

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**Degradált biológiai anyagmaradványok alkalmazhatósága
madárgenetikai és konzervációbiológiai vizsgálatokban**

Esettanulmány a parlagi sas (*Aquila heliaca*)
Kárpát-medencei populációján

PhD értekezés

Vili Nóra

2013

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Hornung Erzsébet
Intézetvezető egyetemi tanár
SZIE, Állatorvos-tudományi Kar
Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Dr. Horváth Márton
Fajvédelmi csoportvezető
Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület

Dr. Kalmár Lajos
Tudományos főmunkatárs
MTA Természettudományi Kutatóközpont
Enzimológiai Intézet

Készült 8 példányban. Ez a .sz. példány.

.....
Vili Nóra

Tartalomjegyzék

Rövidítések és idegen szavak jegyzéke.....	5
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	7
1.1 Természetvédelmi-konzervációbiológiai háttér.....	7
1.2 Molekuláris módszerek a természetvédelemben.....	8
1.2.1 A mintavételi eljárások csoportosítása.....	9
1.2.2 A minták tárolása és minősége.....	11
1.2.3 A vizsgálatok tervezésének ajánlott lépései.....	12
1.2.4 A nem invazív mintavétel alkalmazásakor felmerülő további problémák rövid áttekintése.....	14
1.3 A parlagi sas (<i>Aquila heliaca</i>) bemutatása, természetvédelmi helyzete és vizsgálatának indoklása.....	14
1.4 A munka során vizsgált kérdések, célkitűzések.....	17
1.4.1 Módszertani kérdések.....	17
1.4.2 Populációgenetikai és populációdinamikai kérdések.....	17
2. Anyag és módszer.....	19
2.1 Mintagyűjtés és DNS-izolálás.....	19
2.1.1 Mintagyűjtés és tárolás.....	19
Speciális szűrőpapírra vett vérminták.....	22
2.1.2 A DNS minőségének ellenőrzése.....	22
2.1.3 Az alkalmazott DNS-izolálási módszerek.....	23
DNS izolálás kisózással.....	23
DNS izolálás a nem-destruktív módszerrel vett mintákból.....	25
2.2 Ivarmeghatározás.....	25
2.2.1 Parlagi sas ivari dimorfizmus.....	25
2.2.2 PCR-reakció, ellenőrzés.....	26
2.3 Mikroszatellita fragmensanalízis.....	27
2.3.1 A vizsgált mikroszatellita lokuszok.....	27
2.3.2 PCR-reakciók.....	28
2.3.3 Kapillaris elektroforézis és genotipizálás.....	29
2.4 Használt programok, számítások.....	31
2.4.1 MS Microsatellite Toolkit.....	31
2.4.2 MICRO-CHECKER 2.2.3.....	31
2.4.3 GenAlEx 6.41 – Genetic Analysis in Excel.....	31
2.4.4 zt 1.1.....	32
2.4.5 Genepop 4.0.10.....	32
2.4.6 R.....	33
3. Eredmények.....	34
3.1 Módszertani kérdések.....	34
3.1.1 A DNS minősége a minta típusa szerint.....	34
3.1.2 A toll minőségének, típusának, méretének és korának hatása.....	35
3.1.3 Mikroszatellita lokuszok.....	38
3.2 Populációgenetikai és populációdinamikai eredmények.....	41
3.2.1 A szlovákiai állomány genetikai szerkezete.....	41
3.2.2 Ivararány.....	41

3.2.3	A tojók cserélődési aránya.....	42
3.2.4	A hagyományos terepi territóriumterképezés megbízhatóságának ellenőrzése	46
3.2.5	A terjedési mintázat	49
4.	Megbeszélés	51
4.1	A minták típusának és a tollak fizikai jellemzőinek hatása	51
4.2	A szlovákiai állomány genetikai szerkezete	52
4.3	Éves cserélődési arány a magyarországi állományban	53
4.4	A territóriumterképezési módszer megbízhatóságának ellenőrzése	56
4.5	A terjedési mintázat.....	57
5.	Új tudományos eredmények	59
	Módszertani eredmények.....	59
	Gyakorlatban hasznosítható eredmények	59
6.	Összefoglalás	61
7.	Summary	63
8.	Irodalomjegyzék.....	65
9.	Az értekezés alapját képző tudományos publikációk	83
10.	Függelék.....	87
10.1.	A vizsgált territóriumokban tapasztalt cserék (tojók)	87
10.2.	A territóriumok száma és helyzete 1980 és 2007 között.....	89
10.3.	A terepi territórium-meghatározási módszer rövid ismertetése	90
10.4.	Példák az azonosított egyedek fészkeinek mozgására.....	92
11.	Köszönetnyilvánítás	93

Rövidítések és idegen szavak jegyzéke

allélkiesés: "allelic dropout", kevés vagy nagyon rossz minőségű, töredezett DNS felszaporítása során heterozigótáknál csak az egyik allél sokszorozódik fel, így tévesen homozigótának határozható ("false homozygote")

amplifikálás: DNS szakasz PCR alapú felsokszorozása

DNS-ujjlenyomat, DNS-profil: rövid, ismétlődő, nagy polimorfizmusú, nem kódoló DNS-szakaszok egyedre jellemző mintázata

"false homozygote": allélkiesés miatt tévesen homozigótának határozott egyed

genotipizálási hiba: "genotyping error", a DNS-profil hibás megállapítása amplifikálási vagy detektálási hiba miatt

HWE: Hardy-Weinberg egyensúly

„large allele dropout”: a nagy allélek kiesése, más néven a kis allélek dominanciája ("short allele dominance"); a heterozigóta genotípus rövidebb allélja nagyobb hatásfokkal szaporítható fel

LD: Linkage Disequilibrium, kapcsoltsági egyensúlytalanság

marker (genetikai marker): olyan gén vagy DNS-szekvencia (pl.mikro- és miniszatelliták), amely varabilitása miatt alkalmas fajok, egyedek megkülönböztetésére.

mtDNS: mitokondriális DNS

multiple tube approach: rossz minőségű, töredezett DNS-minták vizsgálatához javasolt módszer, a konszenzus DNS-profil összeállításához több párhuzmos PCR eredményét használják fel

multiplex PCR: több lokusz egyidejű felszaporítása, a reakció során több primerpár van jelen ugyanabban a reakcióelegyben

nDNS: nukleáris DNS

születés (itt kirepülés) utáni helyhűség: "natal philopatry", a felnőtt egyedek visszatérnek születési helyükre

nem invazív mintavétel: az egyedek nincsenek jelen a mintavételnél, a vizsgálatban valamilyen általuk hátrahagyott nyomot használnak fel

NND: Nearest Neighbour Distance, a legközelebbi szomszédos fészkek távolsága

nested PCR: olyan eljárás, amely során a keresett szakaszt két körben szaporítják fel, két pár primerrel, ennek hatására jelentősen kevesebb aspecifikus termék várható

null allél: olyan allél, amely a primerkötőhelyen történt mutáció miatt nem amplifikálható, így az egyedet arra a lokuszra nézve, tévesen homozigótának lehet határozni

PCR: Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció

PI: Probability of Identity, annak az átlagos valószínűsége, hogy a mintából két véletlenszerűen kiválasztott minta többlokuszos genotípusa megegyezzen

primer: rövid, egyszálú, lánckezdő DNS darab (oligonukleotid)

shadow band: a DNS-polimeráz tévesztése miatt keletkező aspecifikus termék, ami a kapilláris elektroforézis után dadogásként jelentkezik; a jelenség megnehezíti annak eldöntését, hogy az egyed homo- vagy heterozigóta az adott lokuszon, így torzíthatja a tényleges homozigóta / heterozigóta arányt

semi-nested PCR: a nested PCR olyan változata, ahol a második körben az egyik alkalmazott primer azonos az első kör egyik primerével

semispecies: olyan populációk, melyeknél a reprodukív izoláció meghaladja az alfaji szintet, de még nem tekinthetők elkülönült, önálló fajoknak

size standard: meghatározott allélhosszúságú DNS-szakaszokat tartalmazó keverék

territórium: a fészeklő pár által aktívan védett terület

touch-down PCR: a PCR specificitása függ a primerek ideális tapadási hőmérsékletétől, magasabb hőmérsékleten nagyobb a specificitás, kevés aspecifikus termék keletkezik; az eljárás során a hőmérsékletet ciklusonként az ideális hőmérsékletig 1-2 °C-kal csökkentve az amplifikálni kívánt termék mennyisége is nő

Tolltípusok rövidítése

GC: nagyfedő (Greater Covert)

P: kézevező (Primary)

PC: kézevező fedő vagy fiókszárny (Primary Covert or alula)

ST: karevező vagy harmadrendű (Secondary or Tertiary)

T: faroktoll (Tail)

SH: vállfedő (SHoulder covert)

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1 Természetvédelmi-konzervációbiológiai háttér

A biodiverzitás védelme napjaink természetvédelmének egyik legfontosabb feladata. Az utóbbi évek vizsgálatai alapján egyértelmű, hogy a hatékony fajvédelmi és konzervációbiológiai munkához elengedhetetlen a fajok minél szélesebb körű és pontosabb ismerete. A veszélyeztetett fajok megőrzéséhez szükséges védelmi intézkedések tervezéséhez tisztában kell lenni viselkedésükkel, táplálkozási, fészkelőhely- és párválasztási szokásaikkal, területigényükkel és azzal, hogy mennyire tűrik az emberi zavarást (Curio, 1996). Az ilyen jellegű információk megszerzéséhez nagy segítséget nyújthat az egyedek jelölése és azonosítása, aminek következtében akár több éven át nyomon követhetők (Taberlet és Luikart, 1999). Az így kapott adatokból a populációkra vonatkozó becslések tehetők, és így lehetőség nyílik a védelmi tevékenység hatásfokának ellenőrzésére is (pl. Bhagavatula et al., 2006).

Az egyedek azonosítására számos módszer ismert. Lehetséges az egyedek mintázata, színezete alapján fotók segítségével, például rákosi vipera (*Vipera ursinii rakosiensis*) egyedeket a fejpajzsaik száma és formája alapján (Halpern és Péchy, 2004), kis termetű ceteket, kardszárnyú delfineket (*Orcinus orca*) a pigmentáltságuk vagy sebhelyeik (Würsig és Jefferson, 1990), szalamandrákat a színezetük (Carafa és Biondi, 2004), jegesmedvéket (*Ursus maritimus*) a bajusszálak tövénél látható pöttyök (Anderson et al. 2010), tigriseket (*Panthera tigris*) a horpaszokról készült felvételek alapján lehet azonosítani (Kawanishi és Sunquist, 2004).

Az egyedi mintázatok keresése mellett az állatok mesterséges jelölése is régóta alkalmazott módszer. Gerinctelenek esetén gyakran használnak vízálló festéket szárnyon, vagy testen, bogarak esetén elterjedt a gravírozás. Gerincesek közül madaraknál a leggyakoribb módszer a gyűrűzés (pl. Danko, 1996), de gyakran használnak krotáliákat (pl. fülön, szárnyon), ami az emlősöknél is sokszor alkalmazott eljárás. A szőrzet és tollazat festése és fehérítése is elterjedt módszer (pl. Nunes et al. 2000). További lehetőség az ujjak, úszók csonkolása, a transzponderek és bőr alá ültethető chipek, valamint a tetoválás. Használhatók radioaktív és kémiai (pl. rodamin b) jelölések is (átfogó leírás, Silvy et al., 2005).

Egyre elterjedtebb az egyedek rádiós (Webb és Shine, 1997; McGrady et al., 2002; Bulger et al., 2003) és műholdas nyomkövetése (Meyburg et al., 1995), de ilyen esetekben általában – gyakran anyagi okokból – csak kis mintaszámmal lehet dolgozni.

Az utóbbi évtizedekben a genetikai azonosítás is előtérbe került (Morin et al., 1994; Arsenault et al., 2005). Számos fajra dolgoztak ki megfelelő marker készletet mind egyedi,

mind populációs szintű vizsgálatokhoz (pl. Martínez-Cruz et al., 2002; Busch et al., 2005; Huang et al., 2005; Bourke és Dawson 2006; Hailer et al., 2006; Mondol et al., 2009; Zenke 2010).

1.2 Molekuláris módszerek a természetvédelemben

A konzervációgenetika a sokféleség szintjei közül a genetikai diverzitással foglalkozik. A ma már rutinszerűen végzett genetikai vizsgálatok eredményeinek felhasználásával a gyakorlatban is hasznosítható eredményekhez lehet jutni. A populációkon belül mért genetikai változatosságból következtetni lehet például arra, hogy mekkora a beltenyésztettség, fennáll-e a sodródás veszélye, illetve a faj vizsgált állományának más populációktól való távolsága is meghatározható. Az ilyen jellegű vizsgálatok felmérhetik, hogy az emberi tevékenység következtében fellépő veszélyeztető tényezők, mint pl. az élőhelyek elvesztése, környezetszennyezés, túlhasználat milyen és mekkora hatással van a populációk genetikai állapotára (O'Brien, 1994; Schwartz et al., 2002; Allendorf et al., 2008).

Kezetben allozimekkel vizsgálták a genetikai variabilitást, és azt kutatták, hogy egy állomány mennyi random mutációt visel (Muller féle genetikai teher). Később arra is próbáltak következtetni, hogy a variancia mintázata adaptív vagy szelektíven neutrális magyarázatot támaszt alá. Az első ilyen vizsgálatok egyikében Bonnel és Selander (1974) elefántfóka (*Mirounga angustirostris*) populációban 24 allozim lokuszt vizsgált, de nem talált polimorfizmust. A tapasztaltakat azzal magyarázták, hogy a vadászat palacknyak-hatást ("bottleneck effect") okozhatott a 18. században. Ezt később más vizsgálatok is megerősítették. Ugyanígy allozimek felhasználásával vizsgálták egy amerikai varangyfaj (*Bufo woodhousii fowleri*) populációjának struktúráját (Hranitz és Diehl, 2000; átfogó írás: O'Brien, 1994).

A polimeráz-láncreakció kidolgozása (Mullis és Faloona, 1987) és a hipervariábilis miniszatellita, illetve később, a mikroszatellita lokuszok felfedezése után, az egyedek ilyen lokuszok polimorfizmusán alapuló egyedi azonosítása is lehetővé vált (Jeffreys et al., 1985a és b; DNS-ujjlenyomat, DNS-profil meghatározás).

A mikroszatelliták a nukleáris DNS nem kódoló régióiban található 2-6 bázispáros nukleotid ismétlődések. Az ismétlődő szakasz hossza alapján lehetnek di-, tri-, tetra-, penta- és hexanukleotidok. Szerepük még nem teljesen tisztázott, de nagy számuk, hosszbeli polimorfizmusuk és jellemzően jó amplifikálóságuk miatt ezeket a lokuszokat régóta használják egyedi szintű azonosításra (Jeffreys et al., 1985b). A módszer alapja, hogy az egyes mikroszatellita szakaszok hossza egyedenként változó lehet, így több ilyen szakaszt vizsgálva, a bázispárokban megadott hosszuk egyedre jellemző mintázatot ad (DNS-ujjlenyomat, DNS-profil).

Az ilyen genetikai vizsgálatok arra is lehetőséget adnak, hogy az azonosított egyedeket a hagyományos jelölés-visszafogásos vizsgálatokhoz hasonlóan hosszú időn keresztül nyomon kövessük (Lukacs, 2005; Lukacs és Burnham, 2005; Peakall et al., 2006). Az így nyerhető információk felhasználásával pontos fajvédelmi programok készülhetnek, illetve a futó programok sikerességének ellenőrzésére, folyamatos monitorozására is lehetőség nyílik. Az ilyen vizsgálatok előnye, hogy az egyedek eleve jelöltek, így a jelölés nem jelent további terhet, azaz nem befolyásolja az egyed túlélését, és az nem veszik el. Ugyanakkor a módszer hátránya, hogy míg a mesterséges jelölések esetén rendelkezésre áll egy lista a lehetséges jelölésekről, addig a DNS-profil meghatározáson alapuló vizsgálatoknál nincs mód egy előzetes lista készítésére. Azaz a lekopott vagy elveszett mesterséges jelölésekhez hasonlóan előfordulhatnak téves azonosítások (a hibás leolvasások és az ezekből eredő azonosítási problémák kiküszöbölésére kidolgozott módszerekről részletesen a 1.2.3. és 1.2.4. fejezetekben lesz szó). A DNS-vizsgálatok továbbá az egyedek ivarának meghatározását is lehetővé teszik. Erre madarak esetében a legtöbb esetben nincs szükség, mivel a hímek és nőstények gyakran nagyon eltérő tollazatúak. Bizonyos esetekben azonban az ivari dimorfizmus nagyon kicsi vagy egyáltalán nem figyelhető meg, így molekuláris módszerekre van szükség az ivar meghatározásához. Madaraknál a tojó a heterogametikus (WZ ivari kromoszómákkal rendelkező) míg a hím a homogametikus ivar (ZZ kromoszómák). Így a W kromoszóma vagy a W kromoszómára specifikus szekvenciák kimutatása alkalmas az ivarmeghatározásra.

Az első W kromoszómához kötődő gént madarakban (CHD1W) 1995-ben (Griffiths és Tiwari, 1995) fedezték fel. Ez a gén a kromo-helikáz DNS-kötő fehérje kódolásáért felel, és a legtöbb fajban előfordul. A csak tojókra jellemző CHD1W génnek van egy mindkét ivarban megtalálható, Z kromoszómán található változata is (CHD1Z). A CHD1 W és Z gének az ivari kromoszómák rekombinálandó pszeudoautoszomális régióin kívül helyeződnek, így meglehetősen konzervatívak, és alkalmasak az ivarok azonosítására. Ellegren és Sheldon (1997), illetve Cerit és Avalus (2007) is arra a következtetésre jutottak a vizsgálataik során, hogy ez a módszer a többihez képest (karyotipizálás, RAPD, RFLP, AFLP, hibridizálás, mini- és mikroszatellita lokuszok vizsgálata) megbízhatóbb és lényegesen kevesebb időt vesz igénybe.

1.2.1 A mintavételi eljárások csoportosítása

A genetikai vizsgálatokhoz szükséges mintákat a begyűjtésükhöz használt módszerek alapján Taberlet és munkatársai (1999) három csoportra osztották. Az első csoportba a destruktív mintavételi módszerek tartoznak, melyek során a begyűjtött egyedek elpusztulnak. A második csoportba sorolták az invazív, de nem destruktív módszereket.

Ehhez szükséges az állatok befogása, de a mintavétel (pl. vér, nyálkahártya, biopszia) után az egyedeket elengedik. A harmadik csoportba tartoznak a nem invazív módszerek, melyeknél az állatok befogása, zavarása nélkül is elérhető hátrahagyott nyomokat (vedlett toll, szőr, ürülék) használnak fel.

Az első két módszer családnál jó minőségű DNS-hez lehet jutni, ám az egyedek elpusztítása, sérülése, valamint a zavarásuk okozta stressz sok esetben nem elfogadható, illetve a felhasználható mintaszám is általában erősen korlátozott (Taberlet és Luikart, 1999). Ilyen fajoknál abban az esetben van lehetőség invazív mintavételre (pl. vérvételre), amikor az egyedek egyébként is kézbe kerülnek (pl. fiókok gyűrűzése, állatorvosi vizsgálat, kezelés).

Mivel a genetikai célú vizsgálatokhoz igen kis mennyiségű minta is elegendő, a vérvétel okozta stressz csökkenthető minimál invazív módszerek alkalmazásával (McDade et al., 2007, Nagy et al., 2010). Ennél az eljárásnál egyetlen csepp szűrőpapírra vett vérből, rövid idő alatt, egyszerű eljárással lehet megfelelő mennyiségű és minőségű DNS mintához jutni. Továbbá a minták tárolása sem igényel külön felszerelést, mivel a papír száradása után akár szobahőmérsékleten is viszonylag hosszú ideig tárolhatóak anélkül, hogy az izolálható DNS minősége jelentősen romlana (Coyne et al., 2004).

A nem invazív mintavételi módszerek kifejlesztése komoly előrelépést jelentett a genetikai vizsgálatokban, hiszen a vadon élő, veszélyeztetett, vagy stresszre érzékeny állatfajok esetében a vizsgálatokhoz szükséges mennyiségű és minőségű DNS-minták begyűjtése gyakran gondot jelent. A nem invazív eljárásokkal a mintaszám jelentősen növelhető, hiszen nincs szükség a vizsgálandó egyed befogására, zavarására. A módszer hátránya, hogy az így begyűjtött minták legtöbbször jelentősen rosszabb minőségűek, mint az állatok befogását igénylő módszerekkel vett minták, és ez jelentősen növelheti a vizsgálatra fordítandó költséget és időt (Taberlet et al., 1999). Ugyanakkor a megfelelő módszerek alkalmazásával a frissen begyűjtött és megfelelően tárolt és kezelt toll, szőr és ürülék általában jó minőségű genetikai mintát szolgáltat.

A nem invazív mintavételekről 2005-ben és 2009-ben írt összefoglaló cikkek alapján (Waits és Patkeau, illetve Beja-Pereira et al.) addig a vizsgálatok során leggyakrabban szőrt és ürüléket használtak fel, de egyre nagyobb a vedlett tollakat felhasználó kutatások száma is. A növekvő tendencia annak is köszönhető, hogy nagyméretű tollak felhasználására új, megbízható protokollok készültek (Horváth et al., 2005; Bayard De Volo et al., 2008). Szőrminták esetén a begyűjtés gyakran szőr csapdákkal történik. Ezek általában valamilyen szőrfogó berendezésből állnak (szögesdrót, ragasztós felületű cső, szalag, hurokcsapda, ragasztószalag pl. Mowat és Paetkau, 2002; García-Alaníz et al., 2010; Sloane et al., 2000; O'Clark et al., 2002/2003; Bremner-Harrison et al., 2006; Zielinski et al., 2006). A csapdákat általában olyan területekre helyezik ki, ahol az állatok gyakran áthaladnak (pl. csapások,

odúk, üregek bejárata). Szőrből a szálak szőrhagyma környékén található sejtjeiből lehet izolálni a DNS-t, így fontos, hogy minél több szál azzal együtt akadjon a csapdába (Reiners et al., 2011). Az egyedi azonosítást azonban megnehezítheti, ha több állat is használja az adott útvonalat. Előfordul, hogy csalit tesznek ki (pl. Foran et al., 1997; García Alaníz et al., 2010), de ez a minta torzítását okozhatja ("trap happiness", vonzódás a csapdákhöz és "trap shyness", csapdakerülés).

Az ürülminták esetén az ürülékkel leváló bélhámsejtekből vonható ki DNS, ugyanakkor az ilyen mintákkal való munkát nehezíti, hogy rendszerint sok táplálékmaradvány, és PCR-gátló anyag is jelen van a mintában. Emellett fontos az emésztőenzimek lehető legrövidebb időn belül történő gátlása a DNS-degradáció megelőzése érdekében (Murphy et al., 2003a és b; Maudet et al., 2004; Nsubuga et al., 2004; Hájková et al., 2006).

Tollak esetén a nem invazív mintavételt megkönnyíti, hogy a levedlett tollak viszonylag könnyen, komolyabb zavarás nélkül begyűjthetők a fészkelő- vagy pihenőhelyek terepi ellenőrzésekor. Emellett a szőr-csapdák mintájára tollcsapdák is alkalmazhatók, amelyek nem befolyásolják jelentősen a madarak viselkedését (Maurer et al., 2010).

1.2.2 A minták tárolása és minősége

A minták eredetétől és típusától függetlenül fontos a begyűjtött minták megfelelő tárolása. Ez ürülminták esetén általában a bontó enzimek jelenléte miatt alkoholban való tárolást, vagy azonnali fagyasztást jelent (Wasser et al., 1997; Murphy et al., 2003a; Roeder et al., 2004). A minták fagyasztása és szárítása mind szőr-, mint pedig tollminták esetén fontos. Roon és munkatársai (2003) azt találták, hogy az így tárolt minták esetén is jelentősen romlott a kinyert DNS amplifikálhatósága a begyűjtéstől számított fél éven belül. Egy házilúd (*Anser anser domesticus*) tollakon végzett kutatás során kiderült, hogy a különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, páratartalom, UV-sugárzás) közül elsősorban a nedves környezet és az ott aktív mikroorganizmusok jelentik a legnagyobb veszélyt a tollakból izolálható DNS-re (Vili et al., 2013).

A tárolás mellett a minták begyűjtéskori állapota döntő jelentőségű. Ürülmintáknál több vizsgálat is kimutatta, hogy a legjobb eredményt a friss és hideg vagy száraz helyen gyűjtött minták szolgáltatják (Farrell et al., 2000; Pigott et al., 2004; Lucchini et al., 2002). Murphy és munkatársai (2003a) megállapították, hogy az idő, a hőmérséklet és a harmatpont fontos tényezők a nukleáris DNS felszapríthatóságában, továbbá, hogy a leolvasási hibák az idő előrehaladtával egyre gyakoribbak lesznek. A mitokondriális DNS esetén a nagyobb kópiaszám miatt ezek a faktorok kevésbé befolyásolják a vizsgálat sikerességét.

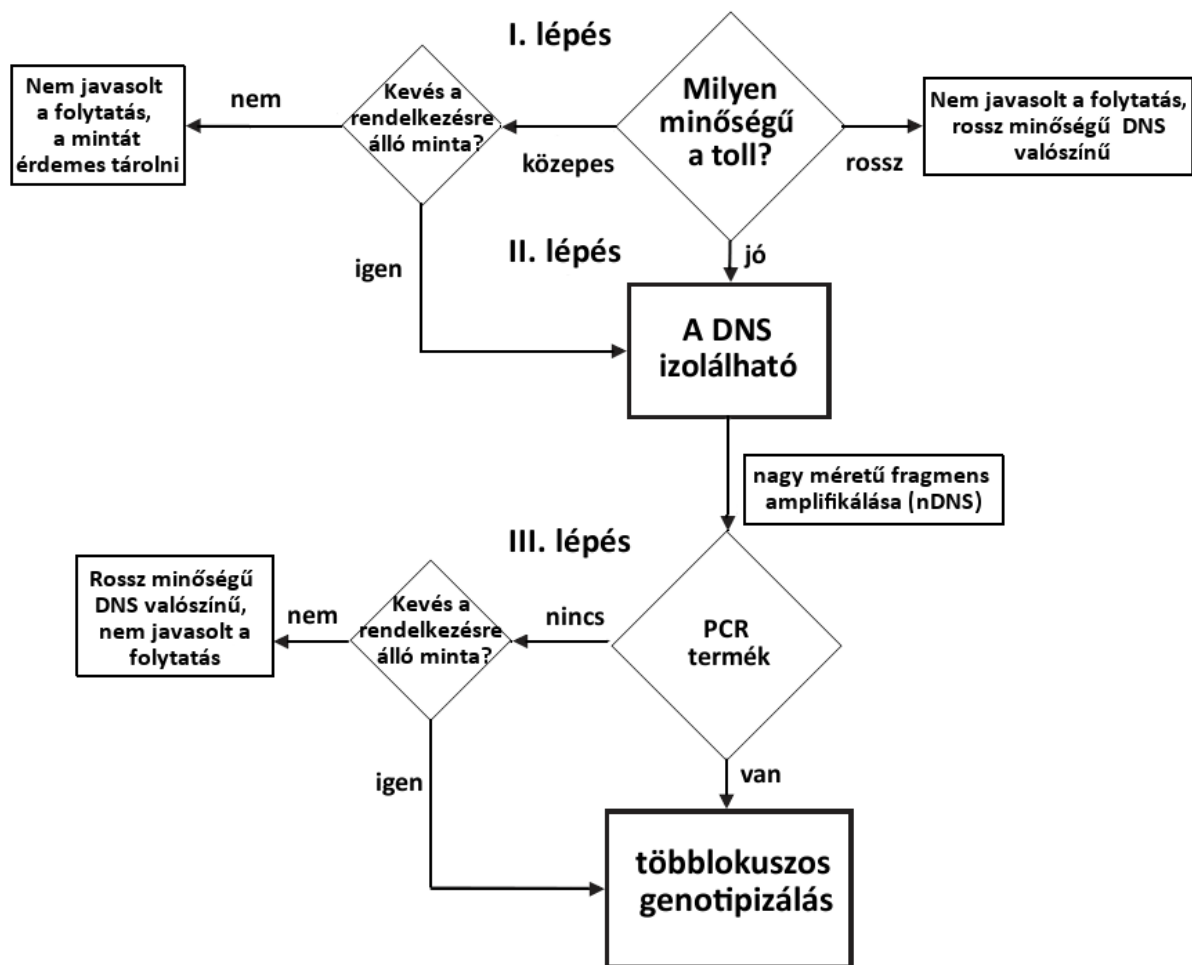
1.2.3 A vizsgálatok tervezésének ajánlott lépései

A minták kontaminációjának elkerülése elsődleges fontosságú. Taberlet és Luikart (1999), javaslata szerint a nem invazív eljárással vett mintákat az ősi DNS-nél szokásos módokon kell kezelni. A vizsgálatok tervezésének kritikus pontjait Beja-Pereira és munkatársai (2009) foglalták össze egy, a nem invazív mintavételi módszerek felhasználási területeivel foglalkozó cikkben. A fő elveket öt pontban gyűjtötték össze, melyek közül az első a minták gyűjtésére és tárolására vonatkozik. Fontos, hogy minden mintát steril körülmények között, megfelelően dokumentálva (gyűjtési időpont, esetleg terepi és időjárási körülmények) tároljanak, és a felhasználásig ellenőrizzék az állapotukat. A második kritikus pont az izolálás steril körülményeinek biztosítása: az izoláló helyiséget vagy fülkét a munka megkezdése előtt legalább egy órán át kell UV-fénnyel megvilágítani, fontos az eszközök megfelelő tisztítása és a negatív kontrollok alkalmazása, illetve annak biztosítása, hogy PCR-termék ne szennyezhesse az izoláló helyiséget. A PCR-ek előkészítésére és kivitelezésére vonatkozó harmadik lépésben hasonlóan kell eljárni, vagyis izolálás után közvetlenül nem szabad a PCR-ek összeméréséhez kezdeni. Itt is fontos a megfelelő sterilitás (UV-fény, hipo – NaOCl, nátrium-hipoklorit – 10%-os oldatával történő lemosás). A lokuszok kiválasztásakor törekedni kell a rövidebb szakaszok kiválasztására (ajánlott 200 bázispárnál kisebb szakaszokat választani), illetve a reakció megfelelő optimalizálására, az esetleges gátlóanyagok megkötésére BSA ("Bovine Serum Albumin") alkalmazásával. Lehetőség szerint filterrel ellátott hegyeket kell alkalmazni és ajánlott gyakran cserélni a kesztyűket is. Nagyon fontos a negatív kontrollok alkalmazása, illetve a párhuzamos reakciók futtatása, így a leolvasási hibák megbecsülhetőek lesznek az adatok kiértékelésekor (Stoneking, 1995; Waits et al., 2005).

A negyedik lépésben a DNS-profilok elkészítésével kapcsolatosan fontos, hogy az allélhosszok leolvasása többször, egymástól függetlenül történjen. Az értékelhetetlen vagy nem egyértelmű mintákat ki kell zárni a vizsgálatból vagy meg kell ismételni.

Végül az adatelemzés során meg kell bizonyosodni arról, hogy az allélek hossza megfelel-e a marker típusának. A null allélek előfordulásának valószínűségét és a Hardy-Weinberg (HWE) egyensúly fennállását is ellenőrizni kell, hogy az allélkiesések detektálhatók legyenek. Fontos a csak egy-két allélban eltérő profilok ellenőrzése és a leolvasásból eredő hibák mértékének becslése. A szükséges számításokhoz számos, az adatok típusától és a vizsgálat céljától függő algoritmust használó számítógépes program áll rendelkezésre (pl. Van Oosterhout et al., 2004; Kalinowski, 2006). A programok egy része a HWE-től való eltérést vizsgálja, mások leszármazási adatok figyelembe vételével próbálják kiszűrni a hibákat.

A kifejezetten tollakra, illetve azon belül a tollak hegyéből izolálható DNS minőségére irányuló vizsgálatok közül Hogan és munkatársai (2008) összefoglalták a minták értékelési szempontjait, illetve ajánlást adtak a DNS minősítésére vonatkozóan (1. ábra). Eredményeik alapján a toll fizikai állapota döntően befolyásolja a kinyerhető DNS minőségét, így csak akkor javasolják közepes minőségű tollak felhasználását, ha kevés a rendelkezésre álló minta. A DNS minősítését egy nagyméretű, nukleáris eredetű DNS-fragmens alapján javasolják, mert várhatóan az annál rövidebb szakaszok is felszaporíthatóak (amennyiben ez az amplifikáció sikeres).



1. ábra: Hogan és munkatársai (2008) által javasolt döntési folyamat annak megállapítására, hogy egy adott toll alkalmas-e többblokuszos genotipizálásra (újrarajzolva és lefordítva a szerző engedélyével)

1.2.4 A nem invazív mintavétel alkalmazásakor felmerülő további problémák rövid áttekintése

Jellemző probléma az egyedi profilok téves leolvasása ("genotyping error"), amit az okozhat, hogy az ilyen mintákból izolált DNS általában nagyon híg és/vagy töredezett. Ilyen esetben gyakrabban fordulnak elő allélkiesések ("allelic dropout"), amelyek miatt egy heterozigóta egyedét homozigótának lehet meghatározni ("false homozygotes", Taberlet és Luikart, 1999). A jelenséget okozhatja, ha például annyira híg a DNS oldat, hogy a pipettázásnál a két allél közül csak az egyik kerül bele a reakcióelegybe, de előfordulhat az is, hogy valamilyen okból az egyik allél nem amplifikálható, például extrém módon töredezett DNS esetén.

Ide kapcsolható az ürülékek felhasználásakor jelentkező nehézség, hogy a mintában táplálékból és baktériumokból származó DNS is jelen van (Bradley és Vigilant, 2002; Broquet et al., 2006). Több vizsgálatban feltételezték, hogy az amplifikálhatóság függ az elfogyasztott tápláléktól (Reed et al., 1997; Farrel et al., 2000), ami egy Murphy és munkatársai (2003b) által végzett vizsgálatban kimutatható volt. Továbbá a minták a táplálék típusától függően, nagy mennyiségben tartalmazhatnak PCR-gátló anyagokat (Monteiro et al., 1997).

A leolvasási hibákból adódó problémák kiküszöbölésére az egyik legtöbbet idézett és elfogadott módszer az ún. "multiple tube approach" ("többcsöves megközelítés") (Navidi et al., 1992; Taberlet et al., 1996), ahol minden mintát több független alkalommal genotipizálnak, és az egyes futtatások eredményéből következtetnek a tényleges genotípusra.

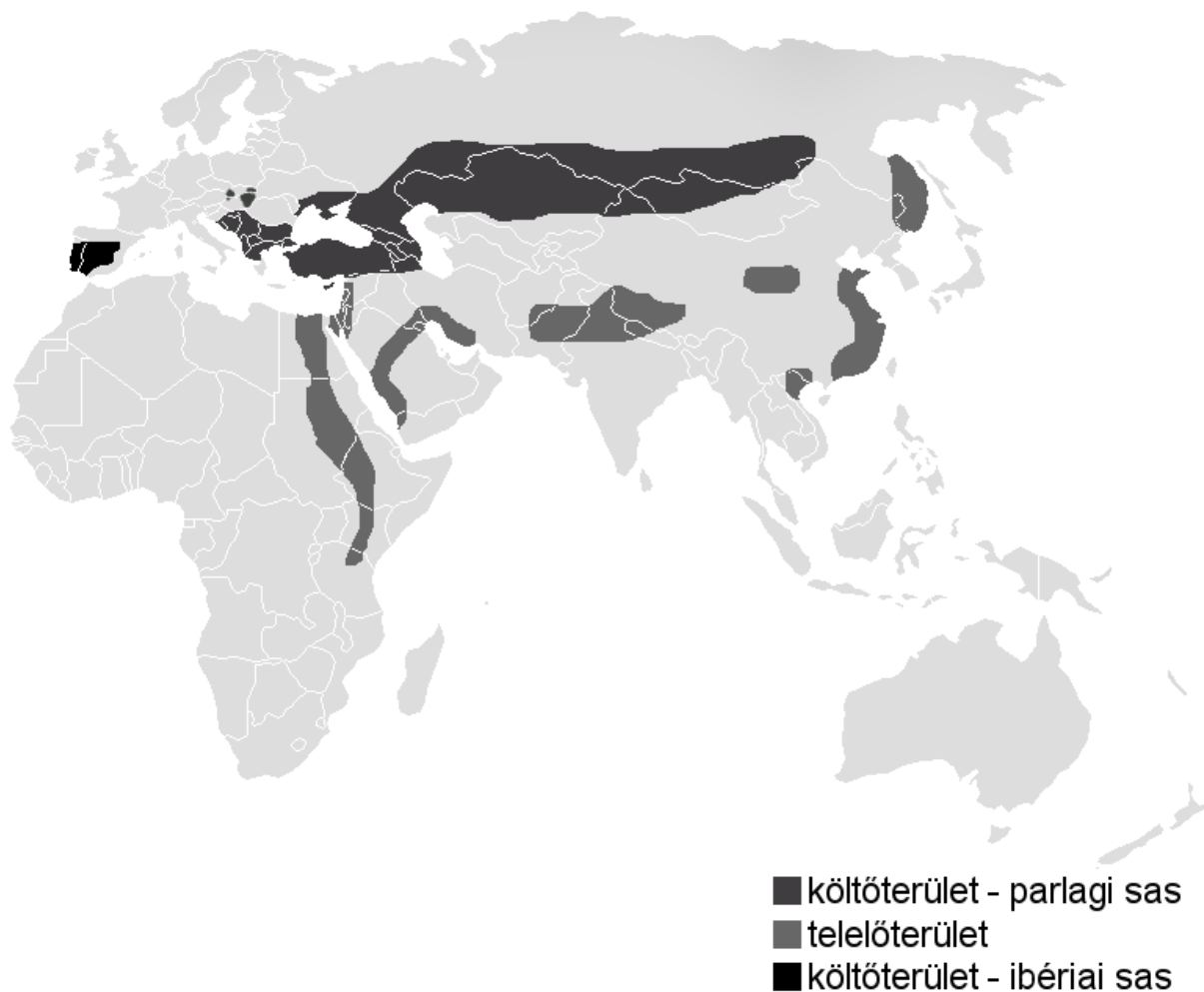
A rossz minőségű vagy nagyon híg mintákból adódó nehézségek kiküszöbölésének egy másik lehetséges módja, hogy két körben történik a minták amplifikálása. Először egy multiplex előzetes PCR történik, amit egy semi-nested PCR követ, így a gyengébb minőségű minták is szolgáltathatnak megfelelő PCR-terméket (Bellemain és Taberlet, 2004).

1.3 A parlagi sas (*Aquila heliaca*) bemutatása, természetvédelmi helyzete és vizsgálatának indoklása

A parlagi sas (*Aquila heliaca*) nagytestű, territóriális faj, mely több nemzetközi természetvédelmi egyezményben kiemelt helyen szerepel (Washingtoni Egyezmény - CITES I. és II. függelék, 1973, Bonni Egyezmény - CMS I. és II. függelék, 1979). A Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) vörös listáján a sebezhető ("vulnerable", VU) kategóriába tartozik. Világállománya kevesebb, mint 15 000 pár, és jelenleg csökkenő tendenciát mutat. Magyarországon fokozottan védett, természetvédelmi értéke egyedenként egymillió forint.

A faj nagyon érzékeny az emberi zavarásra, különösen a költési és fiókanevelési időszakban. Egy tanulmány (Kovács et al., 2005) szerint 2003 és 2005 között a tojásos korban meghiúsuló költések 13%-ában, és a fiókás korban meghiúsuló költések 4%-ában bizonyítható volt okként az emberi zavarás. Nagy valószínűséggel az ismeretlen okok közt is főleg ez a tényező a legkomolyabb hatású. A felnőttkori mortalitás legfontosabb ismert okai az áramütés (16%) és a mérgezés (9%).

Elterjedési területe Közép- és Délkelet-Európától egészen Közép-Ázsiáig húzódik (2. ábra). Európában jelenleg három, többé-kevésbé elszigetelődött populációt különböztethetünk meg: a Kárpát-medenceit, a Balkán-félszigetit és a Kelet-európai-síkságait. Az ázsiai területen élő parlagisas-populációk Kis-Ázsiában, a Kaukázusban, Nyugat-Ázsiában (Kazahsztán, Oroszország) és a Távoll-Keleten (Oroszország Bajkál-tó környéki területei) találhatóak (Horváth et al., 2002).



2. ábra: A parlagi sas (*Aquila heliaca*) és az ibériai sas (*Aquila adalberti*) elterjedési területe (a kép forrása:http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Aquila_heliaca_dis.PNG)

A parlagi sas egy kazahsztáni populációján végzett vizsgálat alapján genetikailag és szociálisan is monogám faj (Rudnick et al., 2005). A fiókák nevelésében mindkét szülő részt vesz, de a főleg a hímek vadásznak, és a tojók a költési időszakban csak kis időt töltenek a fészektől távol.

A Kárpát-medencében számuk 140 pár körül van, de az állomány elterjedése nem egyenletes. A Szlovákia keleti és a nyugati részén fészkelő párokat nagyjából 150 km, míg a Magyarországon élőktől kb 70 km választja el egymástól. Fiatal (immatur) madarak esetében a két terület között tapasztaltak átjárást (Danko, 1996; Horváth és Kovács, 2009), de egyelőre nincs bizonyítottan olyan eset, amikor az egyik területen kirepült egyed a másik szubpopulációban kezdett költésbe.

A magyarországi állomány a XX. század közepére 15-20 párra csökkent, és az 1980-as évek végéig az Északi-középhegységbe visszaszorulva élt. Az 1990-es évek elején, valószínűleg a mezőgazdasági művelésben bekövetkezett változásoknak és az aktív fajvédelmi munkának köszönhetően, számuk emelkedésnek indult (Bagyura et al., 2002), és a sík területek felé kezdtek terjeszkedni. Ennek következtében a parlagi sasok ma hazánkban kétféle élőhely-típusban költenek. Egyrészt a középhegységekben megmaradtak a korábban használt költőterületek és viszonylag állandó a fészkek száma, másrészt a síkvidéken az 1989-es megjelenésük óta folyamatos egyedszám-növekedés tapasztalható. Jelenleg a hazai költőállomány több mint száz pár, melynek közel háromnegyed része síkvidéki mezőgazdasági környezetben fészkel (Horváth et al., 2011). A Kárpát-medencében költő öreg madarak a költőterület közelében telelnek, míg a fiatal madarak ivarérikig kóborolnak a Kárpát-medencében (elsősorban az Alföldön), valamint Délkelet-Európában és a Közel-Keleten.

Legközelebbi rokona az ibériai sas (*Aquila adalberti*) az egyik legjobban kutatott ragadozómadár-faj. A hagyományos terepi megfigyeléseken alapuló vizsgálatok mellett rádiótelemterias adatok alapján vizsgálták a faj párválasztási, fiókanevelési szokásait (pl. Ferrer, 1993a; Ferrer és Penteriani, 2003; Penteriani és Ferrer, 2004; Margalida et al., 2007); a kirepült fiatalok diszperzióját (Ferrer, 1992; Ferrer, 1993b) és populációdinamikai, demográfiai jellemzőket (pl. Ferrer és Penteriani, 2008; Penteriani et al., 2008; Ortega et al., 2009). A kutatások alapján legfontosabb mortalitási tényezők az ibériai sasnál is az elektromos távvezetékek okozta áramütés, illetve a mérgezés. Kimutatták, hogy 1990 óta az elhullott és megtalált egyedek több mint 50%-a lett mérgezés áldozata. Ennek következtében a populáció éves mortalitása 6,07%-ról 12,01%-ra nőtt (Ferrer és Penteriani, 2008).

Az ibériai sast sokáig a parlagi sas spanyol alfajaként tartották számon. Ma a legtöbb leírásban önálló fajként kezelik, amit ökológiai, morfológiai, parazitológiai és genetikai vizsgálatok is alátámasztanak (Hiraldo et al., 1976; Martín-Mateo, 1980; Ferrer, 2001; Martínez-Cruz et al., 2004). Ugyanakkor Gonzalez (2008) a "fél-faj" ("semispecies")

besorolást tartja elfogadhatónak kutatásai és részben az előzőekben említett vizsgálatok, illetve a faji besorolás kritériumai (Helbig et al., 2003) alapján.

Miután az ibériai sasra 18 dinukleotid mikroszatellita markert dolgoztak ki (Martínez-Cruz et al., 2002) a faj populációgenetikai vizsgálata is lehetővé vált (Martínez-Cruz et al., 2004; Martínez-Cruz et al., 2007) és a vizsgált lokuszok a közeli rokonság miatt a parlagi sasnál is alkalmazhatóak.

A Kárpát-medencei parlagi sas populáció kutatása tehát egyedülálló lehetőségeket biztosít arra, hogy egy veszélyeztetett faj terjedését, illetve annak populációgenetikai és populációdinamikai hatásait megvizsgálhassuk és nyomon követhessük a Magyarországon folyó intenzív fajvédelmi tevékenység eredményességét is.

1.4 A munka során vizsgált kérdések, célkitűzések

A munka során vizsgált kérdések két csoportra oszthatóak. Az elsőbe a minták típusára, a DNS-izolálásra, illetve a kinyert DNS minőségére vonatkozó módszertani kérdések, míg a másodikba a genetikai adatok gyakorlatban történő alkalmazásával megválaszolható kérdések tartoznak.

1.4.1 Módszertani kérdések

1. Mennyire tér el a nem invazív módon vett, vedlett tollakból izolálható DNS minősége a minimál invazív módon, szűrőpapírra vett vérmintákból izolálhatóétól?
2. Mennyire befolyásolják az izolálható DNS minőségét a tollak fizikai jellemzői (minőség, típus, kor és méret)?
3. Van-e olyan könnyen vizsgálható paraméter, amely alapján következtetni lehet a felső köldökből izolált DNS fragmentáltságára?

1.4.2 Populációgenetikai és populációdinamikai kérdések

1. Mennyire alkalmas a választott mintavételi módszer és a rendelkezésre álló markerkészlet a Kárpát-medencei parlagi sasok populációgenetikai, illetve populációdinamikai vizsgálatára?

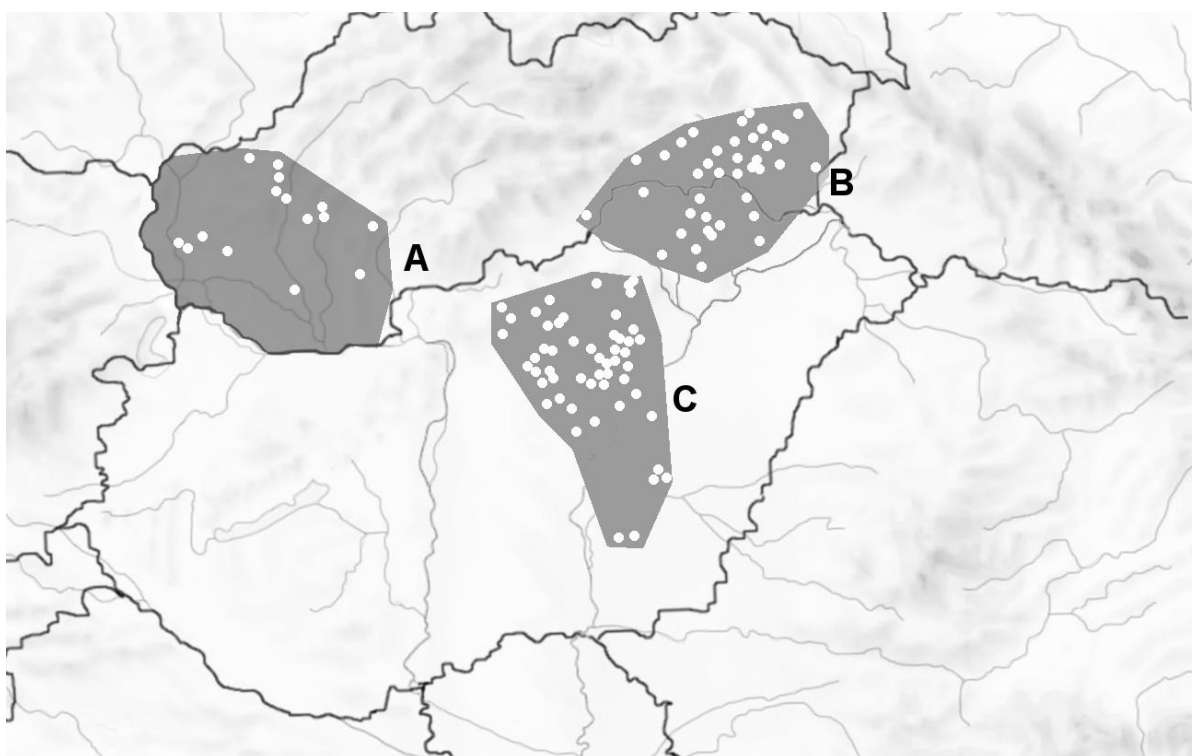
2. Egységesnek tekinthető-e a szlovákiai parlagi sas populáció nukleáris és mitokondriális markerek alapján? Megfigyelhető-e génáramlás a keleti és nyugati területek között?
3. Mekkora az éves mortalitás, illetve ha ez nem vizsgálható, az éves cserélődési arány a Magyarországon fészkelő állományban?
4. Megfelelőek a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület által alkalmazott territóriumtérképezési módszerek a növekvő parlagi sas állományban a territóriumok alakulásának nyomon követésére?
5. Milyen mintázat figyelhető meg az alföldi területekre visszatelepülő parlagi sasok territórium-választásában?

2. Anyag és módszer

2.1 Mintagyűjtés és DNS-izolálás

2.1.1 Mintagyűjtés és tárolás

A vizsgálat során a Magyarország keleti területein levő territóriumokból, illetve Szlovákia keleti és nyugati területein fészkelő állományokból származó mintákat vizsgáltunk (3. ábra).

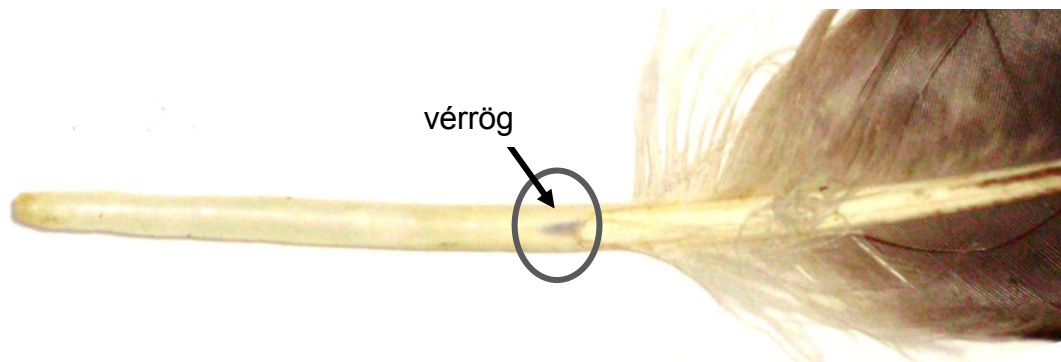


3. ábra: A kutatás során vizsgált minták származási helye. A – nyugat-szlovákiai állomány, B – kelet-szlovákiai és észak-magyarországi állomány, C – kelet-magyarországi állomány (Ábra: Szabó Krisztián)

A Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME) és a Szlovák Ragadozómadár-védelmi Egyesület (RPS) munkatársai rendszeresen ellenőrzik a parlagi sasok fészkeit és a költéseket, valamint ők végzik a fiókák gyűrűzését is. A gyűrűzés a felnőtt madarak vedlési idejével esik egybe, ezért ilyenkor általában nagy mennyiségű, frissen kihullott tollat lehet a fészkek és az ismert kiülőfák körül összegyűjteni. Mivel a faj a fiókák kirepüléséig fokozottan territoriális, az ebben az időszakban a fészkek alól, illetve

közvetlen közeléből begyűjtött tollak nagy valószínűséggel az adott territóriumban költő párhoz tartoznak. A kiülőfák közelében, illetve a territórium más részein talált tollak esetén ez a valószínűség csökken. A kihullott tollak a vedlést követően, az időjárási körülményektől függő sebességgel degradálódni kezdenek. Kísérletek bizonyítják (Vili et al., 2013), hogy meleg, párás környezetben a tollak napok alatt jól láthatóan károsodnak, ezért annak a valószínűsége minimális, hogy egy előző évből maradt toll azéviként kerüljön nyilvántartásba.

A tollakat begyűjtés után egyedi azonosítóval láttuk el, majd lemértük a zászló és cséve hosszát, illetve a felső köldök magasságában a cséve átmérőjét (4. ábra). Ez a tollak későbbi azonosítása miatt is fontos, mert a jelölés lekophat. Az azonosító a territórium kódjából, a gyűjtés évéből és egy sorszámából áll, pl. HS-17/2002/2, ami a Hevesi-sík 17-es számú territóriumából származó, 2002-ben másodikként lemért és katalogizált tollat jelenti.



4. ábra: A felső köldök (bekarikázva), és azon belül a vérrög elhelyezkedése a csévén, a zászló tövénél (nyíllal jelölve)

A tollakat állapotuk szerint három kategóriába soroltuk. Jó minőségűnek (2) azokat a tollakat vettük, amelyeknél a cséve és a felső köldök is jó állapotban volt. Közepes (1) kategóriába kerültek azok, ahol a csévén már látható volt fizikai károsodás, de a felső köldök nem vagy alig sérült. Rossz (0) minőségűnek soroltuk be a tollakat, ha a csévét és a felső köldököt is komolyabb fizikai hatás érte (5. és 6. ábrák).



5. ábra: Példa a három minőségi kategóriába tartozó tollakra. A "0" a leggyengébb, az "1" a közepes és a "2" a jó minőségi kategóriát jelenti. A képen látható tollak különböző típusúak, nem méretarányosak.



6. ábra: A három minőségi kategóriába tartozó tollak csévéje a felső köldök magasságában (a felső köldök nyíllal jelölve látható).

A cserék arányára, illetve a territóriumterképezésre vonatkozó vizsgálatban a fészkek kiválasztásakor elsődleges szempont volt, hogy legalább három egymást követő évből legyen az adott territóriumról gyűjtött toll. Mivel rendszeres gyűrűzés és ezzel egybekötve a vedlett tollak gyűjtése csak az állomány keleti részében folyik, ezért innen válogattam fészkeket. Mivel a vizsgálatok során különböző eredetű, korú és állapotú minta gyűjthető, a

vizsgálathoz minden alkalommal a toll típusát, méretét és minőségét figyelembe véve, a három legalkalmasabb tollat választottam.

A vizsgálat során a kézevező fedőket és vállfedőket összevontan kezeltük (1. táblázat), mivel ebben a két típusban a cséveátmérők és –hosszok megegyeztek (Welch-próba: cséveátmérő – $t = -0.5963$, $df = 93$, $p = 0.5524$; csévehossz – $t = 1.648$, $df = 93$, $p = 0.1024$; r v.2.12.1).

1. táblázat: A tollak megoszlása típus és minőség szerint. A táblázatban a kézevező fedők és vállfedők összevontana szerepelnek.

tolltípus	tollminőség (db)				cséveátmérő (mm)
	jó	közepes	rossz	összesen	
elsőrendű evezőtollak	122	23	1	146	5.5 – 8.9
másod- és harmadrendű evezőtollak	137	20	1	158	3.3 – 6.7
faroktollak	66	13	1	80	5.5 – 7.2
közepes méretű fedőtollak *	102	14	2	118	2.0 – 5.3
nagyméretű fedőtollak	67	11	1	79	1.9 – 5.2
összesen	494	81	6	581	

* kézevező fedők és vállfedők

A szlovák állománnyal kapcsolatos vizsgálatban az RPS munkatársai által kiválasztott területek minden mintáját bevontuk a vizsgálatba, de mivel itt a gyűrűzés során vett minták között testvérek mintái is szerepeltek álltak, a pszeudoreplikáció elkerülése végett minden fészekből egy mintát vettünk be az elemzésbe.

Speciális szűrőpapírra vett vérminták

Az RPS munkatársai 2004 és 2006 között, a parlagi sas fiókáktól gyűrűzéskor a madarak szárnyvénájából pontszerű szűrást követően néhány csepp vért itattak fel egy speciálisan kialakított és impregnált szűrőpapírra (IsoCode STIX™). Ez az eljárás nagy valószínűséggel nem növelte a gyűrűzéssel járó stresszhatást (minimál invazív mintavétel; McDade és mtsai, 2007; Nagy et al., 2010).

2.1.2 A DNS minőségének ellenőrzése

A minták minősége a vizsgálatok fontos tényezője, ezért ellenőrzése fontos a további reakciók elvégzése előtt. A spektrofotométerrel végzett koncentrációvizsgálat nem mindig ad

megfelelő eredményt, mivel az a töredék DNS-t, RNS-t és fehérjéket is méri (Teare et al., 1997) így a tényleges DNS-koncentrációnál magasabb értéket lehet kapni.

A DNS töredezettségének agaróz gélen elektroforézissel történő ellenőrzése is alkalmazott módszer (Zayats et al., 2009), így minden alkalommal gélfotó alapján döntöttünk a kivont DNS felhasználásával kapcsolatban (2.1.3 fejezet, 8. ábra).

Az ellenőrzés után a leghosszabb fragmens amplifikálásával folytattuk (CHD1W/Z), majd ennek eredménye alapján döntöttük el, hogy az adott minta alkalmas-e további vizsgálatokra. Erre azért volt szükség, mert a DNS a hisztonfehérjék mentén töredezik, nagyjából 150 - 200 bp-os darabokra (Binladen et al., 2006), így ha a későbbi vizsgálatoknál ennél hosszabb szakaszokat vizsgálunk az előzetesen a kimutatott magas DNS-koncentráció ellenére sikertelen lehet a minták felszaporítása.

2.1.3 Az alkalmazott DNS-izolálási módszerek

DNS izolálás kisózással

A toll fejlődése során a cséve végénél található alsó köldökön át belép egy ér a tollszárba, ami a felső köldöknél lép ki a toll külső felszínére. Az ér a tollfejlődés lezárultakor visszahúzódik, de a felső átlépésnél megmarad egy kis vérrög. Mivel a madarak vörösvérsejtjei tartalmaznak sejtmagot, a beszáradt vérrögből nyerhető DNS általában elegendő mennyiségű az ivarmeghatározáshoz és egyedi genetikai profil elkészítéséhez (Horváth et al., 2005).



7. ábra: Egy jó minőségű tollból kimetszett felső köldök és helye a csévén

A preparálás előtt a tollszáron található szennyeződések etanollal mostuk le, majd szikepengével vágtam ki (7. ábra). A művelethez minden alkalommal steril szikepengét, új

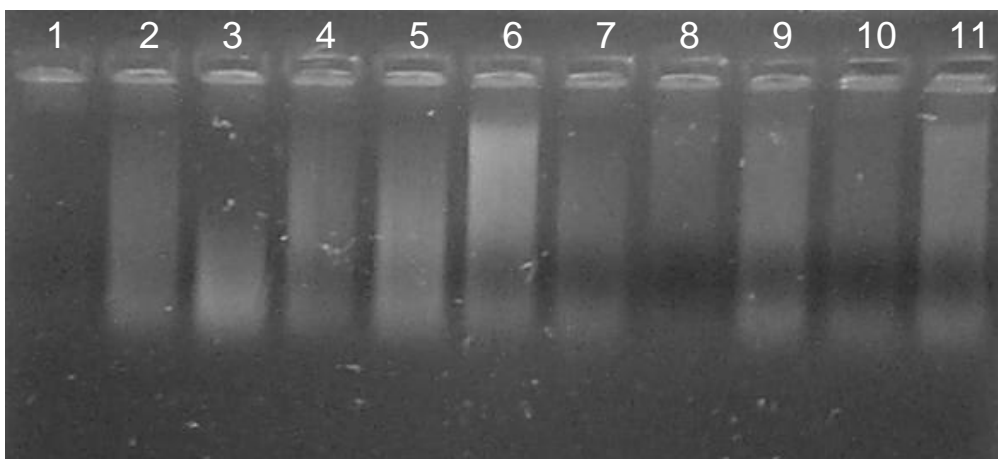
gumikesztyűt és papíralátétet használtunk a keresztkontamináció elkerülésére. A preparált darabok a DNS-izolálásáig fagyasztóba kerültek (-20°C).

A DNS-kivonást kisózásos protokoll (Gemmell és Akiyama, 1996) alapján kis módosításokkal végeztük. A kivágott darabokat először Proteináz-K-s emésztésnek tettük ki: 15 µl Proteináz-K oldat (Fermentas), 15 µl SDS, 100 µl Proteináz-K puffer, 155 µl víz és 10 µl DTT (1,4-ditio-treitol, a keratin oldásában vesz részt). Az így kezelt minták alapos keverés után egész éjszakára 55-60°C-os vízfürdőbe kerültek.

A következő lépésben a felülúszóból a maradék peptideket 5 mol/l koncentrációjú LiCl oldattal csaptuk ki (315 µl), majd a tisztítás kloroform-izoamilalkoholos (24:1 arányú, 630 µl) kirázással folytatódott. Alapos keverés után a mintát 10 percig maximális fordulatszámon (13000 rpm) centrifugáltuk, hogy a két fázis jól elkülönüljön. A DNS-t tartalmazó felső fázisból 400 µl-t vittünk át új csőbe, majd a DNS-t 400 µl tömény izopropanol hozzáadásával csaptuk ki. A csövek forgatás után egy éjszakára fagyasztóba (-20°C) kerültek.

Másnap újabb centrifugálás után (15 perc, 13000 rpm) a mintákat 800 µl 70%-os etanollal rehidráltuk. Az alkoholt újabb centrifugálás után (15 perc, 13000 rpm) leöntöttük a DNS-ről, illetve ha látható volt a DNS, akkor pipettával szívtuk le, majd 50 µl TE pufferben (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) oldottuk be. A mintákat a további degradáció elkerülése érdekében felhasználásig fagyasztóban tároltuk.

Felhasználás előtt a minták minőségét és fragmentáltóságát agarózgélén történő futtatással ellenőriztük (8. ábra). A futtatás során 3 – 3µl DNS-t vittünk fel 2 – 2µl felvivőfestékkel (Ficoll).



8. ábra: Különböző minőségű DNS oldatok 0,8%-os agaróz gélen futtatva; 1, 3, 7, 8, 10: rossz minőségű minták, 2, 4, 9: közepes minőségű minták, 5, 6, 11: jó minőségű minták

DNS izolálás a nem-destruktív módszerrel vett mintákból

A szűrőpapírt teljes száradás után feldolgozásig fagyasztoóban tároltuk, majd a mintákból desztillált vizes mosás után forralással (100 µl nukleázmentes vízben, 15-30 perc) vontuk ki a DNS-t. A kisózásos eljáráshoz hasonlóan ebben az esetben is ellenőriztük a kivont DNS mennyiségét és minőségét (8. ábra).

2.2 Ivarmeghatározás

2.2.1 Parlagi sas ivari dimorfizmus

A parlagi sasokra nagyon kicsi, méretbeli ivari dimorfizmus jellemző. A spanyol parlagi sashoz hasonlóan (Margalida et al., 2007) a tojók és a hímek között a tojók javára 5-10%-os méretbeli eltérés lehetséges. Mivel színbeli eltérés nincs a két ivar között, a vedlett tollak méretéből nem lehet egyértelműen és biztosan megállapítani az egyedek nemét. (9. ábra).

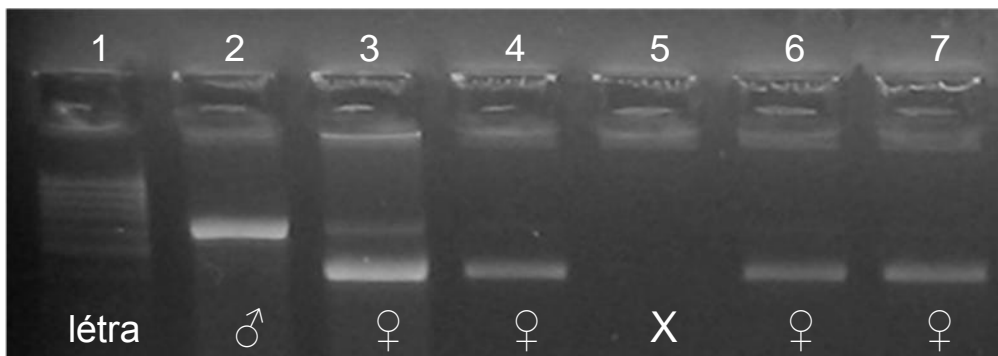


9. ábra: Egy tojó és egy hím parlagi sas faroktolla: a két toll színe és mintázata megegyezik, méretbeli különbség nem látható.

Az egyedek ivarának meghatározására a Fridolfsson és Ellegren (1999) által kidolgozott allélspecifikus PCR alapú technikát alkalmaztuk. A módszer a futómadarak kivételével, a legtöbb madárfaj esetén használható, érzékeny és biztonságos. A technika alapja, hogy olyan primereket alkalmazunk, amelyeket az ivari kromoszómákon

megtalálható, és típusonként eltérő méretű intronokat tartalmazó CHD1 gén intronokat határoló szakaszaira terveztek (ebben az esetben a 2550F/2718R pár), így nincs szükség utólagos enzimes hasításra és gyorsan eredményhez lehet jutni. Ivartól függően parlagi sas hímek esetén egy hosszabb, nagyjából 600 - 700 bázispáros, illetve tojók esetén egy további, nagyjából 400 - 450 bázispár hosszú PCR termék is keletkezik (Horváth et al., 2005). A tojóknál előfordulhat, hogy csak a rövidebb szakaszból keletkezik agaróz gélen is jól látható mennyiség, azonban a génváltozatok méretében jelentkező, megközelítőleg 250 bázispáros különbségnek köszönhetően ebben az esetben is elkülöníthetőek az ivarok (10. ábra).

Mivel az egyedi DNS-profilok elkészítéséhez használt szakaszok egy kivételével 450 bázispárnál rövidebbek, ezért a későbbi vizsgálatokba az olyan mintákat vontuk be, amelyeknél a CHD1 gén megfelelő szakaszait sikeresen fel lehetett szaporítani.



10. ábra: Az ivarmeghatározásra használt PCR-reakció végeredménye, 2,5%-os agaróz gélen; 1: méretmarker; 2: hím; 3 – 4: tojó; 5: sikertelen PCR; 6 - 7: tojó

2.2.2 PCR-reakció, ellenőrzés

A PCR 15 µl térfogatban zajlott (2. táblázat) és az amplifikáláshoz touch-down PCR-programot alkalmaztunk (3. táblázat). Ezzel a módszerrel a PCR reakció a korai lépésekben erősen specifikus, azonban alacsonyabb hatásfokú. Így kezdetben kevés, de specifikus PCR-termék képződik, amely már jóval hatékonyabban sokszorozódik fel a későbbi, alacsonyabb anellációs hőmérsékletű ciklusok során. A vizsgálatban minden alkalommal két ismert ivarú madár (egy tojó és egy hím) mintáját használtuk pozitív kontrollként, illetve minden reakciónál (a később leírt PCR-eket is beleértve) alkalmaztunk negatív kontrollt, ahol nukleázmentes vízzel helyettesítettük a DNS-t.

2. táblázat: A PCR-ek során használt mixek (minden mennyiség µl-ben értendő).

lokuszok	Primerek		Mastermix®	GoTaq®	MgCl ₂	H ₂ O	DNS
	F	R					
IEAAAG14	0,5	0,5	7,5	1	1	4	1
IEAAAG09	1	1					
IEAAAG04	1	1	7	1	1	4	1
IEAAAG12	0,5	0,5					
IEAAAG11	0,8	0,4	7	1	1	4	1
IEAAAG13	0,8	0,8					
IEAAAG15	1	2					
Aa02	0,25	0,25					
Aa39	0,5	0,5	7	-	1	3	1
Aa35	0,75	0,75					
CHD1	2	2	7	1	1,5	1	1

3. táblázat: Az alkalmazott PCR programok táblázatos összefoglalása.

Lépések	Ivarmeghatározás	Dinukleotid lokuszok	Tetranukleotid lokuszok	Tetranukleotid lokuszok (módosított)
Kezdeti denaturálás	94°C - 2 perc			
TD	I. 92°C	92°C		92°C
	II. 60-50°C 11 ciklus	66-50°C 17 ciklus		66-60°C 17 ciklus
	III. 72°C	72°C		72°C
	I. 92°C	92°C	92°C	92°C
	II. 50°C 25 ciklus	50°C 19 ciklus	65°C 30 ciklus	50°C 19 ciklus
	III. 72°C	72°C	72°C	72°C
Végső extenzió	72°C - 5 perc			

I. – denaturálás, II. – anelláció, III. – elongáció, mindegyik 30 másodperces volt

TD – Touch-down szakasz

2.3 Mikroszatellita fragmensanalízis

2.3.1 A vizsgált mikroszatellita lokuszok

A vizsgálatban a parlagi sas testvérfajára (*Aquila adalberti*) kidolgozott dinukleotid (Aa02, Aa35, Aa39; Martínez-Cruz et al., 2002) illetve *Haliaeetus* és *Aquila* genusba tartozó fajokra kidolgozott tetranukleotid lokuszokat (IEAAAG04, IEAAAG09, IEAAAG11,

IEAAAG12, IEAAAG13, IEAAAG14, IEAAAG15; Busch et al., 2005) használtunk az egyedek azonosítására (4. táblázat). Utóbbiak értékelése egyszerűbb, ugyanis a PCR során az említett szakaszokon a polimeráz enzim kevesebbet téved és így kevesebb, a várt allélekhez méretben hasonló, aspecifikus termék keletkezik. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy általában ezekre a lokuszokra kisebb variabilitás jellemző, mint a dinukleotidokra.

4. táblázat: A vizsgálatban használt lokuszok neve, a felszaporításukhoz használt oligonukleotidok szekvenciája, a várható mérettartomány és az általunk alkalmazott jelölések (5').

Lokusz	Szekvencia	Min.	Max.	Jelölés
IEAAAG04	F [^] : GCATGTAACAAGTTTAATGTTGATGG R: GTTGGAAACAGGACATGTTAAGC	235	259	HEX
IEAAAG09	F [^] : GAACAATTTTCAGGTAGATATTACCTGCAATA R: GTATTGACTGCACATCATTGTGG	482	494	TET
IEAAAG11	F [^] : GGCTGACTGAGCTCCAGAGC R: GTGTTTGCTTCATCGAAACAGC	332	344	6-FAM
IEAAAG12	F [^] : GCTGCTGCTAAGAATCACTCATGTAC R: GTGGGAAGGTGGGTTGTCAG	132	136	HEX
IEAAAG13	F [^] : GAATACCACAATAAGAGGCAGAGTG R: GTCTAAAATGAAGTGAATCTGTAAGACAG	192	258	6-FAM
IEAAAG14	F [^] : GTCCAGATTCCTGCTAGAAAGC R: GTTGGAGAGTCTAAGCACTGAATCAG	200	204	TET
IEAAAG15	F [^] : GAGAATAATTTTTGAAAAGCAGTAGG R: CTTAGTTGTTTCAGAGGACGGTAAG	111	123	6-FAM
Aa02	F [^] : CTGCAGATTTTCACCTGTTCTG R: GTTTCTTCCAGGTCTTGCAGTTTACC	141	155	6-FAM
Aa35	F [^] : GCAGCAGAAAGTGCATACGA R: GACCAAATGAAATGCGCC	250	264	HEX
Aa39	F [^] : TTCTGTTTTTCCACTTGCTTG R: GTTTTATTGAGCTCACAAAAACAAAGG	191	223	HEX

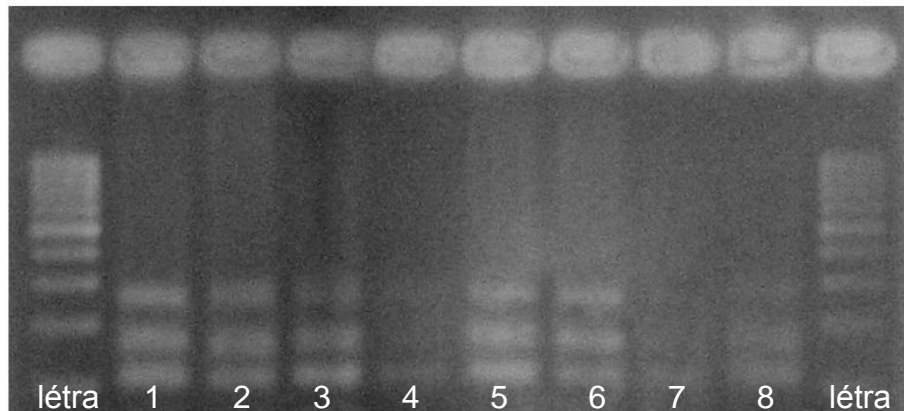
[^] fluoreszcensen jelölt primer

2.3.2 PCR-reakciók

A minták gyorsabb feldolgozása és a költségek csökkentése érdekében multiplex PCR rendszert dolgoztunk ki és több lokuszt egyben amplifikáltunk. Az optimalizált mixek az 2. táblázatban (2.2.2. fejezet) láthatóak.

A dinukleotid lokuszokat felerősítő PCR-reakció azonos a Martínez-Cruz és munkatársai (2002) által publikált programmal. (2.2.2. fejezet, 3. táblázat). A tetranukleotid lokuszok esetén az IEAAAG 04, IEAAAG 09 és az IEAAAG 12-es lokuszok amplifikálására a lokuszokat leíró cikkben (Busch et al., 2005) közölt PCR programot alkalmaztuk (2.2.2. fejezet, 3. táblázat). Az IEAAAG 11-es és az IEAAAG 15-ös lokuszok esetén azonban ez a

program nem adott elég erős terméket, ezért a dinukleotidoknál leírt touch-down programot optimalizáltuk a primerek olvadási hőmérsékletének megfelelően (2.2.2. fejezet, 3. táblázat). A PCR-termékekből ellenőrzésként 4-4 μl -t futtattunk 2,5%-os agaróz gélen (11. ábra).



11. ábra: Nyolc egyed három dinukleotid lokuszra irányuló multiplex PCR-ének ellenőrzése 2,5%-os agaróz gélen

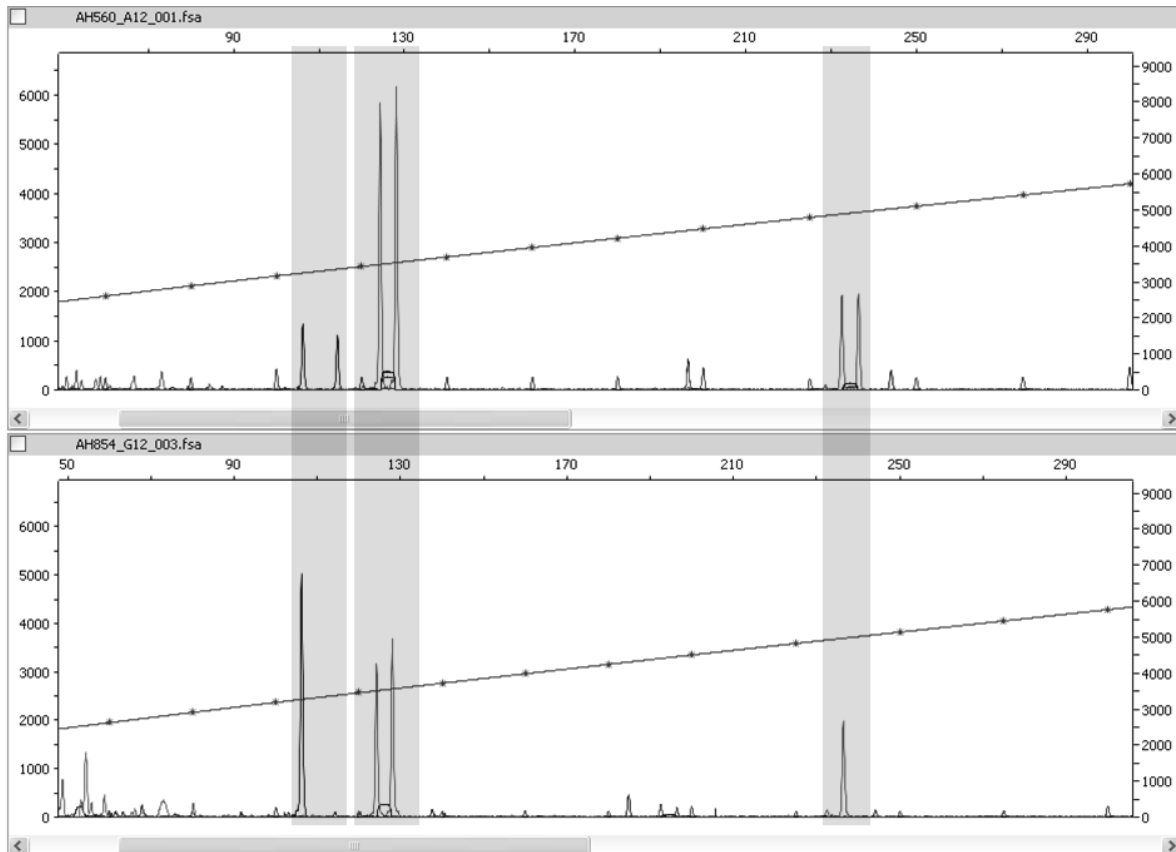
2.3.3 Kapilláris elektroforézis és genotipizálás

Az egyedi DNS-profilok elkészítéséhez kapilláris elektroforézist alkalmaztunk. A módszer előnye, hogy lehetővé teszi a különböző időpontokban futtatott minták összehasonlítását. Az eljárás során elektromos feszültség hatására a fragmensek méretük szerinti sebességgel haladnak a pozitív pólus felé egy géllal/polimerrel teli vékony csőben. Így eltérő időben érnek a kapillárison található detektorablakhoz, ahol a primereken található fluoreszcens festékeket egy lézer gerjeszti. A fluoreszkáló festékek által kibocsátott fényt egy kamera érzékeli. Mivel minden festék más hullámhosszú fényt emittál, egyszerre több lokusz is vizsgálható. A megfigyelt fragmensek hossza egy szintén a mintával futtatott méret markerhez ("size standard") hasonlítva megkapható.

A keletkezett PCR-termékek töménységét agaróz gélen ellenőriztük és szükség esetén hígítottuk azokat. A futtatásokhoz használt elegy mintánként 24 μl deionizált formamidot (Promega), 1 μl méret markert (GS-500 TAMRA és GeneScan™ – 500 LIZ Applied Biosystems, ILS 600, Promega) és 1 μl PCR-terméket tartalmazott. A mintákat ezután egy perces denaturálással (95°C) tettük elektroforézisre alkalmassá.

A vizsgálatot ABI PRISM® 310-es és 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABI) készülékeken végeztük. A futtatások a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karán az Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet DNS laboratóriumában, a GenoID Kft. laboratóriumában, illetve a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában történtek.

Az adatok értékelésekor minden mintát hárman (Kovács Szilvia és Szabó Krisztián segítségével), egymástól függetlenül olvastunk le, majd ezek alapján határoztuk meg a konszenzus genotípust, illetve döntöttünk az ismétlés szükségességéről, vagy a minták kizárásáról (Beja-Pereira et al., 2009). A leolvasásokat a GeneScan® 3.7 és a Peak Scanner® 1.0 (ABI) programokkal végeztük (12. ábra).



12. ábra: Két minta összehasonlítása a Peak Scanner® 1.0 programmal: szürkével kiemelve sorrendben az IEAAAG15-ös, IEAAAG12-es és IEAAAG13-as lokuszok láthatók

A preparáláskor a mintákat a faj latin nevének kezdőbetűiből és egy sorszámból álló kóddal (pl. AH001), illetve szlovákiai minták esetén a gyűrűzéskor kapott kóddal jelöltük, így az DNS-profilok elkészítésekor nem volt információnk az egyed származási helyéről.

Az egyedi genotípusokat az egyed ivara, territórium kódja és az adott genotípus első előfordulási éve alapján kódoltuk. Például a **Z01F1_1997** a zempléni 01-es territórium elsőként azonosított tojóját jelenti, és a tollmintát, amiből a DNS származott 1997-ben gyűjtötték. A későbbiek során minden egyedet az ilyen az azonosítójával jelöltünk, minden előfordulásakor. Az elemzésekben minden genotípus egyszer szerepelt.

2.4 Használt programok, számítások

2.4.1 MS Microsatellite Toolkit

Az MS Microsatellite Toolkit (Park 2001) az adatok ellenőrzésére (elgépelésből adódó, lokuszméret szempontjából kiugró adatok, hiányos adatsorok), duplikált vagy azonos genotípusú minták azonosítására, illetve allégyakoriságok és diverzitási statisztikák számítására alkalmas.

2.4.2 MICRO-CHECKER 2.2.3

Az egyes lokuszokon a null allélek előfordulásának valószínűségét és a dadogást (a leolvasást nehezítő, aspecifikus termék, "shadow band" előfordulását) a "MICRO-CHECKER 2.2.3" programmal ellenőriztük (Van Oosterhout et al., 2004, www.microchecker.hull.ac.uk). A fent említett jelenségek miatt az adatsorban megnő a homozigóta lokuszok aránya. Ha ez az azonos mérettartományba tartozó lokuszok közül csak az egyikben jelentkezik, akkor az null allélek jelenlétére utal. Ha kifejezetten a nagyobb allélokat tartalmazó lokuszokon fordul elő, akkor az eltérést a nagyméretű allélek kiesése okozza, aminek hátterében a DNS-ek töredezettsége állhat.

2.4.3 GenAIEx 6.41 – Genetic Analysis in Excel

A "GenAIEx", (Peakall és Smouse, 2006) egy eredetileg oktatáshoz írt populációgenetikai számításokat (pl. F-statisztikák, AMOVA) végző Microsoft Excel makró.

A programmal végzett számítások:

- PI (Probability of identity, Waits et al., 2001) számítása: A PI annak a valószínűségét adja meg, hogy a mintából két, véletlenszerűen kiválasztott minta többlokuszos genotípusa mennyire megegyező (p_i az i -edik allél gyakorisága adott lokuszon):

$$PI = (\sum p_i^2)^2 - \sum p_i^4$$

- GD (Genetic distance): A program Smouse és Peakall által (1999) publikált módszer alapján számítja a genetikai távolságot, majd egy NxN-es mátrixba rendezi (N egyed esetén), ami a Mantel-tesztben használt genetikai távolságmátrix.

- GGD (Geographic distance, földrajzi távolság) számítása: a fészkek távolságát a koordináták különbségéből Pitagorasz tétellel számolja ki. Ez képezi a Mantel-tesztnél használt földrajzi távolságmátrix alapját [x_i és x_j i és j pontok x koordinátái, y_i és y_j pedig i és j pontok y koordinátái; a koordináták EOVS (Egységes Országos Vetület) szerintiek].

$$D = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2}$$

- AMOVA (Analysis of Molecular Variance): A programban a számítások Excoffier és munkatársai (1992), Huff és munkatársai (1993), Peakall és munkatársai (1995), illetve Michalakis és Excoffier által (1996) publikált módszereket követik. (V_{AP} : a populációk közti variancia; V_{WP} : a populációkon belüli variancia)

$$F_{ST} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})}$$

2.4.4 zt 1.1

A "zt1.1" egy parancssorból futtatható, egyszerű és részleges Mantel-teszt elvégzésére alkalmas program (Bonnet és van de Peer, 2002), mellyel két távolságmátrix közti összefüggést lehet vizsgálni. A teszt nullhipotézise, hogy a két mátrix megfelelő elemei között nincs összefüggés, azaz a mátrixok egymástól függetlenek.

Ebben az esetben tesztet a fészkek földrajzi távolsága és az ott azonosított tojók genetikai távolságából képzett mátrixok összehasonlítására alkalmaztuk. A mátrixokat a GeAlEx 6.41-el készítettük. A randomizációk számát az alapbeállításon hagytuk, ami 10000 volt.

A program a következő képlet alapján számolja a mátrixok (a képletben A és B mátrix) közti korrelációt (r : a Pearson-féle korrelációs koefficiens; N : a mátrix elemeinek száma, \bar{A} : az A mátrix elemeinek átlaga; s_A : az A mátrix elemeinek szórása):

$$r = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left[\frac{(A_{ij} - \bar{A})}{s_A} \right] \left[\frac{(B_{ij} - \bar{B})}{s_B} \right]$$

2.4.5 Genepop 4.0.10

A "Genepop" (Raymond és Rousset, 1995) többek között alkalmas a vizsgált lokuszokon a HWE fennállásának (Guo és Thompson, 1992), illetve a lokuszok közti kapcsoltság mértékének („linkage disequilibrium”, LDE) vizsgálatára.

Mindkét tesztnél Markov-lánc modellt és az alapbeállításokat (dememorizációk száma: 1000; menetek ("batch") száma: 100; iterációk száma menetenként: 1000) alkalmaztuk. A számítások elvégzéséhez a program online verzóját használtuk (<http://genepop.curtin.edu.au>).

2.4.6 R

A statisztikai számításokhoz az "r 2.12.1"-es verzióját (R Development Core Team 2011) használtuk. A feltételes következtetésen alapuló döntési fa ("Conditional Inference Tree"; Strasser és Weber, 1999) építéséhez a Hothorn és munkatársai által publikált (2011) "party" nevű r-csomagot alkalmaztuk. A feltételes következtetésen alapuló döntési fák rekurzív bináris partícionáló algoritmust alkalmazva regressziós kapcsolatot becsülnek. A módszer előnye, hogy a változók egymáshoz viszonyított helyzete is leolvasható a fáról.

Az algoritmus működése általánosságban a következőképpen írható le:

- Az első lépésben a magyarázó változók és megfigyelések közti függetlenséget vizsgálja. Ha a nullhipotézist (függetlenség) nem lehet elutasítani, akkor a vizsgálat leáll. Ha nincs függetlenség, akkor kiválasztja azt a magyarázó változót, aminek a legszorosabb a kapcsolata a függő változóval. Az ehhez tartozó p-érték csak a kiválasztott változóra és a megfigyelt értékekre vonatkozik.
- A második lépésben a kiválasztott bemeneti változó alapján kettéosztja a megfigyeléseket.
- A harmadik és minden további lépésben pedig rekurzív módon ismétli az első és a második lépést.

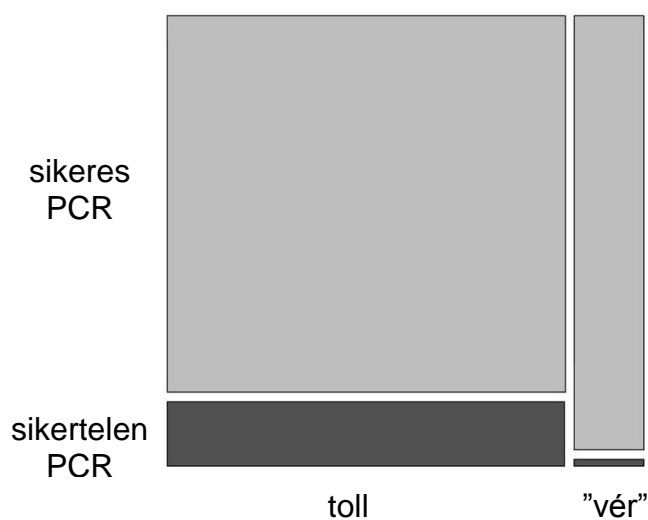
A vizsgálat során a többszörös összehasonlítások miatt Bonferroni-korrekción alkalmaztunk. A kettéosztás kritériuma $p = 0,2$ volt, ami azt jelenti, hogy csak azok a változók szerepelnek a fán, amelyekhez ennél kisebb p-érték tartozik.

3. Eredmények

3.1 Módszertani kérdések

3.1.1 A DNS minősége a minta típusa szerint

A vizsgálat során, a terepen begyűjtött vedlett tollakban található vérrögéből származó DNS minőségét hasonlítottuk 717 tollmintából, 128, szűrőpapírra vett vérmintából származó DNS-mintáéhoz.



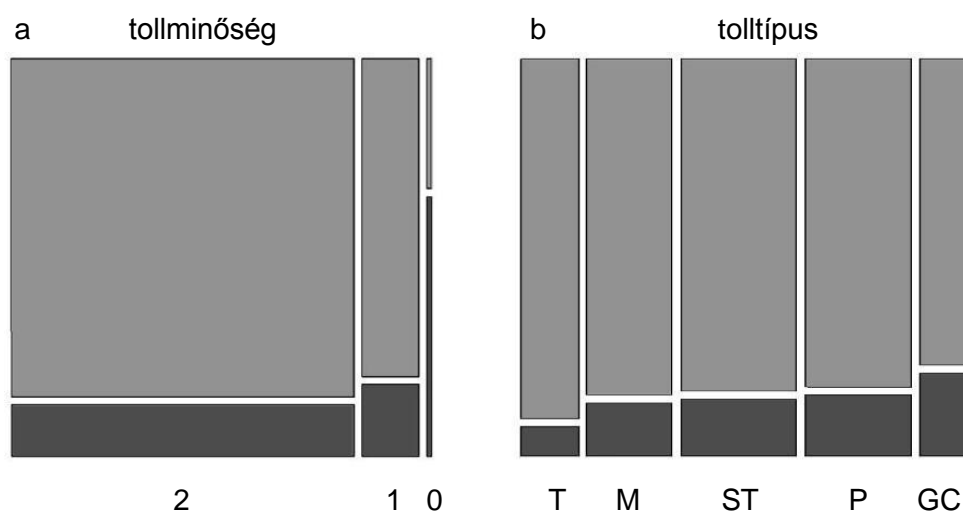
13. ábra: Az ivarmeghatározás sikeressége a minta eredetét tekintve (r v.2.12.1); a vér a szlovákiai fiókákból szűrőpapírra vett vérmintákat jelenti

A feldolgozott minták 87,8%-ából lehetett az ivar meghatározására alkalmas mennyiségű és minőségű DNS-hez jutni. Az elvégzett Khi-négyzet próba alapján a sikeresség nem különbözött szignifikánsan a vedlett tollak (85,5%) és a szlovák fiókák vérmintái (98,4%) esetén ($\chi^2 = 0,9791$, $df = 1$, $p = 0,3224$) esetén (13. ábra). Ez az eredmény alátámasztja mindkét mintavételi módszer hatékonyságát, és az ilyen célú vizsgálatokban való alkalmazhatóságát. Mindkét kivonási módszerrel hosszú távú tárolásra alkalmas minőségű és mennyiségű DNS-oldathoz lehetett jutni.

3.1.2 A toll minőségének, típusának, méretének és korának hatása

A következő vizsgálatokhoz csak a Magyarországon begyűjtött ismert korú és méretű tollakat használtuk fel.

A tollakat fizikai állapotuk alapján három minőségi kategóriába osztottuk be (2.2.1. fejezet, 5. és 6. ábra). A felhasznált 581 tollból 494 darab volt jó minőségű (85,03%), a közepes kategóriába 81 toll került (13,94%), és rossz besorolást 6 toll (1,03%) kapott. A legjobb minőségű tollak 86,64%-a (428 darab), a közepes minőségű tollak 81,49%-a (66 darab), míg a rossz minőségi besorolású tollak 33,3%-a (2 darab) adott értékelhető eredményt (14a ábra, 5. táblázat).



14. ábra: Az ivarmeghatározás eredményessége a toll minősége és típusa szerint (r v.2.12.1); világos terület - sikeres reakció; sötét terület - sikertelen PCR reakció; 0 – rossz minőség, 1 – közepes minőség, 2 – jó minőség; GC - nagyméretű fedőtollak, P - elsőrendű evezőtollak, M - közepes méretű fedőtollak, ST - másod- és harmadrendű evezőtollak, T - faroktollak

5. táblázat: Az ivarmeghatározás eredménye a tollak minősége szerint

tollminőség	CHD1 amplifikáció			
	sikertelen		sikeres	
jó ("2")	66	(13,36%)	428	(86,64%)
közepes ("1")	15	(18,51%)	66	(81,49%)
rossz ("0")	4	(66,67%)	2	(33,33%)
összesen	85	(14,63%)	496	(85,37)

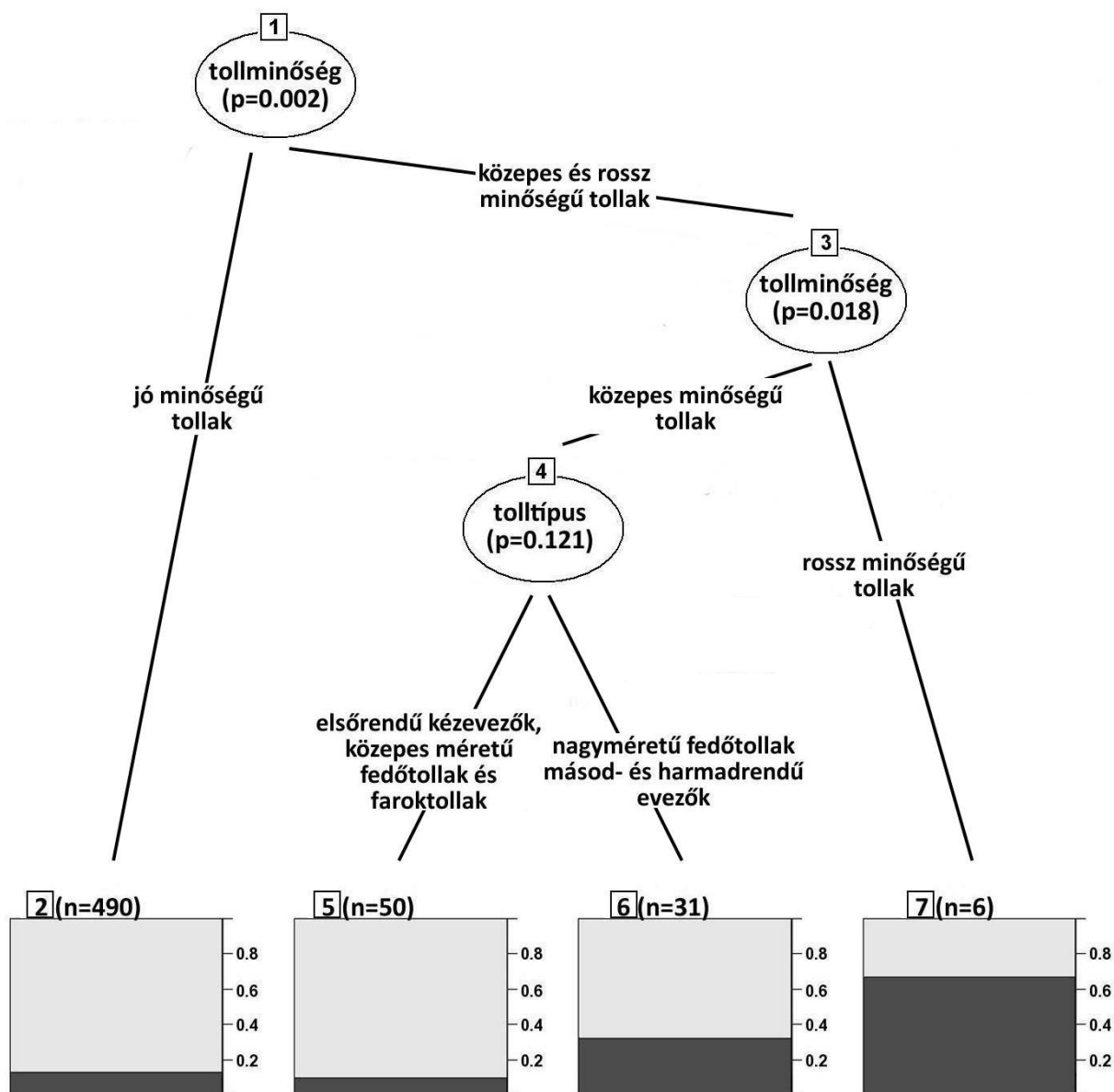
Típusonként tekintve csak a jó minőségű tollakat hasonlítottuk össze, hogy a minőséget, mint befolyásoló tényezőt kizárjuk. Az eredmények alapján a faroktollak bizonyultak a legmegbízhatóbbaknak, ennél a típusnál a sikeres amplifikációk aránya 92,5% volt. A legkevesebb sikeres PCR-t, 82,1%-ot a fedőtollakból kivont DNS-nél lehetett tapasztalni. A többi toll esetén ez az arány 89% és 84% között változott (6. táblázat és 14b ábra).

6. táblázat: Az ivarmeghatározás eredménye jó minőségű tollak esetén, a tollak típusa szerint.

tolltípus	CHD1 amplifikáció			
	sikertelen		sikeres	
elsőrendű evezőtollak	19	(15,60%)	103	(84,40%)
másod- és harmadrendű evezőtollak	17	(12,40%)	120	(87,60%)
közepes méretű fedőtollak	13	(12,70%)	89	(87,30%)
faroktollak	5	(7,50%)	61	(92,50%)
nagyméretű fedőtollak	12	(17,90%)	55	(82,10%)
összesen	66	(13,36%)	428	(86,64%)

A hatások elemzéséhez feltételes következtetésen alapuló döntési fa (Conditional Inference Tree) módszert és logisztikus regressziót alkalmaztunk (15. ábra). Az eredmények alapján a CHD1W/Z gén amplifikálhatóságát a vizsgált változók közül szignifikánsan csak a toll minősége befolyásolta (15. ábra, 1. és 2. nóduszok; GLM, p – érték = 0,0066).

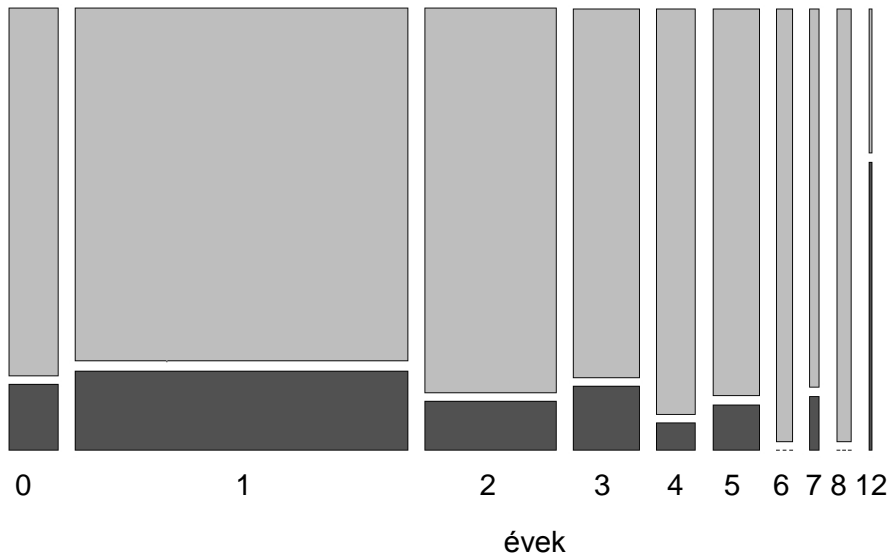
A toll minősége és típusa között szignifikáns interakciót találtunk (GLM, p – érték = 0,0431). A közepes minőségű tollak esetén a tolltípusok közül a nagyméretű fedőtollak, illetve a másod- és harmadrendű evezőtollak esetén volt rosszabb a sikeres amplifikációk aránya, de ez az összefüggés nem volt szignifikáns (15. ábra, 4. nódusz).



15. ábra: A toll minőségének és típusának hatását illusztráló döntési fa. A vizsgált változók közül csak a minőség volt szignifikáns hatással a DNS minőségére. Az oszlopok világos része a sikeres, a sötét rész a sikertelen amplifikációkat jelzi. (r v.2.12.1)

A vizsgálatban a DNS-t nem a toll hegyéből, hanem a felső köldöknél megmaradó vérrögéből izoláltuk, ezért feltételeztük, hogy a cséve felső köldöknél mért átmérője meghatározó lehet a vérrög méretét tekintve, így utalhat a kinyerhető DNS mennyiségére. Az elvégzett statisztikai elemzés alapján azonban a méretnek nem volt hatása, ezért a döntési fa paraméterezése (2.4.6. fejezet) miatt nem látható az ábrán.

A begyűjtés és a preparálás közt eltelt időnek sem volt hatása a CHD1W/Z lokusz amplifikálhatóságára. Ezt azonban az is eredményezhette, hogy az egyes csoportokban jelentősen különböztek a mintaszámok (16. ábra).



16. ábra: Az ivarmeghatározás sikeressége a tollak begyűjtése és a preparálás közt eltelt idő szerint (r v.2.12.1); sötét terület - sikertelen reakció; világos terület - sikeres PCR reakció

3.1.3 Mikroszatellita lokuszok

Az egyedek azonosítása és az adatsor ellenőrzése

Az adatsort először a MICRO-CHECKER 2.2.3 programmal elemeztük. Ennek során a vizsgált lokuszokon a tapasztalt és várt homozigóta/heterozigóta arány alapján a Kárpát-medence teljes populációját tekintve az IEAAAG09-es és az Aa39-es lokuszon nagy a null allélek előfordulásának valószínűsége. Az ebből adódó torzítás elkerülése érdekében ezeken a lokuszon minden homozigóta genotípust hiányzó adatként kezeltünk az elemzések során. Az ellenőrzés során egyik lokuszon sem találtunk dadogásra, vagy allélkiesésre utaló jelet. A talált allélhosszokat és a hozzájuk tartozó gyakoriságokat a 7. táblázat tartalmazza.

A markerkészlet érzékenységének vizsgálata

Az egyedi azonosításhoz elengedhetetlen, hogy az alkalmazott markerkészlet alkalmas legyen az egyedek megkülönböztetésére. Az általunk kiválasztott lokuszok allélgyakoriságai alapján annak a valószínűsége, hogy két véletlenszerűen kiválasztott

egyed genotípusa megegyezzen $PI = 3,28 \times 10^{-6}$, ami a mintaszám ($N = 137$) alapján elegendően kicsi az egyedi szintű azonosításhoz.

7. táblázat: A Kárpát-medencei madaraknál talált allélhosszak és allélgyakoriságok.

lokusz	allélhossz (allélgyakoriság)								Σ	
IEAAAG04	218	228	232	236	240				5	
	0,007	0,073	0,069	0,818	0,033					
IEAAAG09	476	480	484	488					4	
	0,295	0,036	0,241	0,429						
IEAAAG11	306	324	328	332	336	344			6	
	0,008	0,185	0,359	0,149	0,294	0,004				
IEAAAG12	124	128							2	
	0,485	0,515								
IEAAAG13*	236	240	244						3	
	0,100	0,400	0,500							
IEAAAG14	192	196							2	
	0,380	0,620								
IEAAAG15	102	106	114						3	
	0,004	0,814	0,182							
Aa02	137	139	141	143	145	150	152		7	
	0,065	0,088	0,004	0,302	0,248	0,218	0,076			
Aa35*	249	251	253	255	257	259			6	
	0,240	0,300	0,180	0,020	0,100	0,160				
Aa39	180	184	188	190	192	194	196	198	200	9
	0,046	0,289	0,053	0,158	0,243	0,033	0,092	0,072	0,013	

* ezeket a lokuszokat amplifikálási és értékelési nehézségek miatt csak a szlovákiai mintáknál vizsgáltuk, a későbbiekénél nem

Eltérés a Hardy-Weinberg és a kapcsoltsági egyensúlytól

A lokuszok Hardy-Weinberg és a kapcsoltsági egyensúlytól való eltérését a Genepop 4.0.10 programmal vizsgáltuk. Az értékelésből kizártuk az IEAAAG09-es és Aa39-es lokuszokat a null allélek valószínű jelenléte miatt. Továbbá a csak szlovákiai mintákra alkalmazott IEAAAG13-as és Aa35-ös lokuszokat sem teszteltük, mivel túl nagy volt a különbség a mintaelemszámok között.

A fennmaradó hat lokuszon egyenként és az összeset együtt vizsgálva is fennállt a Hardy-Weinberg egyensúly ($\chi^2 = 16,5214$, $df = 12$, $p = 0,1685$) (8. táblázat). Ugyanezeket a lokuszokat vizsgálva a kapcsoltsági egyensúlytól sem találtunk szignifikáns eltérést (9. táblázat).

8. táblázat: A vizsgálat során talált allélszám, effektív allélszám, várt és megfigyelt heterozigócia, a HWE-től való eltérés mértéke, az allélhosszok minimuma és maximuma, zárójelben a lokuszok leírásakor megadott értékek szerepelnek.

Lokusz	N	N _a	N _e	H _{obs}	H _{exp}	HWE		min.	max.
						p	S.E.		
IEAAAG04	137	5	1,47	0,32	0,32	0,0798	0,0126	218 (235)	240 (259)
IEAAAG11	124	6	3,67	0,71	0,73	0,0786	0,0102	306 (332)	344 (344)
IEAAAG12	137	2	1,99	0,52	0,5	0,7313	0,003	124 (132)	128 (136)
IEAAAG14	137	2	1,89	0,45	0,47	0,7227	0,0031	192 (200)	196 (204)
IEAAAG15	137	3	1,43	0,29	0,3	0,8149	0,0052	102 (111)	114 (123)
Aa02	133	7	4,59	0,82	0,78	0,0957	0,0083	137 (141)	152 (155)
IEAAAG09*	56	4	3,03	1	0,67	-	-	476 (482)	488 (494)
Aa39*	76	9	5,32	1	0,82	-	-	180 (191)	200 (223)
IEAAAG13**	10	3	2,38	1	0,58	-	-	236 (192)	244 (258)
Aa35**	25	6	4,63	1	0,78	-	-	249 (250)	259 (264)

* a null allélek jelenléte miatt csak a heterozigóta genotípusok szerepeltek az elemzésben

** csak a szlovákiai mintáknál használt lokuszok (az amplifikálási és értékelési nehézségek miatt ezeket a későbbi mintáknál kihagytuk, és az elemzésekből is kimaradtak)

9. táblázat: A lokuszok kapcsoltsági egyensúlytól való eltérése páronként

Lokusz 1	Lokusz 2	p	S.E.
IEAAAG04	IEAAAG11	0,22944	0,026235
IEAAAG04	Aa02	0,5957	0,037425
IEAAAG11	Aa02	0,07323	0,014187
IEAAAG12	IEAAAG04	0,31434	0,013453
IEAAAG12	IEAAAG11	0,27437	0,011909
IEAAAG12	IEAAAG14	0,64293	0,006199
IEAAAG12	Aa02	0,14563	0,009701
IEAAAG14	IEAAAG04	0,09102	0,007616
IEAAAG14	IEAAAG11	0,08819	0,006863
IEAAAG14	Aa02	0,97753	0,002779
IEAAAG15	IEAAAG04	0,67459	0,01758
IEAAAG15	IEAAAG11	0,41358	0,017734
IEAAAG15	IEAAAG12	0,67112	0,006653
IEAAAG15	IEAAAG14	0,31451	0,008695
IEAAAG15	Aa02	0,08368	0,011865

3.2 Populációgenetikai és populációdinamikai eredmények

3.2.1 A szlovákiai állomány genetikai szerkezete

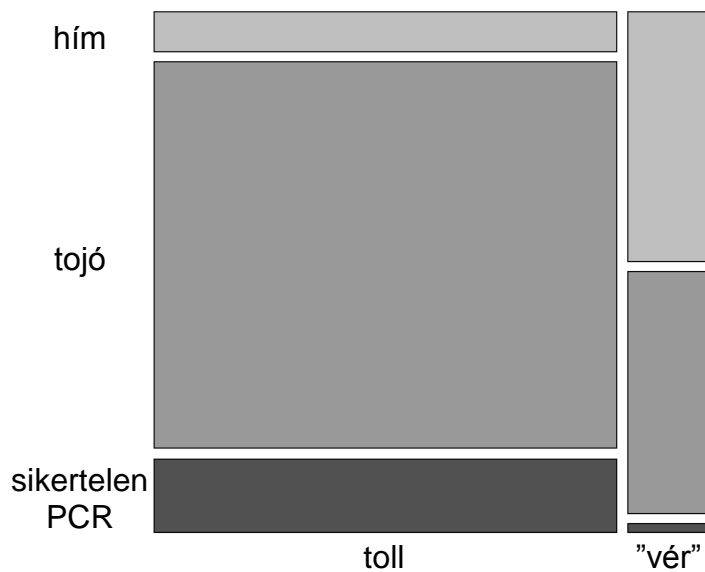
A szlovákiai parlagisas-populáció elterjedése nem egyenletes, két állományra osztható, amiket nagyjából 150 km választ el egymástól. A vizsgálat során arra kerestünk választ, hogy ez a két állomány genetikailag egységesnek tekinthető-e, illetve, hogy milyen kapcsolatban van a magyarországi állománnyal. Emellett tesztelhetjük az alkalmazott módszerek alkalmasságát az ilyen jellegű vizsgálatokra.

Az összehasonlításhoz a vizsgálat során 43 egyed mikroszatellita markereken alapuló DNS profilja, illetve mitokondriális haplotípus meghatározása készült el. 21 minta a keleti, míg 22 a nyugati területről származott (2.1.1. fejezet, 3. ábra). A vizsgálatban minden fészekből csak egy mintát használtunk, hogy elkerüljük a testvérek jelenlétéből adódó torzítást. Azokat a lokuszokat, amelyek esetén valószínű a null allélek előfordulása a 3.1.3. fejezetben részletezett módon kezeltük. A DNS-profilhoz hat tetranukleotid (IEAAAG04, IEAAAG09, IEAAAG11, IEAAAG12, IEAAAG13, IEAAAG14) és három dinukleotid lokuszt (Aa02, Aa35, Aa39) használtunk. A PI érték ezekre a mintákra $6,8 \times 10^{-8}$ volt, azaz elég alacsony az egyedi szintű vizsgálatokhoz (Waits et al., 2001)

A mikroszatellita adatok elemzése során a keleti és nyugati állomány között marginálisan szignifikáns eltérést találtunk (AMOVA, $F_{st} = 0,015$; $P = 0,05$, GenAlEx 6.41). Ezt az eredményt alátámasztja az ugyanezen egyedek mintáin végzett mitokondriális haplotípus-meghatározás eredménye is (AMOVA: $\Phi_{st} = 0,064$; $p = 0,08$; nemparaméteres egzakt teszt: $p = 0,04$; Kovács Szilvia vizsgálata, publ. Vili et al. 2009a). A kelet-magyarországi állományt is bevonva azonban a három állomány egységesnek tekinthető (Kovács Sz. személyes közlés).

3.2.2 Ivararány

A vizsgált tollminták esetében szignifikáns eltérés volt a tojóktól (555 egyed, 90,6%), illetve a hímektől származó (58 egyed, 9,4%) tollak arányában (binomiális próba, $p < 0,0001$). A Szlovákiából származó fióka minták esetén a tojók és hímek aránya nem különbözött szignifikánsan az 1:1 ivararány eloszlástól (tojók: $n = 61$, hímek: $n = 64$; binomiális próba, $p = 0,86$) (17. ábra).



17. ábra: Az ivarmeghatározás eredménye és az ivararányok (r v.2.12.1)

3.2.3 A tojók cserélődési aránya

A cserék arányának számítása

A vizsgálatba bevont 188 tollból 15-nél nem sikerült egyértelmű DNS-profilhoz jutni. A genotipizálásra alkalmas 173 minta összesen 94 különböző egyedről, többségében tojóktól származott (153 tojó, 20 hím),

A kevés hímtől származó minta miatt a cserék arányának számításakor csak a tojókat vettük figyelembe. A cserék arányának megállapításához olyan territóriumokat válogattunk, ahol legalább három egymást követő évből rendelkezésre állt vedlett tollminta. Az adatok értékelésekor a nem egyértelműen leolvasható, de kevés hiányzó lokuszt tartalmazó mintákat új PCR után új fragmensanalízisnek vetettük alá. Amelyek az ismételt reakciók után sem adtak megfelelő eredményt kizártuk a további vizsgálatokból.

Ennek eredményeként az adatsor tartalmazott hiányos éveket, így minimum és maximum cserélődési arányt állapítottunk meg. A hiányzó évek esetén, a teljes adatsorok alapján a következő eljárást alkalmaztuk (a tapasztalt eseményeket a 10. táblázat szemlélteti):

1. Ha a hiányzó év (évek) után ugyanazt az egyedet találtuk, akkor feltételeztük, hogy a kimaradt években sem volt változás.
2. Ha a kimaradt év (évek) után új egyedet találtunk, akkor a minimum cserék megállapításához az egy, biztosan észlelt cserét számítottunk be, míg a

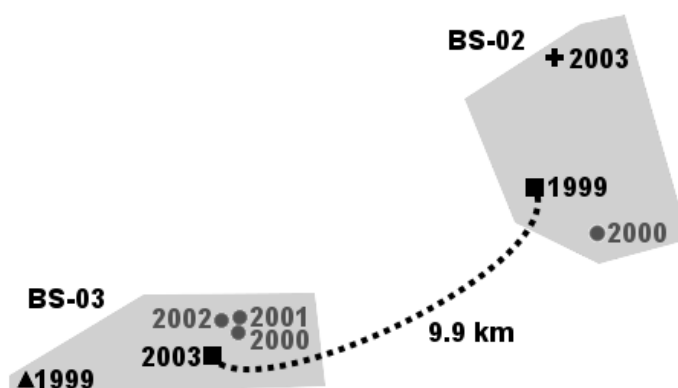
maximális csereszám megállapításkor minden kimaradó évhez számoltunk egy-egy cserelehetőséget.

10. táblázat: A vizsgálat során tapasztalt cserék mintázata

	a vizsgált évek száma						a cserék száma		
	1	2	3	4	5	6	minimum	maximum	
a	A	?	A	-	-	-	0	0	
b	A	?	?	A	-	-	0	0	
Tapasztalt mintázat	c	A	?	B	-	-	1	2	
	d	A	?	?	B	-	1	3	
	e	A	?	?	?	B	-	1	4
	f	A	?	?	?	?	B	1	5

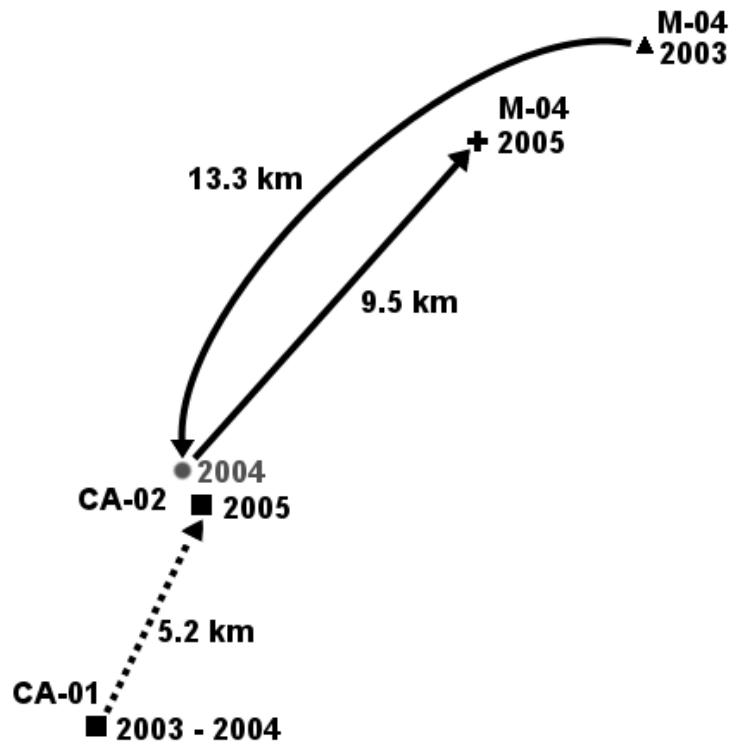
A genotípusok összeazonosítása alapján 32 alkalommal észleltünk cserét a vizsgált 46 territóriumban. Korábban azonosított tojó két esetben került meg, mindkét alkalommal egy korábban más pár által használt territóriumban.

Az első esetben a BS-02-es (Borsodi-sík) territóriumban 1999-ben gyűjtött toll alapján genotipizált tojót 2003-ban egy új alapítású territóriumban (BS-03) találtunk meg. Az eredeti területről 2000-ból nem volt megfelelő tollminta, majd 2001-ben és 2002-ben költést sem figyeltek meg. 2002 után több kisebb territórium létesült az eredeti BS-02 helyén. Mivel csak a tojótól állt rendelkezésre minta, nem lehetett eldönteni, hogy a pár territóriumot váltott és/vagy párcsere történt (18. ábra).



18. ábra: Egy, a genotipizálás eredménye alapján észrevett territórium-váltás. Egy korábban azonosított egyed (BS-02/1999, fekete négyzettel jelölve) egy későbbi alkalommal, másik territóriumban (BS-03/2003) került meg.

A másik esetben két költő pár (CA-01, Cserhátalja-01 és M-04, Mátra-04) terepi megfigyelései alapján feltételezhető volt, hogy több alkalommal is territóriumot váltottak 2003 és 2005 között (19 ábra).



19. ábra: Két pár fészkelésének alakulása 2003 és 2005 között. Terepi megfigyelések alapján is feltételezhető volt, hogy többször territóriumot váltottak. Ezt később a genotipizálási adatok is megerősítették.

2003-ban a fészkeik 18,6 km-re voltak egymástól és a két territórium szomszédos volt (azaz nem volt köztük másik). 2004-ben az egyik pár (M-04) közelebb mozdult a másikhoz (CA-01), ami a korábbi fészket használta. A köztük mért új fészektávolság 5,7 km volt. Mivel az elmozdulás 12,9 km volt, azaz nagyobb az átlagos fészektávolság felénél (3,5 km, Kovács et al., 2005), a fészket új territóriumba sorolták (CA-02). Az elhagyott territórium üresen maradt ebben az évben. 2005-ben a korábban is átmozduló M-04-es pár visszaköltözött az eredeti 2003-as fészke közelébe (9,5 km), az addig helyben maradó CA-01-es pár pedig a 2004-ben újként meghatározott territóriumában kezdett költetni.

A cseréket territóriumonként összegeztük, majd ezeket átlagolva határoztuk meg az átlagos minimum és maximum cserélődési arányt. A minimum arány, azaz a ténylegesen megfigyelt cserék aránya 27,2% volt. Az elméletben lehetséges maximális cserélődési arány 35,5% volt. Számításakor a megfigyelt cserék mellett a hiányzó évekre is cserét számoltunk, ha utánuk új madár költött a territóriumában.

Mivel a síkvidéki és a hegyvidéki fészkek több szempontból (rendelkezésre álló terület, zsákmánymennyiség, territórium méret) eltérő élőhelyek, megnéztük, hogy a cserék aránya összefüggésbe hozható-e az élőhely típusával (11. táblázat). Az alföldi és a hegyvidéki fészkek esetén jelentős különbség volt megfigyelhető, de az eltérés sem a minimum, sem a maximum arányok esetén nem volt szignifikáns (minimum: Brunner-Munzel teszt statisztika = -0,8035, df = 24,409, p = 0,429; maximum: Brunner-Munzel teszt statisztika = -0,764, df = 24,237, p = 0,452; Brunner-Munzel teszt, r v 2.12.1).

11. táblázat: A megfigyelt cserék száma sík- és hegyvidék esetén.

élőhely-típus	cserék			
	minimum		maximum	
síkvidék	24	(29,3%)	38	(38,0%)
hegyvidék	8	(21,3%)	12	(28,3%)
összes	32	(27,2%)	50	(35,5%)

A nem várt, magas cserélődési arány alapján feltételezhető volt, hogy idősebb, tapasztaltabb madarak cserélhetik le a tapasztalatlan, fiatal egyedeket. Mivel a madarak tollazata (mintázat, szín) a korrallal változik, az ismert genotípusú tojók egy részénél a korcsoportot (immatur vagy adult) is meg lehetett állapítani.

A megfigyelések alapján az olyan esetekben, ahol mindkét madár kora ismert volt (20 eset), többségében az új és a korábbi tojó is adult volt (14 eset). Tehát az egyedek kora ésszel összefüggésben a tapasztatlanságuk nem magyarázta a lecserélődésüket.

A hímek cserélődési aránya

A hímekről a kevés minta miatt csak korlátozott információ áll rendelkezésre. Az eredmények igazolják, hogy a párok több éven át együtt maradnak, de a hímek, illetve a párok cserélődési aránya ennyiből nem volt megbecsülhető (12. táblázat).

12. táblázat: A hímek és nőtények váltásai azon territóriumokon, ahonnan legalább két évből volt hímtől származó minta.

	síkvidék				hegyvidék			
	HS-05		HS-13		M-06		Z-01	
1997							Z01F1	?
1998							Z01F1	?
1999							Z01F1	?
2000					M06F1	?	Z01F1	Z01M1
2001	HS05F1	?			M06F1	?	Z01F1	Z01M1
2002	?	HS05M1	?	HS13M1	M06F1	?	Z01F1	Z01M1
2003	HS05F2	HS05M1	HS13F1	HS13M2	M06F1	M06M1	Z01F1	Z01M1
2004	HS05F2	HS05M1	HS13F2	?	M06F1	M06M1	Z01F1	?
2005	?	HS05M1	HS13F2	?	M06F1	M06M1	Z01F1	?
2006					?	M06M1		

3.2.4 A hagyományos terepi territóriumterképezés megbízhatóságának ellenőrzése

Az egyedi szintű azonosítással lehetőség nyílt a terepen alkalmazott relatív átlagos fészektávolságot (legközelebbi szomszéd-távolság) alapul vevő territórium-meghatározási módszer ellenőrzésére (Függelék 10.3. fejezet).

1997 és 2006 között az ismert fészkek száma 37-ről 76-ra nőtt (13. táblázat). A vizsgálat során összesen 46 territóriumban határoztam meg legalább két egymást követő évben az egyedek DNS-profilját (az évek száma 2 és 8 között változott). Ez az adott időszakban aktív fészkek közel 60%-át jelenti.

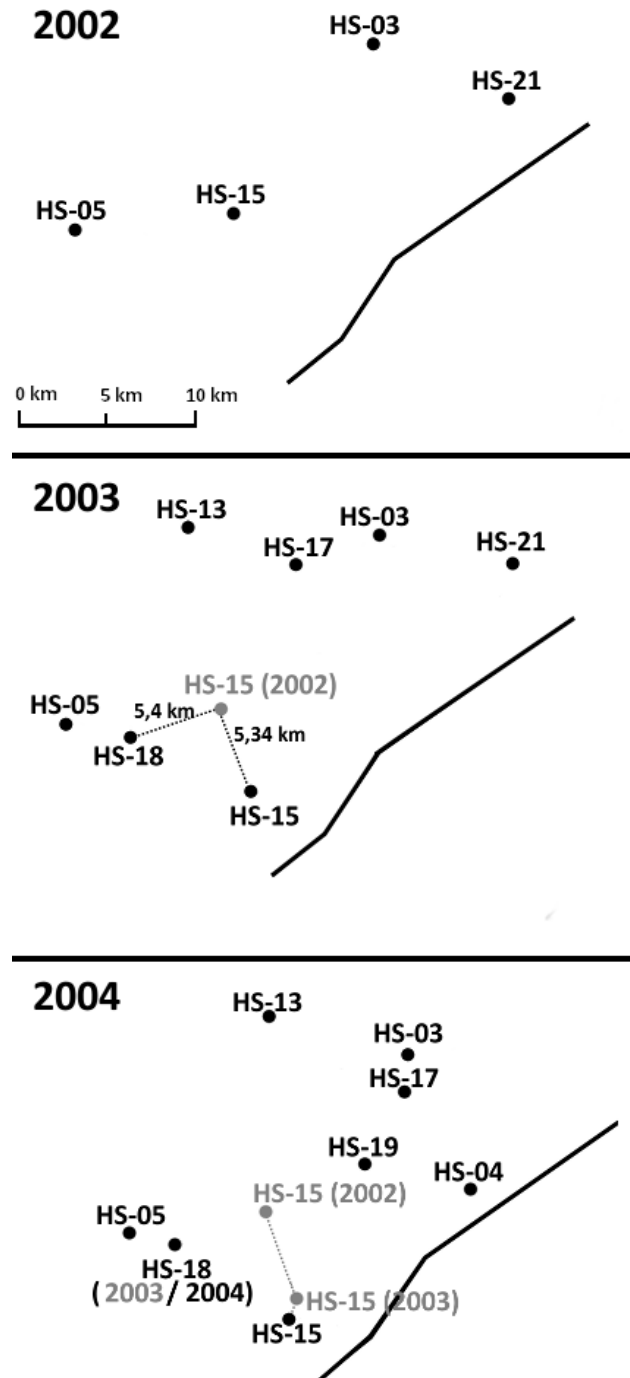
A vizsgált időszakban a tojók (párok) 20 alkalommal ugyanazt a fészket használták az egymás utáni években, míg 42 esetben fészkelőhelyet váltottak. Ha a terepi megfigyelések és fészektávolságok alapján történő territóriumhoz rendelés nehézségeibe ütközött, akkor általában a következő évek adataiból visszakövetkeztetve egyértelműen besorolható volt a fészkek (20. ábra).

13. táblázat: A vizsgálatba bevont fészkek számának alakulása a vizsgálat ideje alatt

év	összes fészkek	költő madár	ismert madár*	%**
1997	37	74	3	4,05%
1998	39	78	2	2,56%
1999	40	80	5	6,25%
2000	44	88	15	17,05%
2001	46	92	13	14,13%
2002	50	100	31	31,00%
2003	61	122	42	34,43%
2004	65	130	29	22,31%
2005	72	144	27	18,75%
2006	76	152	10	6,58%

* a vizsgált egyedek mintázott vagy következtetett száma (következtetett: olyan kimaradó év/évek, amely után nem volt csere)

** az összes egyed hány százaléka ismert



20. ábra: Esettanulmány a HS-15-ös és HS-18-as territóriumokról. A 2003-ban megjelenő két új fészek a távolság módszer alapján nem volt egyértelműen besorolható, de a következő évek fészkelései alapján már igen.

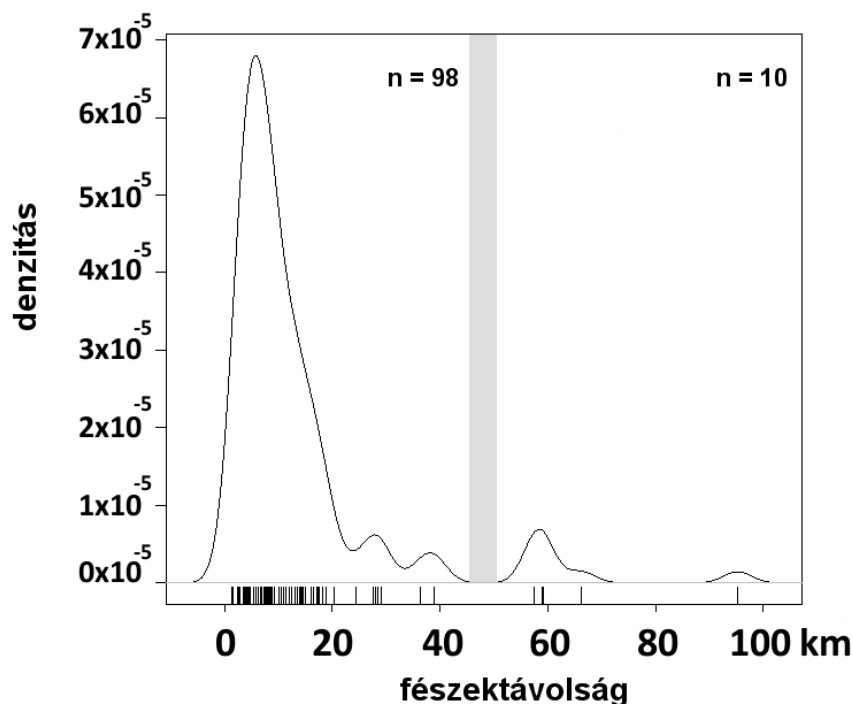
A DNS alapján azonosított egyedek a terepi módszerekkel meghatározott territóriumon belül maradtak vagy eltűntek. A korábban említett (3.2.3. fejezet) két esetet leszámítva nem fordult elő, hogy egy korábban genotipizált, majd hiányzó egyed másik territóriumból került volna elő, azaz ha egy egyedet egy másik lecserélt, akkor az eredeti lakót többet nem találtuk meg.

3.2.5 A terjedési mintázat

A magyarországi parlagisas-populáció terjeszkedési mintázatának vizsgálatokor elemeztem az 1980 és 2007 közötti költési kísérletek adatait. A 881 költés közül 108 új territóriumban történt. Ezeknél a fészkeknél megkerestük a hozzájuk legközelebb eső fészket és a koordinátáik alapján meghatároztuk a távolságukat.

Az eredmény alapján a legtöbb új territórium a már meglévők közé ékelődik. Ezeken a területeken a legkisebb fészkek között mért távolság 1,3 km volt. Néhány pár azonban a korábbiaktól jelentős távolságra, akár 90 km-re foglalt fészket. A későbbi időszakokban ezek köré újabb párok telepedtek, míg végül egységes területet alkotott a sasok által korábban is lakott térséggel.

A fészektávolságok eloszlása nem normális eloszlás (21. ábra). A mért távolságokat figyelembe véve a Shapiro-Wilk teszt eredménye $W = 0,651$; $p = 1,2 \times 10^{-14}$ (a távolságok logaritmusával számolva $W = 0,973$; $p = 0,0271$).



21. ábra: Simított hisztogram a fészektávolságok eloszlásáról. Látható, hogy az eloszlás nem normális, és távolságokban 40 és 60 km között egy szakadás figyelhető meg (szürke sáv).

Annak felmérésére, hogy az új territóriumok létrejöttében tapasztalt mintázat összefüggésbe hozható-e az egyedek rokonsági fokával, azaz, hogy a közelebbi rokonságban levő egyedek közelebb foglalnak fészket, Mantel-tesztet végeztünk (14. táblázat). A tesztet minden olyan évre elvégeztük, ahol nyolcnál több minta volt ($N_{2006} = 8$). A

2006-os év mintái azért kerültek be az elemzésbe, mert elképzelhető, hogy az itt mintázott fiatal madarak között olyanok is vannak, amelyek a vizsgálat kezdeti éveiben (2000-2001) repültek ki, így a korábbi évek mintái közt szerepelhetnek a szüleik, testvéreik.

14. táblázat: A Mantel-teszt eredményei évenként, és az összes év együttvéve.

évek	R_{xy}	p	N
2000	0,0809	0,209	14
2001	0,2545	0,0157	17
2002	-0,0057	0,489	24
2003	0,054	0,045	40
2004	-0,0962	0,14	31
2005	0,0361	0,355	24
2006	-0,0581	0,41	8
összes év	-0,0586	0,163	63

Összesen 63 pontos fészekkoordinátával rendelkező egyedet azonosítottunk, ezért az összes évet együtt vizsgáló tesztekben a maximális egyedszám szerepel (N = 63). Mivel évenkénti bontásban nem volt minden madár egyszerre jelen, az évenkénti egyedszám ettől eltér.

A korrelációs koefficiens a 2001-es év mintáinál szignifikáns eltérést mutatott a nullától, de összességében vizsgálva az egyedek földrajzi helyzete nem volt összefüggésbe hozható a rokonsági fokukkal. Tehát a tapasztalt mintázat nem magyarázható az egyedek közti rokonsággal.

4. Megbeszélés

4.1 A minták típusának és a tollak fizikai jellemzőinek hatása

A tollak genetikai vizsgálatokban történő alkalmazhatóságát számos publikáció említi (pl. Martínková és Searle, 2006; Rudnick et al., 2007; Guerrini és Barbanera, 2009; Jacob et al., 2010), azonban csak kevés, főleg nagy testű ragadozómadár-fajokkal kapcsolatos vizsgálatban használták ezt a mintavételi eljárást (pl. parlagi sas – Horváth et al., 2005; galambok – Seki, 2006; réti sas – Hailer et al., 2007; spanyol parlagi sas – Martínez-Cruz et al., 2007; hárpia – Banhos et al., 2008; kondorkeselyű – Alcaide et al., 2010; szirti sas – Bourke et al., 2010; fekete sas és békászó sas – Váli et al., 2010; strucc - Miller et al. 2011).

A DNS töredezettségét egy nagy méretű (400 – 700 bp) nukleáris lokusz felszaporításával vizsgáltuk. Mivel minden vizsgálni kívánt mikroszatellita szakasz rövidebb volt az itt amplifikált szakaszoknál, feltételeztük, hogy sikeres ivarmeghatározás esetén fragmentáltság nem olyan mértékű, ami miatt az egyedi azonosítás nem lehetséges. A mintatípus, illetve a tollakon mért változók hatásaira az ivarmeghatározás eredményeiből, azaz az amplifikáció eredményességéből következtettünk. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a DNS-oldatok és PCR-termékek elektroforézisének eredménye korábbi kutatásokkal (Hogan et al., 2008; Zayats et al., 2009) összhangban jól jelezte a minták felhasználhatóságát.

A vizsgálat során koncentrációmérést nem végeztünk, mivel korábbi eredmények alapján a nagy méretű parlagi sas tollakból izolált DNS koncentrációja elég magas (93 ng/μL; Horváth et al., 2005). Más vizsgálatok alapján a 10 ng/μL-es koncentráció fölötti értékek megfelelőek a PCR-ek elvégzéséhez (Johansson et al., 2012). Egy 2005-ben publikált ürömfajdokkal (*Centrocercus urophasianus*) foglalkozó kutatás során tépett a fedőtollakból izolált DNS koncentrációja 40 ng/μL volt, és a DNS-izolálás, illetve a PCR-ek sikeressége 100%-os volt (Bush et al., 2005).

A minták típusát tekintve nem találtunk különbséget a felső köldökben fennmaradó vérrögökből kinyert DNS minősége és a minimál invazív módon vett vérmintákból izolált DNS-ek amplifikálhatósága között (Vili et al., 2009b).

A vizsgált paraméterek (a tollak minősége, mérete és típusa, a vedlés és a preparálás közt eltelt idő) közül csak a toll fizikai állapota (minőség) volt szignifikáns hatással a DNS minőségének (tisztaságának és töredezettségének) mértékére. Ez alátámasztja és a tollak felső köldökéből izolált DNS-re is kiterjeszti Hogan és munkatársai (2008) kutatási eredményét, mely szerint a tollak állapota a legfontosabb jelzője a DNS minőségének.

A toll típusa nem volt szignifikáns hatással a reakciók sikerességére, de az elsőrendű evezők, közepes méretű tollak és farktollak jobb eredményt adtak, mint a fedőtollak, illetve

másod- és harmadrendű karevezők. Ezért az utóbbiak használatát lehetőség szerint érdemes kerülni. Emellett fontos megjegyezni, hogy a sikeres amplifikációk aránya a faroktollak esetén volt a legmagasabb, bár ez statisztikailag nem volt igazolható. A jelenséget bizonyos fokig magyarázhatja az a megfigyelésünk, hogy a faroktollak csévéje keményebb a többi típusnál. Így jellemzően nehezebben preparálható a többi tollnál, és valószínűleg a fizikai károsodással szemben is ellenállóbb.

Mivel a begyűjtés és preparálás közt eltelt idő sem volt hatással a DNS felhasználhatóságára, feltételezzük, hogy a tollak tárolási körülményei ideálisak voltak. A tollakat száraz, hűvös és sötét helyen tároltuk, illetve a preparált darabokat felhasználásig fagyasztóban (-20°C) tároltuk.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a nem invazív módon vett minták esetén a megfelelően tárolt jó vagy közepes minőségű, lehetőleg nagy méretű, vedlett tollakból kinyert DNS alkalmas a parlagi sas állományok egyedi szintű populációgenetikai felmérésére. Ezáltal lehetőség nyílik földrajzilag távoli populációk egyedeinek genetikai vizsgálatára, hiszen a terepen begyűjtött tollakat akár postán is, rövid idő alatt el lehet juttatni a mintákat feldolgozó laboratóriumokba. Így a helyi szakemberek bevonásával jelentősen csökkenthetők a vizsgálatok költségei (pl. utazás, mintatárolás). A mintagyűjtést az is leegyszerűsíti, hogy összeköthető a fiókák gyűrűzésével és a fészkek rendszeres ellenőrzésével.

A vizsgálatok tervezésénél és a frissen begyűjtött tollak tárolásánál azonban mindenképp figyelembe kell venni a környezeti tényezőket is, mivel a nedvesség és a közvetlen napfény károsíthatja a DNS-t (Li et al., 2002; Johansson et al., 2011; Vili et al., 2013). Ezért nagyon fontos, hogy a vedlési időszakban az időjárástól függően több mintagyűjtés is történjen. Emellett a kontamináció elkerülése és a mintavétel standardizálása érdekében elengedhetetlen gyűjtést végzők megfelelő felkészítése (Johansson et al., 2011).

4.2 A szlovákiai állomány genetikai szerkezete

A vizsgálat során a földrajzi akadályokkal szétválasztott szlovákiai állomány egységességét vizsgáltuk meg genetikai szempontból, fióktól vett vérmintákból és vedlett tollakból izolált DNS-ek felhasználásával.

A vizsgálat során megállapítottuk, hogy a felnőtt madarak esetén a tollak alapján torzított ivararány (105 tojó és 8 hím) figyelhető meg. A jelenséget valószínűleg az ivarok eltérő viselkedése okozza. A költési időszakban a tojók jóval több időt töltenek a fészken, illetve közvetlen közelében, mint a hímek (Margalida et al., 2007, Horváth M. személyes közlés). Ennek következtében a nagy biztonsággal az adott költőpárhoz rendelhető, azaz a fészkek alól gyűjtött tollak között sokkal több tojótól származó várható.

A fiókamintáknál Rudnick és munkatársai (2005) eredményéhez hasonlóan az ivararány nem különbözött az 1:1-es aránytól (61 tojó és 64 hím). A fiókák ivarát a gyűrűzéskor morfológiai tulajdonságok alapján is meghatározták az SRJ munkatársai. A molekuláris ivarmeghatározáskor azonban kiderült, hogy az esetek harmadában téves eredményre jutottak, azaz a fiókák ivararányának meghatározásához szükséges a DNS alapú szexálás.

A mikroszatellita lokuszok allélgyakoriságainak eloszlását és a mitokondriális haplotípusokat figyelembe véve marginálisan szignifikáns elkülönülést találtunk a keleti és nyugati állomány között (Vili et al., 2009a). Ezek alapján elmondható, hogy a faj nagy migrációs képessége ellenére, relatív kis földrajzi távolság is okozhat génáramlás-csökkenést a két állomány egyedei között. Martínez-Cruz és munkatársai (2004) az ibériai sasnál végzett kutatásukkor hasonlóan kis elkülönülést találtak az egyes populációk között, melyek távolsága megközelítőleg azonos volt a szlovákiai állományok között levővel.

Eredményeink Kovács és munkatársai (2010) eredményeivel együtt értelmezve, alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a Kárpát-medence állományát egységesnek kell tekinteni (Horváth et al., 2002), ugyanakkor a keleti és a nyugati költőállományok szubpopulációknak tekinthetők, melyek között limitált a génáramlás.

Meg kell jegyezni, hogy az ebben a vizsgálatban használt vedlett tollaknak csak 13,6%-ánál sikerült az egyedek teljes DNS-profilját meghatározni, a sikeres ivarmeghatározás ellenére. A későbbi mintatárolásra és környezeti tényezőkre vonatkozó vizsgálat alapján feltételezhető, hogy sem a tollak, sem az izolált DNS-ek tárolása nem volt megfelelő és ez okozhatta a gyenge amplifikálási sikert.

4.3 Éves cserélődési arány a magyarországi állományban

Populáció-, illetve a fajvédelmi programok sikerességének szempontjából nagyon fontos információ, hogy mennyire stabil a védelem alatt álló, illetve kezelt állomány, mekkora mortalitás jellemzi (Ferrer és Calderon, 1990; Kirk és Hyslop, 1998; Wakamiya és Roy, 2009). Ennek egyik gyakran alkalmazott mérési módja az egyedek jelölés-visszafogásos vizsgálata (Rudnick et al., 2009), mivel ilyenkor a jelölt egyedek nyomon követhetők és ebből következtetni lehet az állomány szerkezetére, állapotára.

A rendelkezésünkre álló adatsor nem volt alkalmas jelölés-visszafogásos elemzés elvégzésére. Ennek fő oka, hogy a kirepülés és fészekrakás közt eltelt idő a parlagi sasnál 4-5 év lehet, és erről az időszakról nagyon kevés információnk van. A fiatal madarak a kirepülés után kóborolnak, majd alkalmas párt találva letapednek. A Kárpát-medencében territóriummal rendelkező párok nem vonulnak telelőterületekre, hanem télen is a territóriumukban maradnak, de a határait ilyenkor kevésbé szigorúan védik.

Az éves cserélődési arány megállapításához 46 territóriumot választottunk, de az egyes területekről begyűjtött tollak minősége miatt nem sikerült minden területről minden vizsgált évből értékelhető eredményt kapni, ezért minimum és maximum cserélődési arányt állapítottunk meg.

A becsült cserélődési arány éves átlagos minimuma 27,2%, a maximuma 35,5% volt. Ez az arány jóval nagyobb annál, mint ami a hazai állomány folyamatos terjeszkedése következtében várható lenne. Irodalmi adatok alapján nagy testű és hosszú életű ragadozómadarak közt kifejezetten alacsony éves cserélődési arány várható (6-12%, Ferrer és Penteriani, 2008). A fajjal kapcsolatosan korábban végzett ilyen jellegű vizsgálatban egy stabil (azaz nem csökkenő és nem terjeszkedő), kazahsztáni populációnál három év alatt 131 egyedet megvizsgálva 20 cserét (15 tojó, 3 hím) tapasztaltak (Rudnick et al., 2005). Az általuk alkalmazott számítások eltértek az itt használt módszertől. Elemzéseik során a populációból eltűnő egyedeket két csoportba osztották, az egyikbe kerültek azok, amelyek helyén a következő évben új egyedet találtak (ezeket tekintették cserének), a másikba olyanok, amelyek után üresen maradt az adott territórium. Minden eltűnést figyelembe véve számolták ki az átlagos éves populációs-veszteséget, ami 16%-nak adódott. A tényleges cserék aránya ennél alacsonyabb volt. A tanulmányból azonban nem derül ki, hogy a fészkek mekkora hányadát mintázták, csak annyi, hogy összesen hány egyedet azonosítottak.

A kelet-magyarországi költő madarak rendkívül magas cserélődési arányát három jelenséggel lehetne magyarázni: (i) a territóriumok instabilitása, (ii) az elvándorlás és (iii) a fészkelő madarak nagy mortalitása. Mivel a vizsgálat során csak két olyan eset volt, amikor a költő madár eltűnt, majd másik territóriumban jelent meg, a territóriumok instabilitása kevésbé valószínű. Ezt alátámasztja az is, hogy a szomszédos fészkek távolságaiban nem volt eltérés aszerint, hogy az ott fészkelő tojó lecserélődött vagy sem, így valószínű, hogy a territóriumok létező egységek, amelyek alapvető elhelyezkedését a tapasztalt nagy cserélődési arány nem befolyásolja.

A populációból való elvándorlást nem lehet kizárni, de a valószínűsége Kovács és munkatársai (2010) az európai parlagisas-populációk genetikai struktúrájának és diverzitásának vizsgálatakor kapott eredményei alapján várhatóan nagyon kicsi. Vizsgálatuk során azt találták, hogy bizonyos haplotípusok az összes európai populációban megtalálhatóak, de szinte mindegyik esetén van csak az adott populációra jellemző haplotípus. A Kárpát-medencét és a hozzá legközelebb eső bolgár és macedón populációt tekintve kimutatták, hogy az "S" haplotípus csak a Kárpát-medencében fordul elő, illetve az itt leggyakoribb "E" haplotípus csak bolgár és macedón populációnál távolabbi, kaukázusi állományban található még meg. A szomszédos macedón populációban a "P" haplotípus a legelterjedtebb, de ez haplotípus a Kárpát-medencei állományban nem fordult elő. A bolgár

populációban a csak ott megtalálható az "N" haplotípus mellett kimutatták az "I", a "H" és az "M" haplotípusokat, amelyek nem fordulnak elő a Kárpát-medencében. Ezek alapján a három szomszédos populáció között nem vagy csak nagyon limitált génáramlást valószínűsítettek.

A terepen talált elhullott egyedek száma alapján a tapasztalt magas kicserélődési gyakoriság magyarázható lehet a költő madarak nagy mortalitásával. Habár mintavételünk nem terjedt ki a teljes populációra, annak a valószínűsége, hogy egy genotipizált, majd eltűnt egyed újra megjelenjen az adataink alapján nagyon kicsi. A faj kazahsztáni populációjának vizsgálatakor tapasztalt nagymértékű éves veszteségre Rudnick és munkatársai (2005) két lehetséges magyarázatot adtak. Egyrészt magas cserélődési arány várható, ha az éves túlélés alacsonyabb a vizsgált területen, mint más ragadozómadarak esetén, vélhetően emberi vagy környezeti okok miatt. Másrészt a nagy veszteséget magyarázhatná az is, ha a felnőtt egyedekre nem lenne jellemző a területhűség. Az utóbbi lehetőséget azonban nem tartották valószínűnek, mivel a vizsgálatuk ideje alatt erős helyhűséget tapasztaltak az egyedeknél. Továbbá abból kiindulva, hogy a parlagi sas erősen territoriális faj, feltételezték, hogy ha valamiért nem tud visszatérni a territóriumába, akkor újat foglal vagy alapít, de a vizsgálatuk során nem találtak ilyen esetet. Ezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az éves veszteség megfeleltethető az éves mortalitásnak.

Az elmúlt években a felmérések alapján Magyarországon a legtöbb parlagi sas elhullásáért az elektromos távvezetékek és az illegális mérgezések tehetők felelőssé (Horváth et al., 2011). Ezen tényezők hatását más fajokon is megvizsgálták és kiderült, hogy a közvetlen mortalitás mellett a vezetékek és oszlopok elhelyezkedése nem csak a potenciális territóriumok számát, hanem elhelyezkedését is befolyásolja, ami végül a populáció egyedszámának csökkenéséhez vezethet (Bevanger, 1998; Janss és Ferrer, 2001; Sergio et al., 2004).

Míg Magyarországon a vezetékek hatása az elmúlt években többé-kevésbé állandó maradt, addig a mérgezések száma folyamatosan emelkedik. Az elmúlt hét évben közel 70 mérgezésben elpusztult parlagi sast találtak (Horváth et al., 2011). A mérgezések oka leggyakrabban a forgalomból már kivont növényvédőszeres illegális használata, amelyek hatása olyan gyors, hogy a csali nagy része érintetlen marad. Ennek következtében nem csak azok az állatok pusztulnak el, amelyek a mérgezés elsődleges célpontjai, hanem további ragadozók és dögevők is. Így annak ellenére, hogy a legtöbb esetben nem a sasok a mérgezés elsődleges célpontjai, gyakran áldozatul esnek. Emellett, mivel a legtöbb lecserelődött tojó adult színezetű, tehát valószínűleg idős, tapasztalt madár volt, a cserélődési arányt a költő madarak esetleges tapasztalatlansága sem magyarázza.

A nagy cserélődési arány ellenére a vizsgált populáció folyamatosan növekszik. Ez azt jelenti, hogy az eltűnő egyedek helyére újak érkeznek, és évről évre nő a territóriumok száma. A kirepülő fiatal madarak feltételezett erős helyhűsége miatt a várhatóan nagyszámú

kóborló egyed pótolni tudja az eltűnő madarakat, illetve növeli a populáció egyedszámát (Kenward, 2000). A kóborló egyedek száma egyelőre nem ismert, de a kirepülés előtt álló fiókák DNS-profiljainak elkészítése folyamatban van, így néhány éven belül várhatóan pontosan meg lehet majd határozni a költő madarak eredetét és a kirepült fiókák túlélési és visszatérési arányát. Emellett egy 2012-ben indult palagisas-védelmi LIFE program keretein belül hat éven keresztül 100 magyarországi territórium költőmadarainak genotipizálására kerül sor. Mivel a kiválasztott territóriumokat fokozottan ellenőrzik, a mérgezések okozta elhullásokról is pontos adatok várhatóak. Így az eredmények alapján remélhetőleg jobban meg fogjuk érteni a mérgezés hatásait és magas cserélődési arány és a mortalitás kapcsolata is tisztázódni fog.

4.4 A territóriumterképezési módszer megbízhatóságának ellenőrzése

A populációdinamikai és viselkedésökológiai vizsgálatokban a territóriumokat gyakran használják mintavételi egységként. Ennek oka, hogy az egyes költési kísérleteket külön-külön alapul véve, pszeudoreplikáció lép fel (Bisson et al., 2002; Sergio et al., 2006). A territórium pontos definíciója azonban gyakran hiányzik a vizsgálatokból (Penteriani et al., 2002; Rudnick et al., 2006). Ha mégis található, valamilyen definíció az általában kutatásonként változik. Katzner és munkatársai (2006) kutatásában a territórium olyan terület, amelyben egy vagy több éven megfigyeltek felnőtt egyedeket. Más meghatározásokban az a terület, amely magában foglalja a pár azévi és korábbi fészkeit ("nesting territory", Margalida et al., 2007).

A fészkelő parlagi sas párokról, csakúgy, mint más nagy termetű nem telepesen fészkelő ragadozó madárfajról feltételezik, hogy életre szólóan monogámok, a párok territóriálisak, és több éven át ugyanazt a territóriumot használják (del Hoyo et al., 1994; Ferrer, 2001). Rudnick és munkatársai egy stabil parlagi sas populációban nagyfokú territórium- és párhűségét mutattak ki (2005). A vizsgált időszakban nem találtak territóriumot váltó egyedeket, sem extra-pár utódokat, tehát eredményeik alapján a faj szociáisan és genetikailag is monogám.

A Kárpát-medencében a parlagisas-állomány az 1980-as évek végéig az Északi-középhegységbe visszaszorultán költött (Bagyura et al., 2002). Az 1990-es évek elején az emberi zavarás csökkenésével és a vadászat betiltásával a populáció lassan növekedésnek indult, majd ez később gyakorlatilag exponenciális ütemben folytatódott (Horváth et al. 2011). A vizsgált nyolc év alatt (1998 – 2006) a használatban levő fészkek száma megduplázódott (37-ről 75-re emelkedett). Az MME munkatársai az 1980-as évek óta követik nyomon a hazai parlagisas-állomány alakulását. Megbízható és statisztikailag is értékelhető

állománymonitorozási módszerek (szinkronszámlálások) alkalmazásával folyamatosan ellenőrzik a fészkelő párok számát és a fészkek helyét (Horváth et al., 2011).

A vizsgálat során az új fészkek korábbi territóriumokhoz történő rendeléséhez, illetve az új territóriumok meghatározásához használt tradicionális territóriumterképezési módszert ellenőriztük az egyedi genotípusok felhasználásával. Az esetek legnagyobb részében a genetikai adatok alátámasztották a fészkek terepi megfigyeléseken alapuló territóriumba sorolását, azaz a territóriumterképezési módszer az esetek csak kevesebb, mint 2%-ában nem volt egyértelmű (BS-02-1999/BS-03-2003, M-04/CA-01/CA-02 territóriumok). Így elmondható, hogy az MME által használt módszer megbízhatóan képes követni a territóriumok alakulását.

4.5 A terjedési mintázat

A Kárpát-medencei parlagi sasok terjeszkedési mintázatát vizsgálva megfigyelhető volt, hogy a madarak nem "sávokban" haladnak a déli területek felé, azaz nem a periférián elhelyezkedő territóriumokon kívül, egyértelműen a populáció által lakott terület méretét növelve létesülnek az új territóriumok, hanem a meglévő territóriumok közé ékelődik a legtöbb pár. Néhányan azonban a többiekől messzire, akár 90 km távolságban választottak fészket, majd idővel köréjük újabb párok érkeztek, és feltöltötték a kimaradó helyeket (Függelék 10.2. fejezet). Az ilyen párok száma azonban nagyon kevés, 27 év alatt 10 ilyen eset volt, de a jelenség nem elhanyagolható, mert újabb párok megtelepedését segíti elő.

Az új fészkek és a hozzájuk legközelebb eső territórium azévi fészkei közt mért távolságok eloszlása nem volt folyamatos. Ennek alapján hipotézisünk, hogy a populációban két territórium-foglalási stratégia van jelen. Az elsőt alkalmazó párok igyekeznek olyan helyre települni, ahol már vannak fajtársak, azaz valószínűleg számukra a terület értékét az fejezi ki, hogy már fészkelnek sasok a közelben. Ezek a beékelődő párok kisebb kockázatot vállalnak, amihez valószínűleg kisebb, de biztosabb nyereség társul. A másik stratégiát követő párok nagy kockázatot vállalnak, amikor messzire, sasok által még nem lakott területre fészkelnek, mert nem tudni, hogy a terület alkalmas lesz-e fészkekrákásra és fiókanevelésre. A nyereségük viszont nagyobb lehet, hiszen eleinte kisebb befektetéssel tudják védeni a területüket, és amennyiben elegendő táplálék van a közelben, nagyobb eséllyel tudják felnevelni a fiókáikat.

Mivel a populáció nagyon kicsi egyedszámról indult újra terjedésnek, elképzelhető volt, hogy a terjedési mintázat valamilyen szinten megfeleltethető az egyedek rokonsági kapcsolatainak. Más fajokon végzett korábbi vizsgálatokban azt találták, hogy a közelebbi rokon egyedek által foglalt territóriumok jellemzően egymáshoz közelebb helyezkednek el, mint a távolabbi vagy egyáltalán nem rokon egyedekéi (Piertney et al., 1999; Kitchen et al.,

2005; Moyer et al., 2006). Az egyedek rokonsági fokának és az általuk használt fészkek távolságának kapcsolatát vizsgálva, az egyedek genetikai és fészkeik földrajzi távolsága közt nem volt korreláció. Ez alapján kizárható az a lehetőség, hogy a mintázat a rokonsági kapcsolatokat tükrözi. Meg kell azonban jegyezni, hogy a genotipizált egyedek legnagyobb része tojó volt, így egyelőre nem lehet tudni, hogy az ivarok között van-e eltérés a kirepülés utáni helyhűségben.

További lehetőség a mintázat magyarázatára, hogy a fiatalok a kóborlással töltött éveik alatt felméri egy-egy terület alkalmasságáról, és később oda térnek vissza. Ez egyelőre feltételezés, amit a testvérfajnál korábban már sikerült bizonyítani (Ferrer, 1993c).

Az ibériai sasnál is jelentős populációnövekedés volt megfigyelhető. 1974 és 2004 között. A növekedés három fázisra volt osztható, az első szakaszban (1974 – 1993) évente átlagosan 5,1 párral nőtt a fészkek száma, 25-ről 127-re. A második szakaszban (1994 – 1999) összesen négygel emelkedett az ismert párok száma. Majd harmadik szakasz (2000 – 2004) végére a fészkelő állomány 188 párból állt (átlagosan 14,2 pár évente). A növekedés a Doñana Nemzeti Park kivételével minden élőhelyen tapasztalható volt (Ortega et al., 2009). Az Ibériai-félsziget öt állományát külön vizsgálva valószínűsítik, hogy a nyugati állomány forrásként, míg az északi nyelőként szolgált. Ez a két terület a populációs trendek és az alacsony termékenység miatt valószínűleg telítődött, de a középső és a déli területen még várható növekedés. A populációk közti mozgást a kirepülés utáni territórium-választási adatok (Gonzales et al., 2006) is alátámasztják. Emellett az egyedek területek közti mozgása a Martínez-Cruz és munkatársai (2004) által megfigyelt genetikai mintázatot is magyarázza.

A Kárpát-medencei populáció a költési és populáció-növekedési adatait figyelembe véve valószínű, hogy terület még nem telítődött és további állomány-növekedés várható.

A territórium választással kapcsolatos hipotézist és feltevéseket, illetve ezzel összefüggésben a fiatal madarak kirepülés utáni helyhűségét ("natal philopatry") jelenleg a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Konzerváció-genetikai Munkacsoportja vizsgálja. Az eddigi eredmények alapján a meggyűrűzött fiókák nagyon kis hányada költ a Kárpát-medencében. A minták jelentős részének feldolgozása után a 2004 és 2007 között kikelt és mintázott több mint 200 fióka közül a 2011-ben Magyarországon fészkelő populációban hét egyedet találtunk meg, így egyelőre a kirepülés és költés helye közötti távolság statisztikailag nem értékelhető. A kutatás végén várhatóan arra is választ lehet majd kapni, hogy az ivarok között van-e különbség a terjedési stratégiában, illetve a kirepülési hely típusa (hegyvidék, síkvidék) befolyásolja-e a későbbi territórium-választást.

5. Új tudományos eredmények

Módszertani eredmények

1. A vedlett tollakból izolálható DNS minőségének összehasonlítása más, invazív vagy minimál invazív módszerrel vett mintákkal kimutatta, hogy a nem invazív módon vett minták alkalmazhatósága nem rosszabb a szűrőpapírra vett vérmintákéval.
2. A tollak fizikai jellemzőinek (minőség, kor, típus, méret) összevetése az izolált DNS minőségével. A toll minősége elsődleges az izolálható DNS fragmentáltságát tekintve, ugyanakkor a jó minőségű tollak esetén a cséveátmérő szerint is különbség tapasztalható.
3. Az alkalmazott módszerek és markerek megfelelőek populációgenetikai vizsgálatok végzésére.

Gyakorlatban hasznosítható eredmények

1. A szlovákiai populáció keleti és nyugati állománya közt nukleáris és mitokondriális markerek alapján a kis földrajzi távolság ellenére limitált génáramlás figyelhető meg.
2. A terepi megfigyeléseket alapul vevő territóriumterképezési módszerek és a territóriumok beosztásának egyedi genotípusok alapján történő ellenőrzése kimutatta, hogy a használt módszer alkalmas az új territóriumok, valamint a meglévő territóriumok új fészkeinek azonosítására.
3. A Kárpát-medence növekvő állományában a tojókra vonatkozó éves átlagos cserélődési arány minimuma 27,2%, maximuma 35,5%.
4. A korábban a középhegységekbe szorult parlagi sasok alföldi területek felé történő terjedési mintázatának vizsgálata kimutatta, hogy az új párok nagy valószínűséggel két stratégia szerint foglalnak territóriumot. A terjedés nem folyamatos, hanem

általában a párok a meglevő territóriumok közé, vagy a közelbe fészkelnek, míg más párok a többiektől jelentős távolságra foglalnak fészket és idővel a köztük levő területeken is új territóriumok alakulnak.

5. A kétféle fészekfoglalási stratégia által kialakított mintázat nem feleltethető meg a madarak rokonsági viszonyainak.
6. A vizsgálatok eredményeként létrejött adatbázis és génbank felhasználható hosszútávú populációgenetikai és fiatalkori helyhűséget ("natal philopatry") vizsgáló kutatások megalapozására.

6. Összefoglalás

Napjainkban a veszélyeztetett fajokkal kapcsolatos kutatások egyre nagyobb részében végeznek genetikai vizsgálatokat. Ezeknek célja egyrészt a populációk genetikai állapotának felmérése: mekkora a beltenyésztettség, mekkora a faj adott populációjának más, vizsgált populációtól mérhető genetikai távolsága. Másrészt megfelelő markereket választva, az így kapott adatok a jelölés-visszafogásos vizsgálatokkal egyenértékű, a populáció méretének becslésére és populációdinamikai vizsgálatok végzésére is felhasználhatóak.

A genetikai vizsgálatokhoz szükséges mintavételt jelentősen megkönnyíti, hogy a molekuláris módszerek fejlődésével egyre érzékenyebbé váltak a szükséges reakciók, így nagyon kis mennyiségű DNS-t tartalmazó minták is nagy hatásokkal használhatóak fel. Köszönhetően annak, hogy különösen a veszélyeztetett fajok esetén problémás lehet az egyedek befogása, vagy nem megengedhető a mintavétel által okozott stressz, egyre inkább terjednek a nem invazív mintavételi módszerek. Az állatok által hátrahagyott ürülék, szőr és toll viszonylag könnyen begyűjthető és kellő elővigyázatossággal kezelve nagy biztonsággal alkalmazható konzervációgenetikai vizsgálatokban.

A kutatás első részében vedlett tollak, mint különböző mértékben degradált biológiai anyagmaradványok genetikai kutatásokban való alkalmazhatóságát vizsgáltuk.

A vizsgálathoz a tollak felső köldökében fennmaradó vérrögökből izolált DNS minőségét vetettük össze a madarak szárnyvénájából pontszerű szűrást követően speciális szűrőpapírra vett vérből kivont DNS minőségével. A DNS minőségéről előzetesen agarózgélén történő elektroforézissel tájékozódunk. Majd egy viszonylag hosszabb, nukleáris szakasz (CHD1 W/Z, W: 400 – 450bp, Z: 600 – 700bp) PCR-rel történő felszaporíthatósága alapján döntöttünk a DNS alkalmazhatóságáról. Az összehasonlítás alapján a két mintatípus egyformán megbízhatónak bizonyult. Ezt követően olyan paramétereket kerestünk, amelyek alapján egyszerűen és gyorsan eldönthető, hogy az adott toll alkalmas-e genetikai vizsgálatra. Az eredmények alapján elmondható, hogy a tollak fizikai állapota (minősége) egyértelműen befolyásolja az izolált DNS minőségét. A további vizsgált paramétereket tekintve a felső köldöknél mért cséveátmérő (azaz a közvetve az ott található vérrög mérete), illetve a tollak begyűjtése és a preparálás között eltelt idő nem volt hatással a DNS-re, ugyanakkor a közepes minőségű tollak esetén azt tapasztaltuk, hogy a toll típusa hatással lehet a további reakciók sikerességére.

A kutatás gyakorlati kérdésekkel foglalkozó részében a Kárpát-medencében fészkelő parlagi sas (*Aquila heliaca*) populációt vizsgáltuk. A faj világlétszáma csökkenő tendenciát

mutat, de a Kárpát-medencei állomány az 1990-es évek eleje óta terjeszkedik. A kutatás tehát egyedülálló lehetőségeket biztosít arra, hogy egy veszélyeztetett faj terjedését, illetve annak populációgenetikai és populációdinamikai hatásait megvizsgáljuk és nyomon követhessük a Magyarországon folyó intenzív fajvédelmi tevékenység eredményességét is.

Munkacsoportunk először a szlovákiai populáció szerkezetét vizsgálta mikroszatellita és mitokondriális DNS lokuszok alapján. Ezt követően a magyarországi állományban egyedi DNS-profilok készítésével vizsgáltuk az itt fészkelő parlagi sasok éves cserélődési arányát, illetve ezek alapján ellenőriztük a sasfészkek terepi szakemberek által történt territóriumba sorolását. Továbbá a genetikai és fészkelési adatok összevetése alapján elemeztük a populáció terjedésének mintázatát.

A kiválasztott mintákat hat tetranukleotid (IEAAAG04, IEAAAG09, IEAAAG11, IEAAAG12, IEAAAG14 és IEAAAG15) és két dinukleotid (Aa02 és Aa39) lokusz alapján genotípusoztuk. A vizsgálat során összesen 46 territóriumban, 2-8 éven át követtük a madarak cserélődését. Az eredmények alapján a vizsgált időszakban az éves cserélődési arány minimuma 27,2%, maximuma 35,5% volt.

Az egyedi genotípusok elkészítése, és ezáltal az azonosított egyedek nyomon követése lehetővé tette annak ellenőrzését, hogy a terepi szakemberek által régóta alkalmazott térképezési módszer valóban képes-e követni a territórium-rendszer változását. A genetikai adatok alapján az alkalmazott térképezési módszer megfelelő az új territóriumok azonosítására, illetve a régi territóriumokban új fészket készítő párok megfelelő territóriumhoz rendelésére.

A fészkelési adatok segítségével vizsgáltuk a magyarországi állomány terjeszkedésének mintázatát. Az új fészkek döntő többsége a meglévő territóriumok közelében, gyakran azok közé ékelődve található, de néhány pár a többitől nagyon messze választ fészkelőhelyet. Az egyedek genetikai és földrajzi távolsága között nem találtunk korrelációt, így nem valószínű, hogy a tapasztalt mintázat az egyedek rokonsági kapcsolatait tükrözi. Ezek alapján feltételezhető, hogy a jelenleg is terjeszkedő magyarországi állomány valószínűleg két stratégiát követ. A letelepedő párok jelentős többsége a meglévő territóriumok közé ékelődik, azaz olyan helyre, amely nagy valószínűséggel fészkelésre alkalmas, de a terület védelme nagyobb befektetést igényel. Az új párok fennmaradó része a meglévő territóriumoktól nagyon távol foglal területet, így annak védelmével nem kell sok időt tölteni, viszont a terület nem biztos, hogy alkalmas lesz a fiókák felnevelésére. Köréjük később új párok települnek, és fokozatosan feltöltik az üres részeket a sűrűn lakott területek és a távol fészkelő párok territóriumai között.

7. Summary

Recently the number of conservation studies applying molecular methods increased. The aim of these researches is mostly to compare two populations of the same species, to investigate their individual or population sized relationships and to estimate their genetic stability. Besides these, if appropriate markers are chosen the genetic data can be applied as mark-recapture data, and used for population dynamics studies.

Genetic sampling is greatly facilitated as the molecular methods get more sensitive, and so DNA-samples with very small DNA concentration can be used effectively. As traditional sampling methods are sometimes not implementable if there is potential risk of exposing an animal to serious injury or for larger bodied animals, the use of non-invasive sampling methods is increasing. Shed hair, feather, and faeces can be collected relatively easy, and if handled properly they can be used for conservation genetic studies.

In the first part of this research we examined the applicability of shed feathers in genetic studies by comparing the DNA quality of two sample types. DNA was extracted from the blood clot that remains at the superior umbilicus part of the feather shaft and from blood taken on special filter paper. DNA was preliminary rated after samples were run on agarose gels. Then a relatively large nuclear DNA sequence (CHD1 W/Z, W: 400 – 450bp, Z: 600 – 700bp) was amplified by PCR. Samples were later drawn in or excluded from further analyses based on the amplification success of this PCR. This comparison of the two sample types showed no difference in their usability, meaning both types were equally suitable for genetic analyses. After this we searched for parameters that can indicate whether a particular feather is suitable for DNA extraction. According to the results DNA quality is primarily affected by feather quality. Out of the other examined parameters the calamus diameter, and so indirectly the size of the blood clot, and the storage time had no effect on the DNA. However feather type had small, but not significant effect on DNA extracted from abraded feathers.

In the next part of the research we studied the Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population in the Carpathian Basin. The world population of the species is decreasing, but the breeding population in the Carpathian Basin is expanding since the 1990's. This provides a unique opportunity to study the expansion and its population genetic and population dynamic consequences of an endangered raptor species. First we examined whether the Imperial Eagle population in Slovakia can be regarded as genetically uniform or it is structured by the geographic barriers between the Eastern and Western breeding pairs and found marginally significant genetic differentiation between the subpopulations. We could

also test the sensitivity of our marker set of microsatellite and mitochondrial DNA loci. Following this we studied the annual turnover rate of the female eagles breeding in Eastern Hungary, and tested the territory mapping method used by field experts based on individual genotypes. In addition we analyzed the expansion pattern of the population by the comparison of genetic and geographic distances of individuals.

Selected samples were genotyped based on six tetranucleotide (IEAAAG04, IEAAAG09, IEAAAG11, IEAAAG12, IEAAAG14 and IEAAAG15) and two dinucleotide (Aa02 and Aa39) loci. Turnover of birds were followed for 2 to 8 years during the study. According to the results, the yearly turnover rate was between 27.2% and 35.5% in this period.

Preparing individual genotypes and thus tracking identified individuals made possible to determine whether the territorial changes can properly be tracked by the territory mapping method applied by field experts. DNA-based data matched the field-based data in all cases, thus we can assume the applied methods are appropriate to identify new territories or assigning new nests to existing territories.

The expansion pattern of the Hungarian population was examined using nesting data. In most cases, new territories are founded near to, or in between existing ones, however other pairs choose to build their nests much further. No correlation could be found between the individuals' genetic and geographical distance, thus the observed pattern does not reflect their relatedness. Consequently, the following two different strategies can be assumed in the population. The majority of the settling pairs choose a place that is likely suitable for nesting as eagles already breed there. However this also means that the protection of the territory will require more effort. The rest of the new pairs establish their nests very far from the others. Thus the cost of territory protection is likely low, but the area may not be suitable for raising nestlings. Later new breeding pairs appear around these ones filling up the space between the high density and distant areas.

8. Irodalomjegyzék

- Alcaide M., Cadahía L., Lambertucci S. A., Negro J. J.: **Noninvasive estimation of minimum population sizes and variability of the major histocompatibility complex in the Andean Condor.** *The Condor*, 112: 470-478, doi: 10.1525/cond.2010.090203, 2010
- Allendorf F. W., England P. E., Luikart G., Ritchie P. A., Ryman N.: **Genetic effects of harvest on wild animal populations.** *Trends in Ecology & Evolution*, 23: 327-337, doi: 10.1016/j.tree.2008.02.008, 2008
- Anderson, C.J.R., Da Vitoria Lobo, N. James D. Roth, J.D., Waterman, J.M.: **Computer-aided photo-identification system with an application to polar bears based on whisker spot patterns.** *Journal of Mammalogy*: December 2010, Vol. 91, No. 6, pp. 1350-1359., doi: <http://dx.doi.org/10.1644/09-MAMM-A-425.1>, 2010
- Arsenault D. P., Stacey P., Hoelzler G. A.: **Mark-recapture and DNA fingerprinting data reveal high breeding-site fidelity, low natal philopatry, and low levels of genetic population differentiation in Flammulated Owls (*Otus flammeolus*).** *The Auk*, 122: 329-337, doi: 10.2307/4090370, 2005
- Bagyura J., Szitta T., Haraszthy L., Firmánszky G., Viszló L., Kovács A., Demeter I., Horváth M.: **Population increase of Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) in Hungary between 1980 and 2000.** *Aquila*, 107-108: 133-144, 2002
- Banhos A., Hrbek T., Gravena W., Sanaiotti T., and . Farias I. P.: **Genomic resources for the conservation and management of the Harpy Eagle (*Harpia harpyja*, Falconiformes, Accipitridae).** *Genetics and Molecular Biology*, 31: 146-154, doi: 10.1590/S1415-47572008000100025, 2008
- Bayard De Volo S., Reynolds R. T., Douglas M. R., Antolin M. F.: **An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers.** *The Condor*, 110: 762-767, doi: 10.1525/cond.2008.8586, 2008
- Beja-Pereira A., Oliveira R., Alves P. C., Schwartz M. K., Luikart G.: **Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive**

- genetics.** *Molecular Ecology Resources*, 9: 1279-1301, doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02699.x, 2009
- Bellemain E., Taberlet P.: **Improved noninvasive genotyping method: application to Brown Bear (*Ursus arctos*) faeces.** *Molecular Ecology Notes*, 4: 519-522, doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00711.x, 2004
- Bevanger, K.: **Biological and conservation aspects of bird mortality caused by electricity power lines: a review.** *Biological Conservation*, 86: 67-76, 1998
- Bhagavatula J., Singh L.: **Genotyping faecal samples of Bengal Tiger *Panthera tigris tigris* for population estimation: A pilot study.** *BMC Genetics*, 7:48, doi: 10.1186/1471-2156-7-48, 2006
- Binladen J., Wiuf C., Gilbert M. T., Bunce M., Barnett R., Larson G., Greenwood A. D., Haile J., Ho S. Y., Hansen A. J., Willerslev E.: **Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes.** *Genetics*, 172: 733-741, doi: 10.1534/genetics.105.049718, 2006
- Bisson, I.A., Ferrer, M. & Bird, D.M.: **Factors influencing nest-site selection by Spanish Imperial Eagles.** *Journal of Field Ornithology* 73(3): 298 - 302., 2002
- Bonnel M. L., Selander R. K.: **Elephant Seals: Genetic Variation and Near Extinction.** *Science*, 184: 908-909, doi: 10.1126/science.184.4139.908, 1974
- Bonnet E., van de Peer Y.: **ZT: a software tool for simple and partial Mantel tests.** *Journal of Statistical Software*, 7: 1-12, 2002
- Bourke B. P., Dawson D. A.: **Fifteen microsatellite loci characterized in the Golden Eagle *Aquila chrysaetos* (Accipitridae, Aves).** *Molecular Ecology Notes*, 6: 1047-1050, doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01429.x, 2006
- Bourke B. P., Frantz A. C., Lavers C. P., Davison A., Dawson D. A., Burke T. A.: **Genetic signatures of population change in the British Golden Eagle (*Aquila chrysaetos*).** *Conservation Genetics*, 11: 1837-1846, doi: 10.1007/s10592-010-0076-x, 2010

- Bradley B. J., Vigilant L.: **False alleles derived from microbial DNA pose a potential source of error in microsatellite genotyping of DNA from faeces.** *Molecular Ecology Notes*, 2: 602-605, doi: 10.1046/j.1471-8278.2002.00302.x, 2002
- Bremner-Harrison S., Harrison W. R., Cypher B. L., Murdoch J. D., Maldonado J., Darden S. K.: **Development of a single-sampling noninvasive hair snare.** *Wildlife Society Bulletin*, 34: 456-461, doi: 10.2193/0091-7648(2006)34[456:DOASNH]2.0.CO2, 2006
- Broquet T., Ménard N., Petit E.: **Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates.** *Conservation Genetics*, 8: 249-260, doi: 10.1007/s10592-006-9146-5, 2006
- Bulger J. B., Scott N. J., Seymour R. B.: **Terrestrial activity and conservation of adult California red-legged frogs *Rana aurora draytonii* in coastal forests and grasslands.** *Biological Conservation*, 110: 85-95, doi: 10.1016/S0006-3207(02)00179-9, 2003
- Busch J. D., Katzner T. E., Bragin E. A., Keims P.: **Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaeetus eagles.** *Molecular Ecology Notes*, 5: 39-41, doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00823.x, 2005
- Carafa, M. Biondi, M.: **Application of a method for individual photographic identification during a study on *Salamandra salamandra gigliolii* in central Italy.** *Italian Journal of Zoology*, Suppl.2. 181-184., 2004
- Cerit H., Avalus K.: **Sex identification in avian species using DNA typing methods.** *World's Poultry Science Journal*, 63: 91-99, doi: 10.1079/WPS2006131, 2007
- Coyne S. R., Craw P. D., Norwood D. A., Ulrich M. P.: **Comparative analysis of the Schleicher and Schuell IsoCode Stix DNA Isolation Device and the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit.** *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4859-4862, doi: 10.1128/JCM.42.10.4859-4862.2004, 2004
- Curio E.: **Conservation needs ethology.** *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 260-263, doi: 10.1016/0169-5347(96)20046-1, 1996

- Danko S.: **Beringungsergebnisse am Kaiseradler *Aquila heliaca* im Nordwesten des Brutareals [Results from ringing of Imperial Eagles in the North-West of its breeding range - in German with English summary]**. Eagle Studies (eds. Meyburg, B.-U. & Chancellor, R.D.). World Working Group on Birds of Prey (WWGBP), Berlin, London & Paris, 389-403, 1996
- Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J.: **Handbook of the Birds of the World, vol. 2**, New World Vultures to Guinea-fowl. Lynx Edicions, Barcelona. 638 pp., ISBN-13: 978-84-87334-15-3, 1994
- Ellegren H., Sheldon B. C.: **New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds**. Trends in Ecology & Evolution, 12: 255-259, doi: 10.1016/S0169-5347(97)01061-6, 1997
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J. M.: **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites**. Genetics, 131: 479-491, 1992
- Farrel L. E., Roman J., Sunquist M. E.: **Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats**. Molecular Ecology, 9: 1538-1590, doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01037.x, 2000
- Ferrer, M., Calderon, J.: **The Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti* C.L. Brehm 1861 in Donana National Park South West Spain: A study of population dynamics**. Biological Conservation, 51: 151-161., 1990
- Ferrer M.: **Natal dispersal in relation to nutritional condition in Spanish Imperial Eagles**. Ornis Scandinavica 23: 104-107, 1992
- Ferrer M.: **Natural adoption of fledglings by Spanish Imperial Eagles *Aquila adalberti***. Journal of Ornithology 134: 335-337, 1993a
- Ferrer M.: **Wind influenced juvenile dispersal of Spanish Imperial Eagle**. Ornis Scandinavica 24: 330-333, 1993b

- Ferrer M.: **Juvenile dispersal behaviour and natal philopatry of a long-lived raptor, the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti***. Ibis 135:132-138, 1993c
- Ferrer M.: **The Spanish Imperial Eagle**. Lynx Edicions, Barcelona: 224 pp, doi: ISBN 84-87334-34-2, 2001
- Ferrer M., Penteriani V.: **A process of pair formation leading to assortative mating: passive age-assortative mating by habitat heterogeneity**. Animal Behaviour 66: 137-143, doi: 10.1006/anbe.2003.2158, 2003
- Ferrer M., Penteriani V.: **Non-independence of demographic parameters: positive density-dependent fecundity in eagles**. In Journal of Applied Ecology, 45: 1453–1459, doi: 10.1111/j.1365-2664.2008.01497.x, 2008
- Foran D. R., Minta S. C., Heinemeyer K. S.: **DNA-based analysis of hair to identify species and individuals for population research and monitoring**. Wildlife Society Bulletin, 25: 840-847, 1997
- Fridolfsson A-K., Ellegren H.: **A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds**. Journal of Avian Biology, 30: 116-121, 1999
- García-Alaníz N., Naranjo E. J., Mallory F. F.: **Hair-snares: A non-invasive method for monitoring felid populations in the Selva Lacandona, Mexico**. Tropical Conservation Science, 3: 403-411, 2010
- Gemmell N., Akiyama S.: **An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissue**. Trends in Genetics, 12: 338-339, 1996
- Gonzalez, L.M., Oria, J., Margalida, A., Sánchez, R., Prada, L., Caldera, J., Aranda, A., Molina, J.I.: **Effective natal dispersal and age of maturity in the threatened Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*: conservation implications**. Bird Study, 53, 285–293, 2006
- Gonzalez L.M.: **Origin and formation of the Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*)**. Journal of Ornithology, 149: 151-159, doi: 10.1007/s10336-007-0252-z, 2008

- Griffiths R., Tiwari B.: **Sex of the last wild Spix's macaw**. Nature, 375: 454, doi: 10.1038/375454a0, 1995
- Guerrini M., Barbanera F.: **Noninvasive Genotyping of the Red-Legged Partridge (*Alectoris rufa*, Phasianidae): Semi-Nested PCR of Mitochondrial DNA from Feces**. Biochemical Genetics, 47: 873-883, doi: 10.1007/s10528-009-9288-5, 2009
- Guo S. W., Thompson E. A.: **Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles**. Biometrics, 48: 361-372, 1992
- Hailer F., Helander B., Folkestad A. O., Ganusevich S. A., Garstad S., Hauff P., Koren C., Masterov V. B., Nygárd T., Rudnick J. A., Shiraki S., K. Skarphedinsson, Volke V., Wille F., Vilà C.: **Phylogeography of the White-tailed Eagle, a generalist with large dispersal capacity**. Journal of Biogeography, 34: 1193-1206, doi: 10.1111/j.1365-2699.2007.01697.x, 2007
- Hailer F., Helander B., Folkestad A. O., Ganusevich S. A., Garstad S., Hauff P., Koren C., Torgeir Nygárd, Volke V., Carles Vilà C., Ellegren H.: **Bottlenecked but long-lived: high genetic diversity retained in White-tailed Eagles upon recovery from population decline**. Biology Letters, 2: 316-319, doi: 10.1098/rsbl.2006.0453, 2006
- Hájková P., Zemanová B., Bryja J., Hájek B., Roche K., Tkadlec E., Zima J.: **Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces**. Molecula Ecology Notes, 6: 559-562, doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01269.x, 2006
- Halpern B., Péchy T.: **Rákosi vipera (*Vipera ursinii rakosiensis*) egyedi azonosítása fejpajzsok száma és mintázata alapján**. A Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület VI. Tudományos Ülése, 2004. október 29-31. Debrecen, poszter, 2004
- Helbig A. J., Knox A. G., Parkin D. T., Sangster G., Collinson M.: **Guidelines for assigning species rank**. Ibis, 144: 518-525, doi: 10.1046/j.1474-919X.2002.00091.x, 2002
- Hiraldó F., Delibes M., Calderon J.: **Sobre el status taxonómico del águila Imperial ibérica**. Donana Acta Vertebrata, 3: 171-182, 1976

- Hogan F. E., Cooke R., Burridge C. P., Norman J. A.: **Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis**. *Molecular Ecology Resources*, 8: 561-567, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.02044.x, 2008
- Horváth, M., Haraszthy, L., Bagyura, J., Kovács, A.: **Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) populations in Europe**. *Aquila*, 107-108: 193-204., 2002
- Horváth M. B., Martínez-Cruz M. B., Negro J. J., Kalmár L., Godoy J. A.: **An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds**. *Journal of Avian Biology*, 36: 84-88, doi: 10.1111/j.0908-8857.2005.03370.x, 2005
- Horváth M. B., Kovács A.: **Parlagi sas**. Magyar madárvonulási atlasz. Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület, Csörgő T. et al. (eds) Budapest, 2009
- Horváth M. B., Szitta T., Fatér I., Kovács, A., Demeter I., Firmánszky G., Bagyura, J.: **Population dynamics of Imperial Eagles in Hungary between 2001 and 2009**. *Acta Zoologica Bulgarica*, suppl.3: 61-70, 2011
- Hothorn T., Hornik K. and Zeileis A.: **Unbiased Recursive Partitioning: A Conditional Inference Framework**. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 15: 651-674, 2006
- Hranitz J. M., Diehl W. J.: **Allozyme variation and population genetic structure during the life history of *Bufo woodhousii fowleri* (Amphibia: Anura)**. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 15-27, doi: 10.1016/S0305-1978(99)00032-0, 2000
- Huang C., Hsu Y., Lee L.L. and Li S.H.: **Isolation and characterization of tetramicrosatellite DNA markers in the Eurasian Otter (*Lutra lutra*)**. *Molecular Ecology Notes*, 5: 314-316, doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00912.x, 2005
- Huff D. R., Peakall R., Smouse P. E.: **RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt) Engelm.)**. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 927-394, doi: 10.1007/BF00211043, 1993
- Jacob G., Debrunner R., Gugerli F., Schmidt B., Bollmann K.: **Field surveys of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the**

- species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples.** Conservation Genetics, 11: 33-44, doi: 10.1007/s10592-008-9794-8, 2010
- Janss, G.F.E., Ferrer, M.: **Avian electrocution mortality in relation to pole design and adjacent habitat in Spain.** Bird Conservation International, 11:3–12., 2001
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.: **Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA.** Nature, 314: 67-73, 1985a
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.: **Individual-specific 'fingerprints' of human DNA.** Nature, 316: 76-79, doi: 10.1038/316076a0, 1985b
- Johansson, M.P., McMahon, B.J., Hoglund, J. & Segelbacher, G.: **Amplification success of multilocus genotypes from feathers found in the field compared with feathers obtained from shot birds.** Ibis 154: 15 - 20, 2012
- Kalinowski S. T., Taper M. L.: **Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci.** Conservation Genetics, 7: 991-995, doi: 10.1007/s10592-006-9134-9, 2006
- Katzner, T.E., Bragin, E.A., Knick, S.T., Smith, A.T.: **Dietary response of imperial eagles in Kazakhstan is impacted by spatial heterogeneity in the environment.** Journal of Avian Biology 37: 594-600., 2006
- Kawanishi K., Sunquist M. E.: **Conservation status of tigers in a primary rainforest of Peninsular Malaysia.** Biological Conservation, 120: 329-344, doi: 10.1016/j.biocon.2004.03.005, 2004
- Kenward, R. E., Walls, S. S., Hodder, K. H., Pahkala, M., Freeman, S., Simpson, V. R. **The Prevalence of Non-breeders in Raptor Populations: Evidence from Rings, Radio-tags and Transect Surveys.** Oikos, 91: 271-279, 2000
- Kirk, D.A., Hyslop, C.: **Population status and recent trends in Canadian raptors: a review.** Biological Conservation, 83: 91-118., doi: 10.1016/S0006-3207(97)00051-7, 1998

- Kitchen, A.M., Gese, E.M., Waits, L.P., Karki, S.M., Schauster, E.R.: **Genetic and spatial structure within a swift fox population**. *Journal of Animal Ecology*, 74: 1173–1181., 2005
- Kovács A., Horváth M. B., Demeter I., Fülöp Gy., Frank T., Szilvácsku Zs.: **Parlagisas-védelmi kezelési javaslatok**. MME, Budapest. Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME), ISBN 963 86418 4 3, 2005
- Kovács Sz., Szabó K., Vili N., Horváth M., Kalmár L.: **Genetic structure, genetic diversity and phylogeography of the western populations of the Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*)**. 12th Young Systematists' Forum, 2010.12.01. London, United Kingdom
- Li, S., Paulsson, M.: **Temperature-dependent formation and photorepair of DNA damage induced by UV-B radiation in suspension-cultured tobacco cells**. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 66: 67-72, doi: 10.1016/S1011-1344(01)00277-9, 2002
- Lucchini V., Fabbri E., Marucco F., Ricci S., Boitani L., Randi E.: **Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps**. *Molecular Ecology*, 11: 857-868, doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01489.x, 2002
- Lukacs P. M.: **Statistical aspects of using genetic markers for individual identification in capture-recapture studies**. PhD értekezés, Colorado State University, 2005
- Lukacs P. M., Burnham K. P.: **Review of capture–recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling**. *Molecular Ecology*, 14: 3909–3919, doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02717.x, 2005
- Margalida A., González L. M., Sánchez R., Oria J., Prada L.: **Parental behaviour of Spanish Imperial Eagles *Aquila adalberti*: sexual differences in a moderately dimorphic raptor**. *Bird Study*, 54: 112-119, doi: 10.1080/00063650709461462, 2007
- Martínez-Cruz B., David V. A., Godoy J. A., Negro J. J., O'Brien A. J., Johnson W. E.: **Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*) and related species**. *Molecular Ecology Notes*, 2: 323-326, doi: 10.1046/j.1471-8278 .2002.00231.x, 2002

- Martínez-Cruz B., Godoy J. A., Negro J. J.: **Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*)**. *Molecular Ecology*, 13: 2243-2255, doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02220.x, 2004
- Martínez-Cruz B., Godoy J. A., Negro J. J.: **Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish Imperial Eagle**. *Molecular Ecology*, 16: 477-486, doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03147.x, 2007
- Martínková N., Searle J. B.: **Amplification success rate of DNA from museum skin collections: a case study of stoats from 18 museums**. *Molecular Ecology Notes*, 6: 1014-1017, doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01482.x, 2006
- Martín-Mateo M. P.: **Una nueva especie de *Colpocephalum Nitzsch* (Mallophaga), parásita del Aguila Imperial**. *Eos*, 55: 107-117, 1980
- Maudet C., G. Luikart G., Dubray D., Von Hardenberg A., Taberlet P.: **Low genotyping error rates in wild ungulate faeces sampled in winter**. *Molecular Ecology Notes*, 4: 772-775, doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00787.x, 2004
- Maurer G., Beck N., Double M. C.: **A 'feather-trap' for collecting DNA samples from birds**. *Molecular Ecology Resources*, 10: 129-134, doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02711.x, 2010
- McDade T. W., Williams S., Snodgrass J. J.: **What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research**. *Demography*, 4: 899-925, doi: 10.1353/dem.2007.0038, 2007
- McGrady M. J., Grant J. R., Bainbridge I. P., McLeod D. R. A.: **A model of Golden Eagle (*Aquila chrysaetos*) ranging behavior**. *Journal of Raptor Research*, 36: 62-69, 2002
- Meyburg B.-U., Haraszthy L., Meyburg C., Viszló L.: **Satelliten- und Bodentelemetrie bei einem jungen Kaiseradler *Aquila heliaca*: Familienauslösung & dispersion [Satellite & ground tracking of a young Imperial Eagle *Aquila heliaca*: Break up the family & dispersal - in German with English summary]**. *Vogelwelt*, 116: 153-157, 1995

- Michalakis Y., Excoffier L.: **A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci.** Genetics, 142: 1061-1064, 1996
- Miller J. M., Hallager S., Monfort S. L., Newby J., Bishop K., Tidmus S. A., Black P., Houston B., Matthee C. A., Fleischer R. C.: **Phylogeographic analysis of nuclear and mtDNA supports subspecies designations in the ostrich (*Struthio camelus*).** Conservation Genetics, 12: 423-431, doi: 10.1007/s10592-010-0149-x, 2011
- Mondol S., Karanth K. U., Kumar N. S., Gopalaswamy A. M., Andheria A., Ramakrishnan U.: **Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size.** Biological Conservation, 142: 2350-2360, doi: 10.1016/j.biocon.2009.05.014, 2009
- Monteiro L., Bonnemaïson D., Vekris A., Petry K. G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J., Mégraud F.: **Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* Model.** Journal Of Clinical Microbiology, 35: 995-998, doi: 0095-1137/97/\$04.0010, 1997
- Morin P. A., Moore J. J., Chakraborty R., Jin L., Goodall J., Woodruff D. S.: **Kin selection, social structure, gene flow, & the evolution of chimpanzees.** Science, 265: 1193-1201, doi: 10.1126/science.7915048, 1994
- Mowat G., Patkeau D.: **Estimating marten *Martes americana* population size using hair capture and genetic tagging.** Wildlife Biology, 8: 201-209, 2002
- Moyer, M.A., McCown, J.W., Eason, T.H., Oli, M.K.: **Does genetic relatedness influence space use pattern? A test on florida black bears.** Journal of Mammalogy, 87: 255–261, 2006
- Mullis K. B., Faloona F. A.: **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** Methods in Enzymology, 155 Recombinant DNA Part F: 335-350, doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6, 1987

- Murphy M. A., Kendall K. C., Robinson A., Waits L. P.: **The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification.** Conservation Genetics, 8: 1219-1224, doi: 10.1007/s10592-006-9264-0, 2003a
- Murphy M. A., Waits L. P., Kendall K. C.: **The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in Brown Bears (*Ursus arctos*).** Molecular Ecology, 12: 2261-2265, doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01863.x, 2003b
- Nagy A. L., Csáki R., Klem J., Rovó L., Tóth F., Tálos Gy., Jóri J., Kovács K., Kiss G. J.: **Minimally invasive genetic screen for GJB2 related deafness using dried blood spots.** International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 74: 75-81, doi: 10.1016/j.ijporl.2009.10.021, 2010
- Navidi W., Arnheim N., Waterman M. S.: **A Multiple-Tubes Approach for Accurate Genotyping of Very Small DNA Samples by Using PCR: Statistical Consideration.** American Journal of Human Genetics, 50: 347-359, 1992
- Nsubuga A. M., Robbins M. M., Roeder A. D., Morin P. A., Boesch C., Vigilant L.: **Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method.** Molecular Ecology, 13: 2089-2094, doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02207.x, 2004
- Nunes S., Muecke E-M., Ross H.E., Bartholomew P.A., Holekamp K.E.: **Food availability affect behavior but not circulating gonadal hormones in maternal Belding's squirrels.** Physiology & Behavior, 71: 447-455, doi: 10.1016/S0031-9384(00)00366-8, 2000
- O'Brien S. J.: **A role for molecular genetics in biological conservation.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91: 5748-5755, 1994
- O'Clark H. JR., Cypher B. L., Kelly P. A., Williams D. F., Clifton S. D.: **Use of a hair-sampling tube to detect the San Joaquin kit fox.** Transactions of the Western Section of the Wildlife Society, 38/39: 29-30, 2002/2003
- Ortega ,E., Manosa, S., Margalida, A., Sánchez, R., Oria, J. , González, L.M.: **A demographic description of the recovery of the Vulnerable Spanish imperial eagle *Aquila adalberti*.** Oryx, 43: 113-121., doi: 10.1017/S0030605307991048, 2009

- Park S. D. E.: **Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection.** PhD értekezés, University of Dublin, 2001
- Peakall R., Smouse P.E.: **GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.** *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295, doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x, 2006
- Peakall R., Smouse P.E., Huff D.R.: **Evolutionary implications of allozyme and RAPD Variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactyloides*.** *Molecular Ecology*, 4: 135-147, doi: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00203.x, 1995
- Peakall R., Ebert D., Cunningham R., Lindenmayer D.: **Mark-recapture by genetic tagging reveals restricted movements by bush rats (*Rattus fuscipes*) in a fragmented landscape.** *Journal of Zoology*, 268: 207-216, doi: 10.1111/j.1469-7998.2005.00011.x, 2006
- Penteriani, V., Balbontín, J., Ferrer, M.: **Simultaneous effects of age and territory quality on fecundity in Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus*.** *Ibis* 145: E77–E82., 2003
- Penteriani V., Ferrer M.: **Unpaired female birds use sex to attract already paired males: “La donna e mobile qual piuma al vento”.** *Ethology Ecology & Evolution* 16: 91-95, 2004
- Penteriani V., Ojalora F., Ferrer M.: **Floater mortality within settlement areas can explain the Allee effect in breeding populations.** *Ecological Modelling* 213: 98–104, doi: 10.1016/j.ecolmodel.2007.11.009, 2008
- Piertney, S.B., MacColl, A.D.C., Lambin, N. X., Moss, R., Dallas, J.F.: **Spatial distribution of genetic relatedness in a moorland population of red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*).** *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 317–331., 1999
- Pigott M. P.: **Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA.** *Wildlife Research*, 31: 485-493, doi: 10.1071/WR03096, 2004

- R Development Core Team: **R: A Language and Environment for Statistical Computing**
R Development Core Team R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria,
ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org>., doi: ISBN 3-900051-07-0, 2011
- Raymond M., Rousset F.: **GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism**. Journal of Heredity, 86: 248-249, 1995
- Reed J. Z., Tollit D. J., Thompson P. M., Amos W.: **Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces**. Molecular Ecology, 6: 225-234, doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00175.x, 1997
- Reiners T. E., Encarnação J. A., Wolters V.: **An optimized hair trap for non-invasive genetic studies of small cryptic mammals**. European Journal of Wildlife Research, 27: 991-995, doi: 10.1007/s10344-011-0543-9, 2011
- Roeder A. D., Archer F. I., Poinar H. N., Morin P. A.: **A novel method for collection and preservation of faeces for genetic studies**. Molecular Ecology Notes, 4: 761-764, doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00737.x, 2004
- Roon D. A., Waits L. P., Kendall K. C.: **A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples**. Molecular Ecology Notes, 3: 163-166, doi: 10.1046/j.1471-8286, 2003
- Rudnick J. A., Katzner T. E., Bragin E. A., Rhodes E. JR., Dewoody J. A.: **Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan**. Molecular Ecology, 14: 2959-2967, doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02641.x, 2005
- Rudnick J. A., Katzner T. E., Bragin E. A. DeWoody A. D.: **Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers**. Molecular Ecology Notes, 7: 757-762, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01796.x, 2007
- Rudnick J. A., Katzner T. E., DeWoody J. A.: **Genetic analyses of noninvasively collected feathers can provide new insights into avian demography and behavior**.

Handbook of Nature Conservation, Aronoff J. B.: 181-197, ISBN 978-1-60692-993-3, 2009

Schwartz M. K., Luikart G., Waples R. S.: **Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management.** Trends in Ecology & Evolution, 22: 25-33, doi: 10.1016/j.tree.2006.08.009, 2006

Seki S.: **Application of molted feathers as noninvasive samples to studies on the genetic structure of pigeons (Aves: Columbidae).** Journal of Forest Research, 11: 125-129, doi: 10.1007/s10310-005-0194-3, 2006

Sergio, F., Luigi Marchesi, M., Pedrini, P., Ferrer, M., Penteriani, V.: **Electrocution alters the distribution and density of a top predator, the eagle owl *Bubo bubo*.** Journal of Applied Ecology, 41, 836–845, 2004

Sergio, F., Pedrini, P., Rizzolli, F., Marchesi, L.: **Adaptive range selection by golden eagles in a changing landscape: A multiple modelling approach.** Biological Conservation 133: 2-41., 2006

Silvy N. J., Lopez R. R., Peterson M. J.: **Wildlife marking techniques.** C.E. Braun, editor. Techniques for Wildlife Investigations and Management, The Wildlife Society, Bethesda, Maryland, USA: 339-376, 2005

Sloane M. A., Sunnucks P., Alpers D., Beheregaray L. B., Taylor A. C.: **Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censusing method.** Molecular Ecology, 9: 1233-1240, doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.00993.x, 2000

Smouse P. E., Peakall R.: **Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure.** Heredity, 82: 561-573, doi: 10.1038/sj.hdy.6885180, 1999

Stoneking M.: **Ancient DNA: How do you know when you have it and what can you do with it?** The American Journal of Human Genetics, 57: 1259-1262, 1995

Strasser H., Weber C.: **On the asymptotic theory of permutation statistics.** Mathematical Methods of Statistics., 8: 220–250., 1999

- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escvaravage N., Waits L. P., Bouvet J.: **Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR.** *Nucleic Acids Research*, 24: 3189-3194, 1996
- Taberlet P., Waits L. P., Luikart G.: **Noninvasive genetic sampling: look before you leap.** *Trends in Ecology & Evolution*, 14: 323-327, doi: 10.1016/S0169-5347(99)01637-7, 1999
- Taberlet P., Luikart G.: **Non-invasive genetic sampling and individual identification.** *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 41-55, doi: 10.1111/j.1095-8312.1999.tb01157.x, 1999
- Teare J. M., Islam R., Flanagan R., Gallagher S., Davies M. G., Grabau C.: **Measurement of Nucleic Acid Concentrations Using the DyNA Quant and the GeneQuant.** *BioTechniques*, 22: 1170-1174, 1997
- Váli Ü., Dombrovski V., Treinys R., Bergmanis U., Daróczy Sz. J., Dravecky M., Ivanovski V., Lontkowski J., Maciorowski G., Meyburg B., Mizera T., Zeitz R., Ellegren H.: **Widespread hybridization between the Greater Spotted Eagle *Aquila clanga* and the Lesser Spotted Eagle *Aquila pomarina* (Aves: Accipitriformes) in Europe.** *Biological Journal of the Linnean Society*, 100: 725-736, doi: 10.1111/j.1095-8312.2010.01455.x, 2010
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D., P. M., Shipley P.: **MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data.** *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538, doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x, 2004
- Vili N.: **Parlagi sasok egyedi azonosítása nem invazív mintavételi módszer segítségével.** Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, szakdolgozat, pp. 31. 2005
- Vili N., Chavko J., Szabó K., Kovács Sz., Hornung E., Kalmár L., Horváth M.: **Genetic structure of the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population in Slovakia.** *Slovak Raptor Journal*, 3: 21-28, 2009a

- Vili N., Horváth M. B., Kovács Sz., Chavko J., Hornung E., Kalmár L.: **Alternatív mintavételi módszer gyakorlati alkalmazhatósága madárgenetikai vizsgálatokban: parlagi sasok ivarmeghatározása, mikroszatellitákon alapuló egyedi azonosítása és mtDNS-ének vizsgálata.** Magyar Állatorvosok Lapja, 131: 426-435, 2009b
- Vili, N., Nemesházi, E., Kovács, Sz., Horváth, M., Kalmár, L., Szabó, K.: **Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling.** Journal of Ornithology, doi: 10.1007/s10336-013-0932-9, in press
- Waits L. P., Luikart G., Taberlet P.: **Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines.** Molecular Ecology, 10: 249-256, doi: 10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x, 2001
- Waits L. P., Patkeau D.: **New non-invasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection.** Journal of Wildlife Management, 69: 1419-1433, doi: 10.2193/0022-541X(2005)69[1419:NGSTFW]2.0.CO2, 2005
- Wakamiya , S.M., Roy, C.L.: **Use of monitoring data and population viability analysis to inform reintroduction decisions: Peregrine falcons in the Midwestern United States.** Biological Conservation, 142: 1767-1776., doi: 10.1016/j.biocon.2009.03.015, 2009
- Wasser S. K., Houston C. S., Koehler G. M., Cadd G. G., Fain S. R.: **Techniques for application of fecal DNA methods to field studies of Ursids.** Molecular Ecology, 6: 1091-1097, doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00281.x, 1997
- Webb J. K., Shine R.: **A field study of spatial ecology & movements of a threatened snake species, *Hoplocephalus bungaroides*.** Biological Conservation, 82: 203-217, doi: 10.1016/S0006-3207(97)00032-3, 1997
- White G. C., Garrott R. A.: **Analysis of wildlife radio-tracking data.** Academic Press, New York. pp 384, ISBN10: 0-12-746725-4, 1990
- Würsig, B., Jefferson T.A.: **Methods of Photo-Identification for Small Cetaceans.** Annual reports of the International Whaling Commission, special issue 12., 43-52., 1990

Zayats T., Mackey D. A., Malecaze F., Calvas P., Guggenheim J. A.: **Quality of DNA extracted from mouthwashes.** Plos One, 4: e6165, doi: 10.1371/journal.pone.0006165, 2009

Zenke P.: **Mikroszatellita-polimorfizmusok vizsgálata kutya eredetű anyagmaradványokból.** PhD értekezés, Szent István Egyetem Állatorvostudományi Doktori Iskola, 2010

Zielinski W. J., Schlexer F. V., Pilgrim K. L., Schwartz M. K.: **The Efficacy of Wire and Glue Hair Snares in Identifying Mesocarnivores.** Wildlife Society Bulletin, 34: 1152-1161, doi: 10.2193/0091-7648(2006)34[1152:TEOWAG]2.0.CO2, 2006

9. Az értekezés alapját képző tudományos publikációk

Lektorált tudományos közlemények, magyar nyelvű hazai folyóiratokban

Vili N., Horváth M., Kovács Sz., Chavko, J., Hornung E., Kalmár L.: **Alternatív mintavételi módszer gyakorlati alkalmazhatósága madárgenetikai vizsgálatokban: parlagi sasok ivarmeghatározása, mikroszatellitákon alapuló egyedi azonosítása és mtDNS-ének vizsgálata.** Magyar Állatorvosok Lapja 131: 426-435.

IF: 0,200

Lektorált tudományos közlemények, idegen nyelvű tudományos folyóiratokban

Vili N., Horváth M., Szabó K., Kovács S., Chavko J., Hornung E. , Kalmár L.: **Genetic structure of the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population in Slovakia.** Slovak Raptor Journal 3: 21–28, 2009

Vili N., Nemesházi E., Kovács Sz., Horváth M., Kalmár L., Szabó K.: **Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling.** Journal of Ornithology, in press

IF₂₀₁₁: 1.636

Vili N., Szabó K., Kovács Sz., Kabai P., Kalmár L., Horváth M.: **High turnover rate revealed by non-invasive genetic analyses in an expanding Eastern Imperial Eagle population.** Acta zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, in press

IF₂₀₁₁: 0,564

Könyvfejezet:

Vili N., Kalmár L., Kovács Sz., Horváth M.: **Parlagi sasok (*Aquila heliaca*, Savigny, 1809) populációgenetikai vizsgálata a Kárpát-medencében,** In: Forró L. (ed.): **A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása. [The genesis of the fauna of the Carpathian Basin]** Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest pp. 303-310. ISBN: 963-7093-99-9, 2007

Konferenciaszereplések:

Vili N., Kalmár L., Horváth M. B.: Individual identification of imperial eagles using non-invasive sampling methods. XXIX International Ethological Conference, 2005. augusztus 20-27., book of abstracts p. 237, (poszter)

Vili N., Kalmár L., Horváth M.: Parlagi sas egyedek DNS-ujjlenyomatának meghatározása nem invazív mintavételi módszer segítségével, III. MTBK, 2005. november 3-6. Eger., absztr. kötet 224.o. (poszter)

Vili N., Kalmár L., Horváth M., Dr. Hornung E.: Parlagi sasok egyedi azonosítása degradált biológiai minták felhasználásával, MTA-ÁODI Éves Konferencia, 2006. január 22-26. (előadás)

Vili N., Kalmár L., Horváth M., Dr. Hornung E.: Beszámoló a Kárpát-medence parlagisas-állományának készülő adatbázisáról, MTA-ÁODI Éves Konferencia, 2007. január 22-25. (előadás)

Vili N., L. Kalmár L., Sz. Kovács Sz., Hornung E., Horváth M.: Individual identification of Eastern Imperial Eagles (*Aquila heliaca*) in the Carpathian basin., VIIth Student Conference on Conservation Science, 2007. március 26-29. Cambridge (poszter)

Kovács Sz., **Vili N.**, Kalmár L., Horváth M. B. Comparative genetic analysis of the Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population in the Carpathian basin., VIIth Student Conference on Conservation Science, 2007. március 26-29. Cambridge (poszter)

Vili N., Horváth M. B., Kovács Sz., Chavko J., Hornung E., Kalmár L.: Nem invazív mintavétel gyakorlati alkalmazhatósága madárgenetikai vizsgálatokban a Kárpát-medence parlagisas-állományának vizsgálata alapján, V. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Nyíregyháza, 2008. november 6-9. (poszter)

Vili N., Horváth M. B., Kovács Sz., Chavko J., Hornung E., Kalmár L.: Practical use of alternative sampling methods in genetic analyses of eastern imperial eagles (*Aquila heliaca*), III. International Scientific Conference of PhD. students, Slovak University of Agriculture, Nitra, 2008. november 28. (előadás) ISBN 978-80-552-0138-2 pp:88-91.

Vili N., Horváth M., Kovács Sz., Chavko J., Hornung E., Kalmár L.: Alternatív mintavételi módszerek madárgenetikai vizsgálatokban a Kárpát-medence parlagisas-populáció egyedinek ivarmeghatározása és egyedi azonosítása alapján, MTA-ÁODI Éves Konferencia, 2009. január 26-29. (előadás)

Kovács Sz., **Vili N.**, Kalmár L., Horváth M., Szabó K., Reiczigel J. A Kárpát-medencei parlagisas-populáció genetikai struktúrájának és diverzitásának, valamint filogeográfiai kapcsolatainak elemzése a mtDNS kontroll régiója alapján. MTA-ÁODI Éves Konferencia, 2009. január 26-29. , Budapest (előadás)

Horváth M., Kovács Sz., Szabó K., **Vili N.**, Kalmár L. Az európai parlagisas-populációk genetikai struktúrája és diverzitása. 8. Magyar Ökológus Kongresszus, 2009. augusztus 26-28., Szeged (előadás)

Vili N., Horváth M. B., Kovács Sz., Chavko J., Szabó K., Hornung E., Kalmár L.: Site and mate fidelity in Eastern Imperial Eagles (*Aquila heliaca*) in the Carpathian Basin based on individual DNA-profiles., 2nd European Congress of Conservation Biology, 2009. szeptember 1-5. Prague, Czech Republic (poszter)

Szabó K., Kovács Sz., **Vili N.**, Kalmár L., Horváth M. Genetic structure and diversity in the western populations of the globally threatened eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*)., 2nd European Congress of Conservation Biology, 2009. szeptember 1-5. Prague, Czech Republic (előadás)

Vili N., Kabai P., Kovács Sz., Szabó K., Kalmár L., Horváth M.: Parlagi sas terjedési stratégiák és a territórium értelmezése terepi és genetikai módszerekkel, A Magyar Etológiai Társaság XII. Kongresszusa, 2010. november 12-13. Veszprém (előadás)

Kovács Sz., Szabó K., **Vili N.**, Horváth M., Kalmár L. Genetic structure, genetic diversity and phylogeography of the western populations of the Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*). 12th Young Systematists' Forum, 2010.12.01. London, United Kingdom

Szabó K., **Vili N.**, Kovács Sz., Horváth M., Kalmár L. DNS-izolálás, ivarmeghatározás és egyedi azonosítás fiókákból származó tokos- és pihetollak felhasználásával; MTA-ÁODI Éves Konferencia, 2011. január 24-27. (előadás)

Vili N., Nemesházi E., Kovács Sz., Horváth M., Szabó K.: Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive and non-destructive sampling, 3rd European Congress of Conservation Biology, 2012. augusztus 28- szeptember 1., Glasgow, United Kingdom (poszter)

10. Függelék

10.1. A vizsgált territóriumokban tapasztalt cserék (tojók)

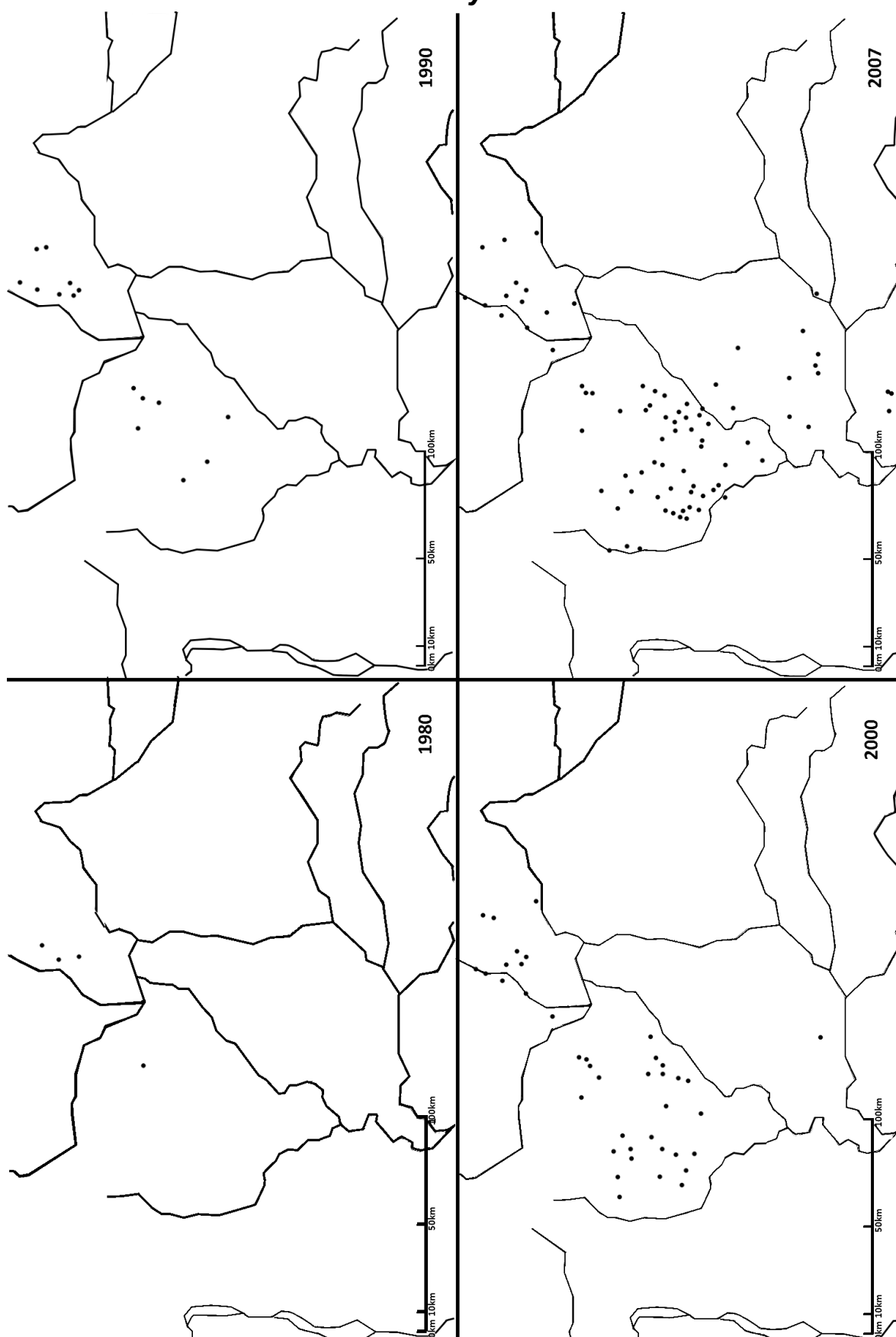
A tojók cserélődési aránya a hegyvidéki territóriumokban; terr – territórium kódja, cserék száma: pot – potenciális cserelehetőségek a vizsgált időszakban, min – minimum, a megfigyelt cserék száma, max – maximum, a megfigyelt és lehetséges cserék száma a genetikai azonosítást figyelembe véve; cserélődési arány: min – a megfigyelt cserék és a potenciális cserelehetőségek aránya, max – a cserék maximális száma és a potenciális cserelehetőségek aránya

terr	vizsgált évek										cserék száma			cserélődési arány	
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	poss	min	max	min	max
Z-01	A	A	a	A	A	A	A	A	A	A	8	0	0	0.000	0.000
Z-02			A	A							1	0	0	0.000	0.000
M-01				A	?	B	C	c	C		5	2	3	0.400	0.600
M-03				A	A	?	?	B	C		5	2	4	0.400	0.800
B-01				A	a	a	A	a	A		5	0	0	0.000	0.000
M-06				A	a	A	A	A	A		5	0	0	0.000	0.000
M-04					A	A	A	?	B		4	1	2	0.250	0.500
B-04					A	B	C				2	2	2	1.000	1.000
Z-03						A	A				1	0	0	0.000	0.000
Z-05						A	A				1	0	0	0.000	0.000
B-05							A	a	A		2	0	0	0.000	0.000
Z-04							A	B	B		2	1	1	0.500	0.500
össz											41	8	12	0.213	0.283

A tojók cserélődési aránya a síkvidéki territóriumokban

terr	vizsgált évek										cserék száma			cserélődési arány	
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	pot	min	max	min	max
HV-04	A	?	?	?	?	B	b	B			7	1	5	0.143	0.714
HV-01	A	a	A	a	a	A	A	A			7	0	0	0.000	0.000
HV-03		A	A	B	?	C					4	2	3	0.500	0.750
BS-03			A	?	?	?	B	B	?	C	7	2	6	0.286	0.857
BS-02			A	?	?	?	B				4	1	4	0.250	1.000
HS-06				A	a	A	A	A	A		5	0	0	0.000	0.000
HV-02				A	a	A	A	A			4	0	0	0.000	0.000
HS-07				A	A	A	A				3	0	0	0.000	0.000
HV-06				A	A	A	A				3	0	0	0.000	0.000
HS-01				A	B	B	B	B	B		5	1	1	0.200	0.200
BK-02				A	B	C	C	C			4	2	2	0.500	0.500
HS-05					A	?	B	B			3	1	2	0.333	0.667
BS-01					A	A	A				2	0	0	0.000	0.000
HS-21					A	A	A				2	0	0	0.000	0.000
BS-05					A	B	C	c	c	C	5	2	2	0.400	0.400
HS-03						A	A	A	A		3	0	0	0.000	0.000
HS-15						A	A	A	B		3	1	1	0.333	0.333
J-02						A	a	A			2	0	0	0.000	0.000
HS-14						A	B	B			2	1	1	0.500	0.500
SZ-01							A	?	B		2	1	2	0.500	1.000
BE-07							A	A	A		2	0	0	0.000	0.000
CA-01							A	a	A		2	0	0	0.000	0.000
HS-17							A	a	A	A	3	0	0	0.000	0.000
HS-13							A	B	B		2	1	1	0.500	0.500
NK-01							A	B	B		2	1	1	0.500	0.500
HS-16							A	B	B	B	3	1	1	0.333	0.333
HS-18							A	B	B	C	3	2	2	0.667	0.667
HS-08							A	B			1	1	1	1.000	1.000
BS-06								A	A		1	0	0	0.000	0.000
NK-02								A	A		1	0	0	0.000	0.000
HS-19								A	A	A	2	0	0	0.000	0.000
BE-06								A	B		1	1	1	1.000	1.000
HS-04								A	B		1	1	1	1.000	1.000
J-07									A	B	1	1	1	1.000	1.000
össz											102	24	38	0.293	0.380

10.2. A territóriumok száma és helyzete 1980 és 2007 között

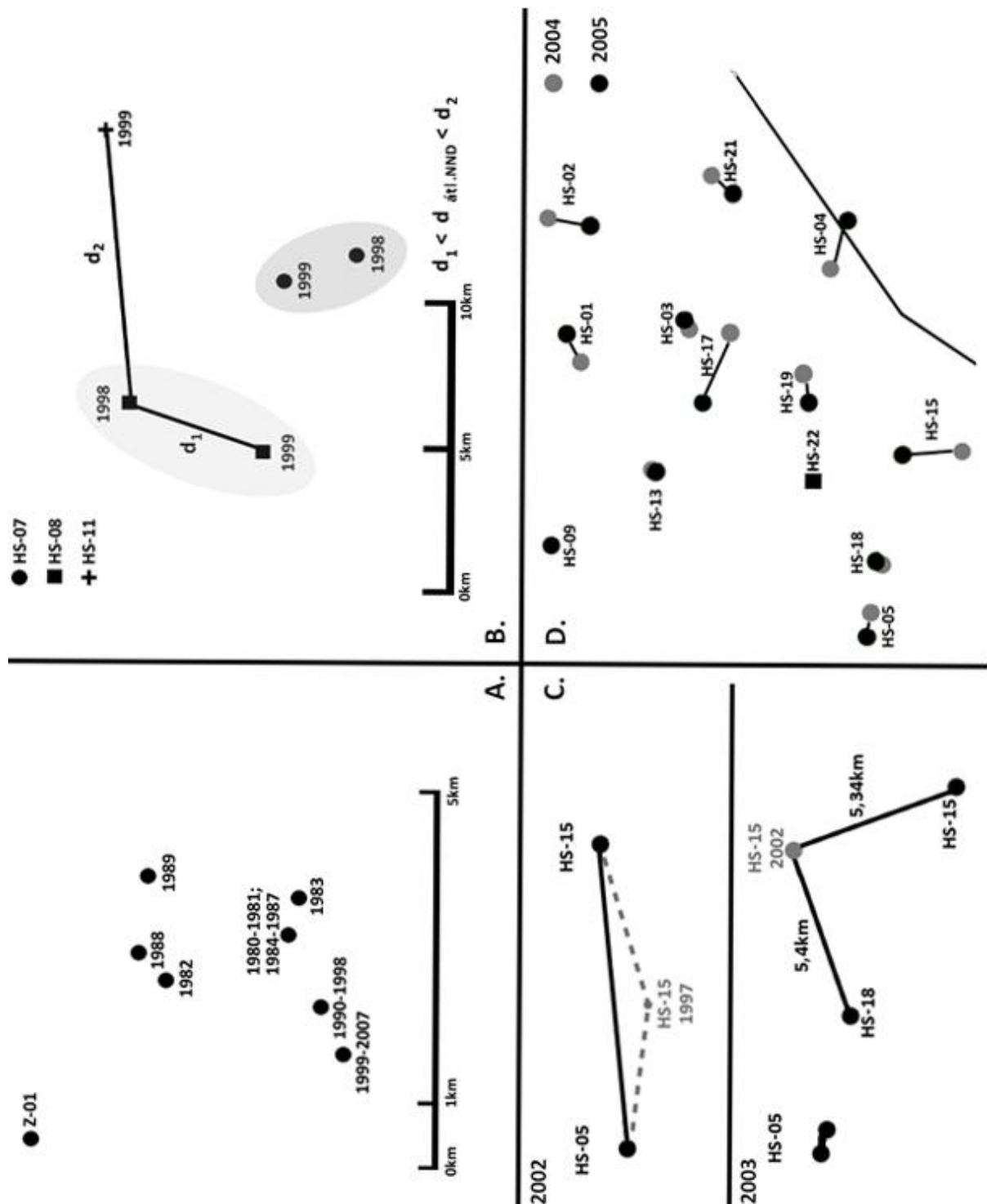


10.3. A terepi territórium-meghatározási módszer rövid ismertetése

A terepi territórium-térképezést 1980 óta a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület és a Nemzeti Parkok munkatársai végezték.

A fészkelőhelyeket 1:25 000 arányú katonai topográfiai térképeken jelölték be, a koordinátaikat GPS segítségével határozták meg. A 2002 előtti fészkeknél az ilyen adatfelvételre még nem volt lehetőség, ezek koordinátáit ahol lehetséges volt utólag egészítették ki. A vizsgálatban az 1998 és 2006 közötti fészkekkel foglalkoztam, ezekben az években minden ismert magyarországi fészkelési kísérletről rendelkezésre álltak az adatok.

A territóriumok kijelölése a relatív fészektávolságok felhasználásával történt, és négy lehetséges esetet lehetett megkülönböztetni (22. ábra). Az első esetben (A.) az előző évi fészket használta a pár, így a fészket ugyanahhoz a territóriumhoz sorolták. A második esetben (B.) az eredeti fészkek helyett új fészket találtak, akkor azt is az eredeti territóriumba sorolták, ha a régi és az új fészkek távolsága nem haladta meg az átlagos azévi szomszéd-távolságot (NND: nearest neighbour distance, az egymáshoz legközelebb eső fészkek távolsága, a hazai parlagisas-populáció esetében átlagosan mintegy 7,3 km, Kovács et al., 2005). A harmadik csoportba (C.) olyan esetek tartoznak, amikor az eredeti fészektől megközelítőleg azonos távolságra két fészkek épült. Ilyenkor a következő év adatai alapján visszamenőleg sorolták territóriumba a fészkeket. Ha korábbi fészkelési adatok is rendelkezésre álltak, akkor szomszédos, elméleti territóriumok ábrázolása után (minimum konvex poligonok, White és Garrott, 1990) az új fészket ahhoz sorolták, amelyikhez a legközelebb esett. A negyedik esetben (D.) az új fészkek száma meghaladta az előző évi fészkek számát, akkor a régi fészkektől legmesszebb levő fészkek alapján új territóriumokat jelöltek ki. Az így megállapított beosztásokat évente újra értékelték, mielőtt a madarak genetikai profiljai rendelkezésre álltak, és befolyásolhatták volna a fészkek ilyen terepi megfigyelésen és tapasztalati utón történő besorolását.

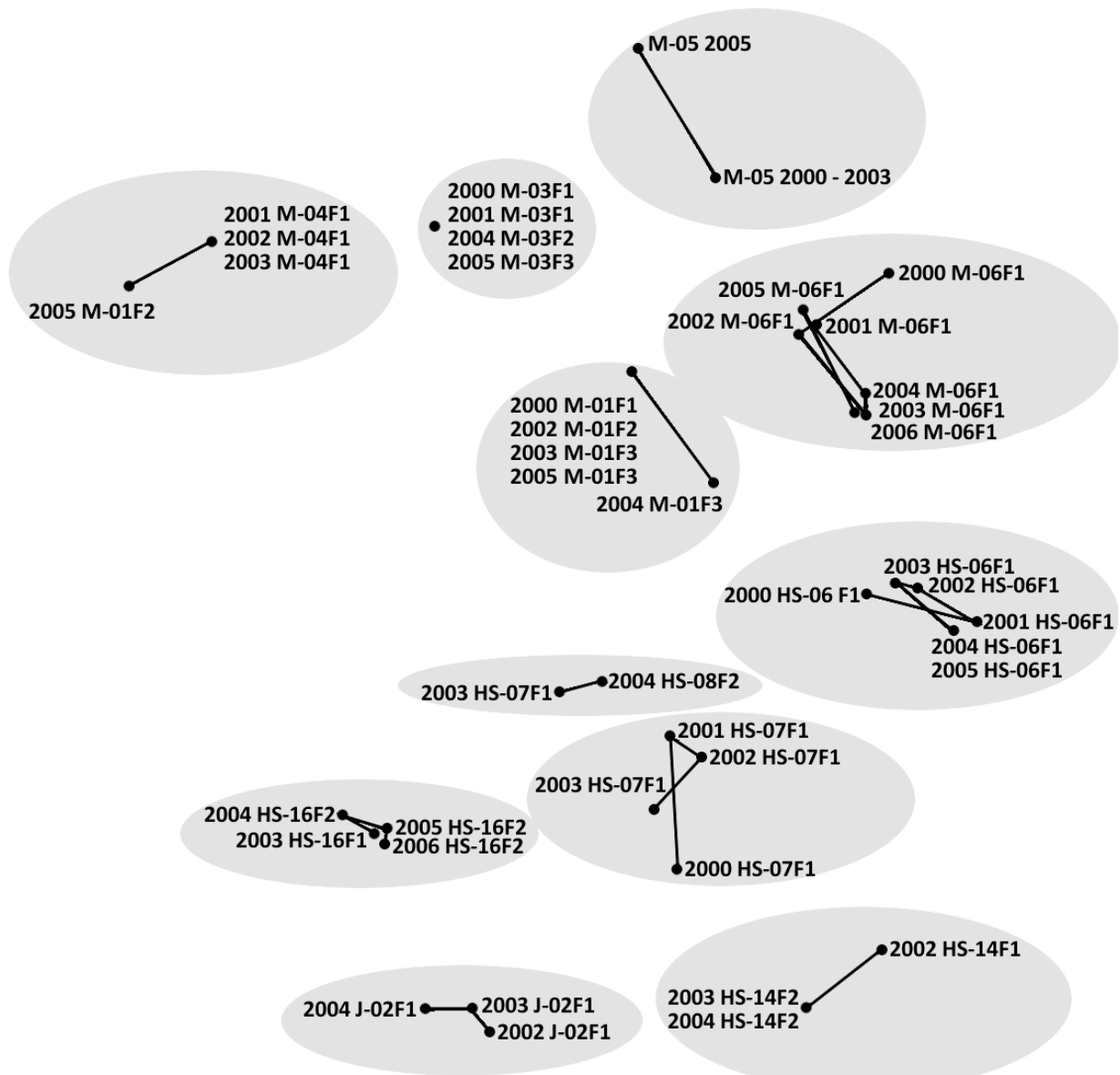


22. ábra: A territórium-térképezés során lehetséges esetek. A. – több éven át ugyanazt a fészket használják, ha újat építenek, akkor is a közelben, B. – Az új fészkek az átlagos szomszéd távolságnál közelebb van; C. – Két új fészkek jelenik meg, a régitől közel azonos távolságra, a következő év adatai alapján lehetséges az egyértelmű besorolás; D. – Az előző évinél több használatban levő fészkek található a területen, a távolságok alapján a régi fészkektől legmesszebb levők kerülnek új territóriumba (HS-22)

10.4. Példák az azonosított egyedek fészkeinek mozgására

Az alábbi sematikus ábrán tíz vizsgált territóriumban követhető nyomon a tojók és a fészkek helyének változása. A szürke színezés a territóriumok könnyebb megkülönböztetését szolgálja.

A tojók jelölése év, territórium és sorszám alapján történt, azaz a 2004 M-03F2 a 2004-ben az M-03-as territóriumban másodikként beazonosított tojót jelenti. Az M-05-ös territóriumban nem történt egyedi azonosítás.



11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Hornung Erzsébetnek, a doktori munka során nyújtott támogatásáért és türelméért.

Köszönöm a témabizottságom tagjainak Dr. Horváth Mártonnak és Dr. Kalmár Lajosnak, hogy tapasztalatukkal és tudásukkal segítették a munkámat.

Segítségéért és értékes tanácsaiért ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kabai Péternek.

Köszönöm Kovács Szilviának és Szabó Krisztiánnak, hogy a közös munka során mindig számíthattam rájuk.

Köszönettel tartozom a Biológia Intézetben dolgozó munkatársaimnak a sok segítségért, folyamatos támogatásért és hogy baráti légkörben dolgozhattam. Külön köszönöm Margónak a folyamatos lelkesítést.

Köszönet illeti a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület Parlagisas-védelmi Munkacsoportjának és Raptor Protection of Slovakia munkatársait, a minták begyűjtéséért.

Köszönöm a SziE Állatorvos-tudományi Doktori Iskola vezetőjének, Dr. Rusvai Miklósnak az irántam tanúsított türelmét.

Köszönöm opponenseimnek Dr. Kövér Szilviának és Dr. Hoffmann Gyulának, hogy vállalták dolgozatom bírálatát, és észrevételekkel és javaslatiakkal segítették annak jobbátételét.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a támogatást, bátorítást és türelmet.