

Szakdolgozat

Örkényi Zoltán

2023

Állatorvostudományi Egyetem

Ökológia Tanszék

Mikroszatellita markerek rokon fajok közötti tesztelése papagájokban

Készítette: Örkényi Zoltán, Biológia BSc. III.

Témavezetők:

Dr. Szabó Krisztián

ÁTE, Ökológia Tanszék, Tudományos munkatárs

Dr. Vili Nóra

ÁTE, Ökológia Tanszék, Adjunktus

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	2
1 Bevezetés.....	3
1.1 Mikroszatellita markerek fajok közötti („cross-species”) alkalmazása.....	3
1.2 Mikroszatelliták.....	5
1.3 Papagájok.....	6
2 Célkitűzések.....	9
3 Anyag és módszer.....	10
3.1 A fajok kiválasztása.....	10
3.2 A markerek kiválasztása.....	12
3.3 Polimeráz-lánreakció.....	12
3.4 Agaróz-gélelektroforézis.....	13
3.5 A markerek polimorfizmusának detektálása kapilláris-elektroforézissel.....	14
3.6 A markerek alkalmazhatósága a genetikai távolság függvényében.....	15
3.6.1 Törzsfakészítés, a genetikai távolságok kiszámítása.....	15
3.6.2 Regressziószámítás.....	15
4 Eredmények.....	17
4.1 A markerek alkalmazhatósága a vizsgált fajokban.....	17
4.2 A markerek alkalmazhatósága a genetikai távolság függvényében.....	19
4.2.1 Genetikai távolságok.....	19
4.2.2 A regressziószámítás eredményei.....	19
4.3 Beltenyészettség három <i>Ara</i> fajban.....	23
5 Következtetések.....	24
6 Összefoglalás.....	28
7 Summary.....	29
8 Irodalomjegyzék.....	30
9 Köszönetnyilvánítás.....	39
10 Nyilatkozatok.....	40

Rövidítések jegyzéke

IUCN	Természetvédelmi Világszövetség (International Union for Conservation of Nature)
STR	rövid tandem ismétlődés (short tandem repeat)
SSR-ek	simple sequence repeats (egyszerű szekvencia ismétlődések)
DNS	dezoxiribonukleinsav
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (random amplifikált polimorf DNS)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz-lánreakció)
mtDNS	mitokondriális DNS
CYTB	cytochrome b (citokróm b)
COI	cytochrome c oxidase subunit 1 (citokróm c oxidáz I. alegysége)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ)
BOLD	Barcode of Life Data
HEX	Hexachloro-fluorescein
FAM	Fluorescein amidite
ROX	Carboxy-X-rhodamine
ML	Maximum likelihood
$N_{a(\text{forrásfaj})}$	Az egyes forrásfajokban detektált allélszám
$N_{a(\text{fókuszfaj})}$	Az egyes fókuszfajokban detektált allélszám
$H_{o(\text{forrásfaj})}$	Az egyes forrásfajokban tapasztalt heterozigócia
$H_{o(\text{fókuszfaj})}$	Az egyes fókuszfajokban tapasztalt heterozigócia

1 Bevezetés

1.1 Mikroszatellita markerek fajok közötti („cross-species”) alkalmazása

Ahhoz, hogy az egyes fajok populációi képesek legyenek az állandóan formálódó körülmények között fennmaradni, elengedhetetlen, hogy kellő mértékű genetikai variabilitással rendelkezzenek. Ennélfogva, a genetikai diverzitás fajok illetve populációk közötti és azokon belüli felmérése a konzervációbiológia egyik legfontosabb célja. Napjainkra már számos technika közül válogathatunk, ha a genetikai diverzitás felderítése a célunk, ezek közül az egyik legnépszerűbb a mikroszatellita genetikai markerek (más néven STR, SSR) alkalmazása [1].

Az utóbbi időben a kutatók egyre többször szavaztak bizalmat mikroszatellita markerek alkalmazásának, a biológia legkülönbözőbb területein végzendő kutatásaikhoz, ugyanis, alkalmazásuk számtalan előnnyel jár [2]. E markerek használatának vannak azonban hátrányai is, melyek közül talán a leggyakoribb, hogy a lókuszok (és a flanking régiók) polimorfizmusa következtében nincsenek hozzájuk olyan univerzális primerek, melyek képesek homológ PCR termékek amplifikációjára a fajok széles spektrumán átívelően [3].

Új mikroszatellita markerkészletek kifejlesztése az egyes fajokra hosszú évekig rengeteg pénzt és időt felemésztő vállalkozásnak számított. Manapság viszont a genomika fejlődésével, új stratégiák és protokollok bevezetésével olcsóbbá vált e markerek *de novo* kifejlesztésének folyamata. Egy adott fajra specifikus mikroszatellita marker tervezéséhez nagy vonalakban a következő protokollt kell követni: első lépésben valamilyen technikával találni kell egy ismétlődéseket tartalmazó DNS szakaszt, valamint azonosítani az ezt szegélyező („flanking”) régiók nukleotid szekvenciáját, hogy meg lehessen tervezni a komplementer primerpárt. Következő lépésben optimalizálni kell a PCR reakciók körülményeit, majd sok egyeden tesztelni a lókuszt, hogy információt kapjunk polimorfizmusának mértékéről [4]. Mindig van lehetőség fajonként külön-külön markerkészletet kifejleszteni, de súlyos anyagi vonzatai miatt gyakran tesztelnek egy adott fajnál polimorfizmus mutató markert közel rokon fajokon is („cross-species testing”).

Habár a primerek nem univerzálisak, egy adott fajra kifejlesztett párjuk viszonylag tág taxonómiai kereteken belül eredményezhet sikeres mikroszatellita felszaporítást, melyet kereszt-, angolul „cross-species” amplifikációnak nevezünk [5]. A „cross-species” amplifikációt illetve polimorfizmust számos tényező befolyásolja, ilyen 1. az eredeti/forrás fajok, („source” species; melyekre az adott primert kifejlesztették), és a kereszt-reakcióban

résztevő fajok, más néven fókuszfajok („target” species) közötti filogenetikai távolság, 2. az esetlegesen fennálló homoplázia, 3. az STR szakasz felszaporításához beállított PCR program anellációs hőmérséklete és 4. a marker forrásfajban megfigyelhető variabilitásának foka [3]. Ezzel ellentétben nem találtak kapcsolatot a „cross-species” amplifikáció sikeressége és a lókuszt repeat motívuma (pl.: di-, tri-, vagy tetranukleotid) illetve struktúrája (pl.: tökéletes, tökéletlen vagy összetett) között [3]. A kereszt-amplifikáció sikere, valamint a forrás- és fókuszfajok evolúciós szétválásának ideje közötti viszonyt sok vizsgálatban elemezték, a madaraknál különösen széles fajspektrumot vizsgálva [4–7].

Ahhoz, hogy a fenti vizsgálatokat elvégezhessek, elengedhetelen az interspecifikus genetikai távolságok megállapítása. Ezt általában olyan markerekkel érdemes elvégezni, melyek már sok fajra elérhetőek az adatbázisokban (pl. mitokondriális *cox1* vagy citokrom-b gének szekvenciái) [8, 9]. A fentebb említett kérdésre vonatkozó eredmények összhangban vannak egymással annyiban, hogy a forrás- és a fókuszfaj közötti genetikai távolság, azaz evolúciós elválási idejük növekedésével csökken a „cross-species” amplifikáció sikere és a marker polimorfizmusa, ennek mértéke azonban taxononként változó [3].

A homoplázia azért játszik fontos szerepet a körüljárt kérdéskörben, mivel abban az esetben is sikeresnek mutakozhat a kereszt-amplifikáció, amennyiben a forrás- és fókuszfajban csupán egymástól függetlenül akultak ki a PCR primerek bekötését lehetővé tevő, hasonló szekvenciájú genomi régiók, mely az aspecifikus „PCR-műtermékek” felszaporodását okozhatja, és ezáltal a marker fókuszfajban való alkalmazását is megnehezítheti.

Egy másik általános szabály, hogy minél alacsonyabb anellációs hőmérsékletet adunk meg egy PCR programnál, annál inkább megnő az esély arra, hogy a „cross-species” felszaporítás sikeresnek bizonyul, illetve, hogy a tesztelt mikroszatellitánál polimorfizmust detektálunk, függetlenül a két faj közti genetikai távolságtól. Ennek oka, hogy a primerek kötődéséért felelős, adott mikroszatellitát szegélyező flanking-régiók rendszertanilag széles körben megtalálhatók, igaz sokszor számos mutációt felhalmozva, a hőmérséklet csökkentésével pedig lehetőség nyílik arra, hogy a primerek hozzákötődjenek ezekhez a nem egészen homológ szakaszokhoz, másképpen kifejezve kisebb lesz a maximális anellációs hőmérséklet, melyen heterológ amplifikáció még lehetséges [3]. Végül egy olyan tendencia is felállítható, miszerint minél nagyobb fokú variabilitás figyelhető meg egy SSR lókusznál az eredeti fajban, a célfajok annál nagyobb körében detektálható polimorfizmus a vizsgált markerre nézve [3].

Összefoglalva, korunkig számtalan kutatást szenteltek a „cross-species” amplifikáció különböző taxonok körében végzett vizsgálatának [1, 5, 6, 10–13], ennél fogva napjainkra már számos ismerettel rendelkezünk, melyek segíthetnek kiindulópontot nyújtani a jövő kutatói számára, hogy milyen tényezőket érdemes szem előtt tartani, amennyiben céljuk, egy adott fajban leírt primer készlet más élőlényeken való, sikeres kereszt-amplifikációs tesztelése.

1.2 Mikroszatelliták

A mikroszatelliták, egyéb neveiken STR-ek (short tandem repeats) vagy SSR-ek (simple sequence repeats), repetitív DNS szakaszok, melyeken belül bizonyos, 1-6 nukleotid hosszúságú motívumok, ismétlődnek tandem módon elrendeződve. Az ismétlődő szakaszok szekvenciáját tekintve, lehetnek tökéletes, tökéletlen, megszakított valamint összetett típusaik, az egyes motívumok hossza alapján csoportosítva pedig mono-, di-, tri-, tetra-, penta- valamint hexanukleoid ismétlődések [14]. Megtalálhatók az összes, eddig vizsgált genomú élőlény örökítőanyag-állományában, még hozzá azok jelentős részét kiteve [15]. Túlnyomó hányadukkal a fehérjéket nem kódoló, míg kisebb részükkel a kódoló régiókban is találkozhatunk [16]. Abnormális expansziójuk összefüggésbe hozható számos emberi betegség, például a Huntington-kór, a törékeny X-szindróma vagy a dystrophia myotonica 1-es és 2-es típusának kialakulásával, melyek jelentős részében a trinukleotid motívumok kódoló régiókbeli felszaporodása felelős [17–19]. Az mikroszatellita régiók felfedezése óta számos szerepükre derült fény. Szerepet játszanak a génextpresszió szabályozásában, az „alternative splicing” folyamatában, a kromatin organizációban és a meiotikus rekombinációban is [15, 17]. A mikroszatelliták eloszlása a kódoló és nem kódoló régiókban, összdenzitásuk, illetve az egyes mikroszatellita típusok előfordulásának aránya a genomban taxonspecifikus. A gerincesek között a madarak genomjában a legalacsonyabb ezen DNS szakaszoknak az aránya [16, 20].

Genetikai markerként való alkalmazásukat számos tényezőnek köszönhetik. Először is, módfelett gyakoriak az élőlények örökítőanyag-állományában, így kellő számban állnak tudósok rendelkezésére. Másodszor, igen nagy variabilitással bírnak, a legtöbb lókuszon többszörös allélizmust találunk, sokszor igen nagy allélszámmal [2]. Ennek oka, hogy a mikroszatelliták a genom többi részéhez viszonyítva, sokkal magasabb mutációs rátával (10^{-2} - 10^{-6} nukleotid/lókuszt/generáció) jellemezhetők, főként a DNS replikációkor bekövetkező csúszás („slippage”) nevű jelenség következtében, mely során a lókuszt ismétlődő motívumainak száma megváltozik). [14, 15, 21]. Harmadszor, ezen DNS szakaszok

autoszómálisak, vagyis biparentálisan, rekombinálandóva öröklődnek, így jobban használhatók például leszarmazási vagy populációgenetikai vizsgálatokban, mint a haploid és uniparentális organellelumi lokuszok. Ráadásul kodomináns markerek, vagyis a heterozigóták azonosítása is lehetséges, ellentétben pl. a domináns/recesszív RAPD vagy miniszatellita technikákkal [2]. Negyedszer, mivel felszaporíthatók PCR technológiával, olyan esetekben is dolgozhatunk velük, mikor mindössze csekély mennyiségű vagy minőségű (ún. low-copy number) DNS minta áll rendelkezésünkre. Így non-invazív minták (pl. egy rejtett életmódot folytató madár levedlett tollában található vérrög) vagy igazságügyi minták (pl. egy bomlásnak indult tetem) esetén is jó eséllyel alkalmazhatók. [22, 23]. Ötödször, a PCR-primereket általában a repetitív régiók melletti (ún. flanking) DNS szakaszokhoz tervezik. [2]. A közel rokon taxonok mikroszatellitáinak flanking régiói pedig gyakran konzerváltak, így egy adott fajra kifejlesztett primer-készlet számos esetben sikeresen alkalmazható közel rokon fajok esetében is [24]. A fajok közötti filogenetikai távolság növekedésével egyre több mutáció halmozódik fel, mind a mikroszatellitákban, mind flanking-régióikban, ennél fogva kijelenthető, hogy egy adott forrásfajban polimorfnek mutató marker sikeres PRC-es amplifikációjának valamint polimorfizmusának valószínűsége csökken a forrás- és a vizsgált faj közti filogenetikai távolság növekedésével [3, 5, 6].

A mikroszatellita markerek felhasználása rendkívül széleskörű, ugyanis azonkívül hogy a genetikai diverzitás felmérésére használják őket konzervációgenetikai kutatásokban [25], számos egyéb területen is alkalmazzák képviselőiket. Így pl. genetikai térképek készítéséhez [26, 27], bűnügyek felderítéséhez [28–30], egyedi azonosításhoz [31], populációgenetikai [32], apasági [33], rokonsági vizsgálatokhoz [34, 35], beltenyésztettség monitorozására [36, 37], és közel rokon fajok filogenetikai rekonstrukciójához is [38].

1.3 Papagájok

A papagájalakúak (*Psittaciformes*) a madarak osztályának egyik módfelett diverz rendjét képviselik, ugyanis fajaik jelentős változatosságot mutatnak morfológiájukban és ökológiai funkciójukban egyaránt. Több mint 400 faj tartozik a rendbe, melyeket a legfrissebb filogenetikai vizsgálatok három családsorozatba (*Strigopoidea*, *Cacatuoidea*, *Psittacoidea*) osztanak [39, 40]. 124 országban találkozhatunk képviselőikkel, az északi szélesség 35° és a déli szélesség 56° foka között, elsősorban a Föld trópusi és szubtrópusi vidékein [41, 42]. Széleskörű elterjedésük ellenére jelenleg élő fajaik közel harmada (29%) fenyegetettséget jelző besorolással (sebezhető, veszélyeztetett vagy súlyosan veszélyeztetett) szerepel a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) Vörös Listáján [43]. Ezt az a tény is

indokolja, hogy fajaik száma gyorsabban apad a többi, hasonló madárrendben megfigyeltékhez képest [44].

Napjainkra élőhelyük folyamatos pusztítása következtében erősen lecsökkent a fészkelésre alkalmas faodvak száma, illetve a megfelelő táplálkozóhelyek mennyisége is [45, 46]. A mezőgazdaság terjeszkedése miatt pedig egyre gyakoribbnak számítanak az állatok és gazdálkodók közti konfliktusok, hiszen az előbbieket természetes élőhelyeiket kultúrnövények ültetvényei váltják fel, és a madarak a telepített gyümölcsfák terméseit elfogyasztva jelentős kárt okozhatnak a gazdáknak. Ez az oka, hogy a megkárosított gazdálkodók megpróbálják minden eszközzel ritkítani a „károsnak” ítélt madarak állományait, így az említett madárrend képviselőit is [28, 47].

A *Psittaciformes* rendbe sorolt fajok kivételes, sok-sok színben pompázó tollazattal, lenyűgöző utánzási képességgel és megkapó természettel bírnak, mely tulajdonságok népszerű és értékes hobbiállattá teszik őket. A kereskedelemben kapható egyedeknek viszont csupán kis hányada származik az e célból tenyésztett állományokból, nagyobb részük illegális befogásból (fészekrablásból vagy csapdázásból) és kereskedelemről eredeztethető [28, 29, 48, 49]. Egyes esetekben, ezen illegális tevékenységek egy-egy faj vadonból történő teljes kihalásához is vezethetnek. [48, 49]. A nagy nyereség (egy-egy ritkább madárnak rendkívül magas az értéke) és az alacsony kockázat (az e téren folytatott büntetőeljárások ritkák, és a kiszabott büntetések sem elég szigorúak) pedig kedvez az illegális tevékenységek fennmaradásának. [50].

Szintén az ember felelős egyes idegenhonos inváziós fajok papagájok élőhelyére történő behurcolásáért, melyek gyakran a bennszülött fajok predátoráivá avagy kompetitoráivá válnak. Különösen jelentős ez a kár Óceánia papagájai körében [51]. Az említettekén kívül végül a globális felmelegedés is kedvezőtlenül hat egyes papagájfajokra. Fokozottan igaz az előző állítás az erősen specialista fajokra, mint amilyen a barnafejű hollókakadu egyik alfaja (*Calyptorhynchus lathami halmaturinus*), mely kizárólag Ausztrália Kenguru-szigetén él, ráadásul elkülönült, szigeti elterjedése mellett csupán egyetlen növényfajra (*Allocasuarina verticillata*) épül étrendje [52].

Részben az ismertetett antropogén veszélyforrásoknak köszönhetően a papagájfajok egyre több figyelmet kapnak, és egyre gyakrabban szerepelnek olyan kutatásokban, melyek célja e taxonok alaposabb megismerése, védelmének, jövőbeli fennmaradásának biztosítása. A molekuláris ökológia fejlődése nagyban hozzájárult ahhoz, hogy teljesebb megismerést

kaphassunk, mind a vadon élő, mind a fogságban tartott papagájokat illetően. A genetikai markerek segítségével pontos filogenetikai fákat készíthetünk, nyomon követhetjük korai diverzifikációjukat és recens populációik variabilitását, lényeges egyedi és populációsintű információkat kaphatunk róluk, melyek fontosak lehetnek a fajok megőrzésének szemszögéből, vagy éppen bővíthetjük a rég kihalt papagájfajokról szerzett ismereteinket [53].

2 Célkitűzések

Szakkolgozatomban három kérdésre kerestem a választ:

1. Milyen mértékben alkalmas fajok közötti („cross-species”) használatra a szakirodalomból kiválasztott tíz mikroszatellita marker az *Arinae* alcsalád fajaiban?
2. Hogyan módosul a tesztelt mikroszatellita markerek variabilitásának mértéke a fókuszfajokban a forrásfajoktól számított filogenetikai távolság függvényében?
3. Milyen mértékű a beltenyésztettség néhány *Ara* faj hazai tenyészállományában?

Munkám célja egy olyan polimorf mikroszatellita markerkészlet kialakítása volt, mely alkalmas finom felbontású genetikai vizsgálatok kivitelezésére, nemcsak a forrás-, de a fókuszfajokban egyaránt, így például genetikai térképek készítéséhez, igazságügyi vizsgálatokhoz, populációgenetikai vizsgálatokhoz és közel rokon fajok filogenetikai rekonstrukciójához is. Továbbá felállítani egy tendenciát a vizsgált markerek kereszt-amplifikációja során tapasztalt markervariabilitás és a forrás- és fókuszfajok között mért genetikai távolság között. Ezenfelül áttekintést nyújtani egyes fajok genetikai diverzitásáról a hazai tenyészállományt tekintve, mely megfelelő útmutatást biztosíthat a jövőre nézve, hogy a tenyésztők kellő nagyságrendű genetikai sokféleséget érhessenek el szaporított madaraik körében.

3 Anyag és módszer

3.1 A fajok kiválasztása

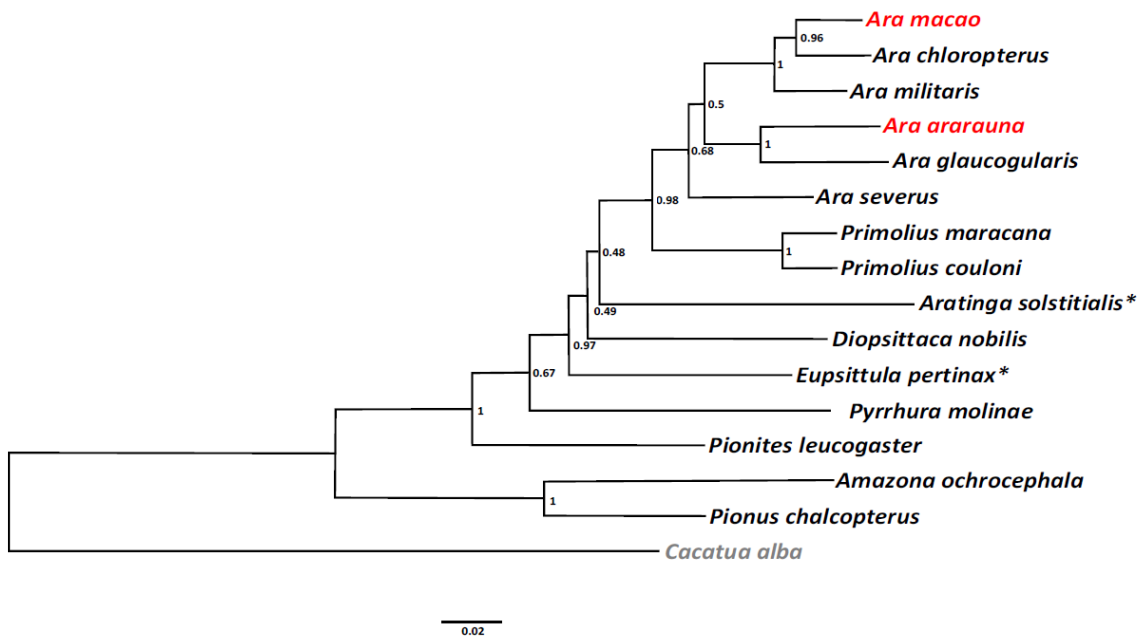
A kereszt-amplifikációkat az *Arinae* alcsalád bizonyos fajain végeztem, melyek közkedvelt tulajdonságaik révén rendkívül népszerű társállatnak számítanak, számtalan tenyésztő foglalkozik szaporításukkal világszerte, így hazánkban is. E tényt kihasználva tudtam kutatásomat kizárólag magyar tenyésztők madaraiból származó mintákra alapozni, melyek többnyire valamilyen szövetminta (toll vagy vér) formájában érkeztek be 2016-2022 között az Állatorvostudományi Egyetem Ökológiai Tanszékén működő szolgáltató laboratóriumba (Aquilabor). Vizsgálatomat megelőzően már elvégezték ezen minták molekuláris szexálását, ezért nem kellett DNS-t izolálnom belőlük. Az egyes minták vizsgálatba történő beválogatásánál a következő szempontokat tartottam szem előtt: 1. Mindegyik faj az *Arinae* alcsalád tagja legyen, 2. Lehetőség szerint minél több nemből, többnyire csak egy-egy faj kerüljön a vizsgálatba. 3. Minden fajból álljon rendelkezésre kellően nagy mintaszám (legalább 10 minta/faj, kivéve azon fajoknál, ahol a beltenyésztettség mértékére is kíváncsi voltam, itt körülbelül 20 minta/faj). 4. Ezek a minták lehetőleg különböző tenyésztőktől származzanak (maximum 2-3 madár/tenyésztő), ezzel elkerülendő, hogy a vizsgált egyedek közeli rokonságban álljanak egymással, ami jelentősen csökkentené a fajon belüli variabilitást. A felsorolt kritériumok betartásával kilenc nem 17 fajának 163 egyedén végeztem el az analíziseket (Bővebben lásd 1. táblázat, 1. és 2. ábra).

1. táblázat: A vizsgálatához kiválasztott fajok. (A zárójeles adatnál az egyik DNS minta elfogyott.)

Latin név	Magyar név	Egyedszám	Tulajdonosok száma
<i>Ara ararauna</i>	Kéksárga ara / Ararauna	20	19
<i>Ara chloropterus</i>	Zöldszárnyú ara	21	19
<i>Ara macao</i>	Sárgaszárnyú ara / Makaó	17	13
<i>Ara ambiguus</i>	Zöld ara	4	2
<i>Ara glaucogularis</i>	Kéktorkú ara	2	1
<i>Ara severus</i>	Barnahomlokú ara	1	1
<i>Ara militaris</i>	Katonaara	4	2
<i>Primolius maracana</i>	Maracana-ara	10	4
<i>Primolius auricollis</i>	Sárganyakú ara	10	3
<i>Primolius couloni</i>	Kékfejű ara	2	1
<i>Diopsittaca nobilis</i>	Északi törpeara	10	7
<i>Eupsittula aurea</i>	Aranyhomlokú aratinga	10 (9)	6
<i>Aratinga jandaya</i>	Jandaya-aratinga	10	10
<i>Pionites leucogaster</i>	Rozsdássapkás papagáj	10	9
<i>Pyrrhura molinae</i>	Molina-papagáj	11	10
<i>Pionus chalcopterus</i>	Bronzszárnyú papagáj	10	9
<i>Amazona ochrocephala</i>	Sárgahomlokú amazon	11	10



1. **ábra:** A vizsgálatba bevont fajok, kiemelve nagyobb képen a két forrásfajt. a: *Ara ararauna*, b: *Ara macao*, c: *Pionites leucogaster*, d: *Pionus chalcopterus*, e: *Pyrrhura molinae*, f: *Amazona ochrocephala*, g: *Aratinga jandaya*, h: *Primolius maracana*, i: *Primolius auricollis*, j: *Primolius couloni*, k: *Eupsittula aurea*, l: *Diopsittaca nobilis*, m: *Ara ambiguus*, n: *Ara severus*, o: *Ara glaucogularis*, p: *Ara militaris*, q: *Ara chloropterus*



2. **ábra:** A vizsgált fajok ML filogramja. Pirossal jelölve a két forrásfajt, szürkével a kulcsoport. A * jelzi azokat az eseteket, ahol nem a vizsgálatban szereplő fajt, hanem csak egy másik, de ugyanabba a nembe tartozó faj adatait találtam meg az GenBank adatbázisában.

3.2 A markerek kiválasztása

Vizsgálatomhoz sárgaszárnyú arában (*Ara macao*) illetve kéksárga arában (*Ara ararauna*) leírt markereket választottam, melyek mindegyikét már korábban publikálták [54, 55]. Az említett két forrásfaj egyaránt szerepel az IUCN vörös listáján, így nem meglepő, hogy napjainkra már számos markert írtak le bennük. A publikált markerek ismétlődő motívumaikat tekintve egységesen dinukleotid ismétlődéseket tartalmaztak, és többnyire 100-300 bázispár hosszúságú PCR-termékeket adtak (2. táblázat).

2. táblázat: A tesztelt markerek és primereik jellemzői

Locus	Forrásfaj	Ismétlődő szakasz	Várható fragmenshossz	Festék	Primer szekvencia (5'-3')	PCR program
SCMA01		(AC) _n	161–197	HEX	F: *ATGGTAGAGGGAGGCACTGA R: GCATGGTATAAGGCCCATCT	
SCMA12		(AC) _n	280–308	HEX	F: *GGTGGAGCACATTGCTGAAA R: CAAAGATGCCACCCAAA	
SCMA19		(GT) _n	270–300	ROX	F: *AGCGCATCTGCCTAGATGTT R: TAATCCACAGCACCACCAAG	
SCMA22	<i>Ara macao</i>	(TG) _n	114–160	FAM	F: *AACTGTGATGAAGTTCGTGGC R: CAACGGCTACACACAGTGCT	SCMA_56-51td
SCMA27		(CA) _n	211–245	HEX	F: *TTCTGCAGCAGTTCCCAA R: TGGACTCTGTATTCCAGTCGC	
SCMA28		(TG) _n	280–330	HEX	F: *GAAGCAAAGTTCATGCTG R: CCATTATGATCAGATTTCCGC	
SCMA44		(AC) _n	280–308	FAM	F: *GGTGGAGCACATTGCTGAAA R: CAAAGATGCCACCCAAA	
UnaCT21		(GT) _n (CTT)(GT) _t	245–273	FAM	F: CTTTCCATACTTAGCCATA R: AGACATTTCAAGACCGTGCC	UnaCT_50
UnaCT32	<i>Ara ararauna</i>	(GT) _n	258–276	ROX	F: TCTTGCTTATTCTTCCCCAG R: ACCACCACCAGGAAGCACGG	UnaCT_53
UnaCT43		(GT) _n	199–219	FAM	F: TCATCCTATCACCAGAAGGG R: CTTGAGGACAGTGCAGAGGG	UnaCT_60

3.3 Polimeráz-lánreakció

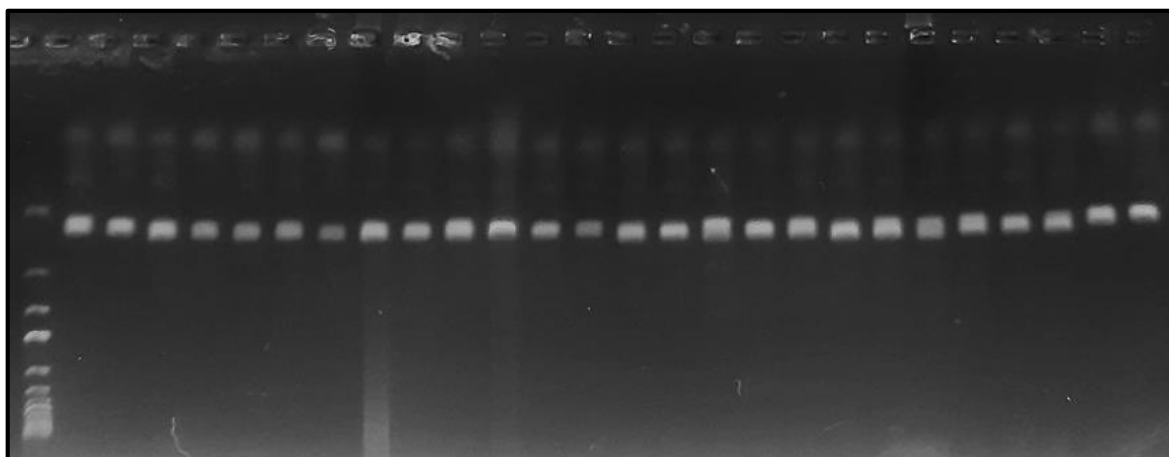
A PCR reakciók összeállításához 5xFIREPol® Master Mixet (Solis BioDyne) használtam, mely DNS-polimerázt, színes felvivőfestéket, magnézium-kloridot (MgCl₂) és dNTP-eket (dezoxi-nukleotid-trifoszfátok) tartalmaz. Az alkalmazott primerpárokban a forward irányú primerek mindegyike fluoreszcens jelöléssel (HEX, ROX és FAM) volt el látva, lehetővé téve az amplifikáció során keletkezett PCR termékek kapilláris-elektroforézissel történő vizualizációját, és ezzel az allélméreték pontos meghatározását [56].

A PCR-ek összeállításához a következő receptet követtem (1 mixre lebontva): 2 μ l 5xFIREPol® Master Mix (Solis BioDyne), 10-10 pmol primerkötél (forward, reverz primer), 4 μ l nukleázmentes víz és 50 ng DNS, tehát az össztérfogat 10 μ l-nek adódott.

A kéksárga arákban publikált markereknél egyszerű PCR-ciklust használtunk (denaturálás 95 fokon 30 mp-ig, anelláció 60 fokon 45 mp-ig, elongáció 72 fokon 45 mp-ig, 37 ismétléssel), míg a sárgaszárnyú arákban leírtakban touchdown PCR program segítségével történt az amplifikáció, (az anellációs hőmérsékletet 56 fokról fél fokként csökkentve 12 cikluson át, majd 51 fokon 25 ciklussal), az aspecifikus termékek felszaporítását megelőzendő. A PCR programok SuperCycler SC-200 (Kyratec ©), LifeECO Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology Co.) és Biometra TOne 96 G (Analytik Jena GmbH©) PCR-készülékeken futottak.

3.4 Agaróz-gélelektroforézis

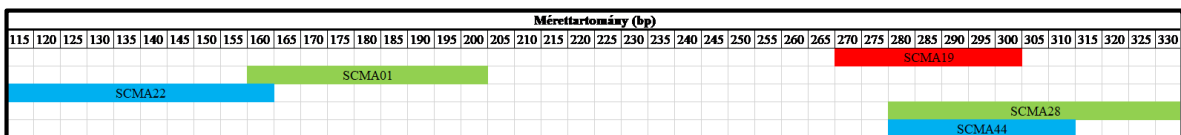
A PCR-reakciók eredményét és a kapott PCR-termékek hosszának durva becslését agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztem (3. ábra) [57], nevezetesen hogy milyen minőségű (specifikus/aspecifikus) illetve mennyiségű (határozott vonal/halvány csík a gélen) amplikon keletkezett. A futás 2%-os agaróz gélen, 100 V feszültséggel, kb. 45 percig, GeneRuler 1 kb vagy GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific™) DNS létrát használva történt. A megfelelőnek tűnő termékeket továbbküldtük kapilláris-elektroforézisre a BIOMI Kft. részére (Gödöllő).



3. ábra: Kép egy sikeres agaróz-gélelektroforézisről, melyen az ábra nagy részén felsorakozó keskeny csíkok az egyes egyedekhez tartozó PCR termékeket, míg az ábra szélén található vonalkomplexum a létra fragmentumait jelzi.

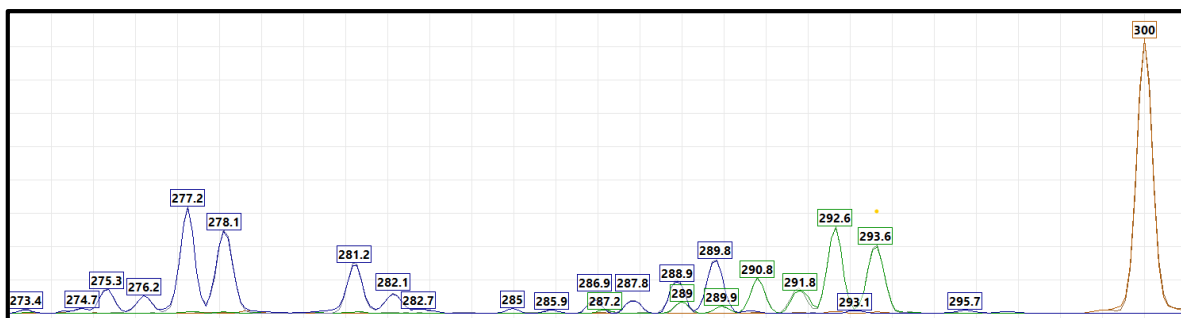
3.5 A markerek polimorfizmusának detektálása kapilláris-elektroforézissel

Az agaróz-gélelektroforézis alapján pozitívnak bizonyult PCR termékeket továbbküldtük kapilláris-elektroforézisre. A singleplex amplikonokat összevegyítettük, a 10 lókuszt két panelbe rendezve, 5-5 lókusszal (egy csőbe kizárólag egyetlen egyedhez tartozó lókuszok kerültek). Ezen felül azt is szem előtt tartottam a munka során, hogy az egy csőbe kerülő markerek eltérő színű fluoreszcens jelöléssel rendelkezzenek a várhatóan hasonló/átfedő hosszúságú amplikonok elkülönítése céljából (4. ábra).



4. ábra: A kapilláris-elektroforézisre összeválogatott, öt lókuszt tartalmazó panel. Színes téglalapok jelzik a várt PCR-termékek mérettartományát és a fluoreszcens festés színét.

Az egyes PCR termékek hossz szerinti elkülönítését OSIRIS program segítségével végeztem (5. ábra) [58].



5. ábra: A kapilláris-elektroforézis eredmények, megjelenítése OSIRIS programban, ahol a kék és zöld csúcsok két eltérő lókuszt reprezentálnak, míg a sárga görbe a létra egyik fragmentjét jeleníti meg. A csúcsok felett megjelenő szám a detektált fragmensek bázispárban kifejezett hosszát hivatott kifejezni.

Az allélek detektálásánál fontos volt, hogy minimalizáljuk a genotipizálási hibákat, vagyis hogy elkülönítsük a tényleges alléleket a műtermékektől, és hogy a később használt variabilitási mérőszámok (allélek száma, heterozigócia) is valósak legyenek. Ezért a dadogásból („stutter bands”), a nagyobb méretű allélek kieséséből („large allele dropout”) és a null-allélek jelenlétéből következő genotipizálási hibákat a ML-Relate és a Micro-Checker programokkal detektáltuk [59, 60].

3.6 A markerek alkalmazhatósága a genetikai távolság függvényében

3.6.1 Törzsfakészítés, a genetikai távolságok kiszámítása

Ahhoz, hogy felállíthassak egy tendenciát, arra vonatkozólag, hogy miképp módosul a tesztelt markerek variabilitása az egyes fókuszfajokban a forrásfajokéhoz képest, a két taxon közti filogenetikai távolság függvényében, ki kellett számítanom a kérdéses genetikai távolságok nagyságát. Erre megfelelők lehetnek a mitokondriális (mtDNS) eredetű markerek, többek között a taxonok széles palettáján ismert szekvenciájú citokróm b (CYTB) és a citokróm oxidáz I (COI) gének, mivel e szakaszok jelentős interspecifikus, ellenben csekély mértékű intraspecifikus variabilitást mutatnak, alkalmassá téve őket fajok közti genetikai különbségek reprezentációjára [61, 62]. E megfontolások szem előtt tartásával, az összes tesztelt faj, említett DNS szekvenciáit az NCBI és a BOLD System adatbázisokból szereztem be, amennyiben rendelkezésre álltak, ahol viszont nem, azokat másik, azonos génuszbeli fajéval helyettesítettem [63, 64]. A letöltött szekvenciákat ClustalX programmal illesztettem, majd meghatároztam a legmegfelelőbb, szekvenciáimra illeszthető szubsztitúciós modellt (MEGA 11 programmal; [65]), mely alapján már kiszámíthattam a fajpárok közötti genetikai távolságokat. E számításokon felül, a könnyebb átláthatóság kedvéért készítettem egy ML módszeren alapuló törzsfát is, az ismertett szekvenciák és szubsztitúciós modell felhasználásával (szintén a MEGA 11 programmal).

3.6.2 Regressziószámítás

A markerek „cross-species” variabilitásának felmérése céljából két változót is használtam, egyrészt a forrás- és fókuszfajokban detektált allélszámok különbségét ($N_{a(\text{fókuszfaj})} - N_{a(\text{forrásfaj})}$), másrészt a megfigyelt heterozigóciák különbségét ($H_{o(\text{fókuszfaj})} - H_{o(\text{forrásfaj})}$), melyekre a későbbiek folyamán, az egyszerűség kedvéért, csak mint N_{a_X-O} és H_{o_X-O} hivatkozom.

A regressziószámítást és annak eredményeinek bemutatását R-ben végeztem [66]. Munkámhoz két R csomagot használtam, az nlme-t a lineáris kevert modellek konstruálásához [67, 68], illetve a ggplot2-t a szemléltető ábrák elkészítéséhez [69]. Mikor a tesztelt markerek fókuszfajonként tapasztalt variabilitását vizsgáltam a forrásfajtól számított genetikai távolság függvényében, a tesztelt lókusztokat, mint random hatást megadva, lineáris kevert modell felállításával történt a munka, mikor viszont az említett viszonyt lókuszonként, külön-külön néztem, egyszerű lineáris modell segítségével zajlott a vizsgálat.

3.7 A beltenyésztettség mérése a kiválasztott fajokban

Azon fajok (*Ara macao*, *Ara ararauna*, *Ara chloropterus*) esetében, ahol kellő mennyiségű, hazai tenyészállományból származó madár mintáival rendelkezttem, a beltenyésztettséget is felmértem, különböző mutatók kiszámítása által. Ily módon megállapítottam a rokon és nem rokon madarak arányát (ML-Relate alkalmazásával), a megfigyelt (H_o) és a várt heterozigócia (H_e) értékét (Arlequin használatával; [70]), valamint a F_{is} értékeket (Fstat programmal; [71])

4 Eredmények

4.1 A markerek alkalmazhatósága a vizsgált fajokban

Szinte az összes vizsgált fajban az összes vizsgált markerben történt amplifikáció a PCR során, mindössze három fajnál, egyes lókusokban nem kaptunk terméket. Nevezetesen az *Ara severus* esetében az UnaCT32-es lókus, illetve a *Pionus chalcopterus*nál az UnaCT32-es és SCMA19-es, valamint az *Amazona ochrocephala* esetében az SCMA01-es lókusznál nem keletkezett PCR termék, a többi szituációban viszont legalább egy allélt sikerült detektálnom fajonként. A vizsgált 16 fajból tízben találtunk legalább egy olyan markert, amely monomorf volt, noha meg kell említeni, hogy három fajban csak egy vagy két egyed állt a rendelkezésünkre. Az esetek túlnyomó hányadában legalább két allélt detektálni tudtam, azaz sikerült bizonyítani viszonylag tág taxonómiai keretek között az említett markerek variabilitását. A részletes „cross-species” adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: Összefoglalás markereim alkalmazhatóságáról a tesztelt fajokban, ahol szürke cellákban az egyes lókusok származási cikkében szereplő, forrásfajokhoz tartató értékekkel találkozhatunk, az N a rendelkezésre álló mintaelemszámot, a range a kapott allélek fragmenshossz tartományát, az N_a a tapasztalt allélszámot a H_o pedig a megfigyelt heterozigóciát jelenti.

Fajok	N	Locus	UnaCT43	UnaCT21	UnaCT32	Fajok	N	Locus	SCMA27	SCMA12	SCMA22	SCMA44	SCMA01	SCMA28	SCMA19
<i>Ara ar.</i>	49	Range	199–219	245–273	258–276	<i>Ara m.</i>	40	Range	211–245	280–308	114–160	280–308	161–197	280–330	270–300
		N _a	9	11	8			N _a	14	13	18	13	16	22	15
		H _o	0,88	0,87	0,62			H _o	0,95	0,85	1,00	0,85	0,70	0,95	0,95
<i>Amazona o.</i>	11	Range	198–213	281	251–299	<i>Amazona o.</i>	11	Range	171	273–300	159–166	265–291	-	283–302	278
		N _a	6	1	2			N _a	1	9	3	10	-	9	1
		H _o	0,73	0,00	0,78			H _o	0,00	0,64	0,80	1,00	-	0,89	0,00
<i>Ara am.</i>	4	Range	203	235–252	259–261	<i>Ara am.</i>	4	Range	162–195	278–282	227–235	284–292	214–226	278–282	284–292
		N _a	1	2	2			N _a	3	3	4	4	2	3	3
		H _o	0,00	0,50	1,00			H _o	1,00	1,00	1,00	1,00	0,25	1,00	0,75
<i>Ara ar.</i>	20	Range	197–219	248–270	261–279	<i>Ara ar.</i>	20	Range	156–209	276–302	213–223	278–294	202–236	276–302	276–300
		N _a	10	8	10			N _a	15	13	4	7	8	13	10
		H _o	0,85	1,00	0,90			H _o	0,89	0,95	0,53	1,00	0,90	0,90	0,90
<i>Ara c.</i>	21	Range	195–201	244–274	261–285	<i>Ara c.</i>	21	Range	169–191	282–302	213–241	280–296	198–240	282–302	284–304
		N _a	4	7	11			N _a	12	10	9	7	12	10	10
		H _o	0,75	0,90	0,75			H _o	0,95	0,90	0,85	0,92	0,81	0,95	0,95
<i>Ara g.</i>	2	Range	199–201	250–262	261–273	<i>Ara g.</i>	2	Range	165–177	277–285	225–229	271	210–216	280–284	275
		N _a	2	2	2			N _a	2	3	2	1	2	3	1
		H _o	1,00	1,00	1,00			H _o	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00
<i>Ara ma.</i>	17	Range	195–218	237–270	263–279	<i>Ara ma.</i>	17	Range	164–200	280–299	203–443	276–296	198–238	274–299	272–298
		N _a	10	10	7			N _a	10	9	12	9	10	10	10
		H _o	0,88	0,75	0,81			H _o	1,00	0,76	1,00	0,83	0,69	0,82	0,88
<i>Ara mi.</i>	4	Range	203	235–252	259–280	<i>Ara mi.</i>	4	Range	162–164	278–282	227–231	284–288	214–228	278–282	280–292
		N _a	1	2	3			N _a	2	3	3	3	3	3	5
		H _o	0,00	0,50	0,75			H _o	1,00	1,00	1,00	1,00	0,67	1,00	0,75
<i>Ara s.</i>	1	Range	218	252	-	<i>Ara s.</i>	1	Range	173	282–296	247	296	232	281–285	282–290
		N _a	1	1	-			N _a	1	2	1	1	1	2	2
		H _o	0,00	0,00	-			H _o	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00
<i>Aratinga j.</i>	10	Range	185	258–266	261–270	<i>Aratinga j.</i>	10	Range	171–202	274–300	161	265–277	208–220	274–300	280–306
		N _a	1	4	3			N _a	9	10	1	5	3	10	4
		H _o	0,00	0,50	0,50			H _o	0,90	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,60
<i>Diosittaca n.</i>	10	Range	193–208	231–252	263–292	<i>Diosittaca n.</i>	10	Range	168–216	278–306	205–221	264–294	198–246	278–306	288–302
		N _a	6	3	5			N _a	6	6	2	7	2	7	4
		H _o	0,71	0,63	0,75			H _o	1,00	0,88	0,13	1,00	0,43	0,88	0,38

3. táblázat (folytatás)

<i>Eupsittula a.</i>	9	Range N _a H _o	185-201 6 0,78	233-262 8 0,78	258-270 3 0,13	<i>Eupsittula a.</i>	10 (9)	Range N _a H _o	168-182 5 0,44	278-298 9 0,67	205-225 5 0,70	266-279 5 0,40	207-238 8 0,90	277-298 9 0,80	288-304 7 0,89
<i>Pionites l.</i>	10	Range N _a H _o	199-230 6 0,90	233 1 0,00	260 1 0,00	<i>Pionites l.</i>	10	Range N _a H _o	157-169 7 0,90	281-313 12 1,00	193 1 0,00	279-309 6 0,70	233-243 2 0,30	281-311 10 0,90	279-292 4 0,60
<i>Pionus c.</i>	10	Range N _a H _o	194-199 2 0,00	223-259 2 0,33	- - -	<i>Pionus c.</i>	10	Range N _a H _o	164-168 2 0,10	278-292 6 0,22	203 1 0,00	268-276 2 0,00	207-213 2 0,50	272-291 4 0,17	- - -
<i>Primolius a.</i>	10	Range N _a H _o	195-205 4 0,50	250-266 7 0,90	265-271 3 0,30	<i>Primolius a.</i>	10	Range N _a H _o	175-187 6 0,70	282-293 5 0,70	221-443 6 0,60	276-286 2 0,50	208-232 6 0,70	282-293 5 0,70	272-294 3 0,30
<i>Primolius c.</i>	2	Range N _a H _o	199-201 2 0,50	237-239 2 0,50	269 1 0,00	<i>Primolius c.</i>	2	Range N _a H _o	173-192 3 1,00	278-291 3 1,00	219-235 3 1,00	276-280 2 1,00	212-216 2 1,00	278-291 3 1,00	288-294 2 1,00
<i>Primolius m.</i>	10	Range N _a H _o	195-210 5 0,50	239-264 7 0,80	265-279 5 0,70	<i>Primolius m.</i>	10	Range N _a H _o	167-191 7 0,80	278-292 7 0,90	209-221 3 0,30	264-280 4 0,30	224-250 9 0,90	278-292 7 0,78	290-304 4 0,80
<i>Pyrrhura m.</i>	11	Range N _a H _o	199-209 6 0,55	241-266 9 0,73	262 1 0,00	<i>Pyrrhura m.</i>	11	Range N _a H _o	190 1 0,00	275-281 4 0,82	203-205 2 0,55	264-274 5 0,64	207-231 9 1,00	275-281 4 0,82	278 1 0,00

A Micro-Checker program alkalmazásával nem sikerült kimutatni dadogás vagy „large allele dropout” miatti genotipizálási hibákat egyik fajban és egyik lókuszban sem. Null-allélek előfordulása viszont több esetben is gyanítható volt (lásd 4. táblázat). Felfedezhető egy olyan tendencia, hogy a forrás- és fókuszfaj közötti filogenetikai távolság növekedésével, egyre több lókuszt válik null-allélekkel terheltté (4. táblázat).

4. táblázat: Null-alléles lókusztok száma a genetikai távolság függvényében

Fajok	<i>Ara a.</i>	<i>Ara c.</i>	<i>Ara m.</i>	<i>Primolius m.</i>	<i>Primolius a.</i>	<i>Diopsittaca n.</i>	<i>Eupsittula a.</i>	<i>Aratinga j.</i>	<i>Pionites l.</i>	<i>Pyrrhura m.</i>	<i>Pionus c.</i>	<i>Amazona o.</i>
Gen. táv. a ff.-tól	0,000	0,077	0,079	0,091	0,091	0,104	0,107	0,107	0,122	0,127	0,145	0,159
Null-alléles lókusztok száma	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	2	1
Fajok	<i>Ara m.</i>	<i>Ara c.</i>	<i>Ara a.</i>	<i>Primolius m.</i>	<i>Primolius a.</i>	<i>Diopsittaca n.</i>	<i>Eupsittula a.</i>	<i>Aratinga j.</i>	<i>Pyrrhura m.</i>	<i>Pionites l.</i>	<i>Pionus c.</i>	<i>Amazona o.</i>
Gen. táv. a ff.-tól	0,000	0,040	0,079	0,083	0,083	0,103	0,103	0,108	0,119	0,120	0,151	0,168
Null-alléles lókusztok száma	1	0	0	1	2	0	4	2	2	1	7	5

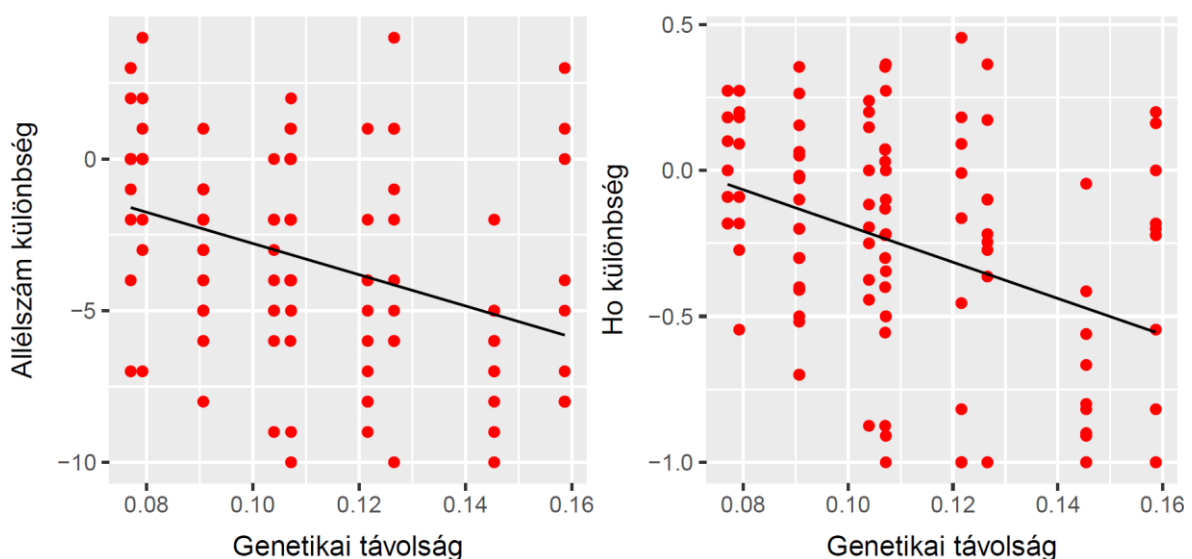
4.2 A markerek alkalmazhatósága a genetikai távolság függvényében

4.2.1 Genetikai távolságok

A fajok közötti genetikai távolságokat a teljes CYTB és teljes COI mitokondriális kódoló gének közös adatmátrixba fűzött adatai segítségével számítottam ki, összesen 2688 nukleotid alapján. A legjobban illeszkedő szubsztitúciós modellnek a HKY+G+I modell adódott, mely figyelembe veszi, hogy az evolúció során a tranzíció/transzverzió ráta nem egyforma, a négy nukleotid gyakorisága eltérő, továbbá, hogy a nukleotid helyek eltérnek a mutációk valószínűségében, valamint, vannak invariábilis (változatlan) pozíciók a szekvenciákban. Az ez alapján számolható, forrásfaj-fókuszfaj genetikai távolságokat a 4. táblázat tartalmazza. Ebből látható, hogy mindkét forrásfaj esetén, a legközelebbi rokon fajnak az *Ara chloropterus* (0,0770 és 0,0396), legtávolabbinak pedig az *Amazona ochrocephala* (0,1587 és 0,1684) bizonyult, az átlagos genetikai távolság pedig 0,1098 és 0,1052 értékű volt a két forrásfajhoz viszonyítva.

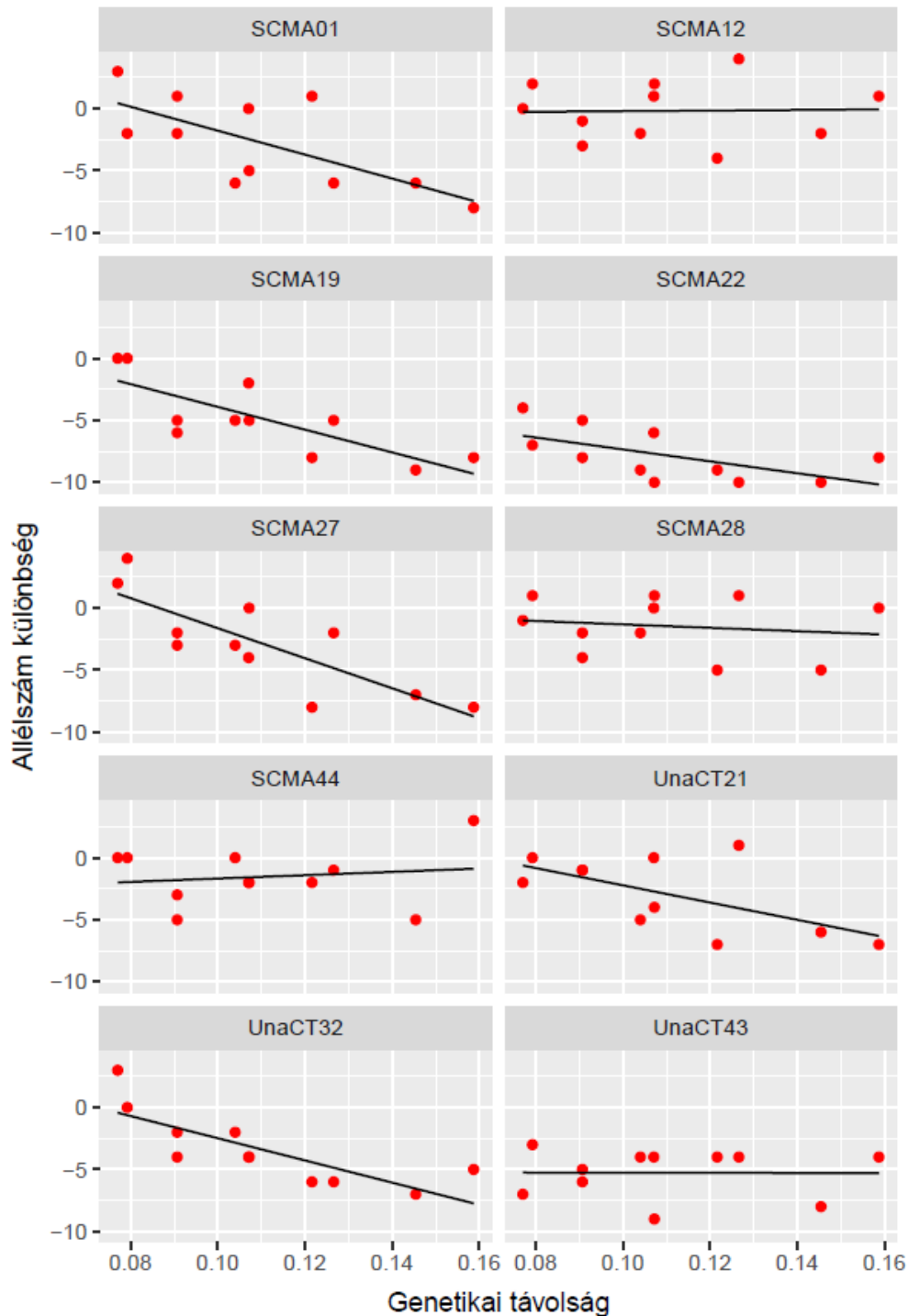
4.2.2 A regressziószámítás eredményei

Mind a tíz markert együttesen vizsgálva (a lókuszt random faktorként alkalmazva) szignifikáns negatív irányú összefüggés mutatkozott a mért variabilitásértékek és a genetikai távolság között: mind a forrásfajhoz viszonyított allélszám (N_{a_X-O}), mind a heterozigócia (H_o_X-O) esetében is (lme, $F=28,8875$, $m=-51,50$, $p<0,0001$ és $F=32,3846$, $m=-6,21$, $p<0,0001$ (6. ábra)). Vagyis minél távolabb volt genetikailag egy fókuszfaj a forrásfajtól, a vizsgált mikroszatellita markerek annál kevésbé bizonyultak variábilisnek.



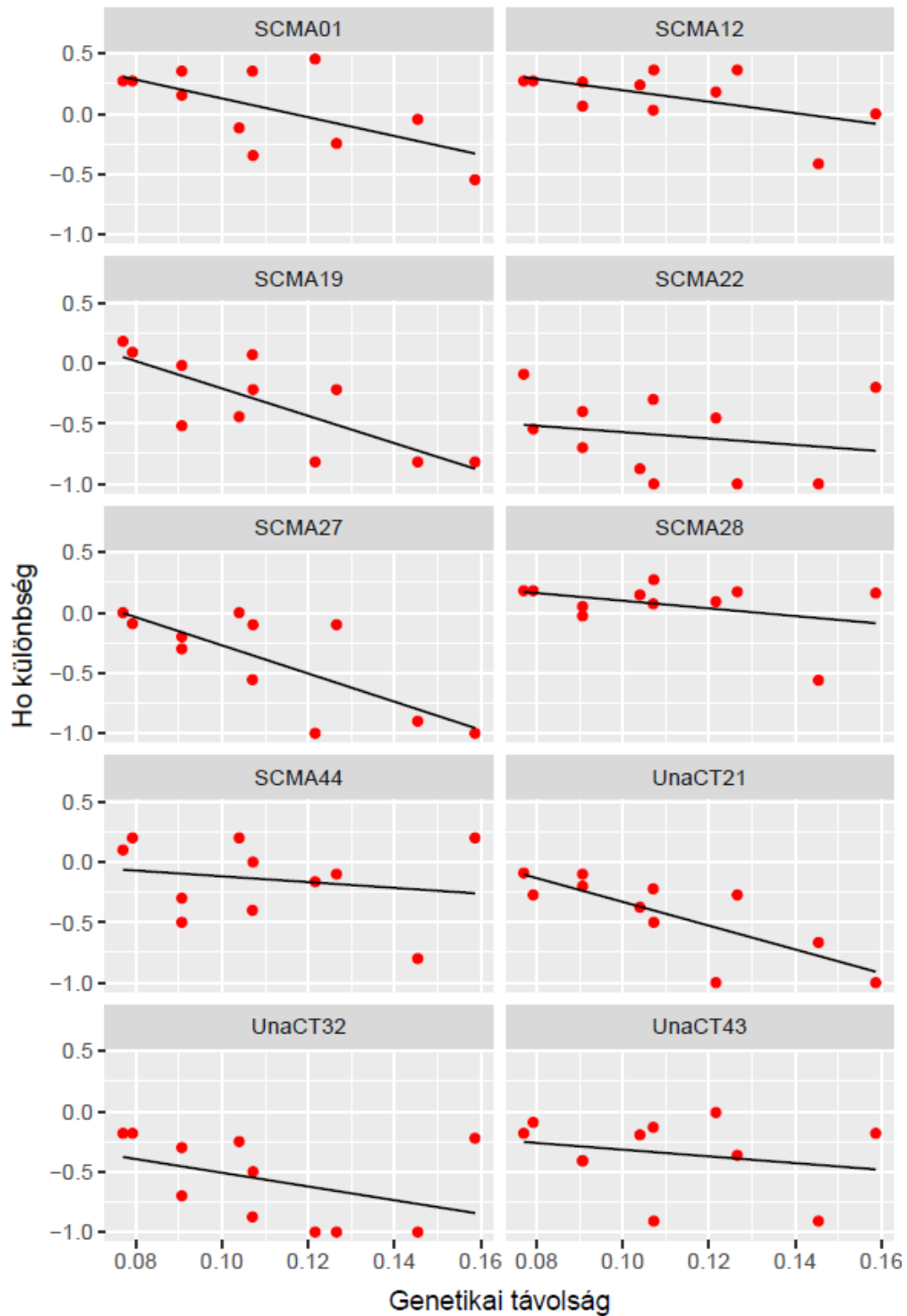
6. ábra: A markerek variabilitása (N_{a_X-O} , H_o_X-O) a genetikai távolság függvényében (lme)

Amikor az allélszámok (N_a -X-O) alakulását lókuszonként külön-külön megvizsgáltuk, tízből hat marker esetében tapasztaltam szignifikáns negatív összefüggést (lm, F: 5,1430-17,7560, m: -121,09-(-48,09), p: 0,0023-0,0495 (7. ábra)). Két marker negatív, de nem szignifikáns viszonyt mutatott (lm, F: 0,0005-0,2160, m: -13,67-(-0,56), p: 0,6531-0,9824 (7. ábra)), míg kettőnél a genetikai távolsággal még enyhén emelkedtek is a variabilitási mérőszámok (lm, F: 0,0061-0,2092, m: 2,42-13,46, p: 0,6583-0,9395 (7. ábra)).



7. ábra: A markerek variabilitása (N_a -X-O) a genetikai távolság függvényében (lm)

Amennyiben viszont a heterozigócia (H_o_X-O) változását vizsgáltam külön-külön lókuszonként, az összes markernél negatív irányú összefüggést fedeztem fel, melyek közül négy volt szignifikáns (lm, F: 5,5195-14,4770, m: -11,68-(-7,79), p: 0,0042-0,0434 (8. ábra)), szemben a másik hat lókusszal (lm, F: 0,3389-3,9356, m: -5,69-(-2,39), p: 0,0786-0,5748 (8. ábra)).



8. ábra: A markerek variabilitása (H_o_X-O) a genetikai távolság függvényében (lm)

Összefoglalásként kijelenthető, hogy mindkét mérőszám esetében, az esetek jelentős részében negatív irányú kapcsolatot fedeztem fel a markerek variabilitása valamint a forrás- és fókuszfaj közötti genetikai távolság között, mely ráadásul számos esetben szignifikánsnak bizonyult. A részletes eredmények az 5. táblázatban olvashatók.

5. táblázat: Összefoglaló a markerek alkalmazhatóságáról a genetikai távolság függvényében, ahol N a rendelkezésre álló mintaelemszámot, N_a a tapasztalt allélszámot, H_o a megfigyelt heterozigóciát, az F és a p a regressziószámításhoz tartozó F és p értékeket jelöli, míg az m a regressziós egyenes meredekségét hivatott kifejezni.

Fajok		Ara o.	Ara C.	Ara m.	Primolius m.	Primolius a.	Diopsittaca n.	Eupsittula a.	Aratinga j.	Pionites l.	Pyrrhura m.	Pionus c.	Amazona o.	Regresszió eredménye	
Locus	Gen. táv	0	0,077	0,079	0,091	0,091	0,104	0,107	0,107	0,122	0,127	0,145	0,159	N_a _X-O	H_o _X-O
UnaCT43	N	11	11	11	10	10	10	9	10	10	11	10	11	F=0,0005	F=0,5376
	N_a	10	3	7	5	4	6	6	1	6	6	2	6	m=-0,56	m=-2,78
	H_o	0,91	0,73	0,82	0,50	0,50	0,71	0,78	0,00	0,90	0,55	0,00	0,73	p=0,9824	p=0,4821
UnaCT21	N	11	11	11	10	10	10	9	10	10	11	10	11	F=5,3633	F=14,4770
	N_a	8	6	8	7	7	3	8	4	1	9	2	1	m=-69,55	m=-9,87
	H_o	1,00	0,91	0,73	0,80	0,90	0,63	0,78	0,50	0,00	0,73	0,33	0,00	p=0,0458	p=0,0042
UnaCT32	N	11	11	11	10	10	10	9	10	10	11	10	11	F=15,7090	F=1,9162
	N_a	7	10	7	5	3	5	3	3	1	1	0	2	m=-89,54	m=-5,69
	H_o	1,00	0,82	0,82	0,70	0,30	0,75	0,13	0,50	0,00	0,00	0,00	0,78	p=0,0033	p=0,1996
Fajok		Ara m.	Ara C.	Ara a.	Primolius m.	Primolius a.	Diopsittaca n.	Eupsittula a.	Aratinga j.	Pyrrhura m.	Pionites l.	Pionus c.	Amazona o.	Regresszió eredménye	
Locus	Gen. táv	0	0,040	0,079	0,083	0,083	0,103	0,103	0,108	0,119	0,120	0,151	0,168	N_a _X-O	H_o _X-O
SCMA27	N	11	11	11	10	10	10	9	10	11	10	10	11	F=17,7560	F=12,0100
	N_a	9	11	13	7	6	6	5	9	1	7	2	1	m=-121,09	m=-11,68
	H_o	1,00	1,00	0,91	0,80	0,70	1,00	0,44	0,90	0,00	0,90	0,10	0,00	p=0,0023	p=0,0071
SCMA12	N	11	11	11	10	10	10	9	10	11	10	10	11	F=0,0061	F=3,9356
	N_a	8	8	10	7	5	6	9	10	4	12	6	9	m=2,42	m=-4,74
	H_o	0,64	0,91	0,91	0,90	0,70	0,88	0,67	1,00	0,82	1,00	0,22	0,64	p=0,9395	p=0,0786
SCMA22	N	11	11	11	10	10	10	10	10	11	10	10	11	F=5,1430	F=0,3946
	N_a	11	7	4	3	6	2	5	1	2	1	1	3	m=-48,09	m=-2,64
	H_o	1,00	0,91	0,45	0,30	0,60	0,13	0,70	0,00	0,55	0,00	0,00	0,80	p=0,0495	p=0,5455
SCMA44	N	11	11	11	10	10	10	10	10	11	10	10	11	F=0,2092	F=0,3389
	N_a	7	7	7	4	2	7	5	5	5	6	2	10	m=13,46	m=-2,39
	H_o	0,80	0,90	1,00	0,30	0,50	1,00	0,40	0,80	0,64	0,70	0,00	1,00	p=0,6583	p=0,5748
SCMA01	N	11	11	11	10	10	10	10	10	11	10	10	11	F=8,2015	F=5,5195
	N_a	8	11	6	9	6	2	8	3	9	2	2	0	m=-96,55	m=-7,79
	H_o	0,55	0,82	0,82	0,9	0,7	0,43	0,9	0,2	1	0,3	0,5	0	p=0,0187	p=0,0434
SCMA28	N	11	11	11	10	10	10	10	10	11	10	10	11	F=0,2160	F=1,4561
	N_a	9	8	10	7	5	7	9	10	4	10	4	9	m=-13,67	m=-3,18
	H_o	0,73	0,91	0,91	0,78	0,70	0,88	0,80	1,00	0,82	0,90	0,17	0,89	p=0,6531	p=0,2583
SCMA19	N	11	11	11	10	10	10	10	10	11	10	10	11	F=14,5620	F=13,2260
	N_a	9	9	9	4	3	4	7	4	1	4	0	1	m=-91,83	m=-11,34
	H_o	0,82	1,00	0,91	0,80	0,30	0,38	0,89	0,60	0,00	0,60	0,00	0,00	p=0,0041	p=0,0054

4.3 Beltenyészttség három *Ara* fajban

Azon fajok esetében, ahol kellő nagyságú és reprezentatív minta áll rendelkezésre egy populációból, már levonhatók érdemi következtetések az adott állomány beltenyészttségére vonatkozólag. Az én esetemben, populáció alatt egyes papagájtaxonok hazai, fogságban tartott egyedeit értem. Úgy gondoltam, hogy azokban a fajokban, amelyekből legalább húsz körüli, független mintával rendelkezem, már reprezentatív lehet egy beltenyészttségi vizsgálat eredménye a faj teljes magyarországi tenyésztett állományára vonatkozóan is. A feltételeknek esetemben három *Ara* faj (*Ara ararauna*, *Ara chloropterus*, *Ara macao*) felelt meg. A beltenyészttségi vizsgálat különböző eredményeit a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat: Beltenyészttségi mutatók a vizsgált három *Ara* fajban (N=mintaszám, H_o =megfigyelt heterozigócia, H_e =várt heterozigócia HW-egyensúly esetén, F_{is} =beltenyészttségi koefficiens)

Fajok	N	H_o	H_e	F_{is}	A rokoni (PO, FS, HS) szintű kapcsolatokkal rendelkező egyedek aránya	Valószínűsíthető null-alléles lókusztok száma
<i>Ara ararauna</i>	20	0,88	0,83	-0,064	13%	0
<i>Ara chloropterus</i>	21	0,87	0,84	-0,036	12%	0
<i>Ara macao</i>	17	0,84	0,86	0,022	20%	1

Két fajnál (*Ara ararauna*, *Ara chloropterus*) a megfigyelt heterozigócia (H_o) értéke magasabbnak adódott a Hardy-Weinberg-egyensúly esetén várthoz (H_e) képest, míg az *Ara macao*-ban is csak igen kevéssel volt kisebb a H_o , mint a H_e (6. táblázat). Ez jól jelzi, hogy nincs beltenyészttség egyik faj hazai állományában sem. A beltenyészttségi koefficiens (F_{is}) értékei is ezt támasztották alá, amelyek vagy negatív, vagy jelentéktelenül kicsi pozitív értékeket mutattak. A vizsgált egyedek rokonsági viszonyainak feltárásánál az derült ki, hogy a rokonoknak tekinthető (szülő-utód, testvér vagy féltestvéri viszonyoknak megfelelő kategóriájú) egyedek mindhárom fajnál jelentős kisebbségben vannak a többiekhez képest. Ez összhangban van a beltenyésztés alacsony fokával, és a minták genetikai függetlenségét is alátámasztja. A null-allélek jelenléte sem befolyásolta az analízist (a homozigótáknak a valószínűsége nagyobb aránya okozhat beltenyészttségre hasonlító értékeket) ugyanis csak az *Ara macao*-nál találtunk egy valószínűsíthetően null-alléles lókuszt.

5 Következtetések

Kutatásom egyik célkitűzése volt, hogy megvizsgáljam, hogy *Ara macao* és *Ara ararauna* fajokra kifejlesztett mikroszatellita markerek „cross-species” alkalmazhatósága hogyan alakul az *Arinae* alcsaládból választott papagájfajok körében. Munkám során arra az eredményre jutottam, hogy a tesztelt lókuszek nem mutatnak nagy fajspecifitást, hanem széles rokonsági körben sikeresen kereszt-amplifikálhatóak, ráadásul a markerek a fókusz-fajok jelentős hányadában polimorfnak mutatkoznak, azaz legalább két (de a legtöbb esetben sokkal több) alléllal bírnak. Egyes fajoknál (*Ara ambiguus*, *Ara glaucogularis*, *Ara militaris*, *Ara severus*, *Primolius couloni*) a kis variabilitás csupán annak volt következménye, hogy vizsgálatomnál az említett taxonok esetében csak csekély mintaelemszámmal tudtam dolgozni.

A mikroszatelliták kereszt-amplifikációs alkalmazhatósága taxonspecifikus, állatcsoportonként eltérő mértékű lehet. Ezt támasztja alá egy 2007-es tanulmány is, mely az említett kijelentésen kívül azt is megfogalmazza, hogy madaraknál a kereszt-amplifikálható lókuszek százalékos aránya családokon belül, genuszok között nagyjából 60%, míg az ezen markerek közül polimorfnak mutatkozók megoszlása körülbelül 55% környékén mozog. Ezen kívül arról is szó esik az említett cikkben, hogy a tesztelt fajok hosszú generációs ideje, hermafroditizmusa illetve forrásfajoknál kisebb genommérete egyaránt megnöveli e markerek kereszt-amplifikációs alkalmazhatóságának valószínűségét, melyek közül papagájkoknál csupán az első feltétel teljesül [44, 72]. Az előbbi információk ismeretében már sejthetjük, hogy madarak esetében, számos kutatás vizsgálta mikroszatellita markerek „cross-species” alkalmazhatóságát, széles taxonómiai keretek között. Ezt indokolja az a tény is, hogy az említett csoportban, különösen érdemes kereszt-amplifikálható lókuszeket keresni, ugyanis a madarak genomjában, a többi gerinces taxonhoz viszonyítva, lényegesen kevesebb mikroszatellita lókuszt találhatók, így például a humán genomban regisztrálthoz képest tízszer kevesebb a számuk [20]. Egy esetben, például két, különböző légykapófajban leírt mikroszatellita markerkészletet teszteltek madártaxonok széles palettáján, 48 fajban, és azon következtetésre jutottak, hogy a *Passeriformes* rendben, az egyes madarakban leírt primer készletek 50%-a mutat polimorfizmust azon fajok között, melyek evolúciója 11 millió éve vált szét a forrásfajokétól [6]. Így egyáltalán nem számít meglepőnek, hogy sokkal szűkebb, alcsaládszintű kereszt-amplifikációnál ilyen kedvező eredményre jutottam. Habár alaposabban megvizsgálva a szakirodalmat, felvetődhetnek bizonyos akadályok. Ilyen például, hogy a *Psittaciformes* renden belül, az egyébként más madártaxonokhoz képest jóval nehezebben kifejleszthető STR lókuszeknél, alacsonyabb fokú a „cross-species” variabilitás, mint a legtöbb madárcsoportnál

[73]. Amikor jákóban (*Psittacus erithacus*) leírt mikroszatellitákat teszteltek afrikai, amerikai és ausztráliai papagájfajokon, azt tapasztalták, hogy a megvizsgált 32 faj (22 különböző genuszból) 71%-ánál sikeresnek mutatkozott a kereszt-amplifikáció. A 12 lókuszból legalább hétnél (58%) polimorfizmust is regisztráltak, nemcsak az afrikai, hanem az amerikai és ausztráliai papagájok körében is, melyek fejlődése körülbelül 30,6 illetve 41,4 millió éve vált el afrikai rokonaikétól [74]. Tovább szűkítve a fókuszfajok körét a rend csupán neotrópusi képviselőire, Gebhardt & Waits két, eltérő *Arinae* fajban leírt markerrel végzett kereszt-amplifikációs tesztet, és ennek során a fókuszfajoknál 23-ból 12, 10, 11, 10, 11 illetve 16 esetben állapított meg polimorfizmust a tesztelt lókusznál [12].

Vizsgálatomban valószínűsíthetően azért voltak sikeresek a markerek kereszt-amplifikációi, mert a forrás- és fókuszfajok közötti evolúciós távolság nem elég számottevő ahhoz, hogy a mikrosatellita lókusztokat szegélyező flanking-régiók (és így a primerkötő helyek) olyan mértékben megváltozzanak, ami már megakadályozza az amplifikációt. Ráadásul az ismert okok következményeként a markerek belső, ismétlődő motívumokat tartalmazó szegmenseiben sem történt oly mennyiségű, az allélek számát variáló differenciálódás, mely a variabilitásbeli különbségek fokozott mértékét okozta volna a forrás- és fókuszfajok között.

Az előbb említett két indok többek között azért is teljesülhetett, mert a tesztelt fajok generációs ideje jelentős, azaz kellő mennyiségű mutációs változás viszonylag hosszú idő leforgása alatt halmozódhat csak fel csoportjukban. A polimorfizmus magas foka mindazonáltal annak is köszönhető lehet, hogy az esetleges műtermékeket tévesen valódi allélként azonosítjuk, ez a mikrosatellitákkal történő munka állandó kísérőjelenségét képezi. Ezt a hibalehetőséget a kapott PCR termékek szekvenálásával lehet csak kiszűrni, de erre a szakdolgozatom keretei között nem került sor. Mindazonáltal kijelenthető, hogy a tesztelt markerek akár alcsalád szintű „cross-species” alkalmazásra megfelelnek.

A forrás- és a célfaj közötti genetikai távolság hatását az adott marker variabilitására két változóval vizsgáltam: a fajpárokban talált allélszám-, illetve heterozigócia-különbséggel. Mindkét változónál egyre kisebb volt a célfajban a variabilitás a genetikai távolság növekedésével (ha a markereket együtt vizsgáltam), de nem minden marker esetében egyformán érvényesült ez a trend. Az allélszám-különbségnél tízből nyolc esetben (hatban szignifikánsan) negatív volt a kapcsolat, de két lókuszból pozitív kapcsolat adódott (igaz, nem szignifikáns módon). A heterozigóciák különbségénél viszont az összes lókuszból negatív volt a kapcsolat (négy esetben szignifikánsan). Az erre vonatkozó szakirodalom is efféle tendenciáról számol be. Mindenesetre itt is fontos megemlíteni, hogy bár a negatív viszony

a legtöbb állatcsoportnál megfigyelhető, de taxononként eltérő a mértéke. Egy madarakban végzett hasonló kutatás szerint a kereszt-amplifikációs sikert/polimorfizmust legfőképp a forrás- és fókuszfaj közti genetikai távolság befolyásolja (negatívan), de más tényezők is hatnak rájuk, például a PCR-ek csökkenő anellációs hőmérséklete növeli a kereszt-amplifikáció esélyét, valamint minél több allél detektálható a forrásfajokban, annál több fókuszfajban tapasztalható polimorfizmus a vizsgált mikroszatellitákra nézve. Ugyanakkor nem volt összefüggés a sikeresség és a lókuszmotívuma (di-, tri-, tetranukleotid), vagy struktúrája (tökéletes, tökéletlen, összetett) között. A genetikai távolság negatív hatását egyéb állatcsoportoknál (például békákban, cetekben) is kimutatták, így a genetikai távolság általánosan hasznos előrejelzője lehet a „cross-species” tesztek sikerének [3]. Egy, a *Passeriformes* rend fajaiban, 40 mikroszatellita lókuszt vizsgáló kutatás szintén fordított arányosságot mutatott ki a genetikai távolság és a kereszt-amplifikációs siker és polimorfizmus között [5]. Ezek a vizsgálatok a markerek variabilitását nem az egyes lókuszonál detektált allélek számával jellemezték, hanem aképp, hogy az egyes fajoknál a tesztelt markerek hány százalékánál jelentkezett polimorfizmus, így a benne szereplő számok közvetlenül nem vehetők össze az én eredményeimmel. Az általam használt változókat alkalmazta viszont a kutatócsoport egy korábbi szakdolgozója is, aki a kapcsolatot több állatcsoporton, egyéb tényezők bevonásával vizsgálta [75]. Eredményei összhangban vannak az általam tapasztaltakkal, ugyanis a madarak csoportján belül ő szignifikáns, negatív előjelű kapcsolatot térképezett fel a markerek variabilitása és a genetikai távolság között. Szintén hasonlóan az én eredményeimhez, egy vizsgálatban a forrás- és fókuszfajok közti filogenetikai távolság növekedtével a null-allélek gyakoriságának gyors ütemű emelkedését is megfigyelték [76], ez a jelenség szintén okozhatja a (megfigyelhető) variabilitás csökkenését, ezáltal limitálva a markerek alkalmazhatóságát a forrásfajtól távolabbi fajokban.

Az evolúciós távolságnak a markerek variabilitását negatívan befolyásoló hatásában számtalan tényező játszhat szerepet. A növekvő genetikai távolsággal egyre kisebb annak esélye, hogy a mikroszatellita lókuszmotívum a genomban még a forrás- és a fókuszfaj közös őséiben (a két faj szétválása előtt) jött létre, és ezáltal mindkét fajban jelen van. Emellett a papagájok hosszú generációs ideje is szerepet játszhatott a mutációs ráta modulálása által. Mivel pedig az evolúciós távolság növekedésével egyre több lókuszmotívum válhat null-allélessé, a hamis homozigóták egyre növekvő aránya is erősítheti a negatív tendencia kialakítását.

A három ara fajban (*Ara macao*, *Ara ararauna*, *Ara chloropterus*) elvégzett beltenyésztés-vizsgálat során arra derült fény, hogy a vizsgált taxonok közül kettőben (*Ara*

ararauna, *Ara chloropterus*) egyáltalán nincs kimutatható beltenyésztettség, míg a harmadikban (*Ara macao*) mindössze jelentéktelen mértékű tapasztalható (ezt okozhatta az is, hogy ebben a fajban az egyik markernél a null-allélek gyakorisága számottevő lehet, és valószínűleg csak a hamis homozigóták nagyobb arányát látjuk).

A fogságban tenyésztett állatok körében gyakran előfordul a beltenyésztettség, mely az egyedek fitness-csökkenését okozhatja („inbreeding-depression”), ha nem is mindig oly erőteljesnek mutatkozva, mint vadon élő fajtársaiknál, hol a túlélés a beltenyésztettség által moderált [36]. Ezért is volt érdekes kideríteni, hogy néhány népszerű, tenyésztők által előszeretettel szaporított papagáj esetén számíthatunk-e az említett, negatív hatások feltűnésére hazai viszonylatban, vagy sem.

A populációk genetikai diverzitásának, beltenyésztettségének felmérésére gyakran használnak mikroszatellita markerek genotipizálásával nyert, genetikai jellegű adatsorokat [37, 77, 78]. Papagájokat érintő, genetikai diverzitást, beltenyésztettséget monitorozó vizsgálatokra sokszor a következő okok miatt lehet szükség: 1 a hobbimadár tenyésztők kíváncsiak állatállományuk genetikai minőségére, beltenyésztettségének mértékére, 2 veszélyeztetett fajok visszatelepítési programjainak részeként a visszajuttatandó állomány ellenőrzése céljából, 3 illetve, hogy egy fogságban tartott állományról megállapítsák, hogy valóban legális módon, regisztrált tenyészetekből származik, vagy illegálisan, vadonból kivont madarakból áll [37, 77].

Ezen felül arról is olvashatunk, hogy a beltenyésztettség felmérése céljából számított fixációs index értékét null-allélek jelenlétében felülbecslik, ami indoklja, hogy ilyen esetben fokozott körültekintéssel kell értelmeznünk a beltenyésztettséget leíró mérőszámot [76]. Egy visszavádítás céljából, fogságban tenyésztett rózsás galamb (*Nesoenas mayeri*) populációnál kimutatták, hogy bár a beltenyésztettség negatív hatással volt az állatok fitnessére, számos ok (csökkent tojás életképesség, túlélési ráta az egyes életfázisokban) következtében, legintenzívebben azon egyedeknél jelentkezett a beltenyésztési leromlás, ahol a beltenyésztési koefficiens (F) értéke nagyobb, vagy egyenlő volt, mint 0,25. Ebből levonható a következtetés, hogy jóval kisebb értékek nem eredményeznek jelentős negatív hatásokat az állatok fitnessében [36]. Összefoglalva, a három vizsgált faj közül egyik hazai állományában sem tapasztalhatók a beltenyésztettség jelei. Ennek hátterében az állhat, hogy a hazai tenyésztők, kiterjedt nemzetközi kapcsolataik révén, sok tenyészmadarat külföldről szereznek be.

6 Összefoglalás

A mikroszatellita markerek vizsgálatán alapuló módszerek napjainkban a genetikai megközelítésű kutatások egyik fő alappillére képezik, és nagy népszerűségnek örvendenek. E markerek széleskörű felhasználásának oka magas mutációs rátájuk által nyert jelentős variabilitásuk, illetve „flanking” régiók konzervatívizmusa. Jelentős költségmegtakarítással járhat, ha egy adott fajra tervezett markert más fajokban is, „cross-species” módon sikerül alkalmazni. E metodika sikerességét számos tényező befolyásolja, melyek közül egyik legjelentősebb az eredeti és fókuszfajok között mért genetikai távolság. A fajok közti alkalmazás sikerességét én az *Arinae* alcsalád fajain vizsgáltam, tíz mikroszatellita markeren, melyek közül hármat az *Ara ararauna* hetet pedig az *Ara macao* fajban írtak le.

Egyik célkitűzésem arra irányult, hogy kiderítsem, alkalmasak-e markereim ily széles fajspektrumú használatra vagy sem. Arra jutottam, hogy meglepően jelentős hányaduk sikeresen alkalmazható e célokra, ugyanis a lókuszek zöme a tesztelt primerek segítségével amplifikálódott a fajok többségében, ráadásul az esetek túlnyomó részében polimorfnek mutatkozott.

Azt is vizsgáltam, hogy markerek fajok közötti alkalmazásának sikeressége – vagyis, hogy az adott lókuszt mennyire variábilis a vizsgált fókuszfajokban – függ-e a forrás- és fókuszfajok genetikai távolságától, a vizsgált taxonómiai keretek között. Ebben a helyzetben a variabilitás nagyságát két mérőszámmal is indikáltam, egyrészt a markerek eredeti és a fókuszfajokban detektált allélszámának, másrészt a megfigyelt heterozigóciák páronkénti különbségével. A markerek variabilitása a legtöbb esetben a genetikai távolsággal szignifikáns mértékű fordított arányosságban állt, néhány lókusztan azonban nem találtunk ilyen összefüggést. E szerint, kijelenthető, hogy bár a kereszt-amplifikációs markerkészlet fejlesztésnek van jövője, alapos megfontoltsággal kell eljárni a téren, hogy a lókuszek forrásfajától milyen genetikai távolságra levő taxonban érdemes próbálkozni egy marker alkalmazhatóságának tesztelésével.

Harmadik célkitűzésem arra irányult, hogy felderítsem néhány ara faj hazai állományában a beltenyésztettség mértékét. Ennek során kiderítettem, hogy a vizsgált, reprezentatív mintákban az egyes fajok egyedei között alacsony volt a közeli rokonok aránya, és egyik faj hazai populációját tekintve sem beszélhetünk beltenyésztettségről, mely valószínűsíthetően a körütekintő tenyésztői munka, és esetlegesen a külföldről történő gyakori tenyészmadar-behozatalnak a következménye.

7 Summary

Microsatellite markers are very popular in any type of molecular ecology studies, mostly due to their high mutation rate and variability. This quick evolution has the consequence that the most effective way of finding such loci is to develop them *de novo* in a given species. As an alternative, cross-species utilisation of STR loci primer sets features a highly cost-effective solution. The success of this method depends on several factors, of which assumably the most significant is the evolutionary distance between the source and the focal species.

Here I present a cross-species amplification study of ten STR loci, developed for *Ara ararauna* and *Ara macao*, in parrot species belonging to the *Arinae* subfamily. First, I tested whether this marker set is applicable to such wide range of parrot taxa. Secondly, I tested whether variability (and therefore usability) of a given marker in the focal species is affected by the genetic distance from the original (source) species. For this purpose I used two variability measures, namely the difference in allele numbers and observed heterozygosity between the source and the focal species. Finally, I assessed the extent of inbreeding in Hungarian captive-bred populations of three *Ara* species by calculating inbreeding coefficients (F_{is}) and heterozygosity measures (H_o , and H_e), as well as by calculating the proportion of related and non-related individuals.

The majority of the loci were successfully amplified in most of the species, and with surprisingly high variability, even in less related genera. Overall cross-species variability of the markers was negatively affected by the genetic distance from the source species, but in a minority of the loci, this trend was not present (or proved not significant). The ratio of closely related individuals in the tested populations were relatively low, and there was no sign of inbreeding in any of the studied populations, maybe due to the incidental international import of birds to the local aviculture. My results highlight that although cross-species usage of microsatellite markers compose a quite promising method, evolutionary distance as an important limitation have to be considered.

8 Irodalomjegyzék

1. da Silva HE, Presti FT, Wasko AP, Pinhal D (2015) Development of microsatellite markers for Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) and their cross-amplification in other parrot species. *BMC Research Notes* 8:736. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1749-9>
2. Wright JM, Bentzen P (1995) Microsatellites: genetic markers for the future. In: Carvalho GR, Pitcher TJ (eds) *Molecular Genetics in Fisheries*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 117–121
3. R. Primmer C, N. Painter J, T. Koskinen M, U. Palo J, Merilä J (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36:348–360. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03465.x>
4. Hughes CR, Kavlie R, Johnson K (1998) Characterization of polymorphic trinucleotide microsatellite loci in the great-tailed grackle, *Quiscalus mexicanus*. *Molecular ecology* 7:783–784
5. Galbusera P, van Dongen S, Matthysen E (2000) Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conserv Genet* 1:163–168. <https://doi.org/10.1023/A:1026587024065>
6. Primmer CR, Møller AP, Ellegren H (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5:365–378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00092.x>
7. Dawson DA, Hanotte O, Greig C, Stewart IRK, Burke T (2000) Polymorphic microsatellites in the blue tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families. *Molecular Ecology* 9:1941–1944. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01094-14.x>
8. Moore WS, DeFilippis VR (1997) The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome b. *Avian molecular evolution and systematics* 83–119
9. Johns GC, Avise JC (1998) A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution* 15:1481–1490. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875>

10. Ringler E (2012) The use of cross-species testing of microsatellite markers and sibship analysis in ex situ population management. *Conservation Genet Resour* 4:815–819. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9642-5>
11. White NE, Mawson PR, Dawson R, Bunce MA, Spencer PBS (2009) Characterisation and cross-species utility of 20 microsatellite markers for population and forensic applications in the endangered Carnaby's Black-cockatoo, *Calyptorhynchus latirostris*. *Conservation Genet Resour* 1:341. <https://doi.org/10.1007/s12686-009-9079-7>
12. Gebhardt KJ, Waits LP (2008) Cross-species amplification and optimization of microsatellite markers for use in six Neotropical parrots. *Molecular Ecology Resources* 8:835–839. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02083.x>
13. Miles LG, Lance SL, Isberg SR, Moran C, Glenn TC (2009) Cross-species amplification of microsatellites in crocodylians: assessment and applications for the future. *Conserv Genet* 10:935–954. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9601-6>
14. Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29:294–307. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>
15. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453–2465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>
16. Srivastava S, Avvaru AK, Sowpati DT, Mishra RK (2019) Patterns of microsatellite distribution across eukaryotic genomes. *BMC Genomics* 20:153. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5516-5>
17. Bagshaw ATM (2017) Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. *Genome Biology and Evolution* 9:2428–2443. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx164>
18. Usdin K (2008) The biological effects of simple tandem repeats: Lessons from the repeat expansion diseases. *Genome Res* 18:1011–1019. <https://doi.org/10.1101/gr.070409.107>
19. Gatchel JR, Zoghbi HY (2005) Diseases of Unstable Repeat Expansion: Mechanisms and Common Principles. *Nat Rev Genet* 6:743–755. <https://doi.org/10.1038/nrg1691>

20. Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary BP, Møller AP, Ellegren H (1997) Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Res* 7:471–482. <https://doi.org/10.1101/gr.7.5.471>
21. Schlötterer C, Harr B (2004) Microsatellite Instability. In: *Encyclopedia of Life Sciences*
22. De Barba M, Miquel C, Lobréaux S, Quenette PY, Swenson JE, Taberlet P (2017) High-throughput microsatellite genotyping in ecology: improved accuracy, efficiency, standardization and success with low-quantity and degraded DNA. *Molecular Ecology Resources* 17:492–507. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12594>
23. 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. <https://doi.org/10.1007/s10336-013-0932-9>
24. Joukhadar R, Jighly A (2012) Microsatellites grant more stable flanking genes. *BMC Research Notes* 5:556. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-556>
25. Presti FT [UNESP, Wasko AP [UNESP (2014) A review of microsatellite markers and their application on genetic diversity studies in parrots. *Open Journal of Genetics* 69. <https://doi.org/10.4236/ojgen.2014.42010>
26. Dietrich WF, Miller JC, Steen RG, Merchant M, Damron D, Nahf R, Gross A, Joyce DC, Wessel M, Dredge RD, Marquis A, Stein LD, Goodman N, Page DC, Lander ES (1994) A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nat Genet* 7:220–245. <https://doi.org/10.1038/ng0694supp-220>
27. Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Kazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380:152–154. <https://doi.org/10.1038/380152a0>
28. White NE, Dawson R, Coghlan ML, Tridico SR, Mawson PR, Haile J, Bunce M (2012) Application of STR markers in wildlife forensic casework involving Australian black-cockatoos (*Calyptorhynchus* spp.). *Forensic Science International: Genetics* 6:664–670. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.10.003>

29. Pillay K, Dawson DA, Horsburgh GJ, Perrin MR, Burke T, Taylor TD (2010) Twenty-two polymorphic microsatellite loci aimed at detecting illegal trade in the Cape parrot, *Poicephalus robustus* (Psittacidae, AVES). *Molecular Ecology Resources* 10:142–149. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02673.x>
30. Jan C, Fumagalli L (2016) Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae). *PeerJ* 4:e2416. <https://doi.org/10.7717/peerj.2416>
31. Zhao J, Li T, Zhu C, Jiang X, Zhao Y, Xu Z, Yang S, Chen A (2018) Selection and use of microsatellite markers for individual identification and meat traceability of six swine breeds in the Chinese market. *Food sci technol int* 24:292–300. <https://doi.org/10.1177/1082013217748457>
32. Barker GC (2002) Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96:S21–S24. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90047-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90047-7)
33. Fridolfsson A-K, Gyllensten UB, Jakobsson S (1997) Microsatellite Markers for Paternity Testing in the Willow Warbler *Phylloscopus Trochilus*: High Frequency of Extra-Pair Young in an Island Population. *Hereditas* 126:127–132. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1997.00127.x>
34. Webster MS, Reichart L (2005) Use of Microsatellites for Parentage and Kinship Analyses in Animals. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 222–238
35. Weinman LR, Solomon JW, Rubenstein DR (2015) A comparison of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for analysis of parentage and kinship in a cooperatively breeding bird. *Molecular Ecology Resources* 15:502–511. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12330>
36. Swinnerton KJ, Groombridge JJ, Jones CG, Burn RW, Mungroo Y (2004) Inbreeding depression and founder diversity among captive and free-living populations of the endangered pink pigeon *Columba mayeri*. *Animal Conservation* 7:353–364. <https://doi.org/10.1017/S1367943004001556>
37. Willows-Munro S, Kleinhans C (2020) Testing microsatellite loci for individual identification of captive African grey parrots (*Psittacus erithacus*): a molecular tool for

parentage analysis that will aid in monitoring legal trade. *Conservation Genet Resour* 12:489–495. <https://doi.org/10.1007/s12686-019-01127-6>

38. Barani-Beiranvand H, Aliabadian M, Irestedt M, Qu Y, Darvish J, Székely T, Van Dijk RE, Ericson PGP (2017) Phylogeny of penduline tits inferred from mitochondrial and microsatellite genotyping. *Journal of Avian Biology* 48:932–940. <https://doi.org/10.1111/jav.01163>

39. Joseph L, Toon A, Schirtzinger EE, Wright TF, Schodde R (2012) A revised nomenclature and classification for family-group taxa of parrots (Psittaciformes). *Zootaxa* 3205:26. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3205.1.2>

40. Provost KL, Joseph L, Smith BT (2018) Resolving a phylogenetic hypothesis for parrots: implications from systematics to conservation. *Emu - Austral Ornithology* 118:7–21. <https://doi.org/10.1080/01584197.2017.1387030>

41. Kosman E, Burgio KR, Presley SJ, Willig MR, Scheiner SM (2019) Conservation prioritization based on trait-based metrics illustrated with global parrot distributions. *Diversity and Distributions* 25:1156–1165. <https://doi.org/10.1111/ddi.12923>

42. Barbosa JM, Hiraldo F, Romero MÁ, Tella JL (2021) When does agriculture enter into conflict with wildlife? A global assessment of parrot–agriculture conflicts and their conservation effects. *Diversity and Distributions* 27:4–17. <https://doi.org/10.1111/ddi.13170>

43. Oláh G, Bankovics A (2022) A papagájalakúak (Psittaciformes) rendjéhez tartozó fajok magyar nevei. *Állattani Közlemények* 107:109–174. <https://doi.org/10.20331/AllKoz.2022.107.1-2.5>

44. Olah G, Butchart SHM, Symes A, Guzmán IM, Cunningham R, Brightsmith DJ, Heinsohn R (2016) Ecological and socio-economic factors affecting extinction risk in parrots. *Biodivers Conserv* 25:205–223. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-1036-z>

45. Vergara-Tabares DL, Cordier JM, Landi MA, Olah G, Nori J (2020) Global trends of habitat destruction and consequences for parrot conservation. *Global Change Biology* 26:4251–4262. <https://doi.org/10.1111/gcb.15135>

46. Laurance WF, Lovejoy TE, Vasconcelos HL, Bruna EM, Didham RK, Stouffer PC, Gascon C, Bierregaard RO, Laurance SG, Sampaio E (2002) Ecosystem Decay of Amazonian Forest Fragments: a 22-Year Investigation. *Conservation Biology* 16:605–618. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01025.x>
47. Chapman TF (2007) An endangered species that is also a pest: a case study of Baudin's Cockatoo *Calyptorhynchus baudinii* and the pome fruit industry in south-west Western Australia. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 90:33–40
48. Wright TF, Toft CA, Enkerlin-Hoeflich E, Gonzalez-Elizondo J, Albornoz M, Rodríguez-Ferraro A, Rojas-Suárez F, Sanz V, Trujillo A, Beissinger SR, A. VB, A. XG, Brice AT, Joyner K, Eberhard J, Gilardi J, Koenig SE, Stoleson S, Martuscelli P, Meyers JM, Renton K, Rodríguez AM, Sosa-Asanza AC, Vilella FJ, Wiley JW (2001) Nest Poaching in Neotropical Parrots. *Conservation Biology* 15:710–720. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015003710.x>
49. Pain DJ, Martins TLF, Boussekey M, Diaz SH, Downs CT, Ekstrom JMM, Garnett S, Gilardi JD, McNiven D, Primot P, Rouys S, Saoumoé M, Symes CT, Tamungang SA, Theuerkauf J, Villafuerte D, Verfailles L, Widmann P, Widmann ID (2006) Impact of protection on nest take and nesting success of parrots in Africa, Asia and Australasia. *Animal Conservation* 9:322–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2006.00040.x>
50. Alacs E, Georges A (2008) Wildlife across our borders: a review of the illegal trade in Australia. *Australian Journal of Forensic Sciences* 40:147–160. <https://doi.org/10.1080/00450610802491382>
51. Olah G, Theuerkauf J, Legault A, Gula R, Stein J, Butchart S, O'Brien M, Heinsohn R (2018) Parrots of Oceania – a comparative study of extinction risk. *Emu - Austral Ornithology* 118:94–112. <https://doi.org/10.1080/01584197.2017.1410066>
52. Berton C, Harris J, Fordham DA, Mooney PA, Pedler LP, Araújo MB, Paton DC, Stead MG, Watts MJ, Reşit Akçakaya H, Brook BW (2012) Managing the long-term persistence of a rare cockatoo under climate change. *Journal of Applied Ecology* 49:785–794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02163.x>
53. Olah G, Smith BT, Joseph L, Banks SC, Heinsohn R (2021) Advancing Genetic Methods in the Study of Parrot Biology and Conservation. *Diversity* 13:521. <https://doi.org/10.3390/d13110521>

54. Olah G, Heinsohn RG, Espinoza JR, Brightsmith DJ, Peakall R (2015) An evaluation of primers for microsatellite markers in Scarlet Macaw (*Ara macao*) and their performance in a Peruvian wild population. *Conservation Genet Resour* 7:157–159. <https://doi.org/10.1007/s12686-014-0317-2>
55. Caparroz R, Miyaki CY, Baker AJ (2003) Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes* 3:441–443. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00475.x>
56. Jiraskova A, Lenicek M, Vitek L (2010) Simultaneous genotyping of microsatellite variations in HMOX1 and UGT1A1 genes using multicolored capillary electrophoresis. *Clinical Biochemistry* 43:697–699. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.01.006>
57. Kesselring H, Hamann E, Stöcklin J, Armbruster GFJ (2013) New microsatellite markers for *Anthyllis vulneraria* (Fabaceae), analyzed with Spreadex gel electrophoresis. *Applications in Plant Sciences* 1:1300054. <https://doi.org/10.3732/apps.1300054>
58. Goor RM, Hoffman D, Riley GR (2021) Novel Method for Accurately Assessing Pull-up Artifacts in STR Analysis. *Forensic Science International: Genetics* 51:102410. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102410>
59. Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ml-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576–579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x>
60. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
61. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLOS Biology* 2:e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
62. Jagielski T, Gawor J, Bakula Z, Decewicz P, Maciszewski K, Karnkowska A (2018) *cytb* as a New Genetic Marker for Differentiation of *Prototheca* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 56:e00584-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00584-18>

63. NCBI Resource Coordinators (2017) Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 45:D12–D17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1071>
64. Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7:355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
65. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
66. R Core Team (2022) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
67. Pinheiro JC, Bates DM (2000) *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, New York
68. Pinheiro J, Bates D, R Core Team (2023) *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*
69. Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York
70. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
71. Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* 86:485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
72. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations - BARBARÁ - 2007 - *Molecular Ecology* - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x>. Accessed 5 Apr 2023
73. Taylor TD, Parkin DT (2007) Characterisation of 13 microsatellite loci for the Moluccan Cockatoo, *Cacatua moluccensis*, and Cuban Amazon, *Amazona leucocephala*, and their conservation and utility in other parrot species (Psittaciformes). *Conserv Genet* 8:991–994. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9211-0>

74. Taylor TD, Parkin DT (2007) Characterization of 12 microsatellite primer pairs for the African grey parrot, *Psittacus erithacus* and their conservation across the Psittaciformes. *Molecular Ecology Notes* 7:163–167. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01566.x>
75. Vámosi R (2020) Mikroszatellita lokuszok kereszt-amplifikációjának sikeressége a fajok genetikai távolságának függvényében. Állatorvostudományi Egyetem
76. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation | *Molecular Biology and Evolution* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/mbe/article/24/3/621/2925626>. Accessed 7 Apr 2023
77. Coetzer WG, Downs CT, Perrin MR, Willows-Munro S (2017) Testing of microsatellite multiplexes for individual identification of Cape Parrots (*Poicephalus robustus*): paternity testing and monitoring trade. *PeerJ* 5:e2900. <https://doi.org/10.7717/peerj.2900>
78. Shahsavarani H, Rahimi-Mianji G (2010) Analysis of genetic diversity and estimation of inbreeding coefficient within Caspian horse population using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology* 9:. <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i3>

9 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálás köszönetemet témavezetőimnek Dr. Szabó Krisztiának és Dr. Vili Nórának munkám során nyújtott segítségükért, támogatásukért, illetve a laborban szolgálatot teljesítő többi személynek, kik mindig előzékenyen segítettek a munkám során felmerült nehézségek elhárításában, problémáim megoldásában. Ezenkívül, köszönettel tartozom családomnak, kik végig támogattak és bátorítottak munkám során.

10 Nyilatkozatok

Alulírott Dr. Szabó Krisztián igazolom, hogy Örkényi Zoltán Mikroszatellita markerek rokon fajok közötti tesztelése papagájokban című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2023. Április 28.

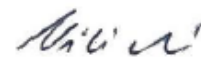


Dr. Szabó Krisztián

ÁTE Ökológia Tanszék

Alulírott Dr. Vili Nóra igazolom, hogy Örkényi Zoltán Mikroszatellita markerek rokon fajok közötti tesztelése papagájokban című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2023. Április 28.



Dr. Vili Nóra

ÁTE Ökológia Tanszék

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Örkényi Zoltán.....

Elérhetőség (e-mail cím): orkenyiz13@gmail.com.....

A feltöltendő mű címe: Mikroszatellita markerek rokon fajok közötti tesztelése papagájokban.....

A mű megjelenési adatai: Szakdolgozat 2023.....

Az átadott fájlok száma: 1 db.....

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

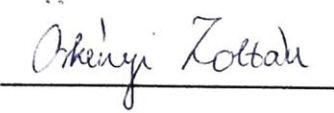
Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról** is:

- Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetÁ-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2023. év április hó 20. nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*