban a vadmacskák reprodukcióban elszigeteltek a házi macska populációtól, kizárólag olyan szélső területeken figyeltek meg kismértékű hibridizációt a házi macskák és vadmacskák között, ahol a vadmacskák alacsony denzitása a házi macskák nagyarányú jelenlétével párosult. Ezzel szemben Magyarországon a vadmacskák házi macskákkal való hibridizációja a közelmúltig gyakori eseménynek számított (Lecis et al., 2005). Az Olaszországban végzett vizsgálat eredményéhez hasonlóan feltételezhető, hogy Németországban is ritkán történik meg a vadmacskák házi macskákkal való hibridizációja. Az ilyen irányú németországi vizsgálatokkor, mind a mitokondriális DNS (mtDNS), mind mikroszatellitek szintjén a házi macska populációk nagyobb genetikai variabilitását tapasztalták a vadmacskákkal szemben. A haplotípusok alapján a vad- és házi macska populációk elkülönültek, az anyai vonalon a génáramlás csak kis mértékben van jelen a házi macskák és vadmacskák között (Eckert et al., 2010). Franciaországban végzett felmérés során azt tapasztalták, hogy az északi területeken gyakrabban hibridizál a vadmacska a házi macskákkal, mint az erdővel sűrűn borított Pireneusokban. Illetve ezzel összefüggésben megállapították, hogy a vadmacskák és házi macskák hibridjei a házi macska populációban fordulnak elő nagy

gyakorisággal, tehát a hibridizáció nagyobb rendszerességgel fordul elő hím vadmacska és nőtény házi macska között, mint fordítva (Beugin et al., 2020).

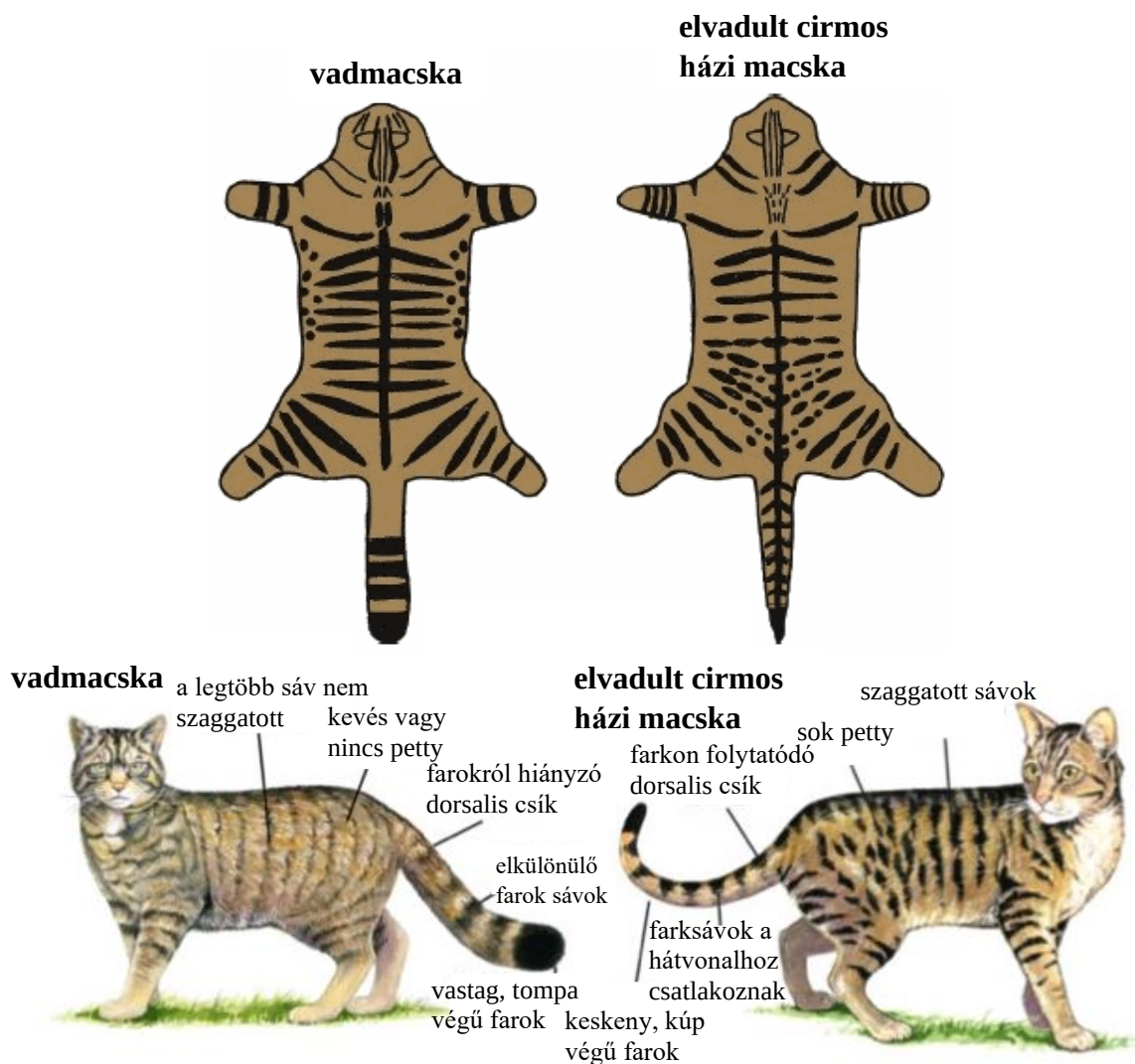
A hazai természetvédelmi szabályozásban a hibrid egyedek is védettséget élveznek (1996. évi LIII. törvény a természet védelméről).

2.4 A házi macska és vadmacska morfológiai eltérései

A házi macskák és a vadmacskák, illetve ezek hibridjeinek morfológiai elkülönítésére Kitchener és munkatársai (2005) által kidolgozott viszonylag hatékony, könnyen alkalmazható és nem-invazív 7PS (7 Pelage Score) módszer 7 tulajdonság pontozásán alapul. A módszer szerint a vizsgálni kívánt példányok minden tulajdonság alapján 1, 2, vagy 3 pontot kaphatnak. A tulajdonságokat és azok pontértékét az 1. táblázat mutatja, és a 3. ábrán látható a vadmacskák és házi macskák közötti morfológiai eltérések.

Tulajdonság	Pontérték		
	1	2	3
dorsalis oldali csík	hiányzik/ teljes farkat takarja	folytatódik a farkon	a fark alapjáig fut
farokcsúcs alakja	kúp	átmeneti	tompa
farok sávozottsága	hiányzik/ dorsalis csíkhöz kapcsolódik	nem egyértelmű/ összeolvadt	különálló
szaggatott oldalsó sávok	>50%/ nincs minta	25-50% szaggatott	<25% szaggatott
far pettyezettség	sűrű/ nincs minta	néhány	nincsenek pettyek
nyak sávozottság	vékony/ nem sávozott	átmeneti	4 vastag sáv
vállak sávozottsága	nem egyértelmű/ nem sávozott	átmeneti	2 vastag sáv

1. táblázat. A házi macskák, vadmacskák és azok hibridjei elkülönítésére használható 7PS módszer alapjául szolgáló 7 tulajdonság és azok pontértékei (Kitchener et al., 2005).



3. ábra. A házi- és vadmacskák morfológiai különbségei. Az ábra bal oldalán a vadmacskák, míg jobbra a cirmos házi macskák mintázata látható (<http5>).

1 pont a házi macskára jellemző tulajdonságokat jelenti, míg 3 a vadmacskákra jellemzőek. Nincsen egyetlen olyan morfológiai tulajdonság, amely alapján hatékonyan és megbízhatóan elkülöníthető egymástól a vadmacska és a házi macska. A 7 tulajdonságot együtt értékelve, ha az egyed minimum 19 pontot ér el a pontozás során, és egyik tulajdonságra sem kap 1 pontot, úgy a módszer szerint vadmacskának tekinthető. További 8 morfológiai tulajdonságot is meghatároztak, amelyek egyikére sem kaphat 1 pontot, olyan egyed, amelyik vadmacska. Ezek az 1 pontot érő tulajdonságok a következők: az állon, a háton vagy a test oldalán található fehér folt, a pofa sávozottságának hiánya; sötét pettyek hiánya a test alsó részén; a hátsó láb sávozottsága; a farok vége nem sötét, vagy fekete; illetve a fül hátulsó részének színe a fej színével megegyező. Egyes példányokban az összefüggő tulajdonságok különbözőségeire a hibridizáció adhat magyarázatot, mivel így a hibrid egyedben néhány vadmacska jellegzetesség elfedhetett bizonyos házi macskára jellemző tulajdonságokat. Az F2 generációban, illetve

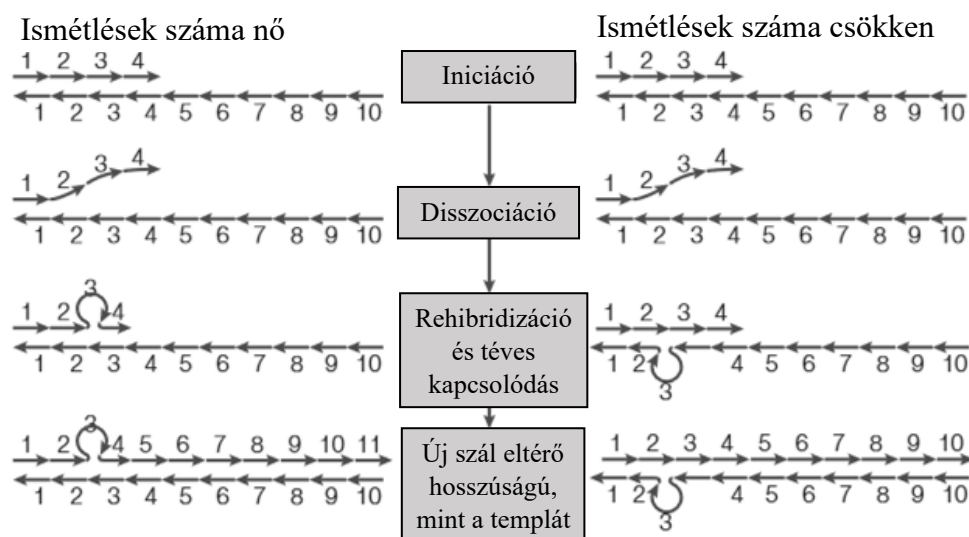
amikor a hibrid egyed az egyik szülőfajjal kereszteződött, az alaki tulajdonságok még nagyobb variációját tapasztalták (Kitchener et al., 2005).

Általánosságban elmondható, hogy a vadmacskák koponyája nagyobb és robusztusabb a háziasított fajhoz képest. A XX. század elején élt vadmacskák koponyájának mérete jelentősen különbözik a közelmúltban élt, illetve a jelenben élő vadmacskák koponyájától. Mivel a házi macskák és vadmacskák hibridjeinek koponyamérete számottevően átfed a modern vadmacskáéval, illetve meglehetősen nagy a variancia az egyes példányok között, így a koponyaméret alapján nehéz a két csoport elkülönítése (French et al., 1988). A morfológiai módszerek megbízhatóságát Ballesteros-Duperón és munkatársai (2014) vizsgálták a vadmacskák és házi macskák elkülönítésében. A morfológia alapján történt fajmeghatározás megegyező eredményt mutatott a genetikai alapú fajmeghatározással, viszont egyes formai tulajdonságok megbízhatóbban használhatók az elkülönítés során, mint mások (Ballesteros-Duperón et al., 2014). Míg az afrikai vadmacska és a házi macska mérete a középkorig folyamatosan redukálódott, addig az európai vadmacska testmérete az idők folyamán stagnált (Krajcarz et al., 2022).

2.5 Molekuláris genetikai markerek

2.5.1 STR (Short Tandem Repeat)

A rövid tandem ismétlődések (STR), egyszerű szekvencia ismétlődésnek (SSR) is nevezik, illetve másnéven mikroszatellitek, olyan 1-6 bp hosszú szekvencia szakaszok a genomban, amelyek egymás után sokszor ismétlődnek. Az 1980-as években fedezték fel a jelenlétüket, mivel funkciójuk nem volt ismert, így junk, azaz szemét DNS néven emlegették. Majd a PCR (Polimerase Chain Reaction) technológia megjelenésével és fejlődésével a mikroszatellitek a genotipizálás alapjává váltak. A mikroszatellitek általában a genom nem-kódoló részein fordulnak elő olyan nagy számban, hogy a genom akár 3%-át is kitehetik. Funkciójuk igen sokrétű, jelenleg is megismerés alatt állnak (Ellegren, 2004). Igen magas a mikroszatellitek polimorfizmus aránya, mert a genom többi részéhez képest magasabb mutációs rátával bírnak. Kialakulásuk és hosszmutációjuk a replikáció során megcsúszó polimeráz eredménye. Az ismétlődő szakasz replikációjának megkezdődése után a két szál el tud válni egymástól. A két szálon eltérő hossz alakul ki. Amennyiben a két szál egymáshoz képest elcsúszva kapcsolódik ismét össze, akkor hurok képződik. Az ismétlődések száma aszerint nő vagy csökken, hogy melyik szálon alakul ki a hurok. Amennyiben az újonnan szintetizálódó szál képez hurkot, az ismétlődések száma nő; ha a templát szál, akkor csökken a mikroszatellit hossza (Ellegren, 2004). A hosszpolimorfizmus kialakulásának mechanizmusa a 4. ábrán látható.

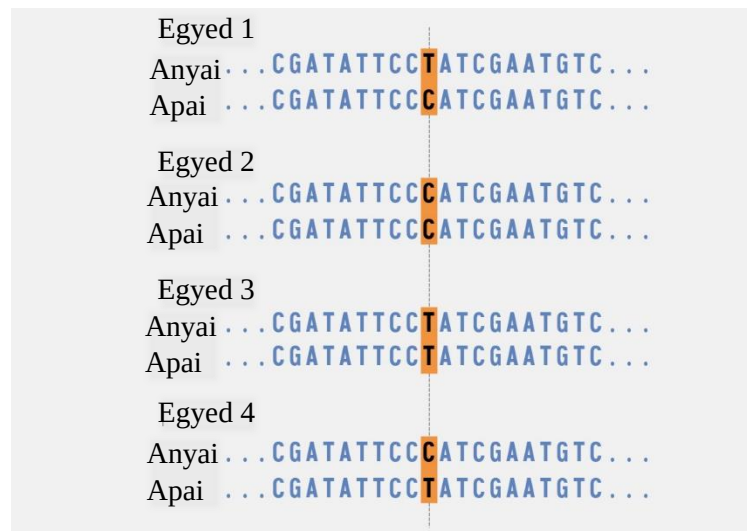


4. ábra. A mikroszatellit kialakulásának mechanizmusa. A polimeráz megcsúsztatása révén változik a mikroszatellit ismétlésszáma. Kép forrása: Ellegren, 2004.

A mikroszatellit a magas polimorfizmus ráta mellett olyan fontos tulajdonságokkal bír, mint a kodomináns öröklés és a közel semleges hatásuk a szelekcióra. Felhasználási lehetőségük közé tartozik a genetikai térképezés, a gének lokalizációja, egyedi azonosítás, illetve apasági vizsgálatok. Populációgenetikai vizsgálatokra is alkalmasak, segítségükkel lehetőség van a migrációs és evolúciós folyamatok megértésére, illetve populációk genetikai variabilitásának megismerésére (Fan and Chu, 2007).

2.5.2. SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Az SNP-k (Single Nucleotide Polymorphism), magyarul egy pontos nukleotid polimorfizmusok a genomban természetesen előforduló szekvencia variációk, amely egyetlen nukleotid megváltozását jelenti a DNS szekvenciájában (5. ábra) (Collins et al., 1998). A legtöbb SNP a genom nem kódoló szakaszain található, amennyiben ezek a bázis polimorfizmusok a DNS kódoló vagy szabályozó régiójában találhatók (ezek a cSNP-k, vagy kódoló SNP-k), akkor gyakran funkcióváltozást eredményeznek (Collins et al., 1998). A nem kódoló szakaszokban található SNP-k bár nincsenek hatással a fenotípusra, de fontos genetikai markerekként használhatóak összehasonlító genetikai, betegségek genetikáját kutató, illetve farmakogenetikai kutatások során (Kim and Misra 2007). Az SNP-k használata mellett szól, hogy nagyobb számban fordulnak elő a genomban, stabilabbak, illetve pontozásuk is jelentősen egyszerűbb, mint a mikroszatellitké (Collins et al., 1998).



5. ábra. SNP bemutatása négy egyed egy pár kromoszómáján (http6).

Bár az egyes szekvencia pozíciókban mind a négy nukleotid előfordulhat, az SNP-k általában két alléllal előforduló polimorfizmusok, amelyek kialakulása tranzíciós és transzverziós mutációs mechanizmuson alapul. Tranzíció során a purin bázisok másik purin bázisra, míg a pirimidin bázisok pirimidin bázisra cserélődnek. Ezzel szemben transzverzió során a purin bázis pirimidinre, a pirimidin bázis purinra cserélődik. Az SNP-k kétszer olyan gyakran alakulnak ki transzverzió következtében, mint tranzíció hatására (Vignal et al., 2002). Annak a kritériuma, hogy a szekvencia egy nukleotidos eltérése SNP-nek legyen tekinthető, hogy a legalacsonyabb frekvenciával rendelkező allél frekvenciája is legalább 1% legyen (Vignal et al., 2002)

2.6 Molekuláris genetikai módszerek

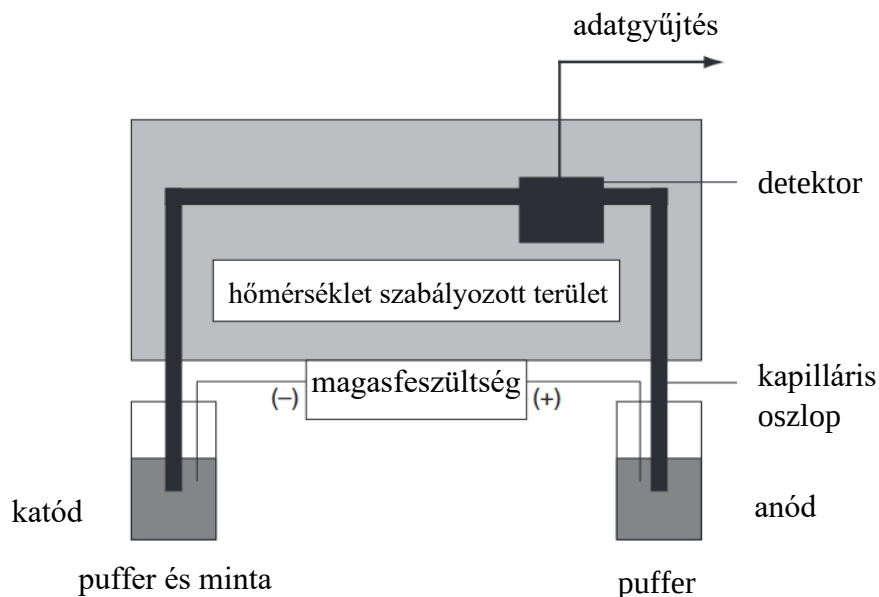
2.6.1 Sanger-szekvenálás

A kutatások során kisebb módosításokkal mostanáig gyakran alkalmazzák a Sanger és munkatársai (1977) által kidolgozott szekvenálási módszert a DNS nukleotid sorrendjének meghatározására. A módszer kidolgozásának alapjául az a megfigyelés szolgált, hogy a 2,3-dideoxinukleotid-trifoszfát gátolja a DNS polimeráz működését, mivel azon nem található szabad 3' hidroxil-csoport, ahová a következő nukleotid be tudna épülni. Sanger az általa kidolgozott szekvenálás első lépésekor a kétszálú DNS szál egyszálúsítását végezte el. Ezt követően az egyszálúsított DNS mintákhoz DNS polimerázt, illetve ^{32}P radioaktív izotóppal jelölt primert adott, majd 4 olyan elegyeket készített, amiben az egyik nukleotid kis koncentrációban, dideoxi formában (ddNTP), míg a másik 3 nukleotid dezoxinukleotid (dNTP) alakban volt jelen. A szintetizálódó szál hossza a dideoxinukleotid beépülésének helyétől függ, mivel ahová beépül a dideoxinukleotid, ott a szál szintézise leáll. Ezt követően

szobahőmérsékleten inkubálta az elegyeket, végül pedig denaturálás után akrilamid gélelektroforézissel választotta el azokat. A módszer 15-300 nukleotid hosszúságú szakasz szekvenálására alkalmas, ennél hosszabb DNS szakaszok meghatározására ezzel a módszerrel úgy van lehetőség, ha a szekvencia meghatározást megelőzően enzimek segítségével több, rövidebb termékekké alakítják az egyetlen hosszú DNS szálát, majd ezen rövid szakaszokat egymástól elkülönítve szekvenálják, ezt követően pedig ezek eredményének illesztésével állapítható meg az eredeti DNS szakasz teljes nukleotid sorrendje (Sanger et al., 1977). A módszer kidolgozásáért Frederick Sanger 1980-ban kémiai Nobel-díjban részesült.

2.6.2 Kapilláris fragmentanalízis

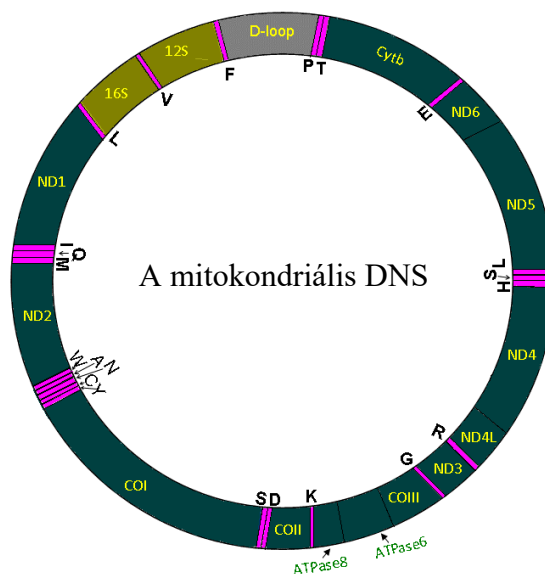
A kapilláris fragmentanalízis egy molekuláris genetikai módszer, amely egy DNS molekula fluoreszcens jelölésén, majd méreetszerinti elektroforetikus elválasztásán alapul, végül belső standardhoz kerül viszonyításra. A fragmentanalízis, mint molekuláris genetikai módszer, olyan különböző módokon használható fel, mint mutációk kimutatására, genotipizálásra, DNS profilozásra, illetve különböző betegségek és kromoszóma rendellenességek azonosítására. Hagyományosan a DNS fragmentumok elválasztása slab gélen történt, amely anyagát tekintve poliakrilamidból vagy agarózból készült. A korábbi módszer előnyei közé tartozott, hogy olcsón, egy gélen akár több minta is elválasztható volt. Negatívuma, hogy több órát is igénybe vehet, illetve a láthatóvá tételhez használt etídium-bromid mutagén hatású. A kapilláris fragment analízis ezzel szemben gyors, érzékeny elválasztást és egyszerű adatkezelést tesz lehetővé (Smith and Nelson, 2003). Fragmentanalízishez olyan primerek használatosak, amelyek fluoreszcens festékmolekulákkal (kék, zöld, piros, sárga) jelöltek. Az elektroforézist megelőzően a fragmentumok amplifikálása PCR-rel történik. Majd ezt követően zajlik a kapilláris elektroforézis, ami a DNS molekulák méret szerinti elkülönítését végzi. A 6. ábrán egy sematikusan ábrázolt, elektroforézishez használatos berendezés látható. A negatív töltésű DNS fragmentumok a pozitív töltésű anód felé vándorolnak, miközben egy lézersugáron haladnak keresztül, ez eltérő hullámhosszon gerjeszti a fragmentekhez kapcsolt festékmolekulákat. A fluoreszcenciát egy kamera detektálja, végül a fluoreszcencia intenzitások digitalizálásra kerülnek (Smith and Nelson, 2003).



6. ábra. A kapillaris elektroforézis vázlatos ábrázolása. Kép forrása: Smith and Nelson, 2003.

2.6.3 Mitokondriális elemzés

A mitokondrium az eukarióta sejtek ATP termelő sejtservecskéje, amely olyan funkciók ellátásáért felelős, mint sejtek energiaháztartása és metabolizmusa, valamint az apoptózis. Felépítését tekintve kettős membránnal rendelkezik, amely egy intermembrán teret zár közre. Kialakulásukat az endoszimbionta elmélettel magyarázzák, mivel a mitokondriumok saját genommal rendelkeznek. Az elmélet szerint az evolúció egy korai szakaszán egy ősi eukarióta sejt bekebelezett egy szabadon élő Eubaktériumot, és a bekebelezett sejt sejtorganellummá vált. Belső membránjuk morfológiája alapján krisztás, tubuláris és vezikuláris formáját lehet elkülöníteni, így feltételezhetően polifiletikus eredetű sejtorganellum, tehát az evolúció során többször történt endoszimbiotikus esemény (Margulis and Bermudes, 1985). Az törzspejlődés során a mitokondriális genomban kódolt gének jelentős része átkerült sejtmagi szabályozás alá, viszont néhány gén megmaradt a mitokondriális genom részeként. A mtDNS kb. 16,6 kb hosszúságú szekvencia, amely kétszálú, cirkuláris formában található meg a mitokondriumok mátrixában. A mitokondriumok replikációja a sejtmagi genom replikációjától függetlenül zajlik. A gerincesek mtDNS-ének replikációjának és a transzkripciójának szabályozásáért a mitokondriális genom kontrol régiója a felelős. Továbbá két riboszomális RNS-t (16S rRNS és 12S rRNS), 22 transzfer RNS-t (tRNS) és 13 fehérjét kódoló szekvencia található az emlősök mtDNS-ében (Harrison, 1989). A mitokondriumban kódolt fehérjék a légzési lánc felépítésében és az ATP szintézisében vesznek részt. A mtDNS szerkezetét az 7. ábra mutatja be.



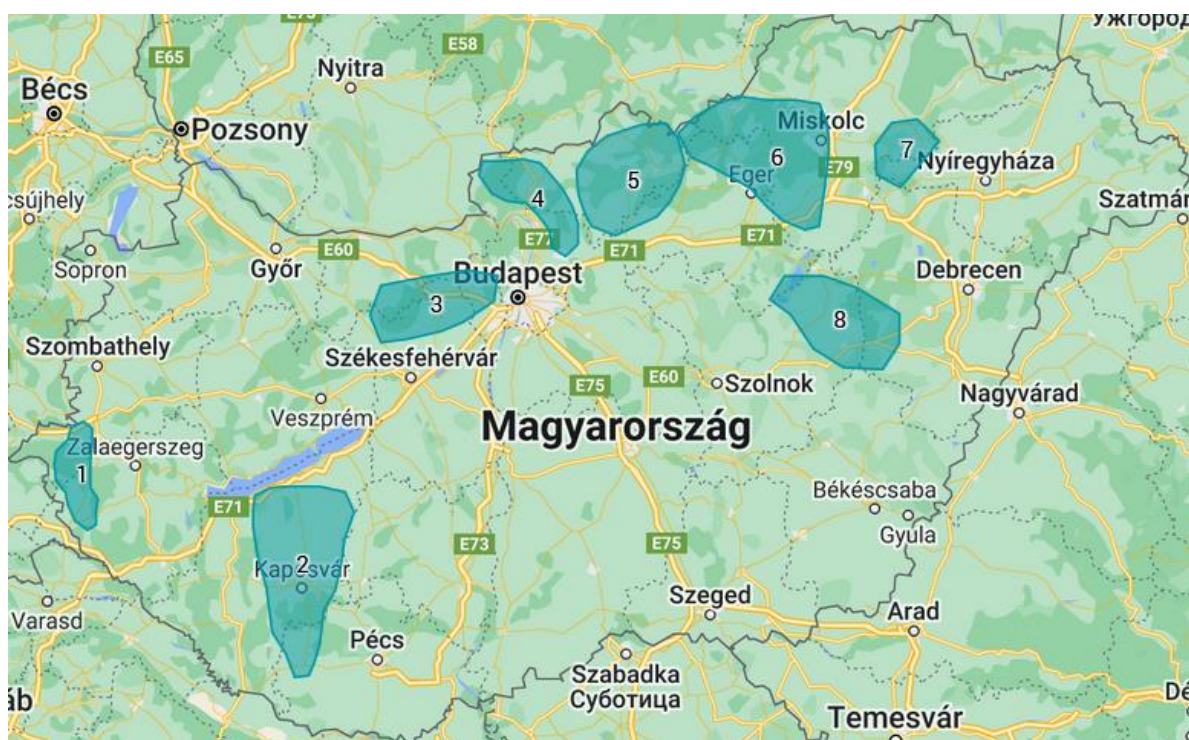
7. ábra. A mitokondriális genom felépítése. Kép forrása: Raju et al 2011.

Fontos sajátossága az emlősök mitokondriumának, hogy jellemzően anyai ágon, haploid formában öröklődnek, néhány kivételes esetben mutat apai öröklődést is (Luo et al., 2018). Egy egyeden belül általában a mitokondriális genom genetikailag uniform, ezt nevezik homoplazmiának. Mivel a mitokondriumok minden szomatikus és ivarsejtben nagy számban vannak jelen, így a mtDNS-ben bekövetkező mutációk általában az egyed teljes mitokondrium-állományának csak egy részét érinti. Heteroplazmia az az állapot, amikor vad típusú és mutáns mitokondriumok egyaránt megtalálhatók egy egyedben (Gustafsson et al., 2016). *In situ* körülmények között a mtDNS rekombinációját nem figyelték meg, viszont a nukleáris genomhoz viszonyítva 5-10-szer gyorsabb mutációs rátával bírnak, amelynek oka, hogy a mitokondriumból hiányoznak azok a hibajavító enzimek, amelyek a sejtmagi DNS replikációjának jelen vannak. Ezen tulajdonságai miatt alkalmas a mtDNS a haplotípus azonosítás révén populációgenetikai vizsgálatok, és különböző betegségekkel összefüggő genetikai változatok azonosítására (Castro et al., 1998). Eckert és munkatársai (2010) a házi macskák és vadmacskák mtDNS kontroll régióját vizsgálva 41 haplotípust azonosítottak, amelyek között 31 polimorf régiót ismertek fel. A vadmacskák és házi macskák között nem azonosítottak átfedő haplotípusokat, 23 haplotípus volt jellemző a házi macskákra és 18 a vadmacskákra (Eckert et al., 2010).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Mintagyűjtés és tárolás

A vizsgálatban 72 macskaféle mintát vizsgáltunk, melyből 16db fenotípus alapján házi macska, mely szövetmintákat az Állatorvostudományi Egyetem munkatársai biztosították számunkra. 56db minta a nemzeti parkok munkatársai által kerültek begyűjtésre 1997. decembere és 2023. októbere között, Magyarország területéről. 43db minta fenotípus alapján vadmacska csoportba lett sorolva a mintagyűjtők által, 13db minta esetében fenotípus alapján nem volt meghatározható a faj. A minták besorolása nem Kitchener et al., 2005 alapján történt. A 8. ábrán látható térképen jelöltem a vadmacska minták származási helyeit. 3 vadmacska minta származási helyéről nem volt információnk. A minták a beérkezést követően egyedi mintaazonosító kódot kaptak, illetve rögzítésre került a gyűjtés pontos helye, időpontja, valamint a feltételezett faj is. A mintákat a laboratóriumba érkezéstől a DNS-izolálás megkezdéséig -20°C-on, egyedileg csomagolva tároltunk.



8. ábra. Magyarország térképén a vizsgálatban résztvevő minták származási helyei.

1. Nyugat-Magyarország (n=4), 2. Dunántúli-dombság (n=1), 3. Budai-hegység (n=12), 4. Börzsöny (n=9), 5. Mátra (n=8), 6. Bükk-vidék (n=14), 7. Zempléni-hegység (n=1), 8. Hortobágy (n=4). Kép forrása: Google Earth.

3.2 DNS-izolálás

A szövetmintákból a genomi és mitokondriális DNS izolálását megelőzően a minták előkészítésekor nagyjából 30mg tömegű szövetdarab került eltávolításra egy erre a célra kijelölt

1,5ml űrtartalmú, jelölt Eppendorf csőbe. A DNS izolálás MagCore® HF16 DNS izoláló robot (RBC Bioscience, Taiwan) segítségével, a szövetből történő DNS-izolálásra alkalmas 401-es kit használatával történt, a gyártó utasításainak megfelelően. A vérmintákból a DNS izolálására szintén MagCore® HF16 DNS-izoláló robot segítségével történt, a vérből DNS-izolálásra alkalmas 101-es kit használatával, a gyártó utasításainak megfelelően. A MagCore® HF16 DNS izoláló robot a 9 ábrán látható. Az izolált DNS-t szövetminta és vérminta esetén is 100µl vízben vettük fel.



9. ábra. A laboratóriumban található MagCore® HF16 DNS izoláló robot, amellyel a DNS tisztítása történt.

Az izolálást követően a DNS minták tisztaságát és koncentrációját spektrofotométerrel (NanoDrop ND1000 Spectrophotometer) ellenőriztük. A mintákat a további vizsgálatok elvégzéséig -20°C-on tároltuk. A DNS mintákat a további vizsgálatok elvégzése előtt 15ng/µl koncentrációra hígítottam.

3.3 Fajhatározás mikroszatellit markerekkel, és a fragmentek analízise

A minták populációgenetikai vizsgálatához 19 mikroszatellit markert használtunk, amelyek részletes adatait a 2. táblázat mutatja be (Menotti-Raymond et al., 1999). A lókuszok felszaporítása 3 multiplex PCR reakcióval történt. Az egyes PCR mixek összemérése 25µl térfogatban történt, 6µl (15ng/µl) mintával. Az egyes lókuszok esetében a forward és reverz irányú primereket primermixként 10 µM koncentrációban alkalmaztuk. A PCR program során 95°C-on 15 percig zajlott a kezdeti denaturáció, amit 30 cikluson keresztül 94°C-on 30 másodperc denaturáció, 58°C-on 30 másodperc annealáció és 72°C-on 1 perc elongáció követett. 60°C-on, 30 percig történt a végső elongáció.

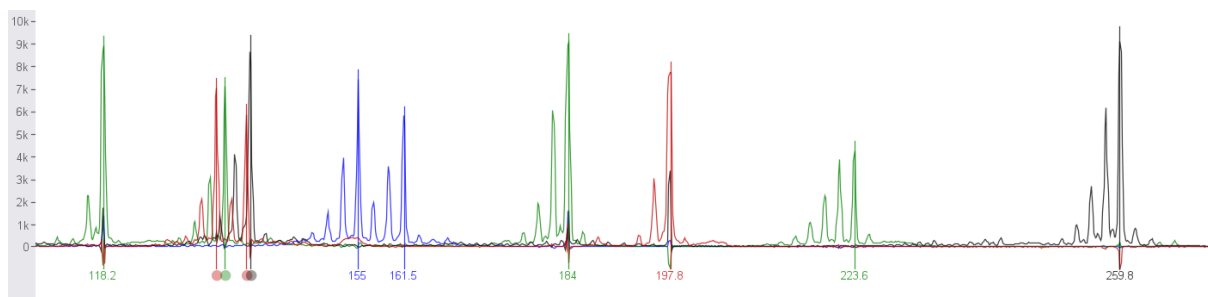
Lókuszt	Jelölés*	Termék hossza (bp)
FCA001	NED	190-212
FCA008	VIC	122-148
FCA023	PET	127-147
FCA043	VIC	116-128
FCA045	PET	146-160
FCA090	6-FAM	93-120
FCA096	VIC	184-224
FCA097	NED	138-148
FCA126	6-FAM	139-145
FCA132	6-FAM	137-153
FCA149	PET	124-132
FCA220	6-FAM	214-222
FCA223	PET	195-227
FCA229	PET	160-170
FCA310	NED	121-137
FCA506	6-FAM	232-258
FCA559	NED	141-195
FCA698	NED	237-267
F115	PET	193-217

2. táblázat. A használt mikroszatellit markerek és a fontosabb információk (Menotti-Raymond et al., 1999). A NED sárga, a VIC zöld, a PET piros és a 6-FAM kék színű festékekkel történt jelölést jelent.

A PCR reakciók eredményességét 1,5%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, reakciónként 5µl-t vittünk fel a gélre 2µl 6xLD (Thermo Fisher, USA) festékekkel és 5µl desztillált vízzel elkeverve. A futás 120V-on 30 percig történt, GeneRuler 100bp+ létrával.

A kapilláris elektroforézist megelőzően a denaturálás érdekében a 100x-os hígítást követően a PCR termékek 1µl-éhez 10,3µl-t mértem Hi-Di formamid és LIZ500 (Gene Scan™-500LIZ™ Size Standard) 33:1 arányú keverékéből.

Az így előkészített minták kapilláris elektroforézisét a Eurofins Biomi Kft. (Gödöllő) laboratóriumában végezték. A futásfájlokat Peak Scanner™ (v1.0, Applied Biosystems) (10. ábra) és Geneious Prime® (Biomatters Ltd.) szoftver segítségével vizsgáltuk meg.



10. ábra. Az 1. mikroszatellit plex futásfájl ellenőrzése Peak Scanner™ szoftver használatával.

A minták genetikai struktúrájának vizsgálatára a Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) modell alapú egyedi genotípusok alapján klaszterező szoftvert használtuk. Kizárólag nem kapcsolt markerekből álló egyedi genotípusadatok felhasználásával Markov chain Monte Carlo (MCMC) algoritmussal modellezi az allélfrekvenciákat. A genetikai strukturáltság analízisét 750 000 MCMC lépéssel és 250 000 lépéses burn in periódussal egytől négyig terjedő K valószínűségi érték mellett, minden értékre 5 független futással végeztem. A program által lefuttatott lehetséges klaszterek közül a legvalószínűbb kiválasztásához a Structure Harvester programot használtam (Earl and vonHoldt, 2012) A vadmacskák csoportjához tartozónak abban az esetben tekintettük az egyedet, amennyiben több, mint 75%-ban genetikailag a vadmacska csoporthoz tartoztak. Házi macskának akkor tekintettük, ha kevesebb, mint 25%-ban hasonlított genetikailag a vadmacskákhoz.

3.4 A mtDNS szakaszok felszaporítása és szekvenálás

A mitokondriális genom 16S rRNS régiójának felszaporítását 5'-AATTGACCTTCCCGTGAAGAGG-3' és 5'-CCTAGGGTAACTTGTTCCGTTG-3' primerpár használatával végeztük, amely kb. 258 bp hosszúságú szakaszt szaporít fel házi macskában és vadmacskában egyaránt (Cossíos and Angers, 2006).

A PCR reakciók 25µl térfogatban zajlottak. A reakció elegyek egyenként 12,5µl DreamTaq Green 2x MasterMix enzimet, 0,5µl 10mM koncentrációjú forward és reverz primert, 6,5µl RNáz mentes vizet és 5µl, 15ng/µl templátot tartalmazott. A PCR program a következőképpen zajlott: kezdeti denaturáció 95°C-on 3 percig, majd 35 ciklus alatt ciklusonként 95°C-on 30 mp-ig denaturáció, 62,5°C-on 30 mp-ig annealáció és 72°C-on 2 percig az elongáció zajlott. A végső elongáció 72°C-on 15 percig történt. A PCR reakció ellenőrzése 1%-os agaróz gél elektroforézissel (120V, 30 perc, GeneRuler 100 bp+ létrával). Pozitív eredményt követően a PCR termékeket szekvenáláshoz visszatisztítottam. A PCR termékek tisztításához

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kitet (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) használtunk a gyártó utasításai szerint.

A tisztított PCR termékek koncentrációját spektrofotométerrel ellenőriztük, illetve 1%-os agaróz gélen (120 V, 30 perc, GeneRuler 100 bp+ létrával) megfuttattuk.

A pozitív mintákon a szekvenáló PCR-t és annak termékeinek kapilláris elektroforézisét a Eurofins Biomi Kft.-nél (Gödöllő) végezték. A visszaérkezett futásfájlokat SeqMan Pro (DNASTar, Inc) és Unipro UGENE 46.0 szoftver segítségével vizsgáltuk meg.

Végül saját eredményeinket összevetettük az NCBI nyilvános adatbázisában megtalálható szekvenciák közül a KJ193070 vadmacska mitokondrium 16S rRNS szekvenciájával.

3.5 Ivarhatározás amelogenin gén segítségével és rokonsági vizsgálat

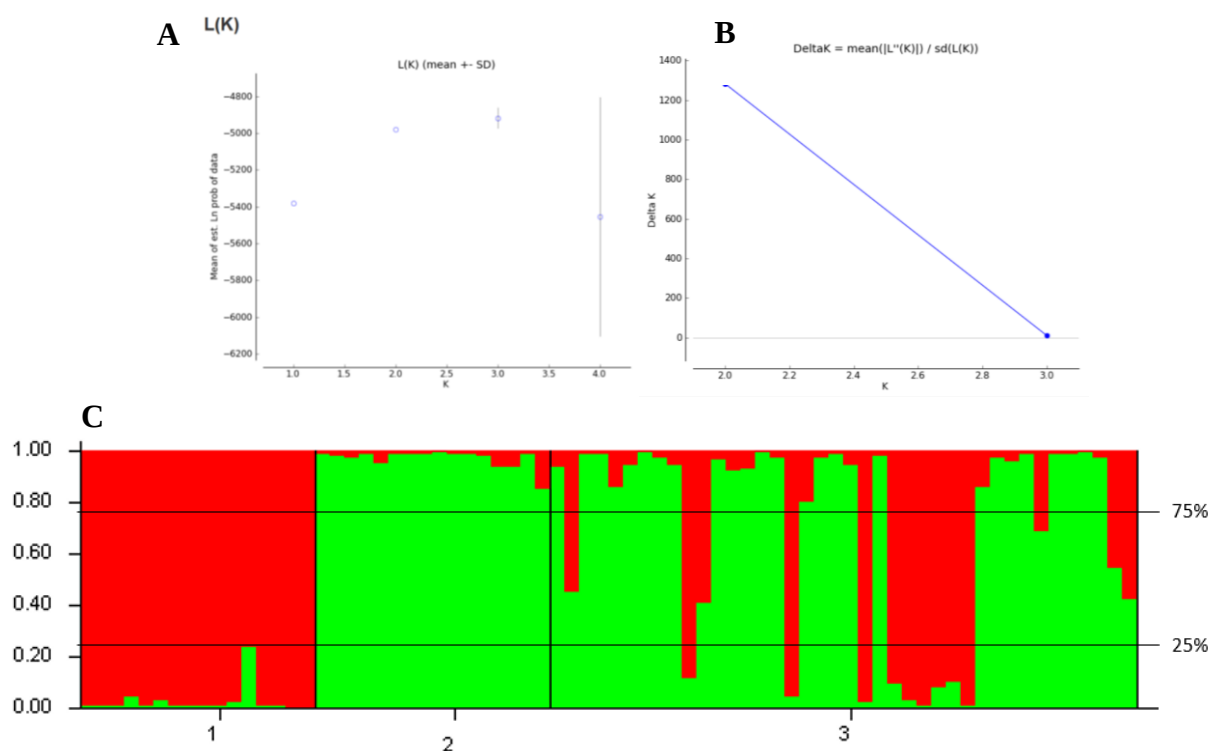
A DNS minták ivarának meghatározását az amelogenin gén segítségével végeztük (Pilgrim et al., 2005). Az ivarhatározó PCR-hez a 5'-CGAGGTAATTTTCTGTTTACT-3' és 5'-GAAACTGAGTCAGAGAGGC-3' primerpárt használtam, amely hím egyedből származó minta esetén két, 194 és 214 bp hosszú terméket ad, míg nőtényekből származó minta esetén egy, 214 bp hosszú termék képződik (Pilgrim et al., 2005). A PCR reakciók 25µl térfogatban zajlottak. A reakció elegyekhez mintánként 12,5µl Multiplex PCR Mixet, 0,25µl forward, illetve szintén, 0,25µl reverz primert, 9µl desztillált vizet tartalmazott, valamint a templátból 3µl-t (15ng/µl) adtunk az elegyekhez. A PCR program során az elődenaturáció 95°C-on 15 percig zajlott, ezt 35 cikluson keresztül 30 másodpercig 94°C-on denaturáció, 55°C-on 30 másodpercig annealáció és 72°C-on elongáció követett. Végül 72°C-on 30 percig a végső elongáció történt. Miután lezajlott a PCR reakció, 5µl termék gélelektroforézisét 2µl 6xLD (Thermo Fisher, USA) festékkel és 5µl desztillált vízzel elkeverve 2%-os agaróz gélen 140V-on 90 percig végeztük, GeneRuler 100bp+ létrával.

A vizsgálatban résztvevő minták rokonsági kapcsolatait a COLONY 2.0.6.7 (Jones and Wang, 2010) szoftver segítségével elemeztük. A program valószínűségi módszer alapján dolgozik, páronkénti valószínűségek alapján határozza meg a szülői és testvéri kapcsolatokat. A szoftver beállításához teljes poligámiát használtunk az anyai és apai oldalról is, és a Best Cluster, Fullsib, Paternity és Maternity eredményeket vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Mikroszatellit lokuszok vizsgálata

A Structure 2.3.4 egyedi genotípusok alapján klaszterező szoftver eredményei alapján végeztük a minták csoportokba sorolását (1 = referencia házi macska, 2 = referencia vadmacska, 3 = vizsgált minták). A klaszterező program a minták kettő csoportra való bontásának ($K = 2$) tulajdonította a legmagasabb átlagos valószínűségi értéket (11. ábra). Így a referencia házi macskák csoportja (pirossal jelölve) egyértelműen elkülönült a vadmacskák klaszterétől (zölddel jelölve). A vizsgált minták között található kilenc olyan egyed, amely kevesebb, mint 25%-ban hasonlít a vadmacskák csoportjához, ezek a minták a vizsgálat alapján házi macskák, valamint öt olyan minta található a vizsgált minták között, amelyik kevesebb, mint 75%-ban hasonlítanak genetikailag a vadmacskákhoz, viszont több, mint 25%-ban tartoznak a házi macskák klaszterébe. Ezt az öt mintát az analízis alapján házi macska és vadmacska hibridjének tekintettük. A vadmacska klaszterbe 26 minta sorolható.



11. ábra. A K értékek valószínűségének logaritmus (‘A’), illetve a K érték változása (‘B’) a Structure 2.3.4 szoftver által készített analízis alapján. A legmagasabb DeltaK ($K = 2$) érték alapján a minták két klaszterre való bontása a legvalószínűbb, ennek az analízisnek az eredménye látható a ‘C’ ábrán. A klaszterező analízisben a számok a csoportokat jelölik: 1 = referencia házi macskák, 2 = referencia vadmacskák, 3 = vizsgált minták. Fajhoz sorolás 75% feletti, illetve 25% alatti valószínűségnél történt.

4.2 Mitokondriális DNS vizsgálata

A mtDNS 16S rRNS régiójának szekvenálását követően 70 szekvenciát tudtunk vizsgálni, 2 mintánál a szekvenálás sikertelen volt. A szekvenciák KJ193070 referencia szekvenciához illesztését követően a 16S rRNS szekvenciákban négy variábilis pozíciót azonosítottunk, ezek az általunk használt 520 bp hosszú KJ193070 referencia szekvencia 294., 323., 371. és 372. pozíciójában voltak megtalálhatóak. A 294. pozícióban található variábilis hely nem mutatott asszociációt sem a vadmacskák, sem a házi macskák csoportjával, így ezt a továbbiakban nem vizsgáltuk. A 16S rRNS szekvenciák vizsgálatakor háromféle haplotípust azonosítottunk, ezek a 3. táblázatban láthatóak.

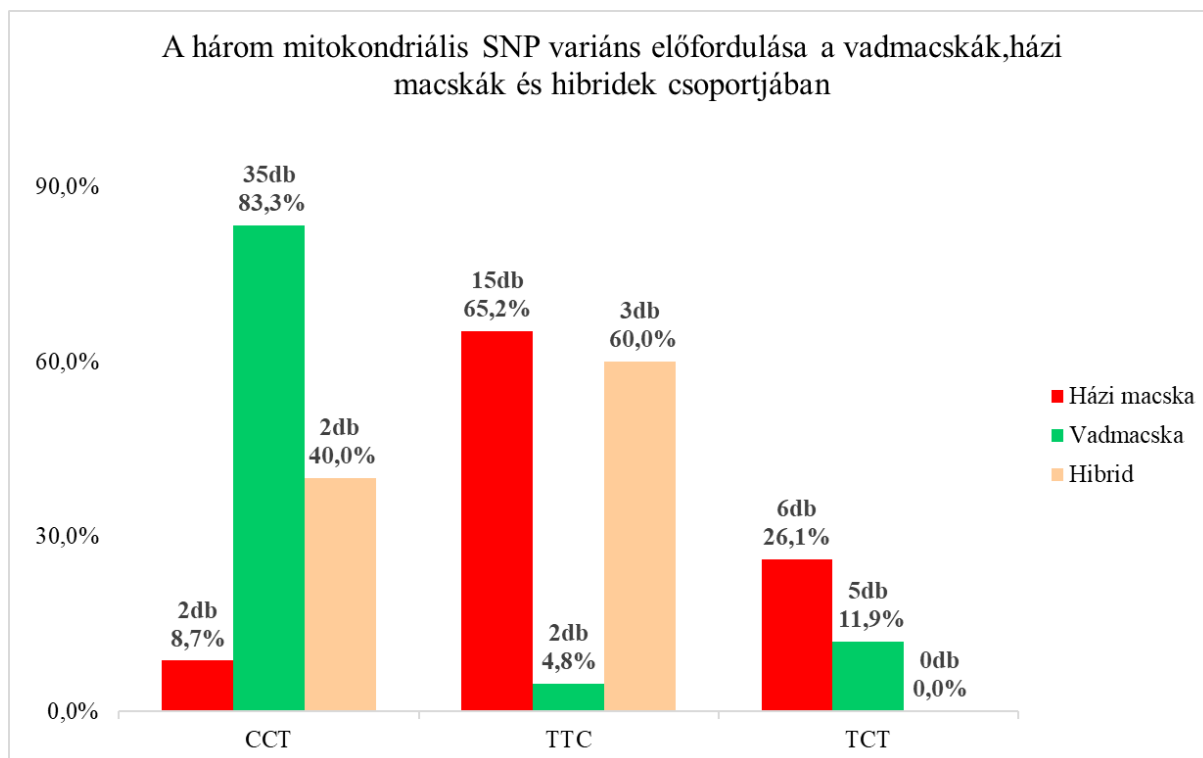
	c.323	c.371	c.372
KJ193070	C	C	T
Haplotípus 1	C	C	T
Haplotípus 2	T	T	C
Haplotípus 3	T	C	T

3. táblázat. A mitokondrium 16S rRNS vizsgálatakor azonosított mitokondriális haplotípusok, melyek az egyes csoportokkal asszociáltak.

Az egyes haplotípusok az általunk vizsgált csoportok (házi macskák, vadmacskák és hibridek) között eltérő gyakorisággal fordultak elő, amelyet a 4. táblázat, és a 12. ábra szemléltet. A 3 haplotípus közül a vizsgálatunkban résztvevő mintákban 2 haplotípus közel magasabb gyakorisággal fordult elő, míg a 3. haplotípus jelentősen kisebb gyakorisággal.

	Házi macskák	Vadmacskák	Hibridek
	Frekvencia	Frekvencia	Frekvencia
Haplotípus 1 (CCT)	0,087	0,833	0,400
Haplotípus 2 (TTC)	0,652	0,048	0,600
Haplotípus 3 (TCT)	0,261	0,119	0,000

4. táblázat. A vizsgált minták genetikai klaszterekbe sorolását követően az egyes haplotípusok frekvenciája csoportonként.



12. ábra. Az általunk azonosított három haplotípus a mtDNS 16S rRNS szekvenciájának 323., 371. és 372. pozíciójában, és azok előfordulása a házi macskák, vadmacskák és hibridek csoportjában (lásd 3. és 4. táblázat). Az oszlopok felett a haplotípusok egyes csoporton belül azonosított darabszáma, alatta a haplotípus frekvenciája a csoportban.

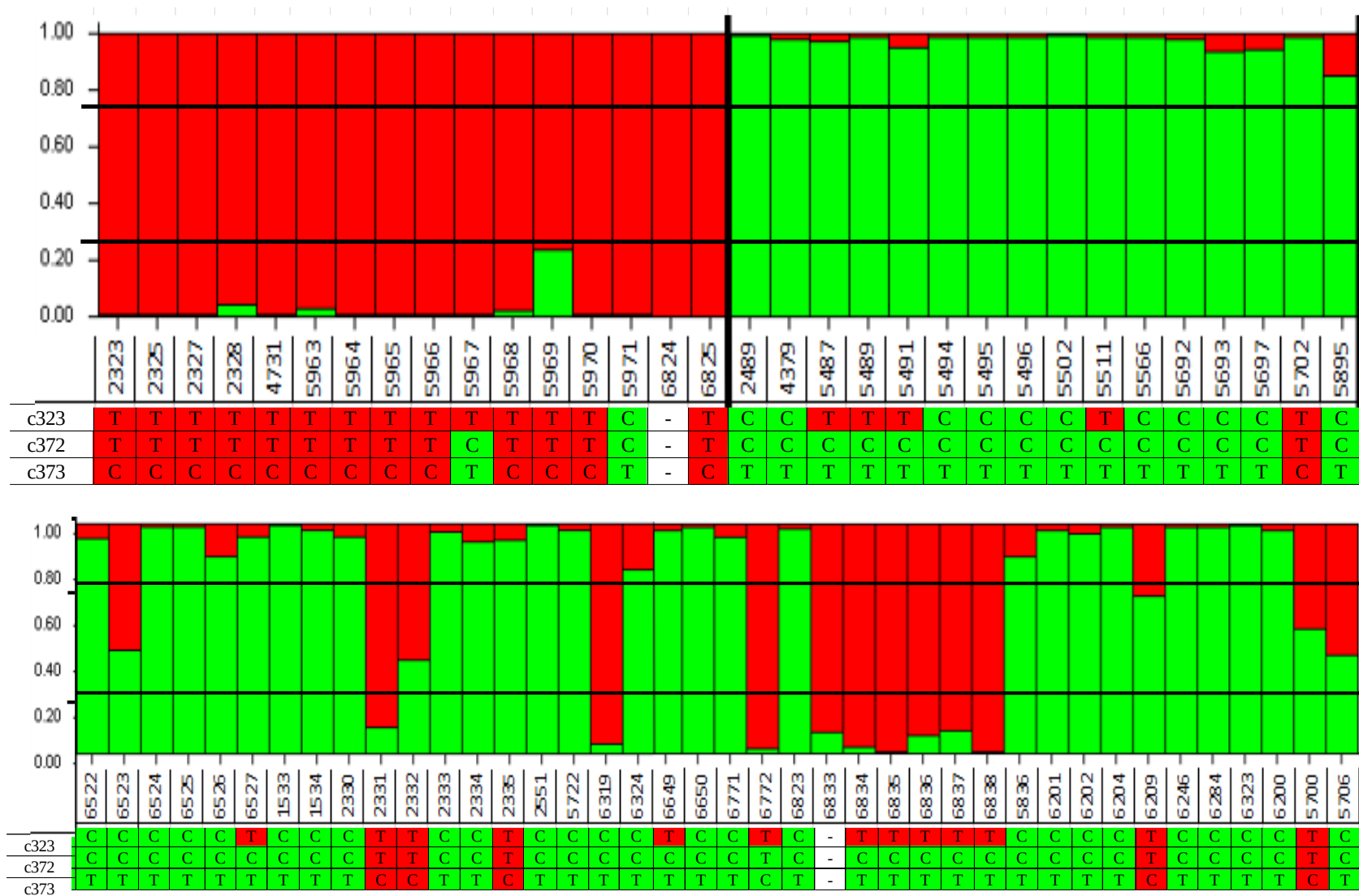
Az 5. táblázatban látható a vizsgálatban résztvevő egyes egyedek mitokondriális genotípusa az általunk azonosított SNP pozíciókban a vadmacskák, házi macskák, valamint a vizsgált minták csoportjában.

A 13. ábrán a klaszterező analízis és a mitokondriális SNP-k eredményének összesített táblázata látható.

Minta azonosító	Pozíció		
	323.	371.	372.
KJ193070	C	C	T
2323	T	T	C
2325	T	T	C
2327	T	T	C
2328	T	T	C
4731	T	T	C
5963	T	T	C
5964	T	T	C
5965	T	T	C
5966	T	T	C
5967	T	C	T
5968	T	T	C
5969	T	T	C
5970	T	T	C
5971	C	C	T
6824	-	-	-
6825	T	T	C
2489	C	C	T
4379	C	C	T
5487	T	C	T
5489	T	C	T
5491	T	C	T
5494	C	C	T
5495	C	C	T
5496	C	C	T
5502	C	C	T
5511	T	C	T
5566	C	C	T
5692	C	C	T
5693	C	C	T
5697	C	C	T
5702	T	T	C
5895	C	C	T

Minta azonosító	Pozíció		
	323.	371.	372.
KJ193070	C	C	T
6522	C	C	T
6523	C	C	T
6524	C	C	T
6525	C	C	T
6526	C	C	T
6527	T	C	T
1533	C	C	T
1534	C	C	T
2330	C	C	T
2331	T	T	C
2332	T	T	C
2333	C	C	T
2334	C	C	T
2335	T	T	C
2551	C	C	T
5722	C	C	T
6319	C	C	T
6324	C	C	T
6649	T	C	T
6650	C	C	T
6771	C	C	T
6772	T	T	C
6823	C	C	T
6833	-	-	-
6834	T	C	T
6835	T	C	T
6836	T	C	T
6837	T	C	T
6838	T	C	T
5836	C	C	T
6201	C	C	T
6202	C	C	T
6204	C	C	T
6209	T	T	C
6246	C	C	T
6284	C	C	T
6323	C	C	T
6200	C	C	T
5700	T	T	C
5706	C	C	T

5. táblázat. A mtDNS 16S rRNS-en található variábilis pozíciók. Bal oldalon felül a referencia házi macska minták, alatta a referencia vadmacska minták, jobb oldalon pedig a vizsgált minták alléljai láthatóak.



13. Ábra. A mitokondrium 16S rRNS szekvenciájában azonosított SNP markerek eredményei a mikroszatellit markerekkel a Structure szoftver klaszterező analízis eredményével összevetve

4.3 Ivarhatározás és rokonsági vizsgálat

Az általunk vizsgált 72db macskaféle minta közül az ivarhatározó PCR elvégzését követően 37 minta bizonyult nőtényből, 34 minta hímből származónak, míg egy minta esetében az ivarhatározás sikertelen volt.

A rokonsági kapcsolatok vizsgálatakor a COLONY program segítségével négy lehetséges testvércsoportot azonosítottuk, ezek a 6. táblázatban láthatóak.

	Lehetséges testvércsoportok						
Valószínűség	Faj	Testvér 1	Testvér 2	Testvér 3	Testvér 4	Testvér 5	Gyűjtés helye
100%	Fs	5487	5489	5491			Bp. Zoo
99,27%	Fs	5494	5495	5496	2551		Miskolc Zoo
100%	Fc	6834	6835	6836	6837	6838	Bükk Nemzeti Park Igazgatóság
100%	Fs	6201	6204				Mezőnagymihály

6.táblázat. A COLONY program segítségével azonosított testvércsoportok valószínűsége, illetve a csoporthoz tartozó minták azonosító kódjai. A fajok rövidítései a következők: Fs = vadmacska, Fc = házi macska

A rokonsági kapcsolatokat megerősíti a gyűjtés ideje és helyszíne, mely a különböző testvércsoportoknál azonos.

4.4 Eredmények értékelése

Több korábbi kutatás során, amelyek célja a vadmacskák állományainak felmérése volt (Lecis et al., 2005, Eckert et al., 2010, Mattucci et al., 2013), alkalmazták a házi macskákra leírt primer párok valamelyikét (Menotti-Raymond et al., 1999), amelyek közül mi is használtunk ezen kutatás során. A klaszteranalízis során a 19 mikroszatellit lokusz használatával elkülönült egymástól a házi macskák és vadmacskák csoportja. Európában a faj különböző elterjedési régiókban eltérő mértékben fordul elő a házi macskákkal történő hibridizáció. Korábbi felmérések alapján Magyarországon jelentősen veszélyeztetni a faj fennmaradását ez a tényező (Pierpaoli et al., 2003, Lecis et al., 2005).

Kutatásunk során az STR markerekkel történt vizsgálat során 72db macskaféle mintát vizsgáltunk. A populációgenetikai vizsgálat során 16 házi macska és 16 vadmacska referencia mintával történt a vizsgált mintáink analízise. A 40db vizsgált minta közül a Structure analízis alapján 26db minta származott vadmacskától és 9db házi macskától. 5db minta bizonyult a két taxon hibridjéből származónak. Az általunk használt mikroszatellit marker-szettel a

hibridizáció F1 szintig állapítható meg, F2 szint felett kevésbé állapítható meg megbízhatóan a hibridizáció megléte. F3 szinttől az SNP markerek megbízhatóbbnak bizonyulnak a mikroszatellittechnél. A fenotípus alapján vadmacskának besorolt 43db minta közül 7db bizonyult a 19 mikroszatellit lokusz alapján házi macskának, ez a fenotípus alapján vadmacska minták 16,28%-a. A fenotípus alapján vadmacska minták 4,65%-a bizonyult az STR markerek alapján hibridnek (2 minta). A fenotípusosan vadmacska minták 79,07%-a, azaz 34 minta bizonyult valóban vadmacskának az STR lokuszok alapján. A fenotípus alapján nem házi macskának besorolt minta (56db) közül 42db volt vadmacska (75%), 9db házi macska (16,1%), és 5db vadmacska és házi macska hibridje (8,9%).

A mtDNS 16S rRNS szekvenciák elemzésekor a mitokondriális szekvenciagenom 16S rRNS referencia szekvencia 323., 371. és 372. pozícióiban 3 olyan SNP markert tudtunk azonosítani, amelyek asszociáltak a minták klasztereivel (lásd 3. táblázat). Ezek között az SNP-k között 3 haplotípust azonosítottunk, amelyek frekvenciája eltérő volt a vadmacskák, házi macskák és hibridek között, illetve a mintákban is eltérő gyakorisággal fordultak elő. A mtDNS 16S rRNS régiójának vizsgálata két esetben sikertelen volt, így 70 vizsgált minta 23db házi macskája közül 2db az 1. haplotípusba (CCT) tartozott (házi macskák 9%-a), 15 minta a 2. haplotípust (TTC) hordozta (ez a házi macska minták 65%-a), míg 6 egyed a 3. haplotípusba (TCT) tartozott (ez a házi macska minták 26%-a). A 42db vadmacskához sorolt mintából 35 hordozta a 1. haplotípust (CCT) (83%), 2 mintában volt megtalálható a 2. (TTC) haplotípus (ez a vadmacska minták 5%-a volt), a vadmacska minták közül 5 hordozta a 3. haplotípust (TCT) (ez a vadmacskák 12%-a volt). A házi macska és vadmacska hibridjeként azonosított 5 minta közül 2 a Haplotípus 1 (40%), míg 3 a Haplotípus 2-t (60%) hordozta. A hibridek között a 3. haplotípust nem azonosítottuk. A mikroszatellit markerek által meghatározott fajsztípus besorolás nem minden esetben egyezik a mitokondriális SNP markerek általi besorolással, mivel egy esetleges fajok közötti kereszteződést követően több generációval a mikroszatellit markerek elkülönítő képessége jelentősen csökken. Két minta (5700 és 5702), amelynél a gyűjtés helye és ideje azonos volt, a mitokondriális szekvencia elemzése során a házi macskákra inkább jellemző genotípust azonosítottuk, ezzel szemben a mikroszatellit markerek eredménye alapján az 5700 a hibridek, míg az 5702 a vadmacskák klaszterébe került besorolásra. Tehát a mtDNS 16S rRNS szekvencia utalhat egy korábbi hibridizációs eseményre.

A testvércsoportok jelenléte megerősíti a mitokondriális genotípus vizsgálatok kapott eredményeket, mivel azoknál a mintáknál, amelyeknél feltételezhető testvéri kapcsolatot sikerült kimutatni, megegyező mitokondriális SNP-k kimutatása valósult meg.

A kutatócsoport macskaféle genetikai munkájából a saját kutatási eredményeim, hogy 18 DNS-t izoláltam szövet és vérmintából, továbbá 16S rRNS vizsgálatot végeztem 72db mintán, valamint 13db STR vizsgálatot csináltam 19 mikroszatellit markerrel. A vizsgált minták ivarát amelogenin gén segítségével határoztam meg. Ezenkívül a klaszterező analízis összeállítását és kiértékelését, valamint a 16S rRNS szekvenciák elemzését és értékelését végeztem.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A Magyarországon fokozottan védett, erdős és füves területhez egyaránt kötődő európai vadmacska (*Felis silvestris silvestris* [Schreber, 1777]) helyzete az elmúlt évszázadban jelentősen leromlott. Fennmaradását az élőhely pusztulása és az orvvadászat mellett a házi macskákkal (*Felis silvestris catus* [Linnaeus, 1758]) történő intenzív hibridizáció is veszélyezteti. Hazánkban a védett fajok hibridei, így a vadmacska hibridek is védettséget élveznek, azonban a faj fennmaradása szempontjából nélkülözhetetlen a fajtiszta vadmacskák azonosítása.

A kutatás során autoszomális lokuszok mikroszatellit markereivel vizsgáltuk a hazánk területéről származó macska mintákat, és végeztük el azok klaszterekbe sorolását. Majd a mitokondriális genom (mtDNS) 16S rRNS régió elemzésekor kerestünk eltérést a vadmacskák és házi macskák szekvenciájában. Végül az amelogenin génre specifikus primerpár használatával a minták ivarának meghatározása zajlott, hogy a minták esetleges rokonsági kapcsolata vizsgálható legyen. 72 mintának határoztuk meg a mikroszatellitek által a genotípusát, a 70 mintának a 16S rRNS régiójának szekvenciáját, illetve 71 minta ivarát. A minták mikroszatellit markerek alapján történő analízisekor a házi macskák és vadmacskák csoportja elkülönült egymástól. 40 vizsgált mintából 26 bizonyult vadmacskának, 9 a házi macskák klaszterével mutatott egyezőséget és 5 mintát hibridként azonosítottunk. A 16S rRNS szekvenciák elemzésekor három olyan SNP-t azonosítottunk, amely asszociált a vadmacskák, vagy házi macskák csoportjával. Ezek az SNP-k a mtDNS 16S rRNS 323., 371. és 372. pozícióiban voltak megtalálhatók. Valamint ezen SNP-k három haplotípusát ismertük fel, amelyek eltérő frekvenciával voltak jelen a mintákban, illetve az egyes csoportok (házi macskák, vadmacskák) között is eltérő gyakoriságot tapasztaltunk. Az ivarhatározó PCR elvégzésével 37 nőstény és 34 hím mintát azonosítottunk. A rokonsági kapcsolatokat célzó vizsgálata során négy testvércsoportot találtunk a mintáink között.

A mitokondriális haplotípusok kevésbé bizonyultak megbízhatónak a fajmeghatározásban az autoszomális markerekhez képest. A mt 16S rRNS CCT haplotípusa 83,3%-os arányban volt jelen a vadmacskákban, míg a TTC haplotípus 65,2%-ban asszociált a házi macskák csoportjával. A fajelkülönítés megbízhatósága további tetranukleotid STR markerek bevonásával növelhető. A hibridizáció detektálása újgenerációs szekvenálási módszerekkel a legmegbízhatóbb, mely során több ezer SNP kerül detektálásra. A fajazonosság meghatározása jelenleg mikroszatellit-markerekre épül, melyekkel pontosabban megállapítható az esetleges hibridizáció, azonban hazánkban a jelenlegi szabályozás alapján a védett fajok hibridjei is védettséget élveznek, így amennyiben a mtDNS eredmény vadmacska anyaságot feltételez, az állat törvényileg visszahelyezhető a természetbe, ám ez természetvédelmi szempontból vitatott.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Åkesson, M., Liberg, O., Sand, H., Wabakken, P., Bensch, S., Flagstad, Ø., 2016. Genetic rescue in a severely inbred wolf population. *Mol Ecol* 25, 4745–4756. <https://doi.org/10.1111/mec.13797>
- Arnold, M.L., Hodges, S.A., 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology & Evolution* 10, 67–71. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)88979-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)88979-X)
- Ballesteros-Duperón, E., Virgós, E., Moleón, M., Barea-Azcón, J.M., Gil-Sánchez, J.M., 2014. How accurate are coat traits for discriminating wild and hybrid forms of *Felis silvestris*? *mammalia* 0. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2013-0026>
- Barton, N.H., 2008. The role of hybridization in evolution: HYBRIDIZATION IN EVOLUTION. *Molecular Ecology* 10, 551–568. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01216.x>
- Barton, N.H., Hewitt, G.M., 1985. Analysis of Hybrid Zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16, 113–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.000553>
- Bastianelli, M.L., Premier, J., Herrmann, M., Anile, S., Monterroso, P., Kuemmerle, T., Dormann, C.F., Streif, S., Jerosch, S., Götz, M., Simon, O., Moleón, M., Gil-Sánchez, J.M., Biró, Z., Dekker, J., Severon, A., Krannich, A., Hupe, K., Germain, E., Pontier, D., Janssen, R., Ferreras, P., Díaz-Ruiz, F., López-Martín, J.M., Urra, F., Bizzarri, L., Bertos-Martín, E., Dietz, M., Trinzen, M., Ballesteros-Duperón, E., Barea-Azcón, J.M., Sforzi, A., Poulle, M.-L., Heurich, M., 2021. Survival and cause-specific mortality of European wildcat (*Felis silvestris*) across Europe. *Biological Conservation* 261, 109239. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109239>
- Berteselli, G.V., Regaiolli, B., Normando, S., De Mori, B., Zaborra, C.A., Spiezio, C., 2017. European wildcat and domestic cat: Do they really differ? *Journal of Veterinary Behavior* 22, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.09.006>
- Beugin, M., Salvador, O., Leblanc, G., Queney, G., Natoli, E., Pontier, D., 2020. Hybridization between *Felis silvestris silvestris* and *Felis silvestris catus* in two contrasted environments in France. *Ecol Evol* 10, 263–276. <https://doi.org/10.1002/ece3.5892>
- Biró, Zs., Lanszki, J., Szemethy, L., Heltai, M., Randi, E., 2005. Feeding habits of feral domestic cats (*Felis catus*), wild cats (*Felis silvestris*) and their hybrids: trophic niche overlap among cat groups in Hungary. *Journal of Zoology* 266, 187–196. <https://doi.org/10.1017/S0952836905006771>
- Biró, Zs., Szemethy, L., Heltai, M., 2004. Home range sizes of wildcats (*Felis silvestris*) and feral domestic cats (*Felis silvestris f. catus*) in a hilly region of Hungary. *Mammalian Biology* 69, 302–310. <https://doi.org/10.1078/1616-5047-00149>
- Breitenmoser U., Lanz T., Breitenmoser-Würsten C., 2019. Conservation of the wildcat (*Felis silvestris*) in Scotland: review of the conservation status and assessment of conservation activities. IUCN SSC Cat Specialist Group

- Castro, J., Picornell, A., Ramon, M., 1998. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 1, 327—332.
- Chan, W.Y., Hoffmann, A.A., Van Oppen, M.J.H., 2019. Hybridization as a conservation management tool. *CONSERVATION LETTERS* 12, e12652. <https://doi.org/10.1111/conl.12652>
- Collins, F.S., Brooks, L.D., Chakravarti, A., 1998. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation: Table 1. *Genome Res.* 8, 1229–1231. <https://doi.org/10.1101/gr.8.12.1229>
- Cossíos, D., Angers, B., 2006. Identification of Andean felid feces using PCR-RFLP. *Mastozoología neotropical*.
- Driscoll, C.A., Menotti-Raymond, M., Roca, A.L., Hupe, K., Johnson, W.E., Geffen, E., Harley, E.H., Delibes, M., Pontier, D., Kitchener, A.C., Yamaguchi, N., O'Brien, S.J., Macdonald, D.W., 2007. The Near Eastern Origin of Cat Domestication. *Science* 317, 519–523. <https://doi.org/10.1126/science.1139518>
- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour* 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Eckert, I., Suchentrunk, F., Markov, G., Hartl, G.B., 2010. Genetic diversity and integrity of German wildcat (*Felis silvestris*) populations as revealed by microsatellites, allozymes, and mitochondrial DNA sequences. *Mammalian Biology* 75, 160–174. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2009.07.005>
- Elledge, A.E., Leung, L.K.-P., Allen, L.R., Firestone, K., Wilton, A.N., 2006. Assessing the taxonomic status of dingoes *Canis familiaris dingo* for conservation. *Mammal Review* 36, 142–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2006.00086.x>
- Ellegren, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5, 435–445. <https://doi.org/10.1038/nrg1348>
- Fan, H., Chu, J.-Y., 2007. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 5, 7–14. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60009-6](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60009-6)
- French, D.D., Corbett, L.K., Easterbee, N., 1988. Morphological discriminants of Scottish wildcats (*Felis silvestris*), domestic cats (*F. catus*) and their hybrids. *Journal of Zoology* 214, 235–259. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1988.tb04719.x>
- Germain, E., Benhamou, S., Pouille, M. -L., 2008. Spatio-temporal sharing between the European wildcat, the domestic cat and their hybrids. *Journal of Zoology* 276, 195–203. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00479.x>
- Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., 2016. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 133–160. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>

- Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution* 4, 6–11. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90006-2)
- Heltai, M., Biró, Z., Szemethy, L., 2006. The changes of distribution and population density of wildcats *Felis silvestris* Schreber, 1775 in Hungary between 1987–2001. *Nat. Conserv* 62, 37–42.
- Jones, O.R., Wang, J., 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10, 551–555. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x>
- Kim, S., Misra, A., 2007. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9, 289–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037>
- Kitchener, A.C., Yamaguchi, N., Ward, J.M., Macdonald, D.W., 2005. A diagnosis for the Scottish wildcat (*Felis silvestris*): a tool for conservation action for a critically-endangered felid. *Animal Conservation* 8, 223–237. <https://doi.org/10.1017/S1367943005002301>
- Krajcarz, M., Krajcarz, M.T., Baca, M., Golubiński, M., Bielichová, Z., Bulatović, J., Csippán, P., Dimitrijević, V., Kysely, R., Makowiecki, D., Marciszak, A., Marković, N., Mladenović, M., Van Neer, W., Obada, T., Živaljević, I., Bulatović, A., Ivanišević, V., Pop-Lazić, S., Mihailović, D., Ostasz, A., Penezić, K., Tasić, N., Špehar, P., Wilczyński, J., Popović, D., 2022. The history of the domestic cat in Central Europe. *Antiquity* 96, 1628–1633. <https://doi.org/10.15184/aqy.2022.128>
- Lecis, R., Pierpaoli, M., Birò, Z.S., Szemethy, L., Ragni, B., Vercillo, F., Randi, E., 2005. Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci: HYBRIDIZATION IN EUROPEAN WILDCATS. *Molecular Ecology* 15, 119–131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02812.x>
- Lozano, J., Virgós, E., Malo, A.F., Huertas, D.L., Casanovas, J.G., 2003. Importance of scrub–pastureland mosaics for wildliving cats occurrence in a Mediterranean area: implications for the conservation of the wildcat (*Felis silvestris*). *Biodiversity and Conservation* 12, 921–935. <https://doi.org/10.1023/A:1022821708594>
- Luo, S., Valencia, C.A., Zhang, J., Lee, N.-C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S.M., Chien, Y.-H., Hwu, W.-L., Fan, P.-C., Wong, L.-J., Atwal, P.S., Huang, T., 2018. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 13039–13044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>
- Margulis, L., Bermudes, D., 1985. Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* 1, 101–124.
- Mattucci, F., Oliveira, R., Bizzarri, L., Vercillo, F., Anile, S., Ragni, B., Lapini, L., Sforzi, A., Alves, P.C., Lyons, L.A., Randi, E., 2013. Genetic structure of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Italy. *Ecology and Evolution* 3, 2443–2458. <https://doi.org/10.1002/ece3.569>
- McKinnell, Z., Wessel, G., 2012. Ligers and tigons andwhat?oh my! *Mol. Reprod. Dev.* 79, Fm i–Fm i. <https://doi.org/10.1002/mrd.22074>
- Mengel, R.M., 1971. A Study of Dog-Coyote Hybrids and Implications concerning Hybridization in *Canis*. *Journal of Mammalogy* 52, 316. <https://doi.org/10.2307/1378675>

- Menotti-Raymond, M., David, V.A., Lyons, L.A., Schäffer, A.A., Tomlin, J.F., Hutton, M.K., O'Brien, S.J., 1999. A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Genomics* 57, 9–23. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5743>
- Molsher, R., Newsome, A., Dickman, C., 1999. Feeding ecology and population dynamics of the feral cat (*Felis catus*) in relation to the availability of prey in central-eastern New South Wales. *Wildl. Res.* 26, 593. <https://doi.org/10.1071/WR98058>
- Nieto-Blázquez, M.E., Schreiber, D., Mueller, S.A., Koch, K., Nowak, C., Pfenninger, M., 2022. Human impact on the recent population history of the elusive European wildcat inferred from whole genome data. *BMC Genomics* 23(1):709. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08930-w>
- Oliveira, T., Urrea, F., López-Martín, J.M., Ballesteros-Duperón, E., Barea-Azcón, J.M., Moléon, M., Gil-Sánchez, J.M., Alves, P.C., Díaz-Ruiz, F., Ferreras, P., Monterroso, P., 2018. Nósténys know better: Sex-biased habitat selection by the European wildcat. *Ecol Evol* 8, 9464–9477. <https://doi.org/10.1002/ece3.4442>
- Otoni, C., Van Neer, W., De Cupere, B., Daligault, J., Guimaraes, S., Peters, J., Spassov, N., Prendergast, M.E., Boivin, N., Morales-Muñiz, A., Bălăşescu, A., Becker, C., Benecke, N., Boroneant, A., Buitenhuis, H., Chahoud, J., Crowther, A., Llorente, L., Manaseryan, N., Monchot, H., Onar, V., Osypińska, M., Putelat, O., Quintana Morales, E.M., Studer, J., Wierer, U., Decorte, R., Grange, T., Geigl, E.-M., 2017. The palaeogenetics of cat dispersal in the ancient world. *Nat Ecol Evol* 1, 0139. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0139>
- Pierpaoli, M., Birò, Z.S., Herrmann, M., Hupe, K., Fernandes, M., Ragni, B., Szemethy, L., Randi, E., 2003. Genetic distinction of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Europe, and hybridization with domestic cats in Hungary. *Molecular Ecology* 12, 2585–2598. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01939.x>
- Pilgrim, K.L., Mckelvey, K.S., Riddle, A.E., Schwartz, M.K., 2005. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Molecular Ecology Notes* 5, 60–61. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00831.x>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155, 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Raju, R., Jian, B., Hubbard, W., Chaudry, I., 2011. The Mitoscriptome in Aging and Disease. *Aging and disease* 2, 174–180.
- Roberts, D.G., Gray, C.A., West, R.J., Ayre, D.J., 2009. Evolutionary impacts of hybridization and interspecific gene flow on an obligately estuarine fish. *Journal of Evolutionary Biology* 22, 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01620.x>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sarmento, P., 1996. Feeding ecology of the European wildcat *Felis silvestris* in Portugal. *Acta Theriol.* 41, 409–414. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.96-39>
- Smith, A., Nelson, R.J., 2003. Capillary Electrophoresis of DNA. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 13. <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1009s13>

Tryjanowski, P., Antczak, M., Hromada, M., Kuczyński, L., Skoracki, M., 2002. Winter feeding ecology of Hím and Nöstény European wildcats *Felis silvestris* in Slovakia. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 48, 49–54. <https://doi.org/10.1007/BF02285356>.

Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A., 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34, 275. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>

http1. International Society for Endangered Cats (ISEC) Canada, 2018. European Wildcat. <https://wildcatconservation.org/wild-cats/eurasia/european-wildcat/>. Utoljára megtekintve: 2023. 04. 18.

http2. The IUCN Red List of Threatened Species. 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Utoljára megtekintve: 2023. 09. 30.

http3. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 2023. Appendices I, II and III, <https://cites.org/sites/default/files/eng/app/2023/E-Appendices-2023-02-23.pdf>. Utoljára megtekintve: 2023. 04. 13.

http4. Védett fajok. 2021. Vadmacska. <https://termeszetvedelem.hu/talalati-oldal/?type=vedett-fajok&id=1764>. Utoljára megtekintve: 2023. 09. 30.

http5. Aigas Field Centre. 2017. Saving Scotland's Highland Tiger. <https://www.aigas.co.uk/saving-scotlands-highland-tiger/>. Utoljára megtekintve: 2023. 04. 13.

http6. National Human Genome Research Institute. 2023. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Single-Nucleotide-Polymorphisms>. Utoljára megtekintve: 2023. 10. 15.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A TDK dolgozatom megírása során számos olyan szakember volt segítségemre, akik nélkül nem készülhetett volna el a dolgozat, ezért hálás köszönet illeti őket. Elsősorban köszönettel tartozom a témavezetőimnek Dr. Stéger Viktornak és Ninausz Nórának, akik szaktudásukkal, tanácsaikkal és türelmükkel támogattak a munkám során. Köszönet illeti továbbá Fehér Pétert, aki témavezetőim mellett segítségemre volt a laboratóriumi munka elsajátításában, valamint tanácsaival hozzájárult a dolgozatom minőségének emeléséhez.

A Bükk Nemzeti Park Igazgatóság területéről származó minták gyűjtésében köszönettel tartozom Gombkötő Péternek a Bükk Nemzeti Park Igazgatóság gerinces zoológiai szakreferensének, illetve a Bükk Nemzeti Park Igazgatóság Természetvédelmi Őrszolgálat munkatársainak. Köszönöm továbbá az Őrségi Nemzeti Park Igazgatóság és a Budakeszi Vadaspark munkatársainak a mintagyűjtést.

Nem utolsó sorban szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Varga László tanár úrnak, aki segítette témaválasztásomat.

8. FÜGGELÉK

Minta azonosító	Faj fenotípus alapján	Faj STR alapján	16S rRNS variábilis pozíciók			Ivar
			108.	156.	157.	
2323	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Nőstény
2325	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Nőstény
2327	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Hím
2328	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Hím
4731	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Nőstény
5963	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Hím
5964	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Nőstény
5965	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Nőstény
5966	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Hím
5967	Házi macska	Házi macska	T	C	T	Nőstény
5968	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Nőstény
5969	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Hím
5970	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Nőstény
5971	Házi macska	Házi macska	C	C	T	Hím
6824	Házi macska	Házi macska	-	-	-	Nőstény
6825	Házi macska	Házi macska	T	T	C	Hím
6524	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
6525	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
1533	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
1534	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
2333	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
2334	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
2489	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
2551	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
4379	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
5487	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
5489	Vadmacska	Vadmacska	T	C	T	Nőstény
5491	Vadmacska	Vadmacska	T	C	T	Hím
5494	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
5495	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
5496	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
5502	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
5511	Vadmacska	Vadmacska	T	C	T	Hím
5566	Vadmacska	Hibrid	C	C	T	Hím
5692	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
5693	Vadmacska	Hibrid	C	C	T	Nőstény
5697	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
5702	Vadmacska	Vadmacska	T	T	C	Nőstény
5722	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
5895	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
6200	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény

6201	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
6202	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
6204	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
6246	Vadmacska	Házimacska	C	C	T	Nőstény
6284	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
6323	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Hím
6324	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
6649	Vadmacska	Vadmacska	T	C	T	Hím
6650	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
6771	Vadmacska	Vadmacska	C	C	T	Nőstény
6823	Vadmacska	Házimacska	C	C	T	Hím
6319	Vadmacska	Házimacska	C	C	T	Nőstény
6833	Vadmacska	Házimacska	-	-	-	Hím
6834	Vadmacska	Házimacska	T	C	T	Hím
6835	Vadmacska	Házimacska	T	C	T	Nőstény
6836	Vadmacska	Házimacska	T	C	T	Nőstény
6837	Vadmacska	Vadmacska	T	C	T	Nőstény
6838	Vadmacska	Vadmacska	T	C	T	Nőstény
5706	Vadmacska	Hibrid	C	C	C	Nőstény
2330		Vadmacska	C	C	T	Nőstény
2331		Házimacska	T	T	C	Hím
2332		Hibrid	T	T	C	Hím
2335		Vadmacska	T	T	C	Hím
5836		Vadmacska	C	C	T	
6522		Vadmacska	C	C	T	Nőstény
6523		Hibrid	C	C	T	Hím
6524		Vadmacska	C	C	T	Hím
6525		Vadmacska	C	C	T	Hím
6526		Vadmacska	C	C	T	Hím
6527		Vadmacska	T	C	T	Nőstény
6772		Házimacska	T	T	C	Hím
6209		Hibrid	T	T	C	Hím
5700		Hibrid	T	T	C	Nőstény

1. Táblázat. Az eredmények összesített táblázata.

2. Ábra. A Structure bemeneti fájl az STR adatokkal.

16S rRNS:

Reagens	1x (μl)
Templát (15ng/μl)	5μl
DreamTaq Green 2x MM	12,5μl
284F primer	0,5μl
284R primer	0,5μl
H2O	6,5μl
Összesen	25μl

95°C	0:03:00	1
95°C	0:00:30	35
62,5°C	0:00:30	
72°C	0:02:00	
72°C	0:15:00	1

STR multiplex PCR:

Feline plex 1:			Feline plex 2:			Feline plex 3:		
Reagens	Konc.	1× (μl)	Reagens	Konc.	1× (μl)	Reagens	Konc.	1× (μl)
Templát	15ng/μl	6	Templát	15ng/μl	6	Templát	15ng/μl	6
Multiplex PCR Mix	2 ×	12,5	Multiplex PCR Mix	2 ×	12,5	Multiplex PCR Mix	2 ×	12,5
FCA023 primer mix	10 μM	0,52	FCA310 primer mix	10 μM	0,2	FCA559 primer mix	10 μM	0,22
FCA043 primer mix	10 μM	0,21	FCA126 primer mix	10 μM	0,52	FCA008 primer mix	10 μM	0,33
FCA096 primer mix	10 μM	0,42	FCA149 primer mix	10 μM	0,48	FCA045 primer mix	10 μM	0,25
FCA097 primer mix	10 μM	0,55	FCA220 primer mix	10 μM	0,5	FCA090 primer mix	10 μM	0,44
FCA132 primer mix	10 μM	0,5	FCA229 primer mix	10 μM	0,26	FCA506 primer mix	10 μM	0,53
FCA223 primer mix	10 μM	0,39	FCA035 primer mix	10 μM	0,33	FCA001 primer mix	10 μM	0,53
FCA698 primer mix	10 μM	0,64	FCA391 primer mix	10 μM	0,42	F115 primer mix	10 μM	0,53
Desztillált víz		3,27	Desztillált víz		3,79	Desztillált víz		3,67
	Összesen	25		Összesen	25		Összesen	25

95°C	15:00	1×
94°C	0:30	30×
58°C	0:30	
72°C	1:00	
60°C	30:00	1×

Ivarhatározó PCR:

Reagens	koncentráció	1× (μl)
Templát	15 ng/μl	3
Multiplex PCR Mix	2 ×	12,5
368_FR	10 μM	0,5
Desztillált víz		9
	Összesen	25

95 °C	15:00	1 ×
94 °C	0:30	35 ×
55 °C	0:30	
72 °C	0:30	
72 °C	_30:00	1 ×

2.Táblázat. A felhasznált PCR protokollok. Felül a mitokondriális 16S rRNS felszaporításához használt protokoll, alatta a mikroszatellit lókuszok vizsgálatához használt multiplex PCR, legalul pedig az ivarhatározáshoz használt PCR protokollja.