

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

**PARLAGI SASOK ROKONELKERÜLŐ VISELKEDÉSÉNEK
VIZSGÁLATA**

Készítette:

Zsinka Bernadett
biológus MSc II.

Témavezető:

Dr. Vili Nóra
tudományos munkatárs
ÁTE, Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Társtémavezető:

Dr. Kövér Szilvia
tudományos munkatárs
ÁTE, Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Budapest, 2020

Tartalom

1. Rövidítések és idegen szavak jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	5
2.1 A beltenyésztés és következményei	5
2.2 Párválasztás és rokonelkerülési mechanizmusok madarakban.....	6
2.3 Ragadozó madarak beltenyésztettsége és rokonelkerülése.....	8
2.4 A parlagi sas biológiája	9
2.4 Rokonságbecslő módszerek.....	11
3. Célkitűzés	15
4. Anyag és módszer	16
4.1 Mintavétel és egyedi azonosítás	16
4.2 A vizsgálatba bevont egyedek kiválasztása.....	16
4.2 Markerkészlet és új lokuszok tesztelése	17
4.3 Rokonságbecslő módszerek tesztelése	19
4.4 Rokonelkerülés vizsgálata	21
5. Eredmények.....	23
5.1 Markerkészlet és új lokuszok tesztelése	23
5.2 Rokonságbecslő módszerek tesztelése	24
5.3 Rokonelkerülés vizsgálata	34
6. Diskusszió.....	36
8. Összefoglalás.....	43
8. Abstract	44
9. Irodalomjegyzék.....	45
11. Köszönetnyilvánítás	51
12. Mellékletek.....	52
13. Nyilatkozatok	57

1. Rövidítések és idegen szavak jegyzéke

adult: végleges tollazattal rendelkező madár

PCR: polimeráz-láncreakció (polymerase chain reaction)

amplifikálás: DNS-szakasz PCR technológiával történő felszaporítása

primer: PCR során használt rövid, egyszálú, lánckezdő DNS-szakasz

szimplex PCR: egy adott DNS-szakasz felszaporítása egy primerpár használatával

multiplex PCR: több, különböző DNS-szakasz egyszerre történő felszaporítása több primerpár segítségével

lokusz: egy adott DNS-szekvencia helye a genomban

genetikai marker: ismert helyzetű DNS-szakasz a genomban, amely variabilitásából adódóan alkalmas például egyedek azonosítására

mikroszatellita: néhány bázispárnyi DNS-szekvencia ismétlődéséből álló genetikai marker, amelyben az ismétlésszám variábilis

nullallél: olyan allél, amely a PCR-reakció során nem amplifikálódik a primer kötőhelyén bekövetkezett mutáció miatt, illetve rossz minőségű vagy kis mennyiségű DNS templát következtében, így a nullallélt hordozó heterozigóta egyedet tévesen homozigótának genotipizáljuk

PI: Probability of Identity, a markerkészlet tulajdonsága, annak a valószínűsége, hogy a vizsgálati populációból véletlenszerűen kiválasztott két különböző egyed genotípusa megegyezik

PI_{SIB}: a PI-értéknek a populációban előforduló lehetséges testvérek figyelembevételével korrigált változata

IBD: leszármazásilag azonos (Identical by Descent), azaz egy önkényes referencia-időpontnál nem régebbi közös őssel rendelkező allélek

r – rokonsági koefficiens: annak a valószínűsége, hogy az egyik egyedben véletlenszerűen kiválasztott allél IBD másolatként megtalálható a másik egyedben

paraméterek becslése a momentumok módszerével: egy egyenlettel kifejezzük a kérdéses paraméterek függvényében az elméleti momentumokat (például átlagot), majd ezt az egyenletet egyenlővé tesszük a mintából becsült momentumokkal, és ebből becsüljük meg a paramétereket

paraméterek becslése maximum likelihood módszerrel: a kérdéses paraméter becslésének azt az értéket választjuk, amely mellett a megfigyelt mintánk a legvalószínűbb

RMSE: átlagos négyzetes hiba négyzetgyöke (root mean square error), a rokonságbecslésre alkalmazva: $RMSE = \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) \sum_{i=1}^n (\hat{r}_i - r_i)^2}$, ahol \hat{r}_i és r_i az i-ik egyedpár becsült és elméleti rokonságértéke, n pedig az egyedpárok száma

2. Bevezetés

2.1 A beltenyésztés és következményei

A beltenyésztés, azaz a rokonokkal történő párosodás (Wright, 1922) a homozigóta genotípusú egyedek túlsúlyát eredményezi, és ezáltal beltenyésztéses leromláshoz, az egyedek csökkent fitneszéhez vezethet (Keller és Waller, 2002). Ennek oka, hogy a rokonok párosodásakor megnő a leszármazásilag azonos alléleket, köztük a káros, recesszív alléleket két példányban hordozó, homozigóta utódok létrejöttének esélye, amelyekben már kifejeződik a recesszív allél fitneszre gyakorolt negatív hatása (Lynch, 1991; Charlesworth és Willis, 2009).

A beltenyésztés számos módon befolyásolhatja a fitneszt (Keller és Waller, 2002). Madarak esetében például csökkenhet a kelési siker a beltenyésztett szülők infertilitása, illetve az embrió csökkent túlélési valószínűsége miatt (Spottiswoode és Møller, 2004; Heber és Briskie, 2010; Hemmings et al., 2012; Kruuk et al., 2002), továbbá negatívan hathat az utódok későbbi túlélésére is (Kruuk et al., 2002; Daniels és Walters, 2000; Møller és Nielsen, 2015). A beltenyésztés fitneszre gyakorolt hatása összetett, eltérő módon érintheti annak egyes komponenseit a faji jellemzők, a populáció genetikai összetétele, valamint a környezet függvényében (Hedrick és Kalinowski, 2000; Armbruster és Reed, 2005; Szulkin *et al.*, 2007). Nádirigókon (*Acrocephalus arundinaceus*) végzett vizsgálatban a pár két tagja közötti rokonság mértéke negatív korrelációt mutatott a kelési sikerrel, ugyanakkor nem mutattak ki összefüggést a fészekaljmérettel és a kirepülési sikerrel (Hansson, 2004). A hihi, vagy öves maorimadár (*Notiomystis cincta*) esetében a beltenyésztés negatívabb hatással volt a hím embriók és fiókák túlélésére, amelyet a hímek nagyobb testméretének és gyorsabb növekedésének, és az ebből adódó nagyobb fejlődési stressznek tulajdonítottak (Brekke *et al.*, 2010).

Beltenyésztés rendszerint kialakul a kisméretű, elszigetelt populációkban (például szigeteken, vagy a kontinentális élőhelyek fragmentáltsága következtében), hiszen kevés potenciális pár áll az egyedek rendelkezésére, és a generációk előrehaladtával egyre inkább megnő a rokonokkal történő párosodás esélye (Frankham *et al.*, 2002). Védett fajok esetében, amelyek sokszor kis létszámú populációkkal rendelkeznek, és akár többször is jelentős populációméret-csökkenésen estek át a múltban, különösen fontos kérdés lehet a beltenyésztés megléte. Illetve, ennek következtében a genetikai variabilitás csökkenése és ezeknek a populáció

életképességére gyakorolt hatása. (Keller és Waller, 2002; Jamieson *et al.*, 2006; Ewing *et al.*, 2008). Nagyméretű populációkban is felléphet beltenyésztés, például a limitált diszperziós képességekkel rendelkező fajok esetében (Szulkin és Sheldon, 2008)

Mivel a beltenyésztés nem csak magának a populációnak a fennmaradását veszélyeztetheti, de az utódokra gyakorolt káros hatásaiból adódóan a párosodó egyedek fitneszét is csökkentheti, az evolúció során megjelentek különböző mechanizmusok a rokonokkal történő párosodás elkerülésére (Pusey és Wolf, 1996).

2.2 Párválasztás és rokonelkerülési mechanizmusok madarakban

A beltenyésztés elkerülése több módon is megvalósulhat. A legkézenfekvőbb esetben az egyed nem rokon, vagy csak kevésbé rokon egyeddel alkot szociális párt, azonban erre eddig kevés bizonyítékot találtak madarakban (Wheelwright és Mauck, 1998; Oh és Badyaev, 2006; Nemesházi *et al.*, 2018a). Ennek számos oka lehet: egyrészt fontos a potenciális pár egyéb szempontból vett genetikai minősége is, amely összefüggésben állhat az általa birtokolt territórium minőségével, a parazitákkal szemben ellenállásával és utódgondozási képességeivel is (Foerster *et al.*, 2006). Másfelől, a potenciális párok térbeli eloszlásától és az intraszexuális kompetíciótól függően a rokonság szempontjából optimális pár keresése nagyobb költségekkel járhat, mint maga a beltenyésztés (Foerster *et al.*, 2006). A beltenyésztés csökkentését elősegítheti a párváltás is: előfordulhat, hogy egy eredetileg rokonnal párbaállt egyed a beltenyésztés negatív hatását érzékelve (mint például csökkent kelési siker) a következő szaporodási időszakban új párt keres és egy kevésbé rokon egyeddel áll össze (Van de Castele *et al.*, 2003). A beltenyésztés elkerülésében szerepet játszhat továbbá az EPC, azaz az extra-pár kopuláció is, amikor az egyed a szociális párján kívül egy másik egyeddel is párosodik. Több esetben is kimutatták, hogy a tojók extra párjukkal való rokonsága kisebb volt, mint szociális párjukkal, így bizonyos fajokban ez is a rokonelkerülés egy fontos mechanizmusa lehet (Blomqvist *et al.*, 2002; Foerster *et al.*, 2003; Brekke *et al.*, 2012). Ezt tovább erősíthetik posztkopulációs mechanizmusok, amennyiben a kevésbé rokon hím spermája jobb fertilizációs képességgel bír (Marshall *et al.*, 2003).

A rokonokkal történő párbaállás elkerülését passzív és aktív mechanizmusok is elősegíthetik (Szulkin és Sheldon, 2008). A passzív rokonelkerülés nem feltételezi a rokon

egyedek nem rokon egyedektől való megkülönböztetésének képességét. Megvalósulhat születési (kelési) diszperzió által, amelynek során az egyedek szétszélednek, elvándorolnak születési (kikelési) helyükről, így csökkentve a rokon egyedekkel való találkozást, és ezáltal a párosodás esélyét is (Greenwood, 1980). Több, madarakon végzett vizsgálatban is mutattak ki fordított irányú összefüggést a kelési helytől számított diszperziós távolság és az egyedek rokonsága között (Foerster *et al.*, 2006; Van de Castele és Matthysen, 2006; Szulkin és Sheldon, 2008; Nemesházi *et al.*, 2018b). A diszperzió kialakulásának nem egyedüli oka a beltenyésztés elkerülése: fontos szerepet játszik a rokon egyedek közötti kompetíció csökkentésében (Hamilton és May, 1977), valamint létrejöttében valószínűleg meghatározó az élőhely tér-és időbeli variabilitása is (Johnson és Gaines, 1990). A beltenyésztés elkerüléséhez elég lehet, ha csak az egyik ivar diszpergál jelentős mértékben, ekkor beszélünk ún. ivarfüggő diszperzióról (Greenwood és Harvey, 1982; Li és Kokko, 2019; Trochet *et al.*, 2016). Több tényezőtől is függ, hogy mely ivar diszpergál messzebbre. Jellemzően az az ivar marad helyben, amelynek nagyobb előnye származik a terület ismeretéből, territóriális madarak esetében tehát a territóriumot fogláló hímek (Greenwood, 1980; Li és Kokko, 2019). Egyes esetekben az ivarfüggő diszperzió önmagában is elégséges mechanizmus lehet a beltenyésztés elkerülésére (Lebigre *et al.*, 2010).

Az aktív rokonelkerülési mechanizmusok esetében szükséges, hogy az egyed valamilyen jel alapján különbséget tudjon tenni rokon és nem rokon egyedek között. Főképp olyan fajokban lehet ennek fontos szerepe, amelyek szaporodási rendszere, illetve kismértékű diszperziója miatt nagyobb a rokonokkal való találkozás esélye (Pusey és Wolf, 1996). Fontos megjegyezni, hogy a rokonok felismerése nem feltételez tudatosságot. A rokonfelismerés háttérében többféle mechanizmus állhat, melyeket legtöbbször két nagy csoportba sorolnak. (Nakagawa és Waas, 2004). Az egyik az előzetes asszociációra épülő rokonfelismerés, amelynek során az egyedek az életük kezdeti szakaszában rokonként megismert egyedet (például fészektársakat) egy későbbi találkozás alkalmával felismerik (Komdeur és Hatchwell, 1999; Penn és Frommen, 2010). Ez tűnik az elterjedt mechanizmusnak a kooperatívan költő fajok esetében (Leedale *et al.*, 2020; Riehl és Stern, 2015), amelyeknél a szülőkön kívül más egyedek is besegítenek a fiókák nevelésébe. A rokonfelismerés másik módja előzetes ismeretséget nem igényel, az egyed a saját vagy rokonai fenotípusához hasonló fenotípusú egyedeket rokonként ismer fel (Lacy és Sherman, 1983). A két mechanizmust külön vizsgálni nehéz, még fészekalj-manipulációs kísérletek során is, mert gyakran van egy rövid asszociációs időszak a fiókák szétválasztásáig, és

a rokonfelismerés alapjául szolgáló jelek akár az inkubációs periódusban is kialakulhatnak (Dowling *et al.*, 2016). Néhány esetben azonban így is találtak az előzetes asszociációt nem igénylő rokonfelismerésre utaló bizonyítékot (Leedale *et al.*, 2020). A sokat vizsgált kooperatív költők esetében a vokális jelek szerepe a rokonfelismerésben bizonyított (Riehl és Stern, 2015; Sharp *et al.*, 2005; Hatchwell *et al.*, 2001). Az utóbbi időben előtérbe került az olfaktorikus jelek vizsgálata is, amelyek rokonfelismerésben betöltött szerepét kimutatták már viharfecskénél (*Hydrobates pelagicus*) (Bonadonna és Sanz-Aguilar, 2012), és esetleg zebra-pintyekben (*Taenopygia guttata*) is fontos lehet (Caspers *et al.*, 2013). A madarak olfaktorikus érzékelésén alapuló párválasztásával kapcsolatban egy esetlegesen a rokonsággal is összefüggő témát is érdemes megemlíteni. Emlősök esetében már régóta ismert az immunrendszer működésében szerepet játszó MHC (fő hisztokompatibilitási komplex) alapján történő párválasztás. Az egyednek előnyös a sajátjától eltérő MHC alléleket hordozó egyeddel párosodni, mert az MHC diverzitás összefügg például a parazitákkal szembeni ellenállással (Kurtz *et al.*, 2004). Madarak esetében is kimutattak már MHC alapján történő párválasztást (Baratti *et al.*, 2012; Bonneaud *et al.*, 2006), továbbá találtak összefüggést az egyedek uropigialis mirigy váladékának kémiai összetétele és az MHC rokonság között (Leclaire *et al.*, 2014). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a madarak az MHC rokonság érzékelésére is képesek, és elképzelhető, hogy ez az emlősökhöz hasonlóan (Eggert *et al.*, 1998) olfaktorikus jeleken keresztül valósul meg.

2.3 Ragadozó madarak beltenyésztettsége és rokonelkerülése

Ragadozó madarak esetében a nagyszámú közelrokon egyed megjelölése és hosszú távú követése sokszor technikai és pénzügyi nehézségekbe ütközik (Warkentin *et al.*, 2013), így a közel rokonokkal történő párosodásról sokszor nem áll rendelkezésre elegendő információ. Több hosszútávú vizsgálat alapján a ragadozó madaraknál a legtöbb esetben ritka esemény a közelrokonokkal történő párosodás (Forsman *et al.*, 2002; Serrano, 2018; Stewart *et al.*, 2007; Wiens *et al.*, 2006), de néhány esetben magas gyakoriságokat is kimutattak (Ewing *et al.*, 2008; James *et al.*, 1987; Warkentin *et al.*, 2013). Míg egyéb madárfajok esetében a beltenyésztésnek jelentős negatív hatásai ismertek (lásd fentebb), addig ragadozó madaraknál erről kevés információ van (Hayashi, 2009). A beltenyésztés jellemzőbb a kisebb távolságokra diszpergáló fajokban (Warkentin *et al.*, 2013), és esélye bizonyítottan csökken a nagyobb diszperziós távolság esetén (Ortego *et al.*, 2008). Ragadozó madár fajokban jellemzően a tojó diszpergál

messzebbre (Serrano, 2018) és ez az ivarfüggő diszperzió fontos szerepet játszhat a rokonelkerülésben.

A ragadozó madarak rokonfelismerésével kapcsolatban hiányosak az ismereteink. Egy barna kányákon (*Milvus migrans*) végzett kutatás eredményei alapján az uropigiális mirigy váladékának kémiai összetétele a költési időszakban pozitív korrelációt mutatott az egyedek közötti rokonság mértékével a hím-hím és hím-tojó egyedpárok esetében (Potier *et al.*, 2018). Amennyiben az egyedek képesek érzékelni ezeket a kémiai szignálokat, úgy ennek akár a rokonelkerülésben is szerepe lehet. Újabb eredmények alapján a ragadozó madarak szaglása valószínűleg fejlettebb, mint azt korábban gondoltuk és az olfaktorikus jelek fontosak lehetnek a vadászat és az egyedek közti kommunikáció, így akár a párválasztás során is (Potier, 2019).

A rokonnal történő párbaállás elkerülését ragadozó madarakban eddig alig vizsgálták, és legjobb tudomásunk szerint csak a rétisas (*Haliaeetus albicilla*) hazai populációjában találtak bizonyítékot ennek meglétére (Nemesházi *et al.*, 2018a). Továbbra is érdekes kérdés marad a rokonelkerülés mechanizmusa, különösképp a monogám, hosszú életű és filopatrikus, azaz kis távolságra diszpergáló fajoknál. Ugyanis ezeknél a közel rokon egyeddel hosszú időre történő párbaállás beltenyésztéses leromlás fellépése esetén jelentősen csökkentheti az egyedek fitneszt.

2.4 A parlagi sas biológiája

A parlagi sas (*Aquila heliaca*, SAVIGNY 1809) egy eurázsiai elterjedésű, hazánkban is költő, nagytermetű ragadozó madár. Elterjedése alapvetően szeppsi élőhelyekhez kötött, nagy számmal fészkel a síkvidéki, mezőgazdasági területeken. Több antropogén tényező is veszélyezteti, hazai adatok alapján kiemelten az illegális mérgezés, a vonattal, légvezetékkel vagy gépjárművel történő ütközés, illetve az áramütés, de veszélyt jelent a sörétszemek elfogyasztása következtében fellépő ólommérgezés, a csapdába esés, valamint a szándékos lelövés is (Deák *et al.*, 2020). Világszintű állományát 2500-10000 költő egyedre becsülik (BirdLife International, 2016), a Természetvédelmi Világszövetség besorolása alapján sebezhető (Vulnerable) faj. A kárpát-medencei állomány az oroszországi és kazahsztáni után a legjelentősebb összefüggő populációja (imperialeagle.eu), melynek nagyrésze (285-300 pár) (Horváth *et al.*, 2020) hazánk területén fészkel. Fokozottan védett, természetvédelmi értéke egymillió forint.

A rokonelkerülés különösen érdekes kérdés lehet ennél a fajnál. A parlagi sas hosszúéletű madár, a legidősebb ismert hazai egyed 26 évesen pusztult el (imperialeagle.eu). Hosszú időre választ párt, párcsere a megfigyelések alapján az egyik egyed pusztulása következtében történik. Territoriális madár, a párok területhűek, akár évtizedekig is használhatnak egy fészket, és a territóriumon belül több váltófészük is lehet. A pár mindkét tagja részt vesz a fiókák gondozásában, a kotlási időszakban főleg a hím vadászik és védelmezi a territóriumot az esetleges betolakodóktól (imperialeagle.eu). Néhány esetben találtak extra pár fertilizációra (EPF) utaló eredményt, de ezek egyrészt valószínűsíthetően genotipizálási hibák következményei (Rudnick *et al.*, 2005), egy másik esetben pedig, mint később kiderült, az apai minta nem a rezidens hímtől, hanem egy betolakodó egyedtől származott (Gyarmati, 2014). Ezek alapján úgy tűnik nem csak szociális, de genetikai monogámia is jellemzi ezt a fajt. A fiatal egyedek ivarérettség előtt több évig kóborló életmódot folytatnak, és az ivarérettséget megért egyedek legtöbbször az eredeti populációba tér vissza költetni (Del Hoyo *et al.*, 1995). A hazai fiatal parlagi sasok kóborló éveik során is nagymértékben ragaszkodnak a Kárpát-medencéhez, ezen belül is a magyarországi területekhez (Prommer *et al.*, 2015).

A fentiekből adódóan feltételezhetően sok rokon egyed található a populációban, így a beltenyésztés elkerülése végett a rokonelkerülés fontos mechanizmus lehet ennél a fajnál. Egy korábbi, a kazahsztáni parlagi sas populáción végzett vizsgálat során a tényleges költőpárok átlagos rokonságát hasonlították véletlenszerű párbaállást feltételezve kapott átlagrokonságok eloszlásához. Az eredmények alapján nem találtak bizonyítékot a rokonelkerülés meglétére (Rudnick *et al.*, 2005), azonban elképzelhető, hogy a rokonságbecsléshez alkalmazott módszer nem volt megfelelő az adott populáció és markerkészlet esetén (Van de Castele *et al.*, 2001).

A hazai populáció az 1970-es évekre egy palacknyak-hatáson ment keresztül, az intenzív vadászat, mérgezés és mezőgazdasági tevékenységek miatt a költőállomány 15-25 párra csökkent (Bagyura *et al.*, 2002). Ezt követően több védelmi program zajlott, illetve zajlik jelenleg is, melyek eredményeképp a hazai kb. 285-300 költőpárból álló populáció továbbra is növekedést mutat (Horváth *et al.*, 2020) Egy korábbi vizsgálat eredményei szerint a kárpát-medencei populáció genetikai variabilitása magas a mitokondriális kontroll régió genetikai diverzitása (0,72), valamint a sejtmagi mikroszatellita lokuszok megfigyelt heterozigóciája (0,70) alapján (Szabó Krisztián, személyes közlés). Ezen eredmények alapján jelentős beltenyésztettség a korábbi állománycsökkenés ellenére sem fedezhető fel a populációban, ami támogatja egy

effektív rokonelkerülési mechanizmus meglétének hipotézisét. Továbbá a hazai populáció esetében ivarfüggő kelési diszperzióra is találtak bizonyítékot, amely szintén alátámaszthatja a rokonelkerülés meglétét (Papp, 2013).

2.4 Rokonságbecslő módszerek

Az egyedek közötti rokonság ismerete számos kutatási területen és kérdés megválaszolásához fontos, például az egyes jellegek öröklhetőségét vizsgáló kvantitatív genetikában (Ritland, 1996), igazságügyi genetikában, humán betegségek genetikai hátterének feltérképezésekor (Weir *et al.*, 2006), génáramlás vizsgálatokor (Morin *et al.*, 1994), szociális viselkedés evolúciójának tanulmányozásához (Hamilton, 1964) és fajvédelmi programok lebonyolítása esetén is (Gautschi *et al.*, 2003; Woolaver *et al.*, 2013). Ezek mellett a rokonokkal történő párbaállítás elkerülésére is következtethetünk az egyedpárok rokonságának becslésével (Richardson *et al.*, 2004; Rudnick *et al.*, 2005; Nemesházi *et al.*, 2018a).

A rokonság alapja a két egyedben található leszármazásilag azonos (IBD, Identical by Descent), azaz egy önkényes referencia-időpontnál (adott számú generációig visszamenőleg) nem régebbi közös őssel rendelkező allélek megléte. Két egyed közötti rokonság mértékét a rokonsági koefficiens (r) adja meg, amely annak a valószínűsége, hogy az egyik egyedben egy véletlenszerűen kiválasztott allél IBD másolatként megtalálható a másik egyedben (Wright, 1922). Szemléletesebben megfogalmazva, ez a két egyedben található IBD allélek arányát jelenti (Blouin, 2003). A fenti definíciókból kifolyólag a rokonság becslésekor mindig van egy ún. referenciapopuláció, amelyben nincsenek IBD allélek, tehát egyik egyed sem rokon és nem is beltenyészett (Wang, 2014). Az egyedek rokonsági fokát mindig ehhez a referenciához képest becsüljük (Wang, 2014). Minél távolabbi generációt veszünk referenciának, a jelen generáció egyedei közötti rokonságot annál nagyobbak fogjuk becsülni. Sokszor csak a jelen generáció áll rendelkezésre mint referencia, ebben az esetben az IBD definíció helyett a korrelációs definíciót használhatjuk a rokonságra, így a negatív rokonság is értelmezhető (Wang, 2014) (lásd később).

A rokonság becslése hagyományosan családfák, törzskönyvek alapján történik az egyes leszármazási vonalak végigkövetésével. Ekkor a referenciát az alapító egyedek adják, amelyeknek felmenői nem ismertek, és amelyekről feltételezik, hogy nem rokon és nem beltenyészett egyedek. Ez a feltétel a legtöbbször nem teljesül, és így a rokonságot a

ténylegeshez képest kisebbnek becsüljük (Russello és Amato, 2004). A családfák alapján történő rokonságbecslés másik hátránya, hogy nem tudja figyelembe venni, hogy az azonos rokonsági kapcsolatban álló egyedpárok (pl. édestestvérek, féltestvérek) tényleges rokonsága nem feltétlen egyezik az allélek véletlenszerű öröklődése miatt (Hill és Weir, 2011). Például a szülő-utód párok és az édestestvérek rokonságának várt értéke is $r = 0,5$, de amíg a szülő-utód párok esetében a rokonság mindig $r = 0,5$, hiszen a szülő minden esetben az alléljei felét adja át az utódnak, addig az édestestvérek esetében ez elméletben 0 és 1 között változhat. Ennek oka, hogy a véletlenből kifolyólag előállhat olyan eset, hogy a testvérpár két tagja a szülőktől teljesen eltérő alléleket ($r = 0$), vagy pontosan ugyanazokat örökli ($r = 1$). Természetesen sok lokusz vizsgálatakor már elenyészően kicsi a fenti szélsőséges esetek valószínűsége.

A természetben előforduló populációk esetében az egyedek családfája általában nem ismert, ilyenkor a rokonság becslése genetikai markerek alapján történik (Taylor, 2015). Leggyakrabban mikroszatellita markereket használnak erre a célra, mert kodominánsan öröklődnek, neutrálisak és sokallélosak, amely tulajdonságuknak köszönhetően akár nyolcszor jobb felbontóképességgel is bírnak, mint az amúgy kisebb költségek mellett nagyobb számban leírható, de csak biallélos SNP markerek (Ayres, 2005; Weir *et al.*, 2006).

Számos marker-alapú rokonságbecslő módszer áll rendelkezésre, ezek részben a momentumok módszerével (Queller és Goodnight, 1989; Li *et al.*, 1993; Ritland, 1996; Lynch és Ritland, 1999; Wang, 2002) részben maximum likelihood módszerrel (Milligan, 2003; Wagner *et al.*, 2006; Anderson és Weir, 2007; Wang, 2007) becslik a rokonságot. A momentumok módszere esetében először egy egyenlettel kifejezzük a kérdéses paraméterek függvényében az elméleti momentumokat (például átlagot), majd ezt az egyenletet egyenlővé tesszük a mintából becsült momentumokkal, és így becsüljük meg a paramétereket. A maximum likelihood módszer esetében a kérdéses paraméter becslésének azt az értéket választjuk, amely mellett a megfigyelt mintánk a legvalószínűbb. Az egyes rokonságbecslő módszerek eltérő megközelítéseket alkalmaznak a rokonság becslésére, így teljesítményük, azaz pontosságuk és precizitásuk eltérő mértékben függ a vizsgált populáció és a markerkészlet tulajdonságaitól: a használt lokuszok számától, ezek allélszámától, az allélgyakoriságoktól (Milligan, 2003; Van de Casteele *et al.*, 2001; Wang, 2014) a genotipizálási hibáktól, nullalélok jelenlététől (Dakin és Avise, 2004), a populáció rokonságösszetételétől (Csilléry *et al.*, 2006; Van de Casteele *et al.*, 2001), a vizsgált egyedek rokonsági fokától, valamint a populáció demográfiai múltjától (Robinson *et al.*, 2013) A

becsléseknek a legtöbb esetben viszonylag nagy a varianciája, amely egyrészt a rokonságban mutatkozó tényleges varianciából (lásd édestestvérek példája), másrészt a módszerek hibájából ered (Csilléry *et al.*, 2006; Taylor, 2015). Éppen ezért ezek a módszerek egy-egy egyedpár pontos rokonságának megállapítására kevésbé, csoportok átlagos rokonságának becslésére inkább alkalmasak (Santure *et al.*, 2010).

Minden esetben szükség van egy korábban már említett referenciapopulációra, amely optimális esetben nem rokon egyedekből áll és elegendő nagyságú ahhoz, hogy kellő pontossággal megbecsülhetők legyenek belőle a megbízható rokonságbecslés alapjául szolgáló populációs allélgyakoriságok (Bink *et al.*, 2008). Korábbi tesztek alapján a likelihood módszerek és a Lynch-Ritland módszer a leginkább érzékenyek a populációs allélgyakoriságok pontos becslésére (Bink *et al.*, 2008), a momentum-alapú Wang-féle módszer a legkevésbé (Wang, 2002). Míg a családfa alapján történő rokonságbecslésnél a vizsgált generációhoz időben nagyon közeli generációt választva referenciának jelentős lehet a becslések torzítása, addig a marker-alapú módszerek esetében ez kevésbé okoz gondot (Wang, 2014). Amennyiben a referenciapopulációt a vizsgált egyedek generációja alkotja, ahogy az a legtöbb esetben lenni szokott a természetes populációk vizsgálatakor, a rokonság többé nem IBD allélek valószínűségeként, hanem az egyedek alléljei közötti korrelációként értelmezendő (Wang, 2014). Ebben az esetben a negatív rokonságértékek is értelmezhetők. A negatív rokonságnak az a jelentése, hogy a két egyed megfelelő alléljei kisebb arányban egyeznek meg, mint a populációs allélgyakoriságokból várható egyezési valószínűség két véletlenszerűen választott egyedre; vagyis a két egyed rokonsága a vártnál kisebb. A korrelációs definíciót csak a momentum-alapú módszerek esetében alkalmazhatjuk, ugyanis a likelihood módszerek természetükből kifolyólag semmilyen esetben sem adnak negatív értéket a rokonságra. Épp emiatt a korlátozás miatt a likelihood módszerek torzítottak a momentum-alapú módszerekhez képest, de ez a torzítás inkább csak a 0-hoz közeli rokonságértékek esetében jelentős, és kellően nagy mennyiségű genetikai információ (körülbelül 20-30 mikroszatellita lokusz, 20 körüli allélszámmal és magas heterozigóciával) esetében minimálisra csökkenthető (Milligan, 2003). A likelihood módszer előnye a momentum-alapú módszerekkel szemben, hogy a legtöbb esetben ezek bírnak a legkisebb standard hibával (Milligan, 2003).

Az előzőekből is látható, hogy nincs olyan módszer, amely egyértelműen minden esetben a legjobban teljesít, így fontos a módszerek előzetes tesztelése a vizsgálni kívánt populáció és

markerkészlet esetén (Van de Casteele *et al.*, 2001; Wang, 2002; Milligan, 2003; Csilléry *et al.*, 2006).

3. Célkitűzés

Kutatásunk fő kérdése, hogy kerülnek-e a parlagi sasok a rokonokkal történő párbaállást. A vizsgálatot a Magyarországon költő parlagi sasok mikroszatellita markerekre alapozott rokonságbecslésével végeztük egy randomizációs teszt segítségével, mely során arra kaptunk választ, hogy a tényleges költőpárok átlagos rokonsága szignifikánsan különbözik-e a véletlenszerűen párba állított egyedek átlagos rokonságától.

Különböző rokonságbecslő módszerek teljesítményét teszteltük annak érdekében, hogy a vizsgált populációnk és a használt markerkészletünk esetében a legmegbízhatóbb becsléseket adó rokonságbecslő módszerrel válaszoljuk meg fő kérdésünket.

Továbbá a jelenleg egyedi azonosításra használt és a rokonságbecslés alapjául szolgáló markerkészletünk későbbi kibővítése érdekében új mikroszatellita lokuszok tesztelését is elvégeztük.

4. Anyag és módszer

4.1 Mintavétel és egyedi azonosítás

Az Állatorvostudományi Egyetem Konzerváció-genetikai Kutatócsoportja 2003 óta végzi a hazai parlagi sas populáció egyedeinek genetikai alapú azonosítását és nyomkövetését. Jelenleg összesen 477 költő egyed kilenc mikroszatellita lokusz alapján felállított DNS-profilja ismert. A költő egyedek genetikai azonosítása nem invazív mintavétel útján történik, nagyrészt a fészkek 100 m-es körzetéből és kisebb arányban a kiülőfák alól gyűjtött vedlett tollak által (Jakab, 2017). A tollak gyűjtése az évenkénti fiókgagyűrűzések alkalmával júniusban, valamint a vedlési időszakban júliustól szeptemberig zajlik a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület Parlagisas-védelmi Munkacsoportja és az illetékes nemzeti parkok közreműködésével. A fiókákat a gyűrűzésükkor tépett hónaljtollaikból izolált DNS alapján genotipizáljuk. A vedlett tollakat zárható zacskókban, sötét, száraz helyen (Vili *et al.*, 2013), a fiókatollakat alkoholos csövekben, -20°C-os mélyhűtőben tároljuk a DNS megőrzése érdekében. A DNS izolálását a vedlett tollak esetében a cséve felső köldök részén található vérrögből (Horváth *et al.*, 2005), a fiókatollak esetén a csévében lévő vérből és kötőszövetből végeztük kereskedelmi kitek segítségével. A molekuláris ivarhatározást F2250/R2787 (Fridolfsson és Ellegren, 1999), illetve i16F/i16R (Suh *et al.*, 2011) primerekkel végeztük. Az egyedek DNS-profilját kilenc mikroszatellita lokusz (Aa02, Aa35, Aa36, Aa39, Aa43, IEAAAG09, IEAAAG11, Hal04, Hal10) (Martínez-Cruz *et al.*, 2002; Busch *et al.*, 2005; Hailer *et al.*, 2005) alapján készítettük el (BSc szakdolgozat: Zsinka, 2018).

4.2 A vizsgálatba bevont egyedek kiválasztása

Ebben a munkában a már korábban azonosított egyedek DNS-profilját használtuk fel. Kérdésünk megválaszolásához olyan költő egyedek rokonságát igyekeztünk vizsgálni, amelyeknek lehetőségük adódhatott egymással párt alkotni. Ehhez térbeli és időbeli szempontokat is figyelembe vettünk. A térbeli szempontból vett elérhetőséget a populáció genetikai struktúrája alapján határoztuk meg. Korábbi eredmények alapján a parlagi sasnak öt genetikailag elkülönülő kládja fordul elő a Kárpát-medencében (Szabó Krisztián, személyes közlés), melyek közül a kelet-magyarországi klád rendelkezik a legnagyobb egyedszámmal, így

ezen a területen fészkelő madarak közül kerültek ki a vizsgált egyedek. A mintavételi időablakot a parlagi sas hosszú élettartamát és hosszú időre történő párválasztását, valamint a rendelkezésre álló minták számát alapul véve választottuk meg. Olyan adult költő egyedeket vizsgáltunk, amelyek a 2010-2018-as időszakban költöttek, és 2010 előttről nem voltak ismertek. Továbbá csak olyan költőpárok rokonságát vizsgáltuk, amelyek tagjai ténylegesen szaporodtak is egymással, tehát minden pártól rendelkezésünkre állt legalább egy olyan fióka, amely genotípusa alapján lehetett a költőpár fiókája.

Mindezen szempontokat figyelembe véve a rokonelkerülés kérdésének megválaszolásához összesen 30 db, 2010 és 2018 között biztosan költő, a kelet-magyarországi területen fészkelő adult párt vizsgáltunk.

A rokonságbecsléshez és a módszerek teszteléséhez szükséges populációs allélgyakoriságot egy csak kelet-magyarországi területen költő egyedekből álló referenciapopuláció alapján határoztuk meg, amely a fentebb említett 30 pár madár mellett további 42 hím és 54 tojót foglalt magában (n=156).

A rokonságbecslő módszerek teszteléséhez a valós populációból is vettünk ismert rokonsági fokú egyedpárokat. Ezeket a referenciapopuláció 77 tojója és 61 hímje, és a hozzájuk tartozó 128 fióka alkotta. Összesen 231 szülő-utód és 42 édestestvér egyedpár rokonságát tudtuk vizsgálni.

4.2 Markerkészlet és új lokuszok tesztelése

A vizsgálatokat az egyedek jelenleg használt kilenc mikroszatellita markerre meghatározott genotípusain végeztük, melyeket parlagi sasban (IEAAAG09, IEAAAG11) (Busch *et al.*, 2005), ibériai sasban (Aa02, Aa35, Aa36, Aa39, Aa43) (Martínez-Cruz *et al.*, 2002), és rétisasban (Hal04, Hal10) (Hailer *et al.*, 2005) írtak le. A markerek erejének (PI, PI_{SIB}, P1X, P2X) megállapítására a Microsoft Excel szoftverhez készített GenAlEx 6.502 makrót használtuk (Peakall and Smouse, 2012). A PI (Probability of Identity) annak a valószínűsége, hogy a populációból véletlenszerűen kiválasztott két különböző egyed genotípusa megegyezik, a PI_{SIB} ennek az értéknek a populációban előforduló lehetséges testvérek figyelembe vételével korrigált változata. Annak vizsgálatát, hogy a fiókák lehetnek-e a fészeknél megmintázott költő egyedek utódai a genotípusok manuális ellenőrzésével végeztük. A módszer megbízhatóságának felmérése

érdekében kizárási valószínűségeket is számoltunk a markerkészletre: ez az a valószínűség, amellyel kizárható az az egyed, amely nem lehet a fióka szülője akkor, ha mindkettő (P1X), illetve ha csak egy szülő (P2X) genotípusát ismerjük (Jones és Ardren, 2003).

A nullallélek olyan allélek, amelyek a PCR-reakció során nem amplifikálódnak a primer kötőhelyén bekövetkezett mutáció miatt, illetve rossz minőségű vagy kis mennyiségű DNS templátból kifolyólag. Ennek következtében az eredetileg heterozigóta egyedet tévesen homozigótának genotipizáljuk. A nullallélek torzíthatják a rokonság becslését (Dakin és Avise, 2004), így ezek jelenlétére is teszteltük az egyes lokuszokat ML-Relate szoftverben (Kalinowski et al., 2006). Amennyiben a tesztek eredménye nullallél jelenlétére utalt, úgy a nullallélek jelenlétével korrigált allélgyakoriságokat használtuk a későbbi elemzések során és módosítottuk a genotípusokat az adott lokuszra. Mivel a nullallél jelenléte miatt a homozigóta egyedekről nem tudjuk biztosan, hogy ténylegesen homozigóták vagy nullallélt hordozó heterozigóták, ezért az adott lokuszra homozigóta egyedek esetében (szimulált és valós egyedek egyaránt) csak egy allélt vettünk figyelembe a rokonságbecslések során, a másikat hiányzónak jelöltük.

Célunk a későbbiekben kibővíteni a jelenleg használt markerkészletünket, hogy az egyedeket még nagyobb biztonsággal azonosíthassuk és rokonságukat nagyobb pontossággal becsülhessük. Ennek érdekében teszteltünk hét új dinukleotid és egy új tetranukleotid (Aa41) mikroszatellita lokuszt (1. táblázat). Ezek közül hármat ibériai sasban írtak le, és parlagi sas egyedeken is teszteltek (Aa41, Aa49, Aa53) (Martínez-Cruz *et al.*, 2002), öt pedig rétisasban került leírásra (Hal01, Hal03, Hal09, Hal13, Hal14) (Hailer *et al.*, 2005). Első körben tíz független, azaz a kelet-magyarországi terület különböző pontjain fészkelő, elsőfokú rokoni kapcsolatban nem álló, az eddigi lokuszokon változatos alléleket hordozó egyedet genotipizáltunk, hogy felmérjük variabilitásukat. A lokuszok tesztelése szimplex PCR-rel történt, a következő reakcióelegyet alkalmazva: 0,065 µl DreamTaq polimeráz (Fermentas), 1,7 µl 10X DreamTaq Green puffer (Fermentas), 0,65 µl 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 0,65 µl 2 mM dNTP mix (Thermo Scientific), 1-1 µl 10 pmol/µl-es forward és reverz primer, 10 µl víz és 2 µl kb. 50 ng/µl koncentrációjú DNS. Az amplifikációhoz a primerek leírásakor publikált PCR programokat alkalmaztuk. Az Aa41, Aa49 és Aa53 lokuszok esetében touchdown programot használtunk a minél specifikusabb termékek keletkezése érdekében, melynek során az annellációs hőmérsékletet a kezdeti 66°C-ról ciklusonként 1°C-kal csökkentettük 50°C-ig. A többi lokusz esetében az annellációs hőmérséklet minden ciklusban a Hal03 esetében 57°C, a Hal01 és Hal14

esetében 60°C, a Hal09 és Hal13 esetében 64°C fok volt. (Részletes PCR programok: Mellékletek 1-4. táblázat).

A polimorf lokuszokra a referenciapopuláció további 49 költő egyedét sikerült genotipizálni, így képet kaptunk az új lokuszok populációs allélgyakoriságairól is. Az allélméret meghatározása kapilláris-elektroforézis útján történt a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában (ABI 3130 típusú szekvenátor, GS500LIZ standard). Az allélhosszak leolvasását Peak Scanner (Applied Biosystems) szoftverrel végeztük.

Az egyes lokuszok eltérő allélszámuk és allélgyakoriság-eloszlásuk miatt eltérő információtartalommal bírnak az egyes rokonságbecslő módszerek számára. Annak érdekében, hogy képet kaphassunk az új, polimorf lokuszok hasznosságáról, a KinInfor szoftverben (Wang, 2006) megvizsgáltuk a teljes markerkészlet lokuszainak információtartalmuk alapján meghatározott fontossági sorrendjét.

1. táblázat: Tesztelésre kiválasztott új mikroszatellita lokuszok és publikált allélszámaik.

lokusz publikált allélszám	ibériai sasban leírt			rétisasban leírt				
	Aa41	Aa49	Aa53	Hal01	Hal03	Hal09	Hal13	Hal14
	3	5	5	7	3	7	6	8

4.3 Rokonságbecslő módszerek tesztelése

A rokonságbecslő módszerek tesztelését biztosan ismert rokonsági fokú (szülő-utód, édestestvér, féltestvér és nem rokon) egyedpárokon végeztük el, valós és szimulált adatokon egyaránt.

Háromféle megközelítést alkalmaztunk, melyek során az ismert rokonsági fokú egyedpárok három különböző populációból kerültek ki: (i) virtuális szülők és az ezekhez generált virtuális utódok, (ii) valós költő egyedek véletlenszerűen párba állítva és az ezekhez a párokhoz generált virtuális utódok, (iii) valós költőpárok és valós utódaik alkotta populáció.

(i) A virtuális populáció elkészítéséhez a referenciapopulációból számolt, nullallélek jelenlétére korrigált populációs allélgyakoriságokat használtuk fel. A valós fiókák összesen 77 tojóhoz és 61 hímhez tartoztak, így 77 tojó és 61 hím kilenc lokuszos diploid genotípust generáltunk, melynek során az egyes lokuszokhoz tartozó alléleket a populációs gyakoriságukkal

egyező valószínűséggel választottuk. A módszerből eredően így biztosan nem rokon virtuális szülőket állítottunk elő. A szülőket maradéktalanul párbaállítva mindegyik szülőpárhoz generáltunk a mendeli szabályok alapján öt közös utódot, amelyek így édestestvéri kapcsolatban álltak. Féltestvérek létrehozásához minden tojóhoz véletlenszerűen választottunk egy, az eredeti párjával nem egyező hím, és az így létrejött új párhoz is generáltunk két közös utódot a mendeli szabályok szerint. Ezek lettek az eredeti párok közös utódainak anyai ágú féltestvérei. Ugyanezt elvégeztük minden pár hím tagjával is, így az eredeti párok közös utódainak apai ágú féltestvéreit kaptuk. Az így létrehozott populációból véletlenszerűen választottunk 300 – 300 szülő-utód, édestestvér, féltestvér és nem rokon egyedpárt.

(ii) A második megközelítés során az ismert rokonsági fokú párok a valós költő egyedek véletlenszerű párbaállításával és az ezekhez generált utódokból kerültek ki. A referenciapopuláció 84 hímjét és 72 tojóját véletlenszerűen párba állítottuk és a fent ismertetett módon minden pár esetén generáltunk öt közös utódot, két anyai ágú és két apai ágú féltestvért. Az így létrehozott populációból véletlenszerűen választottunk 300 – 300 szülő-utód, édestestvér és féltestvér egyedpárt. Mivel a valós szülők rokonságát nem ismertük, ebben az esetben nem tudunk biztosan nem rokon egyedpárokat alkotni.

(iii) A harmadik esetben a valós költő egyedek és valós fiókáik rokonságát vizsgáltuk. Összesen 231 szülő-utód és 42 édestestvér egyedpár állt rendelkezésünkre. Ebben az esetben a féltestvéri kapcsolatban álló egyedek rokonságát a kis mintaelemszám (három egyedpár) miatt nem vizsgáltuk, továbbá a valós szülők közötti rokonság biztos ismeretének hiányában itt sem tudunk nem rokon egyedpárokat vizsgálni.

A fenti három megközelítés esetében különbözik az egyedek háttérrokonsága: a teljesen virtuális populációban a módszerből eredően a szülőpopuláció egyedei biztosan nem rokon egyedek, míg a második és a harmadik populáció esetében nem ismerjük a szülők rokoni viszonyát és beltenyésztés is előfordulhat. Az első és a második megközelítés lehetővé teszi tetszőleges számú ismert rokonsági fokú egyedpár létrehozását, így a mintaelemszám átlagos rokonságra gyakorolt hatásáról is információt kaphatunk.

A vizsgálatunkban hat rokonságbecslő módszert teszteltünk: a momentum-alapú módszerek közül a Lynch-Ritland (Lynch and Ritland, 1999), Queller-Goodnight (Queller és Goodnight, 1989) és a Wang (Wang, 2002) módszert, valamint három likelihood módszert: a diadikus (Milligan, 2003), triadikus (Wang, 2007) és ML-Relate (Wagner *et al.*, 2006) módszereket. Az

utóbbi módszerrel történő becslést ML-Relate szoftverben (Kalinowski *et al.*, 2006), a többi R 3.5.2. statisztikai szoftverben (R Core Team, 2018) végeztük a „related” csomag (Pew *et al.*, 2015) segítségével. A triadikus likelihood módszer számára adott számú referencia egyedre is szükség van a becsléshez, ez minden esetben az alapértelmezett 100 volt.

A rokonságbecslő módszerek teljesítményét több szempontból értékeltük.

1) Megvizsgáltuk az egyes módszerek által az ismert rokonsági fokú párokra adott rokonságbecslések eloszlását: torzított becsléseket adnak-e az egyes módszerek az elméleti értékekhez képest, illetve mekkora a becslések szórása.

2) Számoltunk Pearson-korrelációt az ismert rokonsági fokú egyedpárok elméleti és az egyes módszerek által becsült rokonságértékei között. Ebben a megközelítésben az a módszer számít a legjobbnak, amely esetében a korrelációs koefficiens értéke a legnagyobb.

3) A becsült értékek elméleti rokonságértékektől való eltérését a RMSE (root mean squared error) értékkel vizsgáltuk az egyes módszerekre, melyet a következő képlet alapján számoltunk:

$$RMSE = \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) \sum_{i=1}^n (\hat{r}_i - r_i)^2}$$
, ahol \hat{r}_i és r_i az i -ik egyedpár becsült és elméleti rokonságértéke, n pedig az egyedpárok száma (Bink *et al.*, 2008). Ebben az esetben az a módszer számít a legjobbnak, amely esetében az RMSE érték a legkisebb.

A rokonelkerülés vizsgálatához szükséges rokonságbecsléseket a tesztek eredményei alapján legjobbnak ítélt módszerrel végeztük el.

4.4 Rokonelkerülés vizsgálata

A rokonelkerülés vizsgálatát Monte-Carlo szimulációval végeztük. Nullhipotézisünk a rokonelkerülés hiánya, azaz a rokonságra való tekintettel véletlenszerűen történő párba állás volt. Ennek megfelelően a következő nulleloszlást generáltuk: a tényleges költőpárok tojó egyedeihez véletlenszerűen hozzárendeltük a tényleges költőpárok hím egyedeit, összesen 10 000 különböző módon, és minden esetben vettük az így létrehozott párok átlagos rokonságát, azaz a páronkénti rokonságok átlagát. A teszt során a tényleges költőpárok átlagos rokonságát hasonlítottuk ehhez a nulleloszláshoz és kétoldali p -értéket számoltunk a következő módon: vettük a nulleloszlás megfigyelt átlagrokonsággal megegyező vagy annál extrémebb értékeinek arányát, majd ezt az arányt szoroztuk kettővel. Ha a megfigyelt átlagrokonság a nulleloszlás mediánjánál kisebb volt,

akkor a megfigyelt átlagrokonságnál kisebb értékeket tekintettük extrémebbnek, ellenkező esetben pedig az annál nagyobb értékeket.

A szimulációkat és a dolgozatban szereplő ábrákat R 3.5.2 szoftverben (R Core Team, 2018) készítettük.

5. Eredmények

5.1 Markerkészlet és új lokuszok tesztelése

A használt kilenc lokuszos markerkészlet esetén a PI-érték $7,5 \times 10^{-9}$, a PI_{SIB} -érték $5,4 \times 10^{-4}$ volt. A kizárási valószínűség értéke két szülő ismeretében (P1X) 0,998, egy szülő ismeretében (P2X) 0,966 volt. ML-Relate szoftverben futtatott teszt nullallélre utaló eredményt talált az Aa36-os lokusz esetében (p-érték $< 0,007$). Ezt empirikus bizonyítékok is alátámasztják: 15 valószínű szülő-utód pár esetében a fióka csak erre a lokuszra nem passzolt a biztos szülőhöz, amennyiben legalább egyikük homozigóta volt erre a lokuszra. A minél kisebb mértékű információvesztés érdekében a lokuszt nem hagytuk ki az elemzésből, helyette a következő korrekciókat végeztük el: a nullallél jelenlétére korrigált allélgyakoriságokat használtuk az elemzések során, továbbá hogy kiszűrjük a hamis homozigótákat, az erre a lokuszra homozigóta egyedek esetében csak az egyik allélt vettük figyelembe, a másikat hiányzó értéknek jelöltük. A lokuszok allélszáma 4 – 10 közötti, átlagosan 6,1 volt, az allélgyakoriságok 0,003 – 0,676-ig terjedtek. (Mellékletek 5. táblázat)

A nyolc új lokusz közül öt bizonyult polimorfnak: a három ibériai sasban leírt (Aa41, Aa49, Aa53) és két rétisasban leírt (Hal09, Hal13) lokusz. Az Aa49-es lokusz kivételével további egyedek genotipizálását is elvégeztük a polimorfnak bizonyuló új lokuszokra. A genotipizált 59 felnőtt egyed alapján az új lokuszok allélszáma 2 – 5, átlagosan 3,4 volt, az allélgyakoriságok 0,017 – 0,698-ig terjedtek (2ab. táblázat).

2a. táblázat: Az új mikroszatellita lokuszok tesztelésének eredménye.

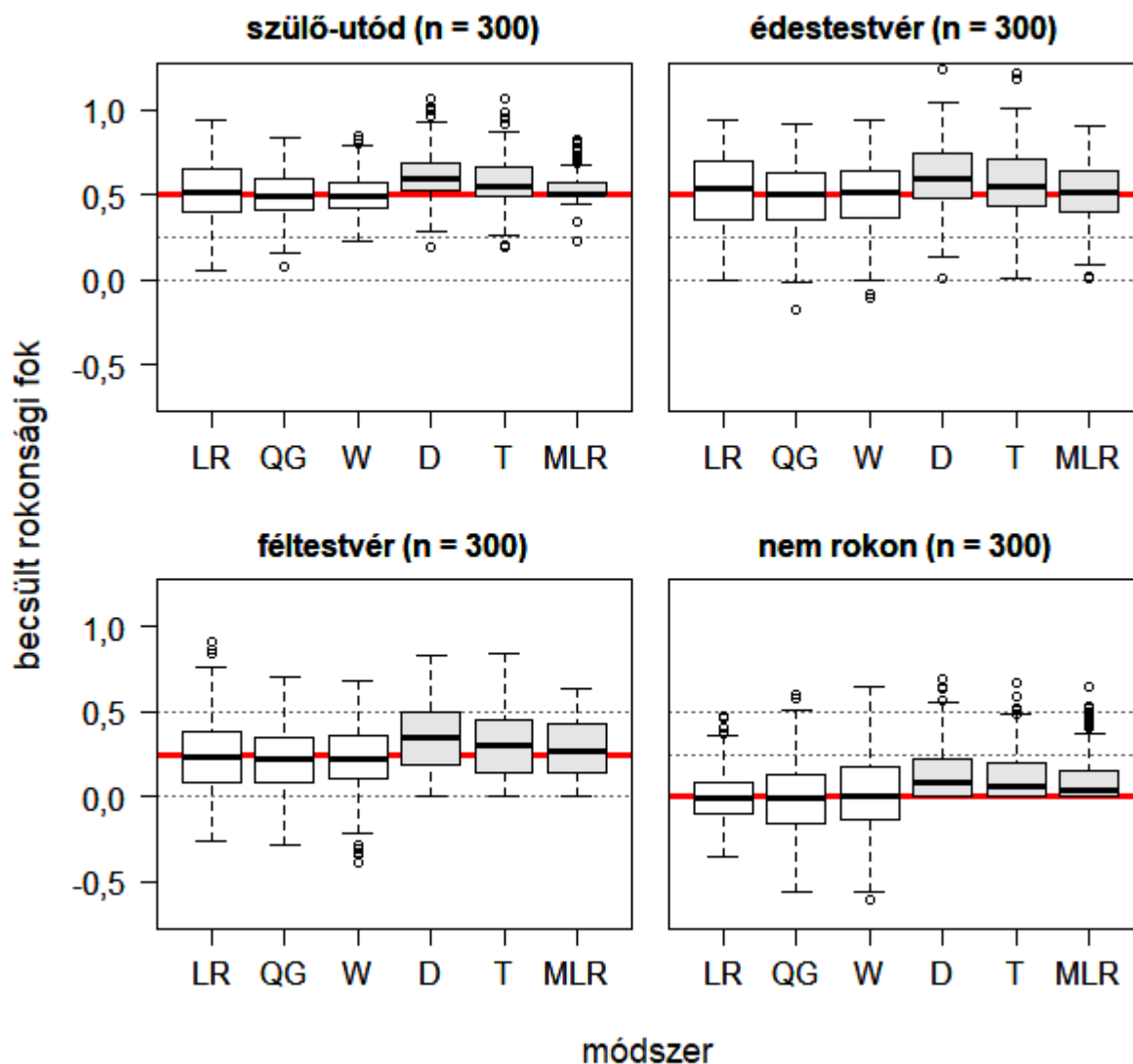
lokusz	ibériai sasban leírt			rétisasban leírt				
	Aa41	Aa49	Aa53	Hal01	Hal03	Hal09	Hal13	Hal14
publikált allélszám	3	5	5	7	3	7	6	8
teszt allélszám (10 minta)	3	4	4	1	1	2	3	1
allélszám (59 minta)	3	--	5	--	--	2	3	--

2b. táblázat: Az új mikroszatellita lokuszok allélgyakoriságai

Aa41		Aa49		Aa53		Hal09		Hal13	
allél	frekvencia	allél	frekvencia	allél	frekvencia	allél	frekvencia	allél	frekvencia
152	0,698	151	--	127	0,263	130	0,652	155	0,542
156	0,216	153	--	129	0,483	132	0,348	157	0,441
160	0,086	155	--	131	0,076			159	0,017
		159	--	133	0,119				
		--	--	135	0,059				

5.2 Rokonságbecslő módszerek tesztelése

(i) Virtuális szülők és virtuális utódok populációja:



1. ábra: Rokonságbecslő módszerek tesztelése a virtuális költők és virtuális utódok populációján: a boxplotok az ismert rokonsági fokú egyedpárokra kapott becslések eloszlását mutatják a különböző módszerek esetében. LR: Lynch-Ritland, QG: Queller-Goodnight, W: Wang, D: Diadikus likelihood, T: Triadikus likelihood, MLR: ML-Relate. Szürkével jelölve a likelihood módszerek. Piros vonal: elméleti érték.

A módszerek eltérően teljesítettek az egyes rokoni kapcsolatok esetében (1. ábra, 3 – 4. táblázat). A szülő-utód és édestestvér egyedpárok esetén a Queller-Goodnight és a Wang módszer által, a féltestvér és nem rokon kapcsolatok esetén a Lynch-Ritland módszer által becsült rokonságok átlaga volt legközelebb az adott rokoni kapcsolat elméleti átlagához. A likelihood módszerek minden rokoni kapcsolat esetében torzított becsléseket adtak: a becslések átlaga az elméleti átlagnál nagyobb volt. Ez a torzítás az ML-Relate módszer esetében volt a legkisebb (3. táblázat).

A becslések szórása egy módszert kivéve (Lynch-Ritland) a szülő-utód kapcsolat esetén volt a legkisebb. A Lynch-Ritland módszer esetében a nem rokon egyedpárokra adott becsléseknek volt a legkisebb a szórása. Minden rokoni kapcsolat esetében az ML-Relate módszer által kapott becsléseknek volt a legkisebb szórása (3. táblázat).

3. táblázat: Rokonságbecslő módszerek tesztelésének eredménye a virtuális szülők és virtuális utódok populációján: becslések átlaga és szórása. A rokoni kapcsolat megnevezése után zárójelben az adott kapcsolat elméleti átlagrokonsága szerepel. Félkövérrrel jelölve az adott rokoni kapcsolat esetében a becslések átlagát és szórását is figyelembevéve a legjobban teljesítő módszer eredményei.

módszer		szülő-utód (0,5) átlag (\pm SD)	édestestvér (0,5) átlag (\pm SD)	féltestvér (0,25) átlag (\pm SD)	nem rokon (0,00) átlag (\pm SD)
LR:	Lynch-Ritland	0,52 (\pm 0,18)	0,51 (\pm 0,22)	0,25 (\pm0,22)	0,00 (\pm0,15)
QG:	Queller-Goodnight	0,49 (\pm 0,13)	0,49 (\pm0,20)	0,20 (\pm 0,20)	0,00 (\pm 0,21)
W:	Wang	0,51 (\pm0,11)	0,49 (\pm0,20)	0,21 (\pm 0,20)	0,02 (\pm 0,22)
D:	Diadikus likelihood	0,62 (\pm 0,13)	0,60 (\pm 0,21)	0,35 (\pm 0,20)	0,14 (\pm 0,16)
T:	Triadikus likelihood	0,57 (\pm 0,13)	0,56 (\pm 0,20)	0,30 (\pm 0,19)	0,12 (\pm 0,14)
MLR:	ML-Relate	0,55 (\pm 0,07)	0,51 (\pm 0,18)	0,27 (\pm 0,18)	0,10 (\pm 0,14)

A Pearson-korreláció értéke az összes rokon kapcsolatot figyelembevéve módszertől függően 0,733 – 0,773 volt. Csak a szülő-utód, édestestvér és féltestvér kapcsolatokat figyelembe véve (táblázatban: „csak rokon”) 0,521 – 0,629 közé eső értékeket kaptunk. A korreláció mindkét esetben az ML-Relate módszer esetében volt a legnagyobb (4. táblázat).

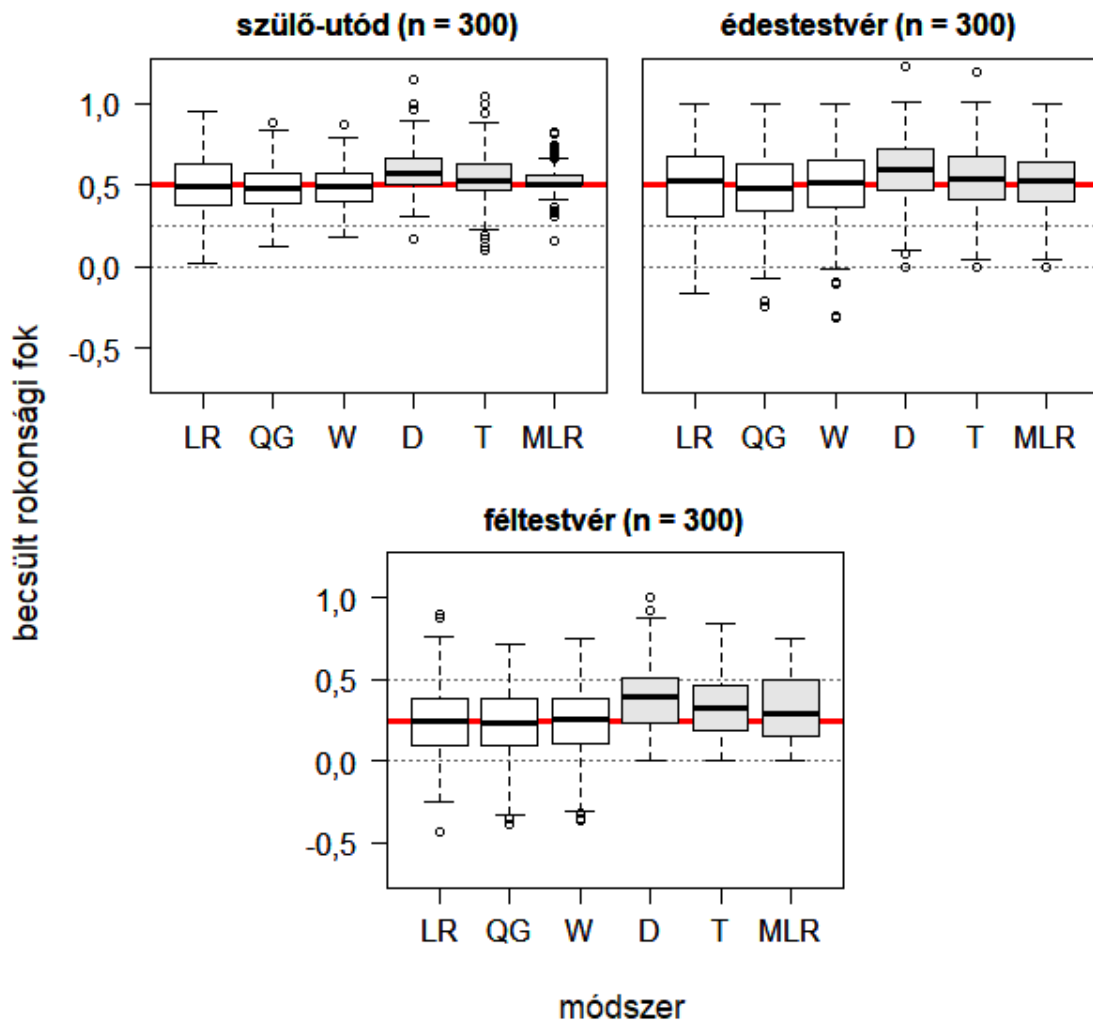
Az becslések pontosságát és precizitását is magába foglaló RMSE érték az összes rokon kapcsolatra számolva, illetve csak a szülő-utód, édestestvér és féltestvér kapcsolatokra (táblázatban: „csak rokon”) az ML-Relate, csak a nem rokon kapcsolatra kapott becsléseket figyelembe véve a Lynch-Ritland módszer esetén volt a legkisebb (4. táblázat).

4. táblázat: Rokonságbecslő módszerek tesztelésének eredménye a virtuális szülők és virtuális utódok populációján: Pearson-korreláció és RMSE (root mean squared error).

Összes: szülő-utód, édestestvér, féltestvér, nem rokon kapcsolatokra adott becslésekre számolva.
Csak rokon: szülő-utód, édestestvér, féltestvér kapcsolatokra adott becslésekre számolva.
Félkövérrrel jelölve az adott kategóriában legjobban teljesítő (korreláció: legnagyobb érték, RMSE: legkisebb érték) módszer eredményei.

módszer	Pearson-korreláció		RMSE		
	összes	csak rokon	összes	csak rokon	nem rokon
LR: Lynch-Ritland	0,739	0,521	0,196	0,209	0,150
QG: Queller-Goodnight	0,739	0,594	0,191	0,184	0,208
W: Wang	0,733	0,606	0,190	0,178	0,221
D: Diadikus likelihood	0,744	0,570	0,211	0,209	0,216
T: Triadikus likelihood	0,748	0,581	0,185	0,187	0,181
MLR: ML-Relate	0,773	0,629	0,158	0,152	0,173

(ii) Véletlenszerűen párba állított valós költők és az ezekhez generált virtuális utódok populációja:



2. ábra: Rokonságbecslő módszerek tesztelése a véletlenszerűen párba állított költők és az ezekhez generált virtuális utódok populációján: a boxplotok az ismert rokonsági fokú egyedpárokra kapott becslések eloszlását mutatják a különböző módszerek esetében. LR: Lynch-Ritland, QG: Queller-Goodnight, W: Wang, D: Diadikus likelihood, T: Triadikus likelihood, MLR: ML-Relate. Szürkével jelölve a likelihood módszerek. Piros vonal: elméleti érték. Biztosan nem rokon egyedpárok ebben az esetben nem álltak rendelkezésre.

Mivel a valós költő egyedek rokonságát nem ismerjük, ezért biztosan nem rokon egyedpárokat nem lehetett alkotni ebben az esetben.

Az előző esethez hasonlóan a módszerek itt is eltérően teljesítettek az egyes rokoni kapcsolatok esetében (2. ábra, 5 –6. táblázat). A szülő-utód és féltestvér egyedpárok esetében a Lynch-Ritland, az édestestvér egyedpárok esetében a Wang módszer által becsült rokonságok átlaga volt legközelebb az adott rokoni kapcsolat elméleti átlagértékéhez. A likelihood módszerek itt is torzított becsléseket adtak minden rokoni kapcsolat esetében: a becslések átlaga az elméleti átlagnál nagyobb volt. Ez a torzítás itt is az ML-Relate módszer esetében volt a legkisebb (5. táblázat).

A becslések szórása minden módszer esetében a szülő-utód kapcsolatra volt a legkisebb. Minden rokoni kapcsolat esetében itt is az ML-Relate módszer által kapott becsléseknek volt a legkisebb szórása (5. táblázat).

5. táblázat: Rokonságbecslő módszerek tesztelésének eredménye a véletlenszerűen párba állított költők és az ezekhez generált virtuális utódok populációján: becslések átlaga és szórása. A rokoni kapcsolat megnevezése után zárójelben az adott kapcsolat elméleti átlagrokonsága szerepel. Félkövérrel jelölve az adott rokoni kapcsolat esetében a becslések átlagát és szórását is figyelembevéve a legjobban teljesítő módszer eredményei. Biztosan nem rokon egyedpárok ebben az esetben nem álltak rendelkezésre.

módszer	szülő-utód (0,5) átlag (\pm SD)	édestestvér (0,5) átlag (\pm SD)	féltestvér (0,25) átlag (\pm SD)	nem rokon (0,00) átlag (\pm SD)
LR: Lynch-Ritland	0,50 (\pm0,19)	0,49 (\pm 0,24)	0,25 (\pm0,22)	--
QG: Queller-Goodnight	0,47 (\pm 0,14)	0,48 (\pm 0,21)	0,23 (\pm 0,21)	--
W: Wang	0,49 (\pm 0,13)	0,50 (\pm0,22)	0,24 (\pm 0,21)	--
D: Diadikus likelihood	0,60 (\pm 0,13)	0,59 (\pm 0,22)	0,38 (\pm 0,20)	--
T: Triadikus likelihood	0,55 (\pm 0,15)	0,54 (\pm 0,22)	0,33 (\pm 0,19)	--
MLR: ML-Relate	0,54 (\pm 0,08)	0,51 (\pm 0,19)	0,30 (\pm 0,18)	--

A Pearson-korreláció eredményeként csak a szülő-utód, édestestvér és féltestvér kapcsolatokra (táblázatban: „csak rokon”) 0,478 – 0,549 közé eső értékeket kaptunk. A korreláció itt is az ML-Relate módszer esetében volt a legnagyobb (6. táblázat).

Az RMSE érték csak a szülő-utód, édestestvér és féltestvér kapcsolatokra számolva (táblázatban: „csak rokon”) itt is az ML-Relate módszer esetén volt a legkisebb (6. táblázat).

6. táblázat: Rokonságbecslő módszerek tesztelésének eredménye a véletlenszerűen párba állított valós költők és az ezekhez generált virtuális utódok populációján: Pearson-korreláció és RMSE (root mean squared error).

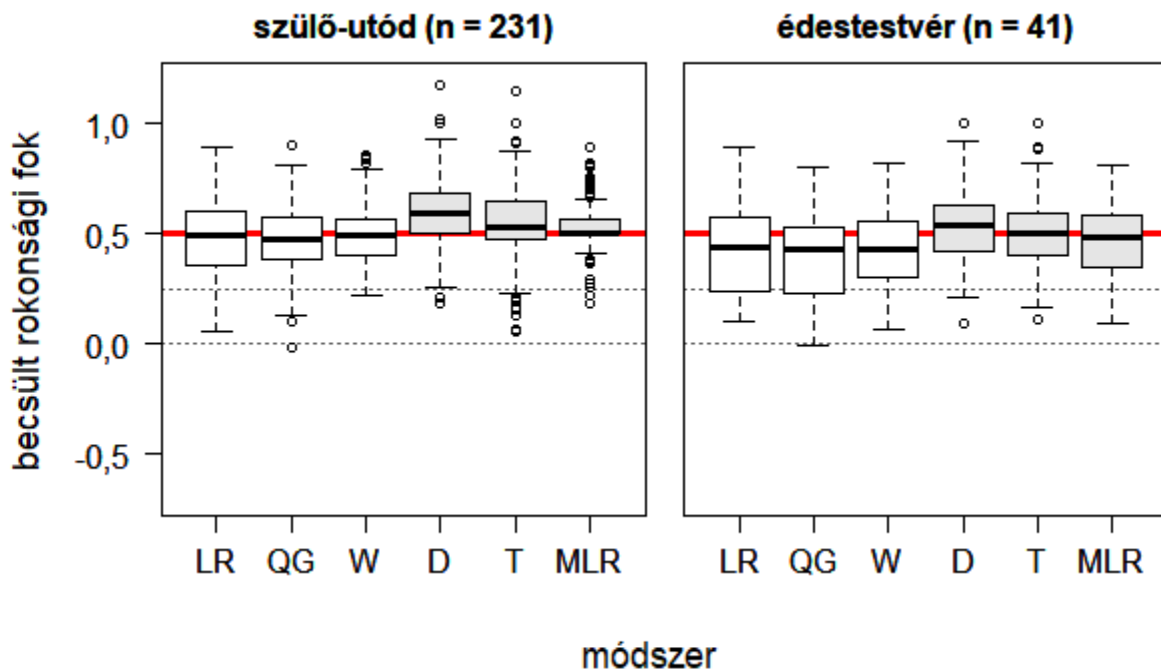
Csak rokon: szülő-utód, édestestvér, féltestvér kapcsolatokra adott becslésekre számolva.

Biztosan nem rokon egyedpárok ebben az esetben nem álltak rendelkezésre.

Félkövérrel jelölve az adott kategóriában legjobban teljesítő (korreláció: legnagyobb érték, RMSE: legkisebb érték) módszer eredményei.

módszer		Pearson-korreláció		RMSE		
		összes	csak rokon	összes	csak rokon	nem rokon
LR:	Lynch-Ritland	--	0,478	--	0,216	--
QG:	Queller-Goodnight	--	0,523	--	0,191	--
W:	Wang	--	0,529	--	0,190	--
D:	Diadikus likelihood	--	0,480	--	0,217	--
T:	Triadikus likelihood	--	0,478	--	0,194	--
MLR:	ML-Relate	--	0,549	--	0,164	--

(iii) Valós költő egyedek és valós utódaik populációja:



3. ábra: Rokonságbecslő módszerek tesztelése a valós költők és valós utódaik populációján: a boxplotok az ismert rokonsági fokú egyedpárokra kapott becslések eloszlását mutatják a különböző módszerek esetében. LR: Lynch-Ritland, QG: Queller-Goodnight, W: Wang, D: Diadikus likelihood, T: Triadikus likelihood, MLR: ML-Relate. Szürkével jelölve a likelihood módszerek. Piros vonal: elméleti érték. Biztosan nem rokon egyedpárok ebben az esetben nem álltak rendelkezésre, a féltestvérekre kapott becsléseket a kis mintaelemszám miatt nem kerülnek közlésre.

Mivel a valós költőpárok rokonságát nem ismerjük, ezért biztosan nem rokon egyedek itt sem álltak rendelkezésre, és a féltestvérek rokonsága a kis mintaelemszám (3 db) miatt nem kerül közlésre.

A szülő-utód egyedpárok esetében a Wang módszer által becsült rokonságok átlaga volt legközelebb az elméleti átlagértékhez. Az édestestvérek esetében a momentum-alapú módszerek negatív irányba torzítottak, becsléseik átlaga az elméleti értéknél kisebb volt, míg a likelihood módszerek az elméleti értékhez közelebbi átlagokat eredményeztek. Tekintettel arra, hogy a likelihood módszerek az előző két esetben mindig pozitív irányba torzítottak, itt valószínűleg az édestestvérek tényleges rokonsága átlagosan kisebb lehet 0,5-nél (3. ábra, 7. táblázat).

A becslések szórása minden módszer esetében a szülő-utód kapcsolat esetén volt kisebb. Mindkét rokoni kapcsolat esetében itt is az ML-Relate módszer által kapott becsléseknek volt a legkisebb a szórása (7. táblázat).

7. táblázat: Rokonságbecslő módszerek tesztelésének eredménye valós költők és valós utódaik populációján: becslések átlaga és szórása. A rokoni kapcsolat megnevezése után zárójelben az adott kapcsolat elméleti átlagrokonsága szerepel. Félkövérrrel jelölve az adott rokoni kapcsolat esetében a becslések átlagát és szórását is figyelembevéve a legjobban teljesítő módszer eredményei. Biztosan nem rokon egyedpárok ebben az esetben nem álltak rendelkezésre, a féltestvérekre kapott becsléseket a kis mintaelemszám miatt nem kerülnek közlésre.

módszer	szülő-utód (0,5) átlag (\pm SD)	édestestvér (0,5) átlag (\pm SD)	féltestvér (0,25) átlag (\pm SD)	nem rokon (0,00) átlag (\pm SD)
LR: Lynch-Ritland	0,48 (\pm 0,18)	0,42 (\pm 0,24)	--	--
QG: Queller-Goodnight	0,48 (\pm 0,15)	0,41 (\pm 0,21)	--	--
W: Wang	0,50 (\pm0,13)	0,44 (\pm 0,22)	--	--
D: Diadikus likelihood	0,61 (\pm 0,15)	0,55 (\pm 0,19)	--	--
T: Triadikus likelihood	0,56 (\pm 0,16)	0,52 (\pm0,20)	--	--
MLR: ML-Relate	0,54 (\pm 0,09)	0,47 (\pm 0,18)	--	--

A csak a szülő-utód, édestestvér és féltestvér kapcsolatokra számolt (táblázatban: „csak rokon”) RMSE érték itt is az ML-Relate módszer esetén volt a legkisebb (8. táblázat).

8. táblázat: Rokonságbecslő módszerek tesztelésének eredménye a valós költők és valós utódaik populációján: RMSE (root mean squared error). Pearson-korreláció számolása ebben az esetben nem volt lehetséges.

Csak rokon: szülő-utód, édestestvér, féltestvér kapcsolatokra adott becslésekre számolva.

Biztosan nem rokon egyedpárok ebben az esetben nem álltak rendelkezésre.

Félkövérrel jelölve a legjobban teljesítő (RMSE: legkisebb érték) módszer eredménye.

módszer	Pearson-korreláció		RMSE		
	összes	csak rokon	összes	csak rokon	nem rokon
LR: Lynch-Ritland	--	--	--	0,187	--
QG: Queller-Goodnight	--	--	--	0,161	--
W: Wang	--	--	--	0,138	--
D: Diadikus likelihood	--	--	--	0,190	--
T: Triadikus likelihood	--	--	--	0,175	--
MLR: ML-Relate	--	--	--	0,111	--

Összegezve:

A momentum-alapú módszerek az esetek többségében torzítatlan becsléseket adtak. A szülő-utód és édestestvér kapcsolatra a három populáció esetében más-más módszerek eredményeztek megbízhatóbb becsléseket. A féltestvér és nem rokon kapcsolatok esetében (amennyiben ezeket vizsgálni tudtuk), a Lynch-Ritland módszer teljesített a legjobban a becslések átlagát és szórását is figyelembevéve.

A likelihood módszerek pozitív irányba torzított becsléseket eredményeztek, ez a torzítás az ML-Relate módszer esetében volt a legkisebb. Az ML-Relate módszer becsléseinek volt a legkisebb a szórása minden esetben, és a Pearson-korreláció, illetve az RMSE-érték alapján is ez a módszer teljesített a legjobban minden rokoni kapcsolat esetében. Ez alól kivétel a nem rokon kategória, ahol a Lynch-Ritland módszer becsléseire kaptuk a legkisebb RMSE értéket.

A költőpárok rokonságára több módszerrel (Lynch-Ritland, Queller-Goodnight, Wang, ML-Relate) elvégeztünk egy előzetes becslést, amely alapján az egyedek nagyrésze nem vagy kis

mértékben rokon. Mivel a tesztek során a kevésbé rokon egyedpárok esetében a Lynch-Ritland módszer teljesített a legjobban, ezért a rokonelkerülés vizsgálatát ezzel a módszerrel végeztük.

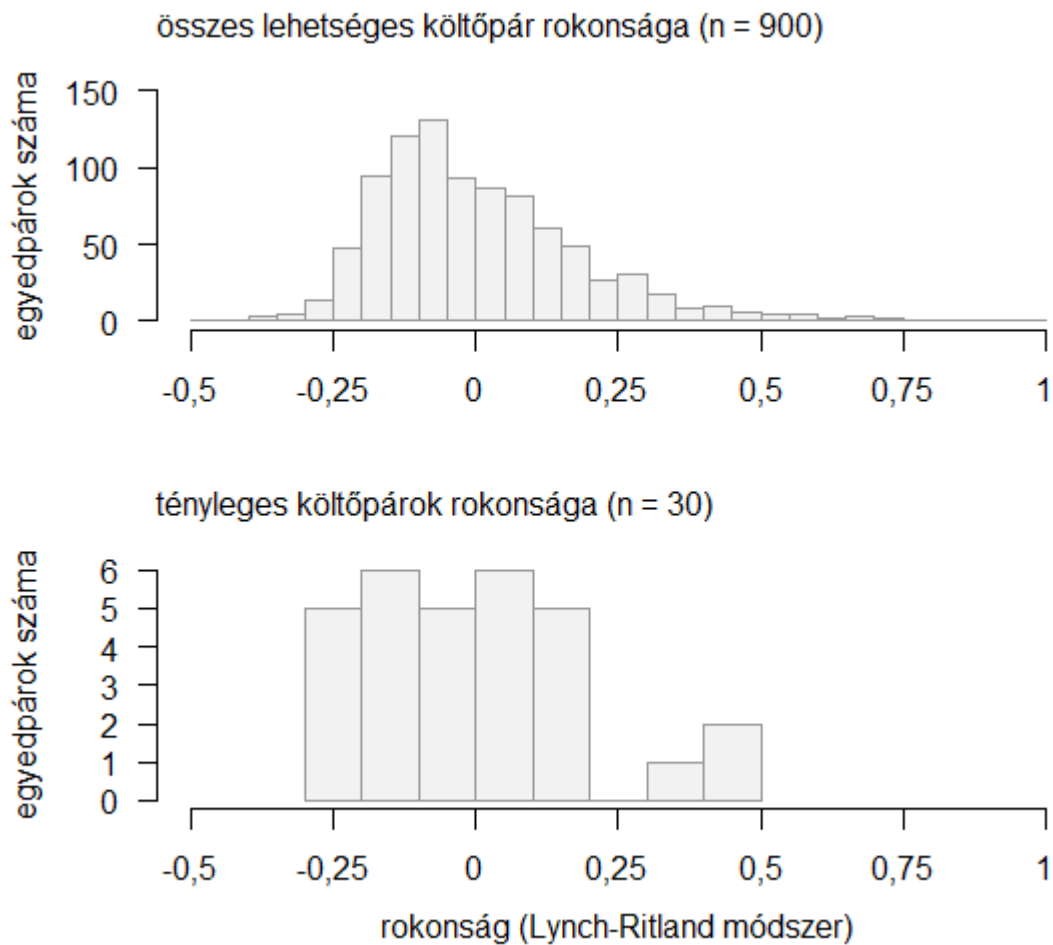
Azt is megvizsgáltuk a KinInfor szoftver segítségével (Wang, 2006), hogy a Lynch-Ritland módszer számára mely lokuszok bírnak a legnagyobb információtartalommal. Ezt a vizsgálatot a jelenleg is használt kilenc lokuszra, valamint az új, polimorf lokuszok közül arra a négyre tudtuk elvégezni, amelyek esetében számoltunk allélgyakoriságokat is 59 egyed genotípusa alapján (Aa41, Aa53, Hal09, Hal13). A legnagyobb információtartalommal a legnagyobb allélszámú Aa35 (tíz allél) lokusz rendelkezett, az új lokuszok közül a leghasznosabbnak pedig az Aa53-as lokusz bizonyult (9. táblázat).

9. táblázat: A lokuszok hasznossági sorrendje a Lynch-Ritland módszer számára (KinInfor szoftverben végzett teszt). Fehér: a jelenleg használt markerkészlet lokuszai. Lila: ibériai sasra leírt új polimorf lokuszok. Barna: rétisasra leírt új polimorf lokuszok.

Lynch-Ritland rangsor	Lokusz	Allélszám	Allélgyakoriság (min – max)
1	Aa35	10	0,003 – 0,312
2	Aa39	8	0,003 – 0,358
3	Aa36	6	0,006 – 0,302
4	Aa02	6	0,033 – 0,280
5	Hal04	5	0,095 – 0,443
6	G11	4	0,119 – 0,465
7	Aa53	5	0,059 – 0,483
8	G09	4	0,060 – 0,617
9	Aa43	7	0,007 – 0,681
10	Aa41	3	0,086 – 0,698
11	Hal10	5	0,010 – 0,507
12	Hal09	2	0,348 – 0,652
13	Hal13	3	0,017 – 0,542

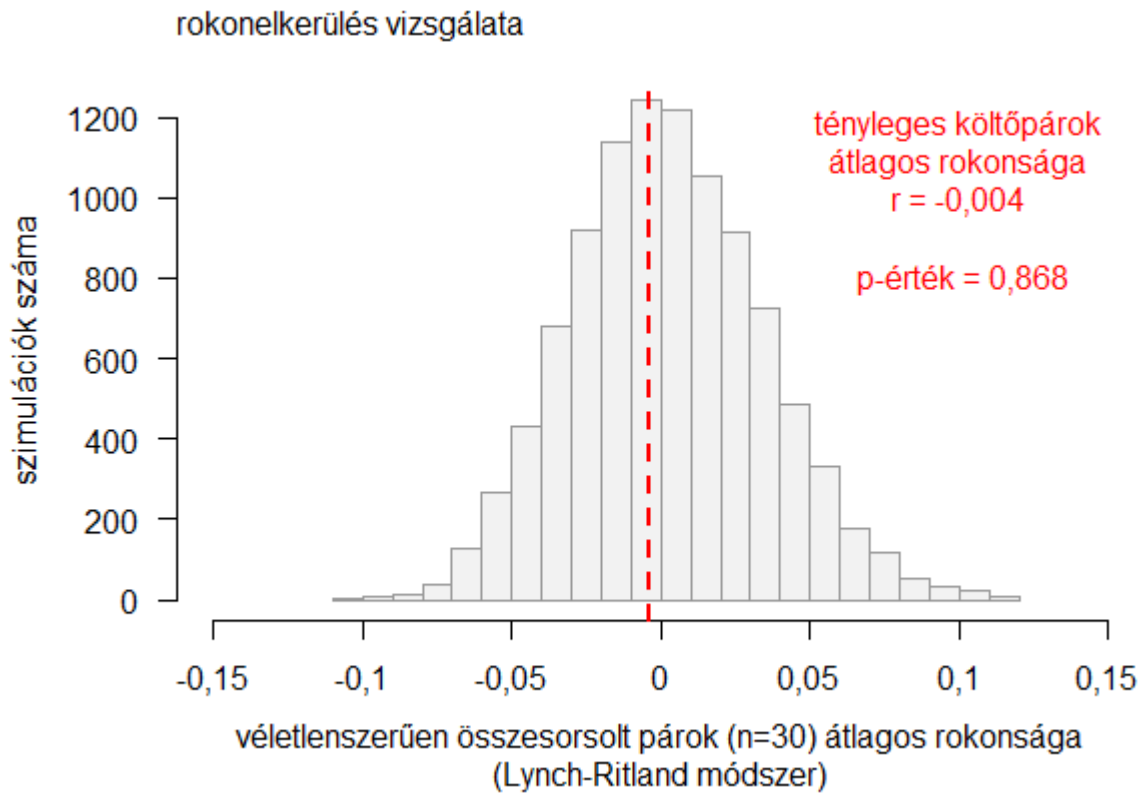
5.3 Rokonelkerülés vizsgálata

A Lynch-Ritland módszerrel becslve az összes lehetséges költőpár és a tényleges költőpárok rokonságára is egy jobbra ferde eloszlást kaptunk. Az összes lehetséges költőpár esetén a becült rokonságértékek $r = -0,5$ és 1 , a tényleges költőpárok esetében $r = -0,28$ és $0,47$ közé estek (4. ábra).



4. ábra: Az összes lehetséges költőpár és a tényleges költőpárok páronkénti rokonságának eloszlása a Lynch-Ritland módszerrel becslve.

A tényleges költőpárok átlagos rokonságát a Lynch-Ritland módszer $r=-0,004$ -nek becsülte, amely nem tér el szignifikánsan a véletlenszerűen összesorsolt párok átlagos rokonságától (p -érték = 0,868). Ennek alapján nem találtunk rokonelkerülés meglétére utaló bizonyítékot (5. ábra).



5. ábra: A rokonelkerülés vizsgálatára végzett Monte-Carlo szimuláción alapuló teszt eredménye. A páronkénti rokonságok becslése Lynch-Ritland módszerrel történt.

6. Diszkusszió

A beltenyésztés az egyedek csökkent fitnesséhez vezethet, így az evolúció során kialakultak különböző mechanizmusok a rokonokkal történő párosodás elkerülésére. Különösen érdekes kérdés lehet ez azoknál a fajoknál, amelyek hosszú időre választanak párt és extra pár fertilizáció nem vagy csak kis mértékben jellemző. Esetükben a rokon egyeddel történő párbaállás nagymértékben csökkentheti az egyedek fitnessét, amennyiben beltenyésztéses leromlás lép fel. Vizsgált fajunk, a parlagi sas is egy hosszú életű, hosszú időre párt választó, szociálisan és genetikailag is monogám, filopatikus ragadozó madár. Korábbi eredmények alapján a kárpát-medencei populáció genetikai variabilitása a pár évtizede lezajlott állománycsökkenés ellenére magas. Továbbá, a hazai populáció vizsgálata során kimutattak ivarfüggő kelési diszperziót is, amely szerepet játszhat a beltenyésztés elkerülésében. Mindezeket alapul véve feltételeztük a rokonelkerülés, azaz a rokonokkal történő párbaállás elkerülésére irányuló mechanizmus meglétét. Ezt a költőpárok mikroszatellita lokuszokra alapozott rokonságbecslésével vizsgáltuk.

A rokonelkerülés kérdésének megválaszolásához először teszteltük különböző rokonságbecslő módszerek teljesítményét. Erre azért volt szükség, mert nincs egy minden körülmények között legjobban teljesítő módszer, így fontos megvizsgálni, hogy az adott populáció és a használt markerkészlet esetében mely módszer adja a legmegbízhatóbb becsléseket. Korábbi tesztek során kimutatták, hogy a különböző rokonságbecslő módszerek teljesítménye függ többek között a használt lokuszok számától, az allélek számától és az allélgyakoriságok eloszlásától, a vizsgált rokoni kapcsolat típusától, a populáció rokonságösszetételétől és a demográfiai múltjától is (Bink *et al.*, 2008; Csilléry *et al.*, 2006; Milligan, 2003; Robinson *et al.*, 2013; Van de Castele *et al.*, 2001; Wang, 2014). A tesztekhez ismert rokonsági fokú egyedpárokat használtak, amelyeket vagy többgenerációs családfák alapján választottak (Bink *et al.*, 2008; Santure *et al.*, 2010), vagy az allélgyakoriságok felhasználásával szimuláltak (Milligan, 2003; Van de Castele *et al.*, 2001; Wang, 2014).

A jelen vizsgálatban a módszerek tesztelését egyrészt szimulált, másrészt valós, ismert rokoni kapcsolatban lévő egyedpárokon végeztük. Többgenerációs családfa a parlagi sasok esetében nem állt rendelkezésre, így a valós egyedpárok közül csak szülő-utód és édestestvér

kapcsolatban állókat vizsgáltunk. A monogámia miatt csak kevés féltestvér kapcsolatot volt lehetőségünk vizsgálni. Ezek olyan eseményekből származnak, amikor a pár egyik tagja elpusztult és a másik új párt választott.

A rokonságbecslő módszerek teljesítményét mértük a szórásukkal, torzítatlanságukkal, Pearson-korrelációval, illetve a precizitást és pontosságot egyszerre jellemző RMSE értékkel. Az irodalmi adatokkal összehangban az általunk végzett tesztek során sem volt olyan rokonságbecslő módszer, amely minden rokonsági kapcsolat és megközelítés esetén egyaránt a legjobban teljesített. A momentumokra alapozott módszerek becslései jelentős torzítást nem mutattak, ellentétben a likelihood módszerekkel, amelyek becsléseinek átlaga tendenciózusan nagyobb volt az elméleti értéknél. A likelihood módszerekre jellemző ez a fajta torzítás, mert becsléseik a $[0,1]$ tartományra korlátozóztak (Milligan, 2003). A torzítás valószínűleg csökkenthető lenne több lokusz bevonásával (Milligan, 2003). A módszerek eltérő módon teljesítettek a különböző rokoni kapcsolatok esetében. Míg a szülő-utód kapcsolatokat a becslése átlaga és szórása alapján a Wang módszer becsülte a legmegbízhatóbban, addig a nem rokon kapcsolatok esetében a Lynch-Ritland módszer teljesített a legjobban. Ez összehangban áll korábbi irodalmi adatokkal (Milligan, 2003; Wang, 2011). Pearson-korrelációt és RMSE értéket is számoltunk a különböző módszerek által adott becslések és az elméleti rokonságértékek között. A korreláció mértéke alapján minden esetben az ML-Relate módszer teljesített a legjobban, amely ténylegesen a legkisebb szórású becsléseket is adta az összes kategóriára. Az RMSE érték magába foglalja a becslések pontosságát és precizitását is. Ennél a legkisebb értékű módszer számít a legjobbnak, amely minden esetben az ML-Relate módszer volt, kivétel a nem rokon kategóriát, amely esetében a Lynch-Ritland módszer teljesített a legjobban. A legtöbb módszer a szülő-utód kapcsolatokra adta a legkisebb szórású becsléseket. Ezt magyarázza, hogy amennyiben a szülők nem rokonok, tehát nem hordoznak IBD alléleket, úgy a szülő-utód rokonság mindig pontosan $r=0,5$, ellenben a nagyobb varianciát mutató édestestvér vagy féltestvér rokoni kapcsolatokkal. A valós édestestvér párok esetében a momentum alapú módszerek az elméleti $r=0,5$ értékhez képest jellemzően kisebb becsléseket adtak. Ha feltételezzük, hogy a tényleges rokonságok valamilyen okból kisebbek voltak a várt $r=0,5$ -nél, akkor érthető, hogy a likelihood módszerek által becsült értékek átlaga ebben az esetben közel volt a várt értékhez, hiszen a többi tesztnél felfelé torzítottak. Mivel a mintaelemszám ebben az esetben kisebb volt ($n=41$), mint a többi teszt során ($n=300$), ezért feltételeztük, hogy kisebb becsült rokonság esetleg mintavételi hiba

következménye. Ennek ellenőrzésére 41 egyedpárból álló mintákat vettünk a virtuális édestestvérek közül, és megvizsgáltuk ezek becsült rokonságának az eloszlását, de ezekben az esetekben nem találtunk jelentős eltérést a várt értékhez képest (Mellékletek 1. ábra, 6-7. táblázat). Habár a mintavételi hiba így sem zárható ki teljesen, az eredmények alapján mégis úgy gondoljuk, hogy a valós édestestvérek rokonsága a vártnál kisebb lehet. Ennek megállapítására további vizsgálatok szükségesek.

A becslések szórásának csökkentése érdekében érdemes lenne további lokuszokat is bevonni az elemzésekbe. Ennek érdekében teszteltünk nyolc új mikroszatellita lokuszt, ezek közül hármat a legközelebbi rokon ibériai sasban (Aa41, Aa49, Aa53) (Martínez-Cruz *et al.*, 2002), ötöt rétisasban (Hal01, Hal03, Hal09, Hal13, Hal14) (Hailer *et al.*, 2005) írtak le. Előbbiek a hazai parlagi sas populáció esetében is polimorfnek bizonyultak és allélszámaik megegyeztek a publikált allélszámokkal. Ellenben a távolabbi rokon rétisásra leírt lokuszok közül mindössze kettő (Hal09, Hal13) volt polimorf, a rétisasban leírt allélszámoknál kevesebb alléllal. Kíváncsiak voltunk rá, hogy az új lokuszok mennyire lehetnek hasznosak a későbbi rokonságbecslés során. A lokuszok információtartalma allélszámuktól, illetve az allélgyakoriságok eloszlásától is függ. A különböző módszerek számára más-más tulajdonságú lokuszok bírhatnak nagyobb információtartalommal. KinInfor szoftver segítségével megvizsgáltuk, hogy a rokonelkerülés becslésére kiválasztott Lynch-Ritland módszer esetében mi a lokuszok fontossági sorrendje az információtartalmukra való tekintettel. Ezt a jelenleg is használt kilenc lokuszra, valamint az új polimorf lokuszok közül arra a négyre tudtuk elvégezni, melyekre allélgyakoriságokat is számoltunk 59 egyed genotípusa alapján (Aa41, Aa53, Hal09, Hal13). Az új lokuszok közül a leghasznosabbnak az Aa53-as lokusz bizonyult, amelyet a KinInfor a hetedik helyre sorolt, a Hal09 és Hal13 lokuszok pedig a legutolsók voltak a rangsorban. Az eredmények alapján a legnagyobb allélszámmal rendelkező lokusz (Aa35, tíz allél) bírt a legnagyobb információtartalommal. Azonban az azonos allélszámú lokuszok összevetéséből látható, hogy a rokonságbecsléshez hasznosabbak azok a lokuszok, amelyeken az allélgyakoriságok egyenletesebbek, mint amelyek esetében egy-két gyakoribb és több kis gyakoriságú allél fordul elő (lásd például G09-G11, 9. táblázat). Ezt a megfigyelést korábbi tesztek is alátámasztják (Milligan, 2003).

A rokonelkerülés vizsgálatát a legjobbnak ítélt Lynch-Ritland módszerrel végeztük. A Monte-Carlo szimuláció során a tényleges költőpárok átlagos rokonsága nem tért el szignifikánsan a véletlenszerű párosodást feltételezve kapott átlagrokonságoktól, ennek alapján tehát nem találtunk bizonyítékot a rokonelkerülés meglétére. Ezt a kérdést parlagi sasban eddig csak a kazahsztáni populációban vizsgálták az általunk is alkalmazott Monte-Carlo szimulációs megközelítéssel, és szintén nem találtak a rokonelkerülés meglétére bizonyítékot (Rudnick *et al.*, 2005).

Ennek számos oka lehet. Elképzelhető, hogy más fajokkal ellentétben ennél a fajnál a rokonokkal történő párosodás nem vezet jelentős beltenyésztéses leromláshoz, de a magyarországi populációban erről nincsenek adataink. A kazahsztáni populációban vizsgálták a beltenyésztés lehetséges hatását abból a szempontból, hogy a költőpárok közötti rokonság összefüggésben áll-e a fészekaljmérettel (Rudnick *et al.*, 2005). Eredményeik alapján nem volt összefüggés a rokonság és a fészekaljméret között, azonban ez nem jelenti azt, hogy a beltenyésztésnek nincs negatív hatása. Ahogy az több, madarakon végzett vizsgálatból is látszik, a beltenyésztéses leromlás eltérő mértékben befolyásolhatja a fitness egyes komponenseit (Keller és Waller, 2002). Így előfordulhat, hogy amíg a fészekaljméret és a párok rokonsága között nincs szoros összefüggés, addig esetleg a költési sikert, a kirepülési sikert vagy az utódok későbbi túlélését jelentősen befolyásolhatja a beltenyésztés. Ezzel kapcsolatos vizsgálatokat érdemes lenne elvégezni a hazai populáció esetében is.

Előfordulhat, hogy ha a populáció hosszú időn keresztül beltenyésztésnek van kitéve, akkor a káros recesszív alléleket hordozó egyedek kiszelektálódásával csökken a genetikai teher és a további beltenyésztés nem lesz jelentős hatással a fitnessre (Barrett és Charlesworth, 1991). Azonban modellekre alapozott vizsgálatok eredményei alapján ez a jelenség a természetes populációkban valószínűleg nem gyakori, mert csak szigorú genetikai és demográfiai körülmények esetében működik effektíven (Keller és Waller, 2002). Egy korábbi vizsgálat során magas genetikai variabilitást találtak a hazai populációban (Szabó Krisztián, személyes közlés) annak ellenére, hogy az 1970-es évekre az állomány jelentősen lecsökkent, mindössze 10-25 párra. Ugyanakkor, a kárpát-medencei populáció genetikai vizsgálata alapján a génáramlás is kismértékű a kárpát-medencei és a környező populációk között (Szabó Krisztián, személyes közlés). Ezek alapján is úgy véltük, hogy létezhet egy effektív rokonelkerülő mechanizmus,

amely elősegítette a genetikai variabilitás megőrzését. Az 1970-es éveket megelőző időszakból nem állnak rendelkezésre megbízható populációméret-becslések, így nem tudjuk, hogy hány generáción keresztül volt alacsony a populációméret. A jelenlegi populációban tapasztalt nagy genetikai változatosság magyarázata további kutatásokat igényel, mert a populációról rendelkezésre álló ismeretek (palacknyak-hatás, kismértékű génáramlás, rokonelkerülés hiánya) alapján kisebb genetikai változatosságot várnánk.

A másik tényező, hogy a rokonságnál fontosabbak lehetnek a potenciális partner egyéb tulajdonságai, például az általa fenntartott territórium minősége. A hazai parlagi sasok a múlt században az Északi-középhegység területére szorultak vissza. A védelmi programoknak köszönhetően a populáció növekedésnek indult és az állomány a síkvidéki mezőgazdasági területeken kezdett el költeni. Az itt költő párok esetében nagyobb a kirepülési siker, ami a parlagi sas fő zsákmányállatának, a mezei nyúlnek (*Lepus europaeus*) nagyobb denzitásával hozható összefüggésbe (Horváth et al., 2010, 2014). A reprodukív sikerre ezenkívül hatással volt a madarak kora is: a legalább egy fiókát kirepülésig felnevelő párok aránya kisebb volt azon párok között, ahol a pár legalább egyik tagja még átszíneződő (nem adult) madár volt (Horváth et al., 2010). Ez alapján a potenciális pár minőségét annak kora is befolyásolja. Tehát a rokonokkal történő párbaállítás elkerülése kevésbé lehet lényeges abban az esetben, ha az egyedek számára rendelkezésre álló potenciális párok vagy egyéb források (jó territórium) mennyisége limitált. Ilyenkor a beltenyésztéses leromlás költsége relatíve kicsi lehet az optimális pár keresésének költségéhez képest. Erre lehet példa a tarka vércsék esete, amelyeknél kevés a fészkelésre alkalmas hely és nagy az egyedek mortalitása. Emiatt a szaporodási lehetőségeik korlátozottak, így elképzelhető, hogy ezért nem figyelhető meg rokonelkerülés (Duncan és Bird, 1989).

A beltenyésztéshez hasonló fitneszcsökkenéshez vezethet annak ellenkezője, a kültenyésztés (outbreeding), melynek során távoli leszármazási ágak kereszteződnek. Míg a beltenyésztéses leromlás a lokuszon belüli allélek kölcsönhatásaként lép fel, addig a kültenyésztéses leromlásnak a lokuszok közötti kölcsönhatás az oka (Edmands, 2007). A két különböző leszármazási vonal, például egy faj két egymástól távoli populációjából származó egyed két eltérő környezethez adaptálódhatott, ún. koadaptált génegyüttesek jöhettek létre. Közös utódjukban ezeket a génegyütteseket feltöri és összekeveri a rekombináció. Ennek következtében az utód se az egyik, se a másik környezethez nem adaptálódott megfelelően, így ez

fitneszcsökkenéshez vezet. A parlagi sas elterjedési területe kelet-nyugati irányban Ausztriától egészen a Bajkál-tóig, észak-déli irányban pedig a Déli-Uráltól Törökországig húzódik (Del Hoyo *et al.*, 1995). Mivel széles elterjedésű madár, ezért a helyi adaptációk fontosak lehetnek, így a kültenyésztéses leromlásnak (outbreeding depression) is talán szerepe lehet. A kültenyésztéses leromlás elkerülését szolgálhatja az állatfajok többségére jellemző pozitív asszortatív párosodás, vagyis a fenotípusosan hasonló partner preferálása (Jiang *et al.*, 2013). Erre utal a parlagi sas legközelebbi rokonán, a spanyolországi ibériai sason (*Aquila adalberti*) végzett vizsgálat eredménye is (Bortolotti *et al.*, 2008). Az ibériai sas megjelenésében is különbözik a parlagi sastól: sokkal kiterjedtebb a váll fehér mintázata, amely egyéni változatosságot is mutat. Az eredmények pozitív asszortatív párosodás meglétét mutatták ki ennél a fajnál, amelynek során az egyedek a legtöbb esetben magukhoz hasonló mintázatú egyeddel álltak párba. A tollazat mintázata nem állt kapcsolatban a madár korával, a territórium-minőséggel és a reprodukív sikerrel sem. Úgy vélik, hogy ez a pozitív asszortatív párosodás a kültenyésztés elkerülésére irányuló mechanizmus, és hozzájárulhatott az ibériai és a parlagi sas gyors divergenciájához a hibridizációs események csökkentésén keresztül (Bortolotti *et al.*, 2008). A parlagi sasra is jellemzők a fehér válltollak, még ha kisebb kiterjedtséget és változatosságot is mutat, így előfordulhat, hogy akár ennél a fajnál is fennáll ilyesféle asszortatív párosodás. A kárpát-medencei populáció továbbá a legnyugatibb, az ibériai sas elterjedési területéhez legközelebbi populációja a parlagi sasnak, így elképzelhető, hogy az itteni egyedekre erős szelekciós nyomás hatott az ibériai sassal történő párosodás elkerülésére.

Legjobb tudomásunk szerint jelen munkán kívül eddig csak két alkalommal vizsgálták a rokonokkal történő párbaállítás elkerülését nagytermetű ragadozó madaraknál: a kazahsztáni parlagi sas (Rudnick *et al.*, 2005) és a hazai rétisas (Nemesházi *et al.*, 2018a) populáció esetében. Ezek a vizsgálatok az általunk is végzett, mikroszatellita alapú rokonságbecslésre alapozott Monte-Carlo szimulációt alkalmazták. A rétisas esetében találtak rokonelkerülés meglétére utaló bizonyítékot, a parlagi sas esetében hozzánk hasonlóan nem mutattak ki. Ennek hátterében talán faji jellemzők állhatnak. A magyarországi parlagi sas populációban kimutattak ivarfüggő diszperziót, amely egy rokonelkerülési mechanizmus lehet, de ennek ellenére a mi vizsgálatunkban nem mutatkozott ez meg a párok rokonságának mintázatában.

A rokonságbecslő módszerek tesztelésére ideális lenne egy többgenerációs családfa (Bink *et al.*, 2008), vagy még inkább egy teljes populáció rokonsági viszonyainak ismerete több generáción át, sok megmintázott egyeddel. Ha ez rendelkezésünkre állna, akkor az alsóbb generációk egyedeire pontosan meg tudnánk határozni a *leszármazásuk szerinti* rokonságukat, figyelembe véve a felsőbb generációkból eredő háttérrokonságot is. Ezt a leszármazásból számított "elméleti" rokonságértéket vethetnénk össze a rokonságbecslő módszerekből kapott becslésekkel. Azonban a nagy generációs idejű, nehezen megmintázható ragadozómadárfajok populációiról nehéz kellő számú, biztosan ismert rokonsági fokú egyedpár genotípusát megállapítani. Vizsgálatunkban csak szülő-utód, illetve édestestvérpárokról tudtunk elegendő adatot gyűjteni, de ezeknek sem ismertük a felsőbb generációkból eredő leszármazási kapcsolatait (háttérrokonságukat), amelyek növelhették a tényleges genetikai korrelációjukat. Ezért olyan egyedi alapú szimulációt fejlesztettünk, melyeknek segítségével képesek voltunk létrehozni virtuális szülő-utód, édestestvér és féltestvér kapcsolatokat. Pontosabban ilyen kapcsolatban álló genotípusokat hoztunk létre a valós populáció genotipizálására használt markerkészletet allélgyakoriságainak felhasználásával. Ebből kiindulva a kutatás következő lépésében többgenerációs egyedi alapú szimulációt tervezünk fejleszteni, melyben az egyedek életmenet paramétereit, a generációk átfedését, a párosodási rendszert és a populációméretet a magyarországi parlagi sas populáció becsült paramétereit alapján állítjuk be. Így változatos, ismert rokonsági fokú virtuális egyedpárokkal tesztelhetjük majd a rokonságbecslő módszereket.

8. Összefoglalás

A beltenyésztés az egyedek csökkent fitnesséhez vezethet, így az evolúció során kialakultak különböző mechanizmusok a rokonokkal történő párosodás elkerülésére. Vizsgálatunk során arra kerestük a választ, hogy kerül-e a parlagi sasok (*Aquila heliaca*) a rokonokkal történő párba állást. A rokonelkerülés meglétét a sok közel rokont eredményező monogámia és kismértékű diszperzió miatt feltételeztük ennél a fajnál.

A rokonságbecslést az egyedek kilenc mikroszatellita lokuszra meghatározott DNS-profilja alapján végeztük. Ezeket a költő madarak esetében a fészkek alól gyűjtött vedlett tollakból, a fiókák esetében a gyűrűzéskor tépett hónalj tollból állapítottuk meg. A kelet-magyarországi területen előforduló, összesen 84 költő tojót, 72 költő hímét és 128 fiókát vizsgáltunk a 2010–2018-as időszakból. Hat különböző rokonságbecslő módszert teszteltünk: három momentum alapú (Lynch-Ritland, Queller-Goodnight, Wang) és három maximum likelihood módszert (diadikus likelihood, triadikus likelihood, ML-Relate). A teszteket biztosan ismert rokonsági fokú (szülő-utód, édestestvér, féltestvér, nem rokon) valós, és a populációs allélgyakoriságok alapján előállított virtuális egyedpárokon végeztük. A rokonelkerülés vizsgálata Monte-Carlo szimulációval történt: a tényleges költőpárok átlagos rokonságát véletlenszerűen összesorsolt hím-tojó párok átlagos rokonságának eloszlásával vetettük össze. Utóbbi eloszlást a költő egyedek random párba állításának és rokonságbecslésének 10 000-szeres ismétlésével kaptuk meg.

A maximum likelihood alapú rokonságbecslő módszerek minden esetben pozitív irányba torzított becsléseket adtak. A módszerek általában a valós édestestvérek rokonságát az elméleti értéknél kisebbnek becsülték. A legmegbízhatóbbnak ítélt Lynch-Ritland módszerrel becsülve a tényleges költőpárok átlagos rokonsága $-0,004$ -nek adódott, amely nem tért el szignifikánsan a véletlenszerűen összesorsolt hím-tojó párok átlagos rokonságától.

Eddigi eredményeink alapján nem találtunk bizonyítékot a rokonelkerülés meglétére a parlagi sas esetében, hasonlóan a faj egy másik populációján végzett korábbi kutatás eredményéhez.

8. Abstract

Inbreeding can lead to decreased fitness of individuals; therefore, various mechanisms have evolved to avoid mating between related individuals. Our study aimed to determine whether the eastern imperial eagles (*Aquila heliaca*) avoid choosing related individuals for mates. Avoidance of relatives was assumed because of the high frequency of closely related individuals caused by the monogamy and natal philopatry characteristic for the species.

Degree of relatedness was estimated based on individual genotypes determined at nine microsatellite loci. In the case of breeding birds, DNA was extracted from shed feathers collected under the nests, and in the case of chicks from the axillary feathers torn during ringing. Samples of 84 breeding females, 72 breeding males and 128 chicks were studied, which were all collected between 2010 and 2018 in Eastern Hungary. We tested six different relatedness estimators: three of these were method of moments estimators (Lynch-Ritland, Queller-Goodnight, Wang) and the other three were maximum-likelihood estimators (dyadic likelihood, triadic likelihood, ML-Relate). Tests were conducted on pairs of real individuals with known degree of relatedness (parent-offspring, full sibs and half sibs) and also on virtual pairs, whose genotypes were generated based on the allele frequencies found in the population. The Monte-Carlo simulation method was used to test the avoidance of relatives in mate choice: average relatedness of real breeding pairs was compared to the distribution of the average relatedness of randomly formed male-female pairs. The latter distribution was sampled 10,000 times by matching randomly the breeding individuals and estimating their relatedness.

The maximum-likelihood relatedness estimators gave positively biased estimates in all cases. The relatedness values of full sibling pairs were estimated generally lower than their theoretical values. The average relatedness of real breeding pairs was estimated at -0.004 by the Lynch-Ritland method that proved to be the most reliable method. This does not significantly deviate from the average relatedness of randomly formed male-female pairs.

According to our results, we have found no evidence for discrimination of relatives in mate choice in eastern imperial eagle, similarly to a study on another population of the species.

9. Irodalomjegyzék

- Anderson, A.D., Weir, B.S., 2007. A Maximum-Likelihood Method for the Estimation of Pairwise Relatedness in Structured Populations. *Genetics* 176, 421–440. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.063149>
- Armbruster, P., Reed, D.H., 2005. Inbreeding depression in benign and stressful environments. *Heredity* 95, 235–242. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800721>
- Ayres, K.L., 2005. The expected performance of single nucleotide polymorphism loci in paternity testing. *Forensic Sci. Int.* 154, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.004>
- Bagyura, J., Szitta, T., Haraszthy, L., Firmánszky, G., Viszló, L., Kovács, A., Demeter, I., Horváth, M., 2002. Population increase of Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) in Hungary between 1980 and 2000. *Aquila* 107 108, 133–144.
- Baratti, M., Dessi-Fulgheri, F., Ambrosini, R., Bonisoli-Alquati, A., Caprioli, M., Goti, E., Matteo, A., Monnanni, R., Ragionieri, L., Ristori, E., Romano, M., Rubolini, D., Scialpi, A., Saino, N., 2012. MHC genotype predicts mate choice in the ring-necked pheasant *Phasianus colchicus*. *J. Evol. Biol.* 25, 1531–1542. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02534.x>
- Barrett, S.C.H., Charlesworth, D., 1991. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 352, 522–524. <https://doi.org/10.1038/352522a0>
- Bink, M.C.A.M., Anderson, A.D., van de Weg, W.E., Thompson, E.A., 2008. Comparison of marker-based pairwise relatedness estimators on a pedigreed plant population. *Theor. Appl. Genet.* 117, 843. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0824-1>
- Blomqvist, D., Andersson, M., Küpper, C., Cuthill, I.C., Kis, J., Lanctot, R.B., Sandercock, B.K., Székely, T., Wallander, J., Kempnaers, B., 2002. Genetic similarity between mates and extra-pair parentage in three species of shorebirds. *Nature* 419, 613–615. <https://doi.org/10.1038/nature01104>
- Blouin, M.S., 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* 18, 503–511. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00225-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00225-8)
- Bonadonna, F., Sanz-Aguilar, A., 2012. Kin recognition and inbreeding avoidance in wild birds: the first evidence for individual kin-related odour recognition. *Anim. Behav.* 84, 509–513. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.06.014>
- Bonneaud, C., Chastel, O., Federici, P., Westerdahl, H., Sorci, G., 2006. Complex Mhc-based mate choice in a wild passerine. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 1111–1116. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3325>
- Bortolotti, G.R., González, L.M., Margalida, A., Sánchez, R., Oria, J., 2008. Positive assortative pairing by plumage colour in Spanish imperial eagles. *Behav. Processes* 78, 100–107.
- Brekke, P., Bennett, P.M., Wang, J., Pettorelli, N., Ewen, J.G., 2010. Sensitive males: inbreeding depression in an endangered bird. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277, 3677–3684. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1144>
- Brekke, P., Wang, J., Bennett, P.M., Cassey, P., Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Ewen, J.G., 2012. Postcopulatory mechanisms of inbreeding avoidance in the island endemic hihi (*Notiomystis cincta*). *Behav. Ecol.* 23, 278–284. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr183>
- Busch, J.D., Katzner, T.E., Bragin, E., Keim, P., 2005. Tetranucleotide microsatellites for *Aquila* and *Haliaeetus* eagles. *Mol. Ecol. Resour.* 5, 39–41.
- Caspers, B.A., Hoffman, J.I., Kohlmeier, P., Krüger, O., Krause, E.T., 2013. Olfactory imprinting as a mechanism for nest odour recognition in zebra finches. *Anim. Behav.* 86, 85–90.
- Csilléry, K., Johnson, T., Beraldi, D., Clutton-Brock, T., Coltman, D., Hansson, B., Spong, G., Pemberton, J.M., 2006. Performance of Marker-Based Relatedness Estimators in Natural Populations of Outbred Vertebrates. *Genetics* 173, 2091–2101. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.057331>
- Dakin, E.E., Avise, J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504–509. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>
- Daniels, S.J., Walters, J.R., 2000. Inbreeding Depression and its Effects on Natal Dispersal in Red-Cockaded Woodpeckers. *The Condor* 102, 482–491. <https://doi.org/10.1093/condor/102.3.482>
- Deák, G., Fatér, I., Juhász, T., Horváth, M., 2020. Parlagi sasok (*Aquila heliaca*) pusztulási és kézre kerülési okainak alakulása Magyarországon 2010 és 2019 között. *Heliaca* 16: 114-117.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. 1995. Handbook of the birds of the world (Vol. 2). Falconiformes to Galliformes. Barcelona: Lynx edicions, 638 p.

- Dowling, J.L., Colombelli-Négrel, D., Webster, M.S., 2016. Kin signatures learned in the egg? Red-backed fairy-wren songs are similar to their Mother's in-Nest calls and songs. *Front. Ecol. Evol.* 4, 48.
- Duncan, J.R., Bird, D.M., 1989. The influence of relatedness and display effort on the mate choice of captive female American kestrels. *Anim. Behav.* 37, 112–117.
- Edmunds, S., 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol. Ecol.* 16, 463–475.
- Eggert, F., Müller-ruchholtz, W., Ferstl, R., 1998. Olfactory cues associated with the major histocompatibility complex. *Genetica* 104, 191–197. <https://doi.org/10.1023/A:1026402531196>
- Ewing, S.R., Nager, R.G., Nicoll, M. a. C., Aumjaud, A., Jones, C.G., Keller, L.F., 2008. Inbreeding and Loss of Genetic Variation in a Reintroduced Population of Mauritius Kestrel. *Conserv. Biol.* 22, 395–404. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.00884.x>
- Foerster, K., Delhey, K., Johnsen, A., Lifjeld, J.T., Kempenaers, B., 2003. Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. *Nature* 425, 714–717. <https://doi.org/10.1038/nature01969>
- Foerster, K., Valcu, M., Johnsen, A., Kempenaers, B., 2006. A spatial genetic structure and effects of relatedness on mate choice in a wild bird population. *Mol. Ecol.* 15, 4555–4567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03091.x>
- Forsman, E.D., Anthony, R.G., Reid, J.A., Loschl, P.J., Sovern, S.G., Taylor, M., Biswell, B.L., Ellingson, A., Meslow, E.C., Miller, G.S., Swindle, K.A., Thrailkill, J.A., Wagner, F.F., Seaman, D.E., 2002. Natal and Breeding Dispersal of Northern Spotted Owls. *Wildl. Monogr.* 1–35.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., Ballou, J. D., 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.
- Fridolfsson, A.-K., Ellegren, H., 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avian Biol.* 116–121.
- Gautschi, B., Jacob, G., Negro, J.J., Godoy, J.A., Müller, J.P., Schmid, B., 2003. Analysis of relatedness and determination of the source of founders in the captive bearded vulture, *Gypaetus barbatus*, population. *Conserv. Genet.* 4, 479–490. <https://doi.org/10.1023/A:1024730128819>
- Gyarmati Ádám, 2014. Magyarországi parlagi sasok (*Aquila heliaca*) túlélési valószínűségei és szaporodási rendszere mikroszatellita allélek alapján. Szakdolgozat, Állatorvostudományi Egyetem, Ökológiai Tanszék.
- Greenwood, P.J., 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim. Behav.* 28, 1140–1162. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(80\)80103-5](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(80)80103-5)
- Greenwood, P.J., Harvey, P.H., 1982. The natal and breeding dispersal of birds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13, 1–21.
- Hailer, F., Gautschi, B., Helander, B., 2005. Development and multiplex PCR amplification of novel microsatellite markers in the White-tailed Sea Eagle, *Haliaeetus albicilla* (Aves: Falconiformes, Accipitridae). *Mol. Ecol. Resour.* 5, 938–940.
- Hamilton, W.D., 1964. The genetical evolution of social behaviour. II. *J. Theor. Biol.* 7, 17–52. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(64\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90039-6)
- Hamilton, W. D. and May, R. M., 1977. Dispersal in stable habitats. *Nature*, 269(5629), 578-581.
- Hansson, B., 2004. Marker-Based Relatedness Predicts Egg-Hatching Failure in Great Reed Warblers. *Conserv. Genet.* 5, 339–348. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000031143.51063.cb>
- Hatchwell, B.J., Ross, D.J., Fowlie, M.K., McGowan, A., 2001. Kin discrimination in cooperatively breeding long-tailed tits. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 268, 885–890. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1598>
- Hayashi, Y., 2009. Close Inbreeding in Blakiston's Fish-Owl (*Ketupa blakistoni*). *J. Raptor Res.* 43, 145–148. <https://doi.org/10.3356/JRR-08-62.1>
- Heber, S., Briskie, J.V., 2010. Population Bottlenecks and Increased Hatching Failure in Endangered Birds. *Conserv. Biol.* 24, 1674–1678. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01553.x>
- Hedrick, P.W., Kalinowski, S.T., 2000. Inbreeding Depression in Conservation Biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31, 139–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.139>
- Hemmings, N.L., Slate, J., Birkhead, T.R., 2012. Inbreeding causes early death in a passerine bird. *Nat. Commun.* 3, 1–4. <https://doi.org/10.1038/ncomms1870>
- Hill, W.G., Weir, B.S., 2011. Variation in actual relationship as a consequence of Mendelian sampling and linkage. *Genet. Res.* 93, 47–64. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000480>

- Horváth, M., Szitta, T., Bagyura, J., Fatér, I., Firmánszky, G., Moskát, C., 2014. Simultaneous effect of habitat and age on reproductive success of Imperial Eagles (*Aquila heliaca*) in Hungary. *Ornis Hung.* 22, 57–68.
- Horváth, M., Szitta, T., Firmánszky, G., Solti, B., Kovács, A., Moskát, C., 2010. Spatial variation in prey composition and its possible effect on reproductive success in an expanding eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 56, 187–200.
- Horváth, M.B., Martínez-Cruz, B., Negro, J.J., Kalmár, L., Godoy, J.A., 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *J. Avian Biol.* 36, 84–88.
- Horváth, M., Fatér, I., Juhász, T., Deák, G., Bereczky, A., 2020. A parlagi sas (*Aquila heliaca*) fészkelőállományának alakulása Magyarországon 2017 és 2019 között. *Heliaca* 16: 42-45.
- Jakab Szilvia, 2017. A nem-invazív mintavétel megbízhatóságának elemzése és betolakodó egyedek vizsgálata egy parlagi sas (*Aquila heliaca*) populációban. Szakdolgozat, Állatorvostudományi Egyetem, Ökológiai Tanszék.
- James, P.C., Oliphant, L.W., Warkentin, I.G., 1987. Close inbreeding in the Merlin (*Falco columbarius*). *Close Inbreeding Merlin Falco Columbarius* 99, 718–719.
- Jamieson, I.G., Wallis, G.P., Briskie, J.V., 2006. Inbreeding and Endangered Species Management: Is New Zealand Out of Step with the Rest of the World? *Conserv. Biol.* 20, 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00282.x>
- Jiang, Y., Bolnick, D.I., Kirkpatrick, M., 2013. Assortative Mating in Animals. *Am. Nat.* 181, E125–E138. <https://doi.org/10.1086/670160>
- Johnson, M.L., Gaines, M.S., 1990. Evolution of dispersal: theoretical models and empirical tests using birds and mammals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 449–480.
- Jones, A.G., Ardren, W.R., 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* 12, 2511–2523.
- Kalinowski, S.T., Wagner, A.P., Taper, M.L., 2006. ml-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol. Ecol. Notes* 6, 576–579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x>
- Keller, L.F., Waller, D.M., 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17, 230–241. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02489-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02489-8)
- Komdeur, J., Hatchwell, B.J., 1999. Kin recognition: function and mechanism in avian societies. *Trends Ecol. Evol.* 14, 237–241.
- Kruuk, L.E.B., Sheldon, B.C., Merilä, J., 2002. Severe inbreeding depression in collared flycatchers (*Ficedula albicollis*). *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 269, 1581–1589. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2049>
- Kurtz, J., Kalbe, M., Aeschlimann, P.B., Häberli, M.A., Wegner, K.M., Reusch, T.B., Milinski, M., 2004. Major histocompatibility complex diversity influences parasite resistance and innate immunity in sticklebacks. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271, 197–204.
- Lacy, R.C., Sherman, P.W., 1983. Kin recognition by phenotype matching. *Am. Nat.* 121, 489–512.
- Lebigre, C., Alatalo, R.V., Siitari, H., 2010. Female-biased dispersal alone can reduce the occurrence of inbreeding in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Mol. Ecol.* 19, 1929–1939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04614.x>
- Leclaire, S., Dongen, W.F.D. van, Voccia, S., Merkling, T., Ducamp, C., Hatch, S.A., Blanchard, P., Danchin, É., Wagner, R.H., 2014. Preen secretions encode information on MHC similarity in certain sex-dyads in a monogamous seabird. *Sci. Rep.* 4, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep06920>
- Leedale, A.E., Li, J., Hatchwell, B.J., 2020. Kith or Kin? Familiarity as a Cue to Kinship in Social Birds. *Front. Ecol. Evol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00077>
- Li, C.C., Weeks, D.E., Chakravarti, A., 1993. Similarity of DNA Fingerprints Due to Chance and Relatedness. *Hum. Hered.* 43, 45–52. <https://doi.org/10.1159/000154113>
- Li, X.-Y., Kokko, H., 2019. Sex-biased dispersal: a review of the theory. *Biol. Rev.* 94, 721–736.
- Lynch, M., Ritland, K., 1999. Estimation of Pairwise Relatedness With Molecular Markers. *Genetics* 152, 1753–1766.
- Marshall, R.C., Buchanan, K.L., Catchpole, C.K., 2003. Sexual selection and individual genetic diversity in a songbird. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, S248–S250. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0081>
- Martínez-Cruz, B., David, V.A., Godoy, J.A., Negro, J.J., O'Brien, S.J., Johnson, W.E., 2002. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Mol. Ecol. Resour.* 2, 323–326.
- Milligan, B.G., 2003. Maximum-Likelihood Estimation of Relatedness. *Genetics* 163, 1153–1167.
- Møller, A.P., Nielsen, J.T., 2015. Genetic variation in birds in relation to predation risk by hawks: A comparative analysis. *Curr. Zool.* 61, 1–9. <https://doi.org/10.1093/czoolo/61.1.1>

- Morin, P.A., Moore, J.J., Chakraborty, R., Jin, L., Goodall, J., Woodruff, D.S., 1994. Kin selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees. *Science* 265, 1193–1201. <https://doi.org/10.1126/science.7915048>
- Nakagawa, S., Waas, J.R., 2004. ‘O sibling, where art thou?’—a review of avian sibling recognition with respect to the mammalian literature. *Biol. Rev.* 79, 101–119.
- Nemesházi, E., Szabó, K., Horváth, Z., Kövér, S., 2018a. The effects of genetic relatedness on mate choice and territorial intrusions in a monogamous raptor. *J. Ornithol.* 159, 233–244. <https://doi.org/10.1007/s10336-017-1494-z>
- Nemesházi, E., Szabó, K., Horváth, Z., Kövér, S., 2018b. Genetic structure confirms female-biased natal dispersal in the White-tailed Eagle population of the Carpathian Basin. *ACTA Zool. Acad. Sci. Hung.* 64, 243–257.
- Oh, K.P., Badyaev, A.V., 2006. Adaptive genetic complementarity in mate choice coexists with selection for elaborate sexual traits. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 1913–1919. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3528>
- Ortego, J., Calabuig, G., APARICIO, J.M., Cordero, P.J., 2008. Genetic consequences of natal dispersal in the colonial lesser kestrel. *Mol. Ecol.* 17, 2051–2059.
- Papp Rita, 2013. A kelési diszperzió vizsgálata a magyarországi parlagisas-populációban. Szakdolgozat, Állatorvostudományi Egyetem, Ökológiai Tanszék.
- Pannoneagle – Parlagi sasok védelme a Pannon-régióban , <http://imperialeagle.eu/> (Letöltés ideje: 2020.04.24.)
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28, 2537e2539.
- Penn, D.J., Frommen, J.G., 2010. Kin recognition: an overview of conceptual issues, mechanisms and evolutionary theory, in: *Animal Behaviour: Evolution and Mechanisms*. Springer, pp. 55–85.
- Pew, J., Muir, P.H., Wang, J., Frasier, T.R., 2015. related: an R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 557–561. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12323>
- Potier, S., 2019. Olfaction in raptors. *Zool. J. Linn. Soc.* <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz121>
- Potier, S., Besnard, M.M., Schikorski, D., Buatois, B., Duriez, O., Gabirot, M., Leclaire, S., Bonadonna, F., 2018. Preen oil chemical composition encodes individuality, seasonal variation and kinship in black kites *Milvus migrans*. *J. Avian Biol.* 49, e01728. <https://doi.org/10.1111/jav.01728>
- Prommer, M., Horváth, M., Bagyura, J., 2015. Mennyire elégséges a Natura 2000 hálózat a nagy diszperzió-képességű jelölő fajok védelméhez? *Természetvédelmi Közlemények* 21, pp. 243–252.
- Pusey, A., Wolf, M., 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends Ecol. Evol.* 11, 201–206. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10028-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10028-8)
- Queller, D.C., Goodnight, K.F., 1989. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution* 43, 258–275. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04226.x>
- R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Richardson, D.S., Komdeur, J., Burke, T., 2004. Inbreeding in the Seychelles Warbler: Environment-Dependent Maternal Effects. *Evolution* 58, 2037–2048. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb00488.x>
- Riehl, C., Stern, C.A., 2015. How cooperatively breeding birds identify relatives and avoid incest: New insights into dispersal and kin recognition. *BioEssays* 37, 1303–1308. <https://doi.org/10.1002/bies.201500120>
- Ritland, K., 1996. A Marker-Based Method for Inferences About Quantitative Inheritance in Natural Populations. *Evolution* 50, 1062–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02347.x>
- Robinson, S.P., Simmons, L.W., Kennington, W.J., 2013. Estimating relatedness and inbreeding using molecular markers and pedigrees: the effect of demographic history. *Mol. Ecol.* 22, 5779–5792. <https://doi.org/10.1111/mec.12529>
- Rudnick, J.A., Katzner, T.E., Bragin, E.A., Rhodes, O.E., Dewoody, J.A., 2005. Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Mol. Ecol.* 14, 2959–2967.
- Russello, M.A., Amato, G., 2004. Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Mol. Ecol.* 13, 2829–2840. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02266.x>
- Santure, A.W., Stapley, J., Ball, A.D., Birkhead, T.R., Burke, T., Slate, J., 2010. On the use of large marker panels to estimate inbreeding and relatedness: empirical and simulation studies of a pedigreed zebra finch

- population typed at 771 SNPs. *Mol. Ecol.* 19, 1439–1451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04554.x>
- Serrano, D., 2018. Dispersal in Raptors, in: Sarasola, J.H., Grande, J.M., Negro, J.J. (Eds.), *Birds of Prey: Biology and Conservation in the XXI Century*. Springer International Publishing, Cham, pp. 95–121. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73745-4_4
- Sharp, S.P., McGowan, A., Wood, M.J., Hatchwell, B.J., 2005. Learned kin recognition cues in a social bird. *Nature* 434, 1127–1130. <https://doi.org/10.1038/nature03522>
- Spottiswoode, C., Møller, A.P., 2004. Genetic similarity and hatching success in birds. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271, 267–272. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2605>
- Stewart, A.C., Rosenfield, R.N., Nyhof, M.A., 2007. CLOSE INBREEDING AND RELATED OBSERVATIONS IN COOPER'S HAWKS. *J. Raptor Res.* 41, 227–230. [https://doi.org/10.3356/0892-1016\(2007\)41\[227:CIAROI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3356/0892-1016(2007)41[227:CIAROI]2.0.CO;2)
- Suh, A., Kriegs, J.O., Brosius, J., Schmitz, J., 2011. Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2993–2997.
- Szulkin, M., Garant, D., McCleery, R.H., Sheldon, B.C., 2007. Inbreeding depression along a life-history continuum in the great tit. *J. Evol. Biol.* 20, 1531–1543. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01325.x>
- Szulkin, M., Sheldon, B.C., 2008. Dispersal as a means of inbreeding avoidance in a wild bird population. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 703–711. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0989>
- Taylor, H.R., 2015. The use and abuse of genetic marker-based estimates of relatedness and inbreeding. *Ecol. Evol.* 5, 3140–3150.
- Trochet, A., Courtois, E.A., Stevens, V.M., Baguette, M., Chaine, A., Schmeller, D.S., Clobert, J., Wiens, J.J., 2016. Evolution of sex-biased dispersal. *Q. Rev. Biol.* 91, 297–320.
- Van de Castelee, T., Galbusera, P., Matthyssen, E., 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Mol. Ecol.* 10, 1539–1549. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01288.x>
- Van de Castelee, T., Galbusera, P., Schenck, T., Matthyssen, E., 2003. Seasonal and lifetime reproductive consequences of inbreeding in the great tit *Parus major*. *Behav. Ecol.* 14, 165–174. <https://doi.org/10.1093/beheco/14.2.165>
- Van de Castelee, T., Matthyssen, E., 2006. Natal dispersal and parental escorting predict relatedness between mates in a passerine bird. *Mol. Ecol.* 15, 2557–2565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02946.x>
- Vili, N., Nemesházi, E., Kovács, S., Horváth, M., Kalmár, L., Szabó, K., 2013. Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling. *J. Ornithol.* 154, 587–595.
- Wagner, A.P., Creel, S., Kalinowski, S.T., 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity* 97, 336–345. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800865>
- Wang, J., 2014. Marker-based estimates of relatedness and inbreeding coefficients: an assessment of current methods. *J. Evol. Biol.* 27, 518–530. <https://doi.org/10.1111/jeb.12315>
- Wang, J., 2011. coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 141–145. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02885.x>
- Wang, J., 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genet. Res.* 89, 135–153. <https://doi.org/10.1017/S0016672307008798>
- Wang, J., 2006. Informativeness of genetic markers for pairwise relationship and relatedness inference. *Theor. Popul. Biol.* 70, 300–321.
- Wang, J., 2002. An Estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers. *Genetics* 160, 1203–1215.
- Warkentin, I.G., Lieske, D., Espie, R., 2013. Close Inbreeding and Dispersal in Merlins: Further Examination. *J. Raptor Res.* 47, 69–74. <https://doi.org/10.3356/JRR-12-00005.1>
- Weir, B.S., Anderson, A.D., Hepler, A.B., 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nat. Rev. Genet.* 7, 771–780. <https://doi.org/10.1038/nrg1960>
- Wheelwright, N.T., Mauck, R.A., 1998. Philopatry, Natal Dispersal, and Inbreeding Avoidance in an Island Population of Savannah Sparrows. *Ecology* 79, 755–767. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[0755:PNDIAIA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[0755:PNDIAIA]2.0.CO;2)
- Wiens, J.D., Reynolds, R.T., Noon, B.R., 2006. Juvenile Movement and Natal Dispersal of Northern Goshawks in Arizona. *The Condor* 108, 253–269. <https://doi.org/10.1093/condor/108.2.253>
- Woolaver, L.G., Nichols, R.K., Morton, E.S., Stutchbury, B.J.M., 2013. Population genetics and relatedness in a critically endangered island raptor, Ridgway's Hawk *Buteo ridgwayi*. *Conserv. Genet.* 14, 559–571. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0444-4>

Wright, S., 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *Am. Nat.* 56, 330–338.

Zsinka Bernadett, 2018. Parlagi sas (*Aquila heliaca*) hímek és tojók túlélésének becslése vedlett és fiókákból tépett tollakból meghatározott genotípusok alapján. Szakdolgozat, Állatorvostudományi Egyetem, Ökológiai Tanszék.

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném nagyon megköszönni témavezetőimnek, Dr. Vili Nórának és Dr. Kövér Szilviának a munka során nyújtott rengeteg támogatást és segítséget.

Köszönettel tartozom a Konzerváció-genetikai Kutatócsoport további tagjainak, Dr. Pásztory-Kovácsi Szilviának és Dr. Szabó Krisztiánnak is a szolgáltatott adatokért és lelkesítésért.

Köszönet illeti Dr. Horváth Mártont és a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület Parlagisas-védelmi Munkacsoportját, valamint a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumának munkatársait.

Végül köszönöm családomnak, barátaimnak és csoporttársaimnak a szeretetet és támogatást.

12. Mellékletek

1. táblázat: Az Aa41, Aa49 és Aa59 lokuszok esetén alkalmazott PCR program.

Aa41, Aa49, Aa53				
			Hőmérséklet	Időtartam
Denaturálás			95°C	2 p
Touchdown				
17 ciklus (-1°C/ciklus)	I.	Denaturálás	95°C	30 mp
	II.	Anelláció	66-50°C	30 mp
	III.	Elongáció	72°C	30 mp
21 ciklus	I.	Denaturálás	95°C	30 mp
	II.	Anneláció	50°C	30 mp
	III.	Elongáció	72°C	30 mp
Végső extenzió				
			72°C	7 p

2. táblázat: A Hal03 lokusz esetén alkalmazott PCR program.

Hal03				
			Hőmérséklet	Időtartam
Denaturálás			95°C	2 p
37 ciklus				
	I.	Denaturálás	95°C	30 mp
	II.	Anelláció	57°C	45 mp
	III.	Elongáció	72°C	45 mp
Végső extenzió				
			72°C	7 p

3. táblázat: A Hal01 és Hal14 lokuszok esetén alkalmazott PCR program.

Hal01, Hal14				
			Hőmérséklet	Időtartam
Denaturálás			95°C	2 p
37 ciklus	I.	Denaturálás	95°C	30 mp
	II.	Anelláció	60°C	45 mp
	III.	Elongáció	72°C	45 mp
Végső extenzió			72°C	7 p

4. táblázat: A Hal09 és Hal13 lokuszok esetén alkalmazott PCR program.

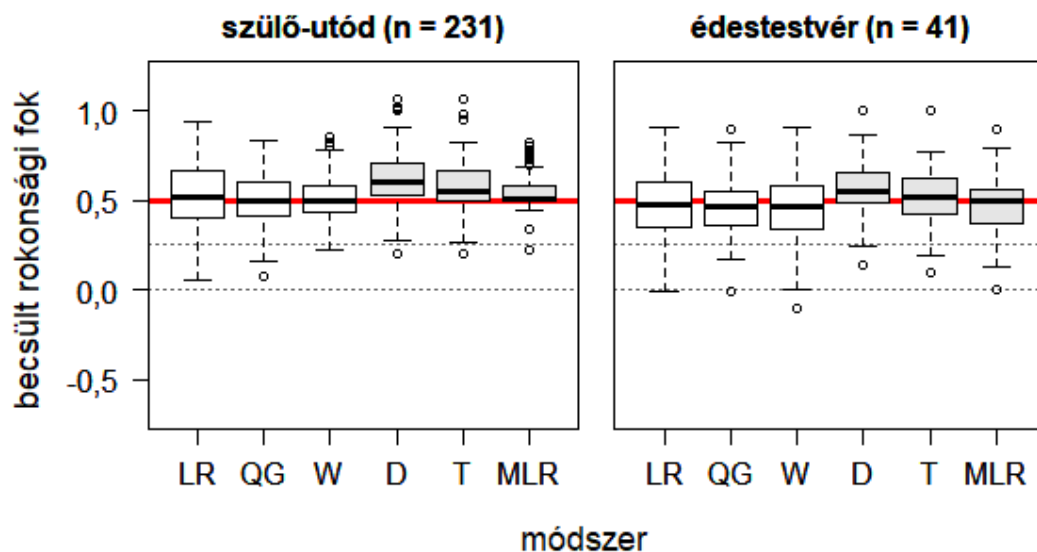
Hal09, Hal13				
			Hőmérséklet	Időtartam
Denaturálás			95°C	2 p
37 ciklus	I.	Denaturálás	95°C	30 mp
	II.	Anelláció	64°C	45 mp
	III.	Elongáció	72°C	45 mp
Végső extenzió			72°C	7 p

5. táblázat: A rokonságbecslés alapjául szolgáló markerkészlet lokuszainak allélszámai és allélgyakoriságai.

Aa02		Aa35		Aa36	
Allél	Frekvencia	Allél	Frekvencia	Allél	Frekvencia
145	0,036	252	0,033	114	0,151
147	0,049	254	0,124	116	0,240
152	0,262	256	0,141	118	0,139
154	0,282	258	0,130	122	0,010
159	0,272	260	0,023	124	0,107
161	0,100	262	0,084	128	0,294
		264	0,141	NULL	0,060
		268	0,003		
		276	0,013		
		278	0,308		
Allélszám	6	10		6	

Aa39		Aa43		G09	
Allél	Frekvencia	Allél	Frekvencia	Allél	Frekvencia
188	0,042	101	0,010	477	0,209
192	0,346	106	0,023	481	0,066
196	0,032	112	0,103	485	0,123
198	0,185	114	0,116	489	0,603
200	0,228	116	0,676		
204	0,099	118	0,007		
206	0,064	120	0,066		
208	0,003				
Allélszám	8	7		4	

G11		Hal04		Hal10	
Allél	Frekvencia	Allél	Frekvencia	Allél	Frekvencia
327	0,136	152	0,160	231	0,068
331	0,450	154	0,412	235	0,034
335	0,200	156	0,095	239	0,520
339	0,214	158	0,191	241	0,367
		160	0,143	245	0,010
Allélszám	4	5		5	



1. ábra: Rokonságbecslő módszerek tesztelése a virtuális költők és virtuális utódok populációján: a boxplotok az ismert rokonsági fokú egyedpárokra kapott becslések eloszlását mutatják a különböző módszerek esetében. LR: Lynch-Ritland, QG: Queller-Goodnight, W: Wang, D: Diadikus likelihood, T: Triadikus likelihood, MLR: ML-Relate. Szürkével jelölve a likelihood módszerek. Piros vonal: elméleti érték. **A mintaelemszámok megegyeznek a valós egyedeken végzett tesztek mintaelemszámaival.**

6. táblázat: Rokonságbecslő módszerek tesztelésének eredménye a virtuális szülők és virtuális utódok populációján: becslések átlaga és szórása. A rokoni kapcsolat megnevezése után zárójelben az adott kapcsolat elméleti átlagrokonsága szerepel. Félkövérrrel jelölve az adott rokoni kapcsolat esetében a becslések átlagát és szórását is figyelembevéve a legjobban teljesítő módszer eredményei. **A mintaelemszámok megegyeznek a valós egyedeken végzett tesztek mintaelemszámaival.**

módszer	szülő-utód (0,5) átlag (\pm SD)	édestestvér (0,5) átlag (\pm SD)	féltestvér (0,25) átlag (\pm SD)	nem rokon (0,00) átlag (\pm SD)
LR: Lynch-Ritland	0,52 (\pm 0,19)	0,46 (\pm 0,20)	--	--
QG: Queller-Goodnight	0,50 (\pm0,13)	0,46 (\pm 0,18)	--	--
W: Wang	0,51 (\pm 0,11)	0,45 (\pm 0,19)	--	--
D: Diadikus likelihood	0,62 (\pm 0,13)	0,56 (\pm 0,20)	--	--
T: Triadikus likelihood	0,58 (\pm 0,13)	0,52 (\pm0,20)	--	--
MLR: ML-Relate	0,55 (\pm 0,08)	0,47 (\pm 0,18)	--	--

7. táblázat: Rokonságbecslő módszerek tesztelésének eredménye a virtuális szülők és virtuális utódok populációján: Pearson-korreláció és RMSE (root mean squared error).

Összes: szülő-utód, édestestvér, féltestvér, nem rokon kapcsolatokra adott becslésekre számolva. Csak rokon: szülő-utód, édestestvér, féltestvér kapcsolatokra adott becslésekre számolva. Félkövérrrel jelölve az adott kategóriában legjobban teljesítő (korreláció: legnagyobb érték, RMSE: legkisebb érték) módszer eredményei. **A mintaelemszámok megegyeznek a valós egyedeken végzett tesztek mintaelemszámaival.**

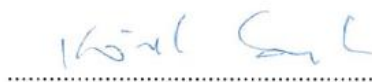
módszer	Pearson-korreláció		RMSE		
	összes	kivéve nem rokon	összes	kivéve nem rokon	nem rokon
LR: Lynch-Ritland	--	--	--	0,190	--
QG: Queller-Goodnight	--	--	--	0,139	--
W: Wang	--	--	--	0,128	--
D: Diadikus likelihood	--	--	--	0,181	--
T: Triadikus likelihood	--	--	--	0,160	--
MLR: ML-Relate	--	--	--	0,107	--

13. Nyilatkozatok

Témavezetői Nyilatkozat

Alulírott Dr. Kövér Szilvia, igazolom, hogy Zsinka Bernadett biológus MSc hallgató „Parlagi sasok rokonelkerülő viselkedésének vizsgálata” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020. 04. 23.



Kövér Szilvia

ÁTE Biológia Intézet, Ökológiai Tanszék

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Vili Nóra, igazolom, hogy Zsinka Bernadett biológus MSc hallgató „Parlagi sasok rokonelkerülő viselkedésének vizsgálata” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020.04.22.



Vili Nóra