

Szakdolgozat

Németh Dorina Mercédesz
2023.

Állatorvostudományi Egyetem
Biológia Intézet, Ökológiai Tanszék

Mikroszatellita markerek rokonfajok közötti tesztelése solymászmadarokban

Készítette: Németh Dorina Mercédesz

Biológia BSc. III.

Témavezető: Dr. Vili Nóra

Egyetemi adjunktus

Társtémavezető: Dr. Szabó Krisztián

Tudományos munkatárs

Állatorvostudományi Egyetem, Ökológiai Tanszék, Molekuláris Ökológiai Kutatócsoport

Budapest, 2023.

Tartalomjegyzék

Rövidítések és idegen szavak jegyzéke	2
Bevezetés.....	3
Ragadozómadarak és a solymászat	3
Védelem nemzetközi szinten	4
Védelem Magyarországon.....	5
A vizsgált fajok.....	5
Célkitűzés	7
Anyag és módszer	8
Mintagyűjtés.....	8
DNS-izolálás	8
Mikroszatelliták	9
Tesztelt markerek	10
PCR	15
Elektroforézis	20
Statisztikai számítások	21
Eredmények	24
Statisztikai számítások eredményei.....	25
Panelek.....	29
Duplexek	30
Következtetések	31
Egyedi és szülő-utód azonosítás	32
Duplexek	33
Beltenyésztettség	33
Összefoglalás	36
Summary: Testing of microsatellite markers in closely related raptor species	38
Melléklet	39
Irodalomjegyzék és források.....	42
A képek forrásai.....	47
Köszönetnyilvánítás	48

Rövidítések és idegen szavak jegyzéke

allél: itt: adott DNS-régiók különböző változatai

amplifikálás: adott DNS-részlet feldúsítása PCR segítségével

anelláció: itt: a primerek kötődése a DNS-szállhoz

ex situ megőrzés: olyan fajvédelmi program, amely a faj védelmét nem annak élőhelyén végzi

forward primer: az 5'-3' irányú DNS szálat felismerő primer

fragment: DNS-részlet

genetikai marker: ismert DNS-részlet, mely változékonysága miatt alkalmas egyedek, populációk vagy fajok genetikai azonosítására

genom: egy egyed teljes DNS-szekvenciája

hipervariabilitás: itt: nagyon sokféle változattal rendelkező gén vagy genetikai régió

keresztkötés: a reakcióban résztvevő primerek a DNS helyett egymáshoz kötődnek, így valódi termék nem képződik

konzervatív régió: itt: olyan genetikai régió, amely rokonfajok esetében valószínűsíthetően a legközelebbi közös ősből is megtalálható volt, ezért a leszármazottakban homológ jellegű

lokusz: egy gén vagy genetikai marker pontos, ismert helye egy kromoszómán

marker: itt: könnyen azonosítható DNS-régió, mely a vizsgálat szempontjából információ tartalommal bír

mikroszatellita/STR (Short Tandem Repeat)/SSR (Simple Sequence Repeat): nem kódoló, 1-6 bázispárnys ismétlésből álló DNS-részlet

panel: a markerek egy olyan csoportja, amely között nem szerepel két egyforma fluoreszcens festékkel festett és átfedő fragmentumokat eredményező marker. A kapilláris elektroforézis során van szerepe.

PCR (Polymerase Chain Reaction): polimeráz láncreakció

polimorf marker: az adott marker segítségével több mint egy allél detektálható

primer: itt: ismert szekvenciájú rövid, egyszálú DNS-szakasz

reverse primer: a 3'-5' irányú DNS szálat felismerő primer

újgenerációs szekvenálás: DNS vagy RNS molekulák nukleotid sorrendjének meghatározása nagy mennyiségben, modern eszközök felhasználásával

univerzális tail/farok: a forward primeren lévő univerzális szakasz, a fluoreszcens festésnél játszik szerepet

Bevezetés

A molekuláris ökológiai és genetikai kutatások nagyon korán kiterjedtek madarakra is [1], így manapság kifejezetten sok adattal rendelkezünk a genetikájukról [2]. A Sanger-, majd később az újgenerációs szekvenálásnak köszönhetően egyre több és több madárfaj teljes genomját, vagy genomjának egy részletét ismerjük, és ezek segítségével egyre több és több típusú marker áll rendelkezésünkre [3]. Ezek az eszközök jelentősen megkönnyítik a madarakkal kapcsolatos kutatásokat; segítenek a madarak védelmében, legyen szó faj- vagy populációs szintű védelemről [4, 5], országos vagy akár nemzetközi szinten [6], illetve lehetővé teszik, hogy a madarakat érintő törvényeket és szabályokat genetikai eredmények alapján alkossák meg [2].

A ragadozómadarak között nagyon sok faj veszélyeztetett. A ragadozómadár populációk 52%-ában csökkenés tapasztalható, valamint a fajok 18%-át kihalás fenyegeti [7]. A legtöbb ragadozómadár csúcsragadozó vagy dögevő; kiemelt szerepet játszanak az ökoszisztémákban. Így védelmük rendkívül fontos, sőt egyes védelmi programokban zászlóshajó fajnak tekintik őket [8].

Szépségük, veszélyességük és ritkaságuk miatt sok esetben orvvadászok vagy illegális állatkereskedők áldozataul esnek, amely tovább csökkenti számukat [9, 10]. Valójában a ragadozómadarak esetében a populációk csökkenését kiváltó vezető okok között a második helyen szerepel a vadonból való kiragadás vagy illegális vadászat az élőhelyeik méretének és számának csökkenése után [11]. Éppen ezért a ragadozómadarakkal kapcsolatos kutatások nagy részét teszik ki a vadvilágot érintő igazságügyi és büntügyi vizsgálatoknak [12–15].

Ragadozómadarak és a solymászat

A ragadozómadarakhoz, azon belül főleg a sólymokhoz (*Falconiformes*) szervesen kapcsolódik az igen nagy múltra visszatekintő solymászat. Bizonyos történelmi leletek szerint az emberek már 3000 évvel ezelőtt is vadásztak idomított sólymokkal [16]. Jóval később a solymászat a nemesek kiváltságává vált [17], több festmény és leírás bizonyítja, hogy királyok és magas rangú személyek nagyon nagy becsben tartották tenyésztett és betanított ragadozómadaraikat szerte a világban [18–20]. A solymászat mind a mai napig a vadászat egyik ága, melyet nagyon jól tükröz a tény, hogy 2016-ban az UNESCO (*United Nations Education, Science and Cultural Organization* – Egyesült Nemzetek Nevelésügyi,

Tudományos és Kulturális Szervezete) az emberiség szellemi kulturális örökségének részévé nyilvánította [21].

A solymászok több esetben is hozzájárultak a vadon élő szaporulatok *ex situ* megőrzéséhez. Több kísérletben is solymászok neveltek fel vagy solymászati módszerekkel tanítottak sólyom-, héja- vagy sasfiókákat és felnőtt egyedeket, amelyeket aztán sikeresen visszaengedtek a vadonba. Kísérletek bizonyították, hogy a solymász-módszerekkel nevelt madarak túlélési esélyei a vadonban sokkal magasabbak voltak, mint a ketrecekben vagy röpdékben tartott egyedeké [22–24].

Azonban a solymászat miatt a sólyomok, héják, karvalyok és sasok még inkább az illegális állatkereskedelem célpontjaivá váltak, rengeteg esetben felnőtt egyedeket vagy tojásokat ragadnak ki természetes környezetükből [9, 25–27]. Sokszor előfordul, hogy solymászok madarai elszabadulnak és elkeverednek vadon élő fajtársaikkal, amely problémás lehet, ha az elszabadult egyedek befolyásolják a populáció genetikai összetételét [28]. Emellett, közel rokon fajoknál hibridizáció is előfordulhat, amely még károsabb hatással van az őshonos fajok populációira. Rodríguez és munkatársai [25] például azt találták, hogy a Kanári-szigeteken élő berber sólymok (*Falco peregrinus pelegrinoides*) 54,1%-a mutatja a fajra jellemző toll-színezetet, a többi esetben viszont az egyedek színe átmenetet mutat más, a szigeteken nem őshonos sólyomfajok tollzatának színe felé. Az előbb felsorolt okok miatt az igazságügyi vizsgálatok egyre nagyobb mértékben indokoltá váltak a ragadozómadarak védelmének érdekében [29–31].

Védelem nemzetközi szinten

A fentebb említett okok alapján könnyen belátható, hogy a ragadozómadárfajok védelmének érdekében nemzetközi összefogásra van szükség. Napjainkban több egyezmény is védi ezen fajokat, például a nemzetközi kereskedelem szigorú szabályozásával – CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* – Egyezmény a veszélyeztetett vadon élő állat- és növényfajok nemzetközi kereskedelméről), más néven Washingtoni egyezmény [32]; vagy a vándorló fajok országok közötti egységes védelmével – Bonni egyezmény [33].

A ragadozómadarak populációit rendszeresen, évről évre monitorozzák, így mindig naprakész információ áll rendelkezésre arról, hogy veszélyeztetett státuszban van-e egy adott faj. Az egyik legmegbízhatóbb forrás ezen a téren az IUCN (*International Union for Conservation of Nature* – Természetvédelmi Világszövetség) által vezetett Vörös Lista [34].

Védelem Magyarországon

Magyarországon minden ragadozómadár védett státuszú, természetvédelmi eszmei értékük 50 000 és 1 000 000 forint között mozog egyedenként (13/2001. (V. 9.) KöM rendelet a védett és a fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségben természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről), ezért minden ragadozómadarakkal foglalkozó tanulmány valamilyen szinten a természetvédelemhez kapcsolható. A legújabb ragadozómadarakat érintő természetvédelmi rendelkezés (136/2022. (IV. 7.) Kormányrendelet (a 348/2006. (XII. 23.) Kormányrendelet módosítása)) szerint, minden solymászati céllal tartott felnőtt ragadozómadár egyedi genotípusát 2022. december 31-ig meg kell határozni, és a hatóságok felé jelenteni. Továbbá a jövőben nem lehet solymász-madarat eladni a genetikai profilját rögzítő bizonyítvány nélkül. Ezzel az intézkedéssel könnyebben ellenőrizhetővé válik a madarak származása, így remélhetőleg elkerülhetővé válik a vadon élő ragadozómadarak illegális befogása, fiókák fészkekből való kiragadása és tenyészmadarak szabadon élő madarakkal való pároztatása.

A vizsgált fajok

A fenti rendelet kapcsán ebben a kutatásban a következő fajokkal foglalkoztunk: héja (*Accipiter gentilis*, Linnaeus, 1758), karvaly (*A. nisus*, L., 1758), szirti sas (*Aquila chrysaetos*, L., 1758), Feldegg-sólyom (*F. biarmicus*, Temminck, 1825), északi sólyom (*F. rusticolus*, L., 1758) és vándorsólyom (*Falco peregrinus*, Tunstall, 1771).

A vizsgált fajaink három csoportba oszthatók genus alapján – *Accipiter*-fajok (héja és karvaly), *Aquila chrysaetos* (szirti sas) és *Falco*-fajok (Feldegg-sólyom, északi sólyom, vándorsólyom). A vizsgálatba további két *Falco*-faj mintáit is bevontuk; *Falco tinnunculus* (vörös vércse) és *Falco vespertinus* (kék vércse) mintát. Ezekkel a fajokkal nem engedélyezett a solymászat, azonban Magyarországon előfordulnak, így a *Falco*-készlet tesztelése releváns volt. A csoportokon belül a fajokat közel rokon fajoknak tekinthetjük, ennek a genetikai markerek kiválasztásánál van jelentősége. A vizsgált fajokhoz tartozó törzsfákat a melléklet 1., 2., 3. ábrája mutatja.

Héja – *Accipiter gentilis*

A vágómadár-alakúak rendjébe (*Accipitriformes*) tartozó faj. Az IUCN Vörös Listán nem fenyegetett státusszal szerepel [35]. A felnőtt egyedek száma Európában nagyjából 234 000-380 000 között van, a populáció csökkenő tendenciát mutat. A Magyarországon fészkelő párok száma 1 200-1 600 közé tehető (2007-2018 között) és a populáció bizonytalan trendet mutat [36, 37]. A hazai solymászállományból 64 madarat azonosítottunk.

Karvaly – *Accipiter nisus*

A vágómadár-alakúak (*Accipitriformes*) rendjébe tartozó faj. Az IUCN Vörös Listán nem fenyegetett státusszal szerepel [38]. A felnőtt egyedek számát Európában 728 000-1 150 000 közé becsülik, az állomány feltehetően stabil. Magyarországon a fészkelő párok száma 3 000-4 800 (2007-2018) között van és bizonytalan trendet mutat [39, 40]. A hazai solymászállományból 3 madarat azonosítottunk.

Szirti sas – *Aquila chrysaetos*

A vágómadár-alakúak rendjébe (*Accipitriformes*) tartozó faj. Az IUCN Vörös Listán nem fenyegetett státusszal bír [41]. Európában a felnőtt egyedek száma 19 200-25 600 között van, az európai állomány növekvő tendenciát mutat, a világszintű állomány stabilnak tekinthető. Magyarországon 2007-2017 között öt fészkelő párt figyeltek meg, ami 2015-2017 között három párra csökkent, a trend leginkább bizonytalannak tekinthető [42, 43]. A hazai solymászállományból 22 madarat azonosítottunk.

Feldegg-sólyom – *Falco biarmicus*

A sólyomalakúak rendjébe (*Falconiformes*) tartozó faj. Az IUCN Vörös Listáján nem fenyegetett státusszal szerepel [44]. Az európai állomány nagyjából 840-1 700 felnőtt egyedből áll és csökkenő tendenciát mutat. Magyarországon az elmúlt évtizedben nem figyeltek meg fészkelő párt [45]. A hazai solymászállományból 3 madarat azonosítottunk.

Északi sólyom – *Falco rusticolus*

A sólyomalakúak rendjébe (*Falconiformes*) tartozó faj. Az IUCN Vörös Listán nem fenyegetett státusszal szerepel [46]. Európában a felnőtt egyedek száma 2 000-3 500 között mozog, feltehetően a populáció stabil. Az elmúlt évtizedben Magyarországon nem figyeltek meg fészkelő párt [47]. A hazai solymászállományból 48 madarat azonosítottunk.

Vándorsólyom – *Falco peregrinus*

A sólyomalakúak rendjébe (*Falconiformes*) tartozó faj. Az IUCN Vörös Listán nem fenyegetett státusszal bír [48]. A felnőtt egyedek száma Európában nagyjából 32 200-62

100, a populáció Európában és világszinten is egyaránt növekszik. Magyarországon 2007 és 2017 között 58-63 fészkelő párt figyeltek meg, növekvő trenddel [49, 50]. A hazai solymászállományból 293 madarat azonosítottunk.

Célkitűzés

Jelenlegi dolgozatomban egy olyan markerkészlet összeállítása volt célunk, amely lehetővé teszi az összes Magyarországon solymászatra engedélyezett és őshonos madárfaj, tehát a héja (*Accipiter gentilis*), a karvaly (*A. nisus*), a szirti sas (*Aquila chrysaetos*), a Feldegg-sólyom (*F. biarmicus*), az északi sólyom (*F. rusticolus*) és a vándorsólyom (*Falco peregrinus*) egyedi azonosítását (1. ábra). A készletekkel kapott genetikai profilokat a magyar hatóság is elfogadja egyedi genetikai azonosítóként. A készletek segítségével az egyedi azonosítás mellett lehetőség nyílik leszármazási vonalak megállapítására, szülő-utód kapcsolatok bizonyítására, valamint az állomány beltenyésztettségének felmérésére.



1. ábra: solymászatra engedélyezett fajok, (A) karvaly, (B) héja, (C) szirti sas, (D) Feldegg-sólyom, (E) északi sólyom, (F) vándorsólyom

(A) Készítette: Bohuš Čičel (B) Készítette: Pellingner Attila a(z) magyar Wikipédia projektből (C) Készítette: Tony Hisgett from Birmingham, UK (D) Készítette: Flickr user Stevie-B (E) Készítette: Ómar Runólfsson (F) Készítette: Carlos Delgado

Anyag és módszer

A laboratóriumi vizsgálatokat az Állatorvostudományi Egyetem Ökológiai Tanszékéhez tartozó Molekuláris Ökológiai Kutatócsoport laboratóriumában végeztük el; a kapilláris elektroforézis kivételével, melyet a Eurofins BIOMI Kft. munkatársai végeztek.

Mintagyűjtés

Az általunk végzett kutatásban felhasznált minták mindegyike magyar solymászoktól, tenyésztőktől származik. A legtöbb mintát a Magyar Solymász Egyesülettől és a Magyar Ifjak Reform Solymász Alakulatától kaptuk, de érkeztek minták egyéni beküldőktől is.

Fontos kritérium volt tehát a mintavételezés. Olyan módszerre volt szükségünk, amely könnyen, szakember segítsége nélkül is elvégezhető, valamint lehetőleg az állatok számára egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben okoz stresszt. Ezeknek a kritériumoknak leginkább az egyedekből származó tollak bizonyultak a legmegfelelőbbnek. Minden toll szárában megtalálható egy kicsi maradvány vérrög, mely a tollban futó ér visszahúzódása után marad meg a tollszárban. Felső köldöknek nevezik azt a pontot, ahol az ér kilép a toll felszínére, mely a toll kinövése után lezárul, így az ott maradó vérrög teljesen elszigetelten, szennyeződésektől mentesen marad meg minden egyes tollban. Mivel a madarak vörösvérsejtjeinek van sejtmagja, ezért a megmaradó vérrögből könnyen és nagy mennyiségben kivonható sejtmagi DNS. A felső köldökből egyszerűen kivágható a vérrög, és mivel védett, teljesen lezárt részen volt, a kivont DNS jó minőségű, ritkán degradálódott, alkalmas genetikai azonosítás elvégzéséhez [51]. A tollakat a tenyésztők akár postán, egy egyszerű borítékban is elküldhetik a laborunknak, a minták felhasználhatósága védett külső körülmények között (száraz, hűvös, napfénytől elzárt módon tárolva) hónapokig nem romlik [52]. Nagy előny továbbá, hogy a tulajdonosok egyszerűen, pár kihullott vagy frissen eltávolított toll formájában tudják számunkra eljuttatni az egyes madaraktól származó mintákat. A tollak mellett a DNS kivonható vér-, nyál-, vagy akár tojáshéj-mintákból is.

A vizsgálat során összesen 293 vándorsólyom, 64 héja, 48 északi sólyom, 22 szirti sas, 5 karvaly, 3 Feldegg-sólyom, valamint 5 kék vércse és 4 vörös vércse mintáját dolgoztuk fel.

DNS-izolálás

A DNS-ek 2018 és 2023 között lettek kivonva a beérkezett mintákból. A tesztek alatt folyamatosan érkeztek további minták a solymászoktól, így az egyedek genotipizálása és a markerkészletek tesztelése részben párhuzamosan zajlott.

A DNS kivonásához minden esetben az Omega E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit-et (Omega Bio-tek Inc.) használtuk a gyártó utasításai szerint, illetve a tollak emésztéséhez DTT-t (ditiotreitolt, 1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol) adtunk az oldatokhoz, 20 µl mennyiségben. A DTT oldja a keratint a benne található diszulfid-hidak redukálásával, ez pedig jelentősen lecsökkenti a tollak emésztéséhez szükséges időt [53].

Mikroszatelliták

A készlet összeállításához mikroszatellita-markereket, másnéven STR-eket (Short Tandem Repeats - rövid tandem ismétlődések) választottunk. A mikroszatellita-régiók a sejtmagi eredetű DNS nem-kódoló részén találhatóak [54]. Mai ismereteink szerint az esetek többségében nincsenek hatással az egyedek fitnessére, így nem állnak szelekció alatt [55, 56]. Rendszerint 1-6 bázispárnyi tandem ismétlődésből; motívumból állnak [57]. Az ismétlődő résznél a DNS-polimeráz könnyen "megcsúszik", mutációt okoz és növeli vagy csökkenti az ismétlések számát, így maga a mikroszatellita régió hossza gyorsan változhat, ez pedig kellően sok régiót vizsgálva lehetővé teszi az egyedi azonosítást [58]. Mivel az allélokat lényegében az egyes mikroszatellita-régiók hossza adja, ezért azok PCR (Polymerase Chain Reaction) általi feldúsítás után könnyen leolvashatók gélelektroforézis [59] vagy kapilláris elektroforézis segítségével [60]. A molekuláris ökológiában rendkívül kedvelt és bevett eszközök, hipervariabilitásuk miatt [61]. Felhasználási körük igen széles, például alkalmasak populációs és metapopulációs struktúrák felmérésére, egyedek közötti rokonsági kapcsolatok megállapítására, és egyedek diszperziós képességének vizsgálatára [62].

A mikroszatellita markereket több okból kifolyólag választottuk: (i) a mikroszatellita régiók hipervariabilitása lehetővé teszi az egyedi azonosítást, (ii) mikroszatellita régiók nagyon gyakoriak a genomban [63], így több lokusszal dolgozhatunk, ami növeli a pontosságot, (iii) a mikroszatellita markerekkel való egyedi azonosítás bevett, és elfogadott módszer a természetvédelmi genetikában, molekuláris ökológiában, illetve természetvédelmi-igazságügyi vizsgálatokban [64], (iv), a solymászatra engedélyezett madarak esetén mindhárom genusra (*Falco*-, *Accipiter*- és *Aquila*-fajok) írtak már le mikroszatellita markereket [65–67]. Ezekből a tesztjeinkbe a konkrét vizsgált fajra (vándorsólyom: 24 marker, karvaly: 12 marker, héja: 20 marker), a fennmaradó fajoknál pedig közeli fajokra (ibériai sas: 10 marker, parlagi sas: 2 marker, japán szirti sas: 8 marker) leírt markereket vontuk be.

Azon célfajok esetében, amelyekhez nem találtunk a fajra leírt markereket, új mikroszatellita markerek fejlesztése helyett – ami nagyon költséges és időigényes munka [57] – már korábban leírt markerek rokonfajok közötti tesztelését választottuk. A közel rokon fajok esetében a markerek működését a mikroszatellita és az előtte és utána lévő régiók konzervativitása teszi lehetővé; közel rokon fajok DNS-ében gyakran található homológ mikroszatellita-régiók, hasonló allél-gyakorisággal [68, 69]. Bár a markerek működését sok tényező befolyásolja [70], sok marker mégis elég megbízhatóan működik rokon fajok esetében is, így lehetővé teszik az egyedi azonosítást. Galbusera és munkatársai [71] szerint a filogenetikai távolság csökkenésével a mikroszatellita markerek amplifikációjának és polimorfizmusának valószínűsége növekszik, vagyis minél közelebbi a rokonság, annál megbízhatóbban működik a marker rokon fajok esetében.

E mellett a leírt és felhasznált markereket tesztelnünk kellett az eredeti forrásfajokban is, ugyanis ezeket a markereket nem hazai populációkból írták le, így nem kizárt, hogy máshogyan működnek a magyarországi egyedekben, például eltérő allél-gyakoriságot vagy eltérő hosszúságú fragmenseket találhatunk [72, 73].

Tesztelt markerek

Az előzetes teszteléshez 76 markert választottunk, ezek fajokra lebontva az 1. táblázatban láthatók. A kiválasztott markerek specifikációit *Aquila*-fajok esetében 2. táblázat, az *Accipiter*-fajok esetében a 3. táblázat, *Falco*-fajok esetében a 4. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: a teszteléshez kiválasztott markerek száma, az eredeti faj, amelyre leírták őket, és a célfajok, amikben teszteltük őket a vizsgálat során

Eredeti faj	Markerek száma (db)	Célfaj
vándorsólyom (<i>Falco peregrinus</i>)	24	vándorsólyom (<i>Falco peregrinus</i>) északi sólyom (<i>Falco rusticolus</i>) Feldegg-sólyom (<i>Falco biarmicus</i>) kék vércse (<i>Falco vespertinus</i>)* vörös vércse (<i>Falco tinnunculus</i>)*
ibériai sas (<i>Aquila adalberti</i>)	10	
parlagi sas (<i>Aquila heliaca</i>)	2	szirti sas (<i>Aquila chrysaetos</i>)
japán szirti sas (<i>Aquila c. japonica</i>)	8	
karvaly (<i>Accipiter nisus</i>)	12	héja (<i>Accipiter gentilis</i>)
héja (<i>Accipiter gentilis</i>)	20	karvaly (<i>Accipiter nisus</i>)

* nem solymászmadar faj

2. táblázat: szirti sasra tesztelt markerek tulajdonságai, a félkövérrel jelölt markerek eredetileg parlagi sasra és ibériai sasra lettek leírva

Lokusz	Motívum	Méret-tartomány (bp)	Forrás
Aa02	[GT] ₁₉	141-155	[74]
Aa26	[AC] ₁₄	145 -159	[74]
Aa27	[CA] ₁₁	92-98	[74]
Aa35	[AC] ₁₇	250-264	[74]
Aa36	[AC] ₁₆	109-119	[74]
Aa39	[AC] ₁₃	191-223	[74]
Aa41	[CAAA] ₉	151-159	[74]
Aa43	[AC] ₁₄	108-114	[74]
Aa49	[AC] ₁₂	146-156	[74]
Aa53	[CA] ₁₂	123-133	[74]
AQJ71	[GTT] ₁₀	176-198	[75]
AQJ72	[AAT] ₁₁	258-276	[75]
AQJ79	[ATT] ₁₂	249-261	[75]
AQJ84	[AC] ₁₆	180-188	[75]
AQJ88	[GT] ₁₂	199-207	[75]
AQJ91	[GT] ₁₁	184-192	[75]
AQJ118	[GGAT] ₁₀	166-186	[75]
AQJ120	[ATT] ₉	207-231	[75]
IEAAG09	[RAAG] ₁₈	482-494	[67]
IEAAG11	[AAG] ₂₆	332-352	[67]

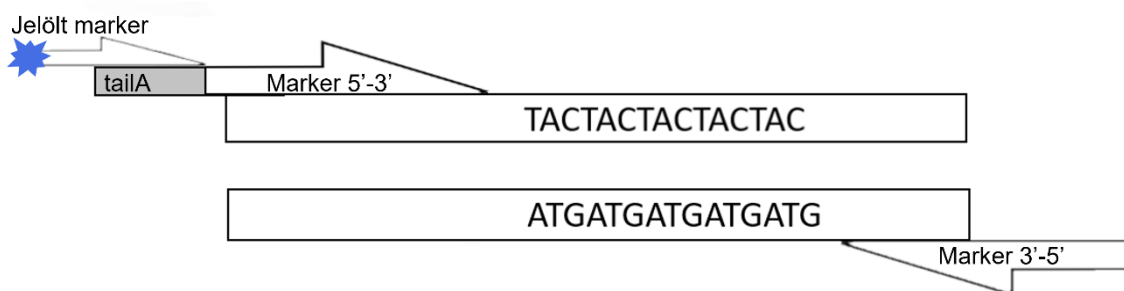
3. táblázat: *Accipiter*-fajokra tesztelt markerek tulajdonságai, az Age/AgCA markerek eredetileg héjára, az An markerek karvalyra lettek leírva, mindegyik markert mindkét fajra teszteltük

Lokusz	Motívum	Méret-tartomány (bp)	Forrás
Age2	[GAGAA] ₁₀ [GA] ₄	158–198	[76]
Age4	[GAGAA] ₁₉	235–275	[76]
Age5	[AAT] ₁₀	149–158	[76]
Age7	[GA] ₂₇	225–245	[76]
Age9	[CT] ₁₃	184–194	[76]
Age11	[AAT] ₁₂	237–249	[76]
AgCA116b	[AC] ₁₂	256–272	[77]
AgCA224	[GT] ₂₂	140–158	[77]
AgCA290b	[TG] ₁₁	203–219	[77]
AgCA303b	[CA] ₁₂	174–188	[77]
AgCA332	[AC] ₉ GC[AC] ₅	228–238	[77]
AgCA361	[TG] ₁₀	105–118	[77]
AgCA365	[GT] ₁₆	196–214	[77]
AgCA380	[AC] ₁₃	172–180	[77]
Age1303	[AT] ₅ [AC] ₈	176–182	[78]
Age1305	[TA] ₁₁	166–182	[78]
Age1308	[GT] ₉	237–245	[78]
Age1311	[GT] ₁₄	131–139	[78]
Age1316	[CA] ₁₀	129–199	[78]
Age1320	[TG] ₁₀	182–190	[78]
An377	[ACTC] ₁₅	177–197	[66]
An2088	[ATCC] ₇	241–273	[66]
An22524	[AAAG] ₁₁	240–272	[66]
An23385	[ATCC] ₁₀	245–273	[66]
An2977	[ACAG] ₈	264–280	[66]
An3169	[ATCC] ₁₅	177–231	[66]
An3611	[ATCC] ₇	202–234	[66]
An3738	[AAAC] ₉	171–191	[66]
An40639	[ACAT] ₇	195–211	[66]
An7105	[AAGG] ₁₂	203–251	[66]
An8617	[ATCC] ₇	197–209	[66]
An108380	[AGAT] ₁₅	166–194	[66]

4. táblázat: sólyomfajokra tesztelt markerek tulajdonságai

Lokusz	Motívum	Méret-tartomány (bp)	Forrás
CABfp18-2	[AGTTAAGTT] ₂₈	158–482	[65]
CAB fp24	[TATTC] ₁₇ [TGTCC] ₆	211–286	[65]
CAB fp77	[TGGA] ₆ GA[TGGA]GA[TGGA] ₈	241–281	[65]
CAB fp85	[TATC] ₁₀	238–258	[65]
CAB fp117	[CATA] ₇ CATG[CATA] ₄	246–270	[65]
CAB fp120	[TATC] ₁₅	261–277	[65]
CABfp157	[TCTA] ₁₄	200–236	[65]
CABfp181	[TCTTA] ₁₁	178–368	[65]
Fpe μ 1	[GATG] ₂₀	150-180	[13]
Fpe μ 2	[GGAAGA] ₃₆	220-360	[13]
Fpe μ 12_1	[GAATG] ₁₉	210-260	[13]
Fpe μ 26_1	[AGAT] ₂₀	150-190	[13]
Fpe μ 33_1	[TCCTA] ₁₇	230-265	[13]
Fpe μ 46_2	[GATG] ₁₃	240-250	[13]
Fpe μ 56_1	[GATA] ₁₈	230-255	[13]
Fpe μ 145_1	[CCCAT] ₁₅	180-220	[13]
Fpe μ 208_1	[GGATA] ₁₆	210-240	[13]
Fpe μ 248_1	[AGAT] ₂₂	200-240	[13]
Fpe μ 298_1	[AGAT] ₁₄	180-200	[13]
Fpe μ 342_1	[ATCT] ₂₀	230-270	[13]
Fpe μ 353_1	[GCATG] ₁₅	180-220	[13]
Fpe μ 435_1	[GTGAT] ₂₀	240-295	[13]
uAge5_PF*	[TAT] ₆	164-170	[13]
uFpe2	[GGAT] ₅	204-330	[13]

A kiválasztott markereink alkalmasak fluoreszcens "farokkal" (*tail*) való jelölésre (2. ábra). A technika lényege, hogy a lokusz-specifikus marker forward (5'-3' irányú) primerén található egy univerzális szakasz (avagy farok/tail), amelyet egy másik, fluoreszcens festékkel jelölt primer ismer fel, így a végső PCR termék szintén fluoreszcens festékkel lesz jelölve. Tehát PCR közben a lokusz-specifikus forward primer felismeri a lokuszt, a lokusz-specifikus forward primer univerzális részét pedig felismeri a fluoreszcens festékkel jelölt második forward primer. Eközben a lokuszt a reverse (3'-5' irányú) primer is felismeri, ezért a technikát három primeres rendszerként is ismerik [79].



2. ábra: Három primeres rendszer sematikus ábrája, egy adott marker egy lokuszt ismer fel

A fluoreszcens festésnek a kapilláris elektroforézis során van jelentősége, ugyanis a jelölésnek köszönhetően az egy DNS-ről származó, különböző markerekkel feldúsított DNS másolatokat egyszerre, egymás után olvashatjuk le. A leolvasás során tudjuk, melyik termék melyik lokuszról származik, ugyanis az egyes primerek, így az egyes lokuszokról származó PCR-termékek eltérő színű fluoreszcens festékekkel vannak jelölve. Ezzel jelentősen csökkenteni tudjuk a kapilláris elektroforézis költségeit. A fluoreszcens festékekkel ellátott primer és az univerzális farok 15 bázispárral megnöveli minden fragmens hosszát, ezt a számot le kell vonni a valódi hosszok megállapításához a kapilláris elektroforézis eredményeinek leolvasása után.

Költségeinket tovább csökkenthetjük multiplex PCR-ek alkalmazásával. Ezek esetében már a PCR összekészítésekor nem egy, hanem kettő vagy több markert adunk a mintához, így egyszerre több lokuszról keletkezik nagy mennyiségű másolat. Az első tesztekhez csak duplexeket hoztunk létre, vagyis egy reakcióban két marker szerepelt egyszerre. A duplexek összeállításánál azonban figyelembe kell vennünk a markerek több tulajdonságát is.

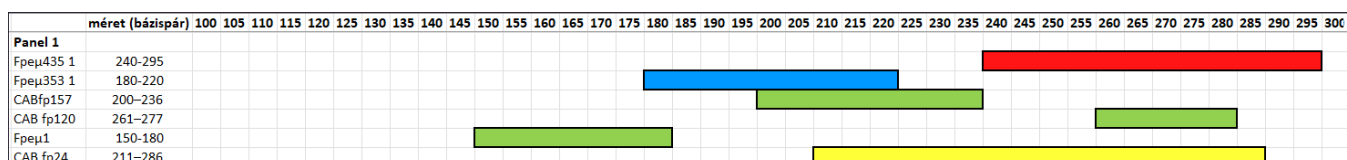
Általában az egyes markerek különböző PCR-programokkal amplifikálhatók, vagyis például a különböző primerek kötődéséhez szükséges optimális hőmérséklet akár 10 °C-kal is eltérhet a primerek szekvenciájától függően. Ebben az esetben ugyanazt a programot használva az egyik vagy a másik marker működésének valószínűsége jelentősen csökkenne.

Figyelembe kellett vennünk továbbá a keresztkötés lehetőségét is. Keresztkötésnél a reakcióban résztvevő primerek a DNS szál helyett egymáshoz kötődnek, valódi termék nem képződik. Ezért a reakciók összeállítása előtt egy online eszköz segítségével (Multiple Primer Analyzer, <https://www.thermofisher.com>) ellenőriztük a primereket és ha a becült primer-dimerizáció valószínűsége magas volt, a primereket nem is teszteltük PCR-rel.

Tényező volt még a választott fluoreszcens festés típusa. Ha a marker forward primere jelölt fluoreszcens festékekkel, akkor akár különböző színnel jelölt markerek is kerülhetnek egy

duplex-reakcióba, ugyanis a termékek ekkor különböző színű fluoreszcens jelet kapnak. Viszont, ha a festék univerzális farokkal ellátott forward primerhez kötött, és a reakció összekészítésénél kerül hozzáadásra, akkor a markerek által feldúsított termékek ugyanolyan színű fluoreszcens festékkel festődnek. Ez abban az esetben nem probléma, ha a fragmensek várható hossza között legalább 100-150 bázispár különbség van, ilyenkor az adott fragmens hosszából következtethetjük ki, hogy melyik lokuszról származik. Viszont, ha a markerek által felismert DNS-régiók hasonló hosszúságúak, akkor a markerek nem szerepelhetnek egy reakcióban, ugyanis leolvasáskor átfednének. Emiatt univerzális festés esetén olyan markereket válogattunk össze, amelyek hossza között nagyobb bázispár különbséget vártunk.

Markereinket a kapilláris elektroforézis figyelembevételével csoportosítottuk. Csoportjainkat úgy alkottuk meg, hogy az egy DNS-ről származó lehető legtöbb PCR-termék egy futás alatt leolvasható legyen, vagyis a lehető legtöbb, különböző színű, nem átfedő termék egy kapilláris elektroforézis alatt detektálódjon. Egy-egy ilyen marker-csoportot úgynevezett panelek segítségével vizualizáltunk. A 3. ábra mutatja az egyik panelünket. Értelemszerűen egy duplex terméket nem lehet markerek szerint szétválogatni, így fontos, hogy a markerek azonos panelbe tartozzanak. Természetesen a panelek átrendezhetőek, de egyik faj esetében sem akartunk kettő panelnél többet létrehozni.



3. ábra: Panel 6 markerre. Az oszlopokban a lokuszt és a feldúsított fragmensek bázispárjainak számát láthatjuk. A színes dobozok a leolvasott régiókat és hosszukat, valamint a fluoreszcens festés színét vizualizálják.

PCR

A PCR-ek összeállításához 5x FIREPol® Master Mix (Solis BioDyne) és 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load with 10.0 mM MgCl₂ (Solis BioDyne)* típusú master mixeket használtunk, amelyek tartalmazzák a DNS-polimerázot, a színes puffert, magnézium-kloridot (MgCl₂) és a dNTP-eket (dezoxi-nukleotid-trifoszfátok). Négy különböző színű fluoreszcens festékkel ellátott univerzális primert használtunk fel a

* ennél a típusú master mixnél a reakció elején a kezdeti denaturáció előtt további 13 perc aktiválási idő szükséges 95 °C-on.

vizsgálathoz: pirosat – PET™ (Applied Biosystems™), kéket – 6FAM™ (Applied Biosystems™), zöldet – VIC™ (Applied Biosystems™), és sárgát – NED™ (Applied Biosystems™).

A PCR-eket a következő recept szerint állítottuk össze (mix 1 mintára): 2 µl master mix; 0,25 µl fluoreszcens festékkel jelölt univerzális primer (piros, zöld, kék vagy sárga); 0,25 µl (univerzális farokkal ellátott) forward primer; 0,5 µl reverz primer; 5 µl nukleázmentes víz; és 2 µl DNS. A végső térfogat így mindig 10 µl volt, mely elég ahhoz, hogy bizonyos hibahatárt megengedjen, például reakció közbeni párolgás, összemérési hiba stb. Duplexek esetében a primerek aránya nagyobb volt, egy mintához 0,5 µl fluoreszcens festékkel jelölt univerzális primert; 0,25 µl (univerzális farokkal ellátott) forward primert és 0,5 µl reverz primert az egyik markerből; 0,25 µl forward primert és 0,5 µl reverz primert a másik markerből; és 4 µl nukleázmentes vizet adtunk a 2 µl master mix és 2 µl DNS mellé.

A PCR-eket a markerekkel együtt publikált programokon futtattuk. A programok leírásai az *5-10. táblázat*okban láthatóak. A programok között TD és grad jelöléssel ellátottak is szerepelnek. A TD touchdown-t a grad pedig gradienst jelent. A *11. táblázatban* a markerekhez tartozó PCR-programokat láthatjuk.

Touchdown PCR-nél az első ciklusban az anellációs hőmérséklet jóval magasabb, mint amit a primer fejlesztésekor megadtak, ez megnöveli a primer specificitását. A következő ciklusokban az anellációs hőmérséklet 0,5-1 °C-ot csökken minden ciklusban, addig amíg eléri a primerhez leírt optimális hőmérsékletet. Mivel az előzetes ciklusokban már keletkezett valamennyi termék, amely specifikusabb a régióra, sokkal több másolat keletkezik a keresett régióról alacsonyabb hőmérsékleten is. A touchdown-szakasz után konvencionális PCR következik.

Gradiens-PCR-nél az anellációs hőmérsékleti különbség nem az egyes ciklusok, hanem a PCR-gép oszlopai között van. Az oszlopok között a gép beállításaitól függően 0,1-1 °C különbség is lehet, így az anellációs hőmérséklet egy gradiens szerint növekszik az oszlopok mentén. Gradiens-PCR segítségével akár több különböző programra leírt markert is tesztelhetünk egyszerre, ha az anellációs hőmérsékletek között csak pár fok eltérés van, és a denaturációs és elongációs hőmérséklet megegyezik.

A PCR-ekhez SuperCycler SC-200 (Kyratec ©), LifeECO Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology Co.) és Biometra TOne 96 G (Analytik Jena GmbH©) PCR-gépeket használtunk.

5. táblázat: vándorsólyom-markerekhez használt PCR-ek, az egyes programokhoz tartozó markerek felsorolása a 11. táblázatban látható

Szakaszok / Program neve	574763TailA/ 665663TailA / 685863TailA	
kezdeti denaturáció	94°C (4 perc)	
denaturáció	94°C (30 s)	
anelláció (Touch-down szakasz, -1 °C/ciklus)	57-47°C/ 66-56°C/ 68-58°C (45 s)	11x
elongáció	72°C (45 s)	
denaturáció	94°C (30 s)	
anelláció	47°C/ 56°C/ 58°C (45 s)	20x
elongáció	72°C (45 s)	
denaturáció	94°C (30 s)	
anelláció (fluoreszcens festési szakasz)	63°C (45 s)	8x
elongáció	72°C (45 s)	
végző elongáció	72°C (10 perc)	

6. táblázat: karvalymarkerekhez használt PCR

Szakaszok / Program neve	Anisus_alap_TailA	
kezdeti denaturáció	94°C (15 perc)	
denaturáció	94°C (30 s)	
anelláció	60°C (45 s)	30x
elongáció	72°C (45 s)	
denaturáció	94°C (30 s)	
anelláció	63°C (45 s)	8x
elongáció	72°C (45 s)	
végző elongáció	72°C (10 perc)	

7. táblázat: héjmarkerekhez használt Touch-down PCR

Szakaszok / Program neve	Age_TD	
kezdeti denaturáció	95°C (1 perc)	
denaturáció	95°C (1 perc)	
anelláció (Touch-down szakasz, -0,5°C/ciklus)	67°C (45 s)	30x
elongáció	72°C (2 perc)	
végző elongáció	72°C (5 perc)	

8. táblázat: héjamarkerekhez használt gradiens PCR. A különböző anellációs hőmérsékletekhez tartozó markerek sorban: AgCA380, AgCA116b, AgCA332, AgCA361, AgCA365 (utóbbi kettő 60°C-on)

Szakaszok / Program neve	Age	Grad			
kezdeti denaturáció	94°C	(4 perc)			
denaturáció	94°C	(30 s)			
anelláció	56°C	57°C	59°C	60°C	60x
elongáció	72°C	(1 perc)			
végző elongáció	72°C	(7 perc)			

9. táblázat: sas-markerekhez használt PCR, a DI és Tetra jelölések a kettő és négy bázispárból álló motívumot tartalmazó markerekhez tartoznak

Szakaszok / Program neve	6650 DI	6660 Tetra
kezdeti denaturáció	94°C (2 min)	94°C (2 min)
denaturáció	94°C (30 s)	94°C (30 s)
anelláció (Touch-down szakasz)	66-50°C (30 s)	17x 66-60°C (30 s)
elongáció	72°C (30 s)	72°C (30 s)
denaturáció	94°C (30 s)	94°C (30 s)
anelláció	50°C (30 s)	19x 60°C (30 s)
elongáció	72°C (30 s)	72°C (30 s)
végző elongáció	72°C (5 min)	72°C (5 min)

10. táblázat: sas-markerekhez használt PCR

Szakaszok / Program neve	605063tailA
kezdeti denaturáció	94°C (2 perc)
denaturáció	94°C (30 s)
anelláció (Touch-down szakasz, -1 °C/ciklus)	60-50 °C (30 s)
elongáció	72°C (30 s)
denaturáció	94°C (30 s)
anelláció	50°C (30 s)
elongáció	72°C (30 s)
denaturáció	94°C (30 s)
anelláció (fluoreszcens festési szakasz)	63°C (45 s)
elongáció	72°C (45 s)
végző elongáció	72°C (10 perc)

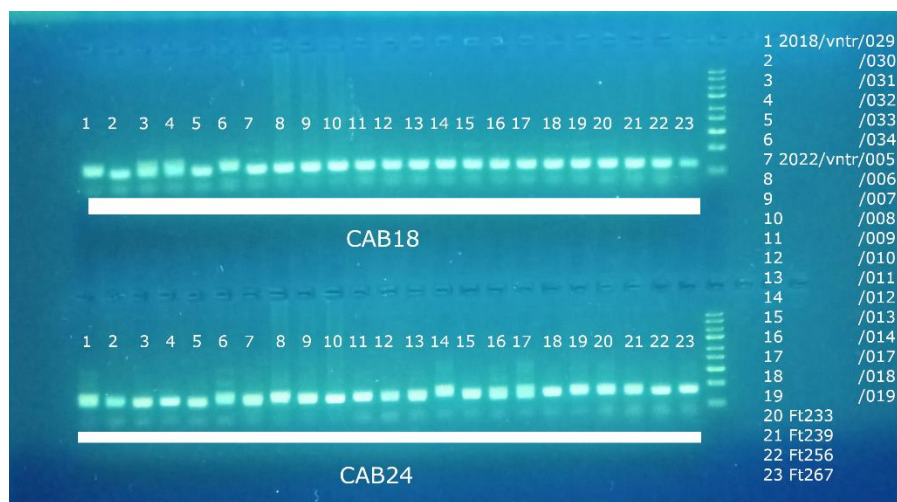
11. táblázat: az összes tesztelt marker PCR-program szerint

Program neve	Marker	Program neve	Marker
574763TailA	Fpeμ1		An377
	CABfp18-2		An2088
	CAB fp24		An22524
	CAB fp77		An23385
	CAB fp85		An2977
	CAB fp117	Anisus_alap	An3169
665663tailA	CAB fp120		An3611
	CABfp157		An3738
	CABfp181		An40639
	Fpeμ2		An7105
	Fpeμ248_1		An8617
	Fpeμ353_1		An108380
	uFpe2		Aa02
	Fpeμ12_1		Aa26
	Fpeμ26_1		Aa27
	Fpeμ33_1		Aa35
	Fpeμ46_2	66-50DI	Aa36
	Fpeμ56_1		Aa39
685863tailA	Fpeμ145_1		Aa43
	Fpeμ208_1		Aa49
	Fpeμ298_1		Aa53
	Fpeμ342_1		IEAAG11
	Fpeμ435_1	66-50Tetra	Aa41
	uAge5 PF*		IEAAG09
	Age2		AQJ71
	Age4		AQJ72
Age_TD	Age5		AQJ79
	Age7	605063tailA	AQJ84
	Age9		AQJ88
	Age11		AQJ91
	AgCA116b		AQJ118
	AgCA224		AQJ120
	AgCA290b		
	AgCA303b		
	AgCA332		
	AgCA361		
Age_grad	AgCA365		
	AgCA380		
	Age1303		
	Age1305		
	Age1308		
	Age1311		
	Age1316		
	Age1320		

Elektroforézis

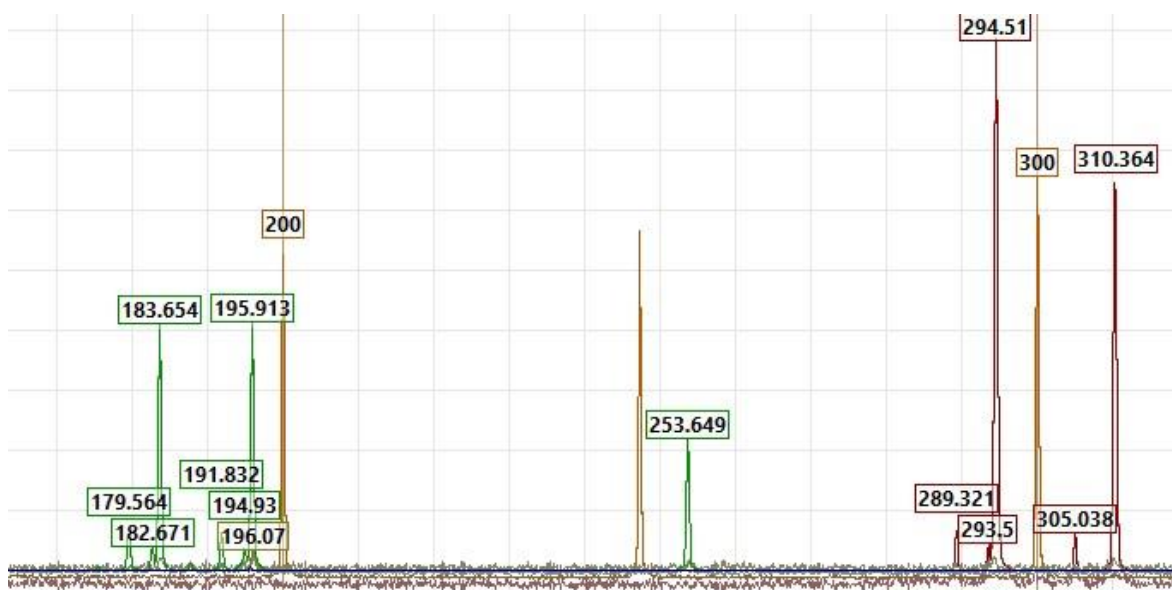
A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélen ellenőriztük. A gél összeállításához agarózt, TAE-puffert (tri-acetát-EDTA) és DYT-FYD007, ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution 20,000X, 1 ml gélfestéket használtunk fel. Az ECO Safe festék kötődik a PCR-termékhez, és UV fény alatt láthatóvá válik [80].

A kész gélbe betöltöttük a PCR-terméket, azután 25 percig, 100 V feszültségen, horizontális elektroforézis kádban futtattuk. A fragmensek hosszának ellenőrzéséhez minden esetben molekuláris tömeg markert, másnéven létrát is tettünk a PCR-termékek mellé. A létrában ismert molekulatömegű DNS-fragmensek találhatóak, melyek az elektroforézis során méretüknek megfelelően különböző távolságra képesek eljutni, a legkisebbek jutnak adott idő alatt a legtovább. A futás során kialakult sávok így megmutatják, hogy adott nehézségű nukleinsav milyen messzire jut el, ebből pedig kikövetkeztethetjük a PCR-termékünk hosszát, illetve a különböző időpontban vagy eltérő ideig futtatott minták is összehasonlíthatóak. A vizsgálatban Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder-t, Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder-t és Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp DNA Ladder-t használtunk. Ha a gélelektroforézis pozitív eredményt hozott, mint például a 4. ábra esetében, a terméket tovább küldtük az Eurofins BIOMI Kft.-nek, ahol megtörtént a kapilláris elektroforézis. A kapilláris elektroforézis segítségével sokkal pontosabban és megbízhatóbban állapíthatóak meg a fragmensek hosszai.



4. ábra: Sikeres gélelektroforézis. A két sor két különböző markert jelöl. A számok az egyes egyedeket, és a vizsgálatban használt egyéni azonosítójukat mutatják. Mindkét sor végén látható létra (számozás nélkül), itt az erősebb csíkok (3. és 6.) 500 és 1000 bázispárt jelölnek.

A kapilláris elektroforézis eredményeit Peak Scanner Software v1.0 [81] és OSIRIS v2.16 [82] programokkal olvastuk le (5. ábra).



5. ábra: Kapilláris elektroforézis eredménye, OSIRIS szoftverrel leolvasva. A zöld és piros színek különböző lokuszokat jelölnek, a narancs színű csúcsok pedig a létrát. A számok a fragmens hosszát, vagyis a bázispárok számát mutatják.

Statisztikai számítások

Amennyiben a mintaszámok megengedték, adatainkkal statisztikai számításokat is végeztünk az egyes markerkészleteket, valamint a különböző fajokat illetően.

Elsőként lokuszonként ellenőriztük nullallélok lehetséges jelenlétét. Nullallél esetében egy lokuszról csak az egyik allél amplifikálódik, a másik kimarad, mert a primer nem ismeri fel a régiót (például a kötőhelyen történt mutáció miatt); így a homozigóták aránya megnövekszik, ami hibás becslésekhez vezet a teljes populációt illetően [83].

Lokuszonként ellenőriztük a Hardy-Weinberg egyensúly fennállását is. Mivel a mikroszatelliták nem kódoló, neutrális régióknak tekinthetők [54–56], ezért rendszerint azt várjuk, hogy a Hardy-Weinberg egyensúly fennálljon. Bevert módszernek számít Hardy-Weinberg egyensúly segítségével ellenőrizni a mikroszatellita markerek megfelelő működését [88].

Az egyes alkészletek egyedi azonosításra való felhasználhatóságát PI-értékek (*Probability of Identity* – identitási valószínűség) számolásával vizsgálhatjuk [89]. A PI-érték megadja annak a valószínűségét, hogy a mintában két egyed genotípusa megegyezik. PI értéket a következő képlet szerint számítjuk:

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

ahol p_i az i -edik allél gyakorisága adott lokuszon. A PI nulla és egy közötti értéket vehet fel, minél közelebb van a nullához, annál megbízhatóbban azonosíthatjuk az egyedeket az adott markerkészlettel. Egyúttal egy szigorúbb PI-értéket is számítottunk, a PI_{sibs} -értéket. A PI_{sibs} már azt is feltételezi, hogy a mintázott egyedek között testvéri kapcsolat áll fenn. PI_{sibs} értéket a következő képlettel számítjuk:

$$PI_{sibs} = 0,25 + (0,5\sum p_i^2) + [0,5(\sum p_i^2)^2] - (0,25\sum p_i^4)$$

ahol p_i megint az i -edik allél gyakorisága az adott lokuszon. A PI_{sibs} értékek rendszerint jóval nagyobbak a sima PI-értékeknél, azonban inkább ezeket vettük figyelembe, tekintve, hogy a solymászmadarak állománya egy tenyésztett állomány, így a legtöbb egyed közeli rokonságban áll egymással.

A készletet szülő-utód azonosításra is szeretnénk felhasználni a jövőben, így ehhez kapcsolódó számításokat is végeztünk. Alkészetenként PX értékeket számoltunk (*Probability of Exclusion* – kizárási valószínűség), amely megadja annak a valószínűségét, hogy egy szülőt vagy szülőpárost nem az egyed szüleiként detektáljuk akkor, ha tényleg nem az egyed szülei [90]. Egy-egy szülő-utód vizsgálatnál ismerhetjük a fióka mindkét feltételezett szülőjét, az egyik feltételezett szülőjét, vagy egyik szülőjét sem. Ezt figyelembe véve három különböző PX értéket számíthatunk, minden esethez egyet (P1 – mindkét szülő ismert, P2 - az egyik szülő ismeretlen, P3 - mindkét szülő ismeretlen). Ezek számítását az alábbi képletekkel végezhetjük:

$$P1 = 1 - 2\sum p_i^2 + \sum p_i^3 + 2\sum p_i^4 - 3\sum p_i^5 - 2(\sum p_i^2)^2 + 3\sum p_i^2 \sum p_i^3$$

$$P2 = 1 - 4\sum p_i^2 + 2(\sum p_i^2)^2 + 4\sum p_i^3 - 3\sum p_i^4$$

$$P3 = 1 + 4\sum p_i^4 - 4\sum p_i^5 - 3\sum p_i^6 - 8(\sum p_i^2)^2 + 8(\sum p_i^2)(\sum p_i^3) + 2(\sum p_i^3)^2$$

ahol p_i megint az i -edik allél gyakorisága az adott lokuszon. Az egyes PX-ek nulla és egy közötti értéket vehetnek fel, minél közelebb vannak az egyhez, annál pontosabb a készlettel végzett szülő-utód azonosítás.

Az egyes fajok esetében felmértük a beltenyésztettséget is. Ehhez F_{IS} értékeket számítottunk, amely megadja, hogy az egyes egyedek mennyire beltenyésztettek a populáció egészéhez képest, valamint megadja annak a valószínűségét, hogy az egyedben két allél leszármazás miatt azonos (*Identical By Descent* - IBD) [91]. F_{IS} értékét az alábbi képlettel számoljuk:

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_i}{H_s}$$

ahol H_i a megfigyelt heterozigócia a populációban az adott vizsgálatban (később H_o -val jelöltük), H_s pedig a feltételezhető, várt heterozigócia, ha fennáll a Hardy-Weinberg egyensúly (később H_e -vel jelöltük).

A nullallélok kiszűrésére a MicroChecker-t [84], az allélok számának, megfigyelt és várt heterozigócia, Hardy-Weinberg egyensúly, PI-értékek (*Probability of Identity*) és PX-értékek (*Probability of Exclusion*) megállapításához a GenALEx6.5 Excel-makrót használtuk [85]. A beltenyésztettség felméréséhez szükséges F_{is} értékeket Genepop 4.0 [86] és FSTAT 2.9.3.2 [87] szoftverek segítségével számoltunk.

Eredmények

A végső készlet összeállításánál az egyes markerek esetében a következő szempontokat vettük figyelembe, amennyiben rendelkezésre állt elég minta: (i) allélok száma, (ii) PI-érték (*Probability of Identity*), (iii) megfigyelt heterozigócia H_o , várt heterozigócia H_e , (iv) Hardy-Weinberg egyensúly.

A PX-értékek (kizárási valószínűség – *Probability of Exclusion*) segítségével ellenőriztük a készletek szülő-utód azonosítására való alkalmasságát. Ezen kívül F_{IS} értékek számításával felmértük az állományok beltenyésztettségét is.

A végső készletek markerlistáit a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat: a végső markerkészlet fajok szerint

Sólyom-fajok	Héja	Karvaly	Szirti sas
(<i>Falco sp.</i>)	(<i>Accipiter gentilis</i>)	(<i>Accipiter nisus</i>)	(<i>Aquila chrysaetos</i>)
CAB24	AgCA116b	AgCA116b	Aa02
CAB77	AgCA332	AgCA380	Aa39
CAB fp120	AgCA361	Age5	Aa43
CAB157	AgCA365	Age7	Aa53
Fpe μ 1	AgCA380	Age11	AQJ71
Fpe μ 12_1	Age2	An377	AQJ72
Fpe μ 26_1	Age4	An2088	AQJ79
Fpe μ 33_1	Age5	An2977	AQJ84
Fpe μ 56_1	Age7	An3169	AQJ88
Fpe μ 353_1	Age11	An3611	IEAAG09
Fpe μ 435_1		An3738	IEAAG11
uAge5_PF		An7105	
		An22524	
		An40639	
		Anl08380	

Héják esetében a karvaly markerek annyira pontatlanok voltak, hogy a végső készletből kizártuk őket. Ennek ellenére a karvalykészletben szereplenek héjamarkerek; a karvalyok esetében nagyon kicsi volt a mintaelemszám (öt egyed), ezért a végső készletben minden olyan markert benne hagytunk, amely értékelhető eredményt hozott géll- és kapilláris elektroforézis leolvasása után. A szirti sasoknál főleg rokonfajokra leírt markerek szerepelnek.

Statisztikai számítások eredményei

Vándorsólymok

Vándorsólymok esetében összesen 293 egyedot genotipizáltunk. A 13. táblázat (lásd 28. oldal) foglalja össze a sólyom-készletet érintő eredményeinket.

Az allélok átlagos száma 22,25 volt (SE 2,164), a 293 egyedben a 12 lokuszon összesen 267 allélt találtunk, a lokuszokon az allélok száma 11 (uAge5_PF*) és 34 (Fpeμ435_1) között mozgott, minden kiválasztott lokusz polimorfizmust mutatott. A megfigyelt és a várt heterozigócia között lokuszonként jelentős különbségek voltak, és egyik lokusz sem volt Hardy-Weinberg egyensúlyban. Vándorsólymok esetében a készlet PI értéke $7,12 \times 10^{-17}$, míg a PI_{sibs} értéke $3,07 \times 10^{-6}$ volt. Mindhárom PX érték (P1, P2 és P3) közelítette az egyet.

Kilenc lokusz esetében (Fpeμ435_1, Fpeμ353_1, CAB fp157, CAB fp120, μAge5_PF*, Fpeμ12_1, Fpeμ33_1, Fpeμ56_1, CAB fp77) találtunk lehetséges null allélokat.

Az F_{IS} értéke Genpop-pal számolva 0,2060; FSTAT-tal számolva 0,206 volt.

Továbbá rendelkezésünkre állt hat olyan egyed mintája, amelynél a rokoni kapcsolatok már ismertek voltak. Ezek az egyedek szülő-utód kapcsolatban álltak egymással. A készlettel kapott eredmények segítségével megállapítottunk feltételezhető szülő-utód párokat, amelyek nem mondtak ellent az ismert adatoknak, így elmondhatjuk, hogy az alkészlet valóban alkalmas szülő-utód kapcsolatok azonosításra is.

Északi sólymok

Északi sólymok esetében összesen 48 minta érkezett be hozzánk, így lehetőségünk volt a sólymok készletét egy másik sólyom-fajon is ellenőrizni.

Északi sólymoknál is mind 12 lokusz polimorf volt. Összesen 111 allélt detektáltunk, lokuszonként átlagosan 9,25-öt (SE 0,863). Az allélok száma 5 (CAB fp120) és 16 (Fpeμ435_1) között volt. A megfigyelt és várt heterozigócia között itt is jelentős volt a különbség. További eredményeinket a 14. táblázat (lásd 28. oldal) mutatja.

Északi sólymok esetében két lokusz feltételezhetően Hardy-Weinberg egyensúlyban volt (CAB fp157, Fpeμ56_1), nullallélokat négy lokuszon találtunk (Fpeμ435_1, Fpeμ353_1, Fpeμ12_1, CAB fp77).

A készlet PI értéke északi sólymokra $3,94 \times 10^{-13}$, PI_{sibs} értéke $1,67 \times 10^{-5}$ lett. Mindhárom PX érték közelítette az egyet.

Az F_{IS} értéke FSTAT-tal számolva 0,112; Genpop-pal számolva 0,1124 volt.

Feldegg-sólymok

A vizsgálat során összesen 3 Feldegg-sólyom egyed mintája érkezett be. Ezeket a mintákat szintén a sólymok készletével genotipizáltuk, azonban a kis mintaelemszám nem tette lehetővé további elemzések elvégzését. Ebben az esetben is mindegyik lokusz polimorf volt, a 12 lokuszon 53 allélt detektáltunk, így az egyedi azonosítás Feldegg-sólymoknál is elvégezhető ezzel a készlettel.

Héják

Héjáknál már egy másik alkészlettel dolgoztunk, összesen 64 egyed adatai álltak rendelkezésre.

Az összes héjára vonatkozó eredményeket a 15. táblázat mutatja.

Héják esetében minden lokusz polimorf volt, összesen 100 allélt detektáltunk 10 lokuszon, lokuszonként az átlagos allélszám 10,00 (SE 1,989) volt. Az egyes lokuszokon az allélok száma 5 (Age11, AgCA380) és 23 (Age2) között mozgott. A megfigyelt és várt heterozigócia között minden lokusz esetében kis különbségek voltak. Összesen 4 lokusz (AgCA365, AgCA116b, Age7, AgCA380) volt Hardy-Weinberg egyensúlyban.

A készlet PI értéke $2,03 \times 10^{-11}$, PIsibs értéke $1,08 \times 10^{-4}$ volt.

P1 és P3 közelítette az egyet, a P2 értékére 0,9936-ot kaptunk.

A héják markerkészletére is ellenőriztük a null allélok jelenlétét, 4 lokuszon (Age2, Age4, Age11, AgCA361) találtunk lehetséges null allélokat.

Genepop-pal számolva az F_{IS} értéke 0,0954, FSTAT-tal számolva 0,095 volt.

15. táblázat: Mintaelemszám (N), Allélszám (N_a), megfigyelt heterozigócia (H_o), várt heterozigócia (H_e) és Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) fennállása lokuszonként, héjáknál

	AgCA116b	AgCA332	AgCA361	AgCA365	AgCA380	Age2	Age4	Age5	Age7	Age11
N	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
N_a	7	7	7	10	5	23	20	7	9	5
H_o	0,688	0,719	0,531	0,563	0,672	0,766	0,813	0,641	0,859	0,516
H_e	0,767	0,706	0,677	0,604	0,737	0,877	0,893	0,693	0,803	0,659
HWE	igen	nem	nem	igen	igen	nem	nem	nem	igen	nem

Karvalyok

Mivel karvalyból a vizsgálat során összesen 5 minta érkezett be, a genotipizáláshoz használt készletet további statisztikai módszerekkel nem állt módunkban ellenőrizni. A karvalyok készlete végső soron 15 markert tartalmaz, ebből 10 markert eredetileg is karvalyra írtak le, a fennmaradó 5 pedig héjamarker. Minden olyan lokusz a készletben maradt, amely gélelektroforézissel jól azonosítható, és kapilláris elektroforézis után egyértelműen leolvasható volt.

Szirti sasok

Összesen 22 szirti sas egyed mintája érkezett be a vizsgálat során, ez már elégséges volt adatelemzések elvégzéséhez.

A szirti sasok készletében a 11 lokusz mindegyike polimorf volt, összesen 69 allélt azonosítottunk, lokuszonként átlagosan 6,273-at (SE 0,905). Az allélok száma lokuszonként 2 (G09) és 11 (AQJ72) között változott.

További eredményeket a *16. táblázat* mutat.

A megfigyelt és várt heterozigócia között lokuszonként kis különbségeket találtunk. A Hardy-Weinberg egyensúlytól 4 lokusz tért el (AQJ71, Aa43, Aa39, AQJ84), nullallélra utaló jeleket egyik lokuszon sem találtunk.

A készlet PI értéke $1,89 \times 10^{-10}$, PI_{sibs} értéke $1,63 \times 10^{-4}$ volt.

P1 és P3 értéke közelítette az egyet, P2 értéke 0,9869 volt.

Az F_{IS} értéke FSTAT-tal számítva 0,083, Genpop-pal számítva 0,0835 volt.

13. táblázat: Mintaelemszám (N), Allélszám (N_a), megfigyelt heterozigócia (H_o), várt heterozigócia (H_e) és Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) fennállása lokuszonként, vándorsólymoknál

	CABfp24	CABfp77	CABfp120	CABfp157	Fpeu1	Fpeu12_1	Fpeu26_1	Fpeu33_1	Fpeu56_1	Fpeu353_1	Fpeu435_1	uAge5_PF*
N	293	293	293	293	293	293	293	293	293	293	293	293
N _a	31	32	19	12	23	26	21	19	23	16	34	11
H _o	0,826	0,672	0,338	0,727	0,782	0,727	0,805	0,720	0,724	0,560	0,413	0,618
H _e	0,881	0,859	0,797	0,807	0,811	0,874	0,836	0,868	0,838	0,776	0,896	0,701
HWE	nem	nem	nem	nem	nem	nem	nem	nem	nem	nem	nem	nem

14. táblázat: Mintaelemszám (N), Allélszám (N_a), megfigyelt heterozigócia (H_o), várt heterozigócia (H_e) és Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) fennállása lokuszonként, északi sölymoknál

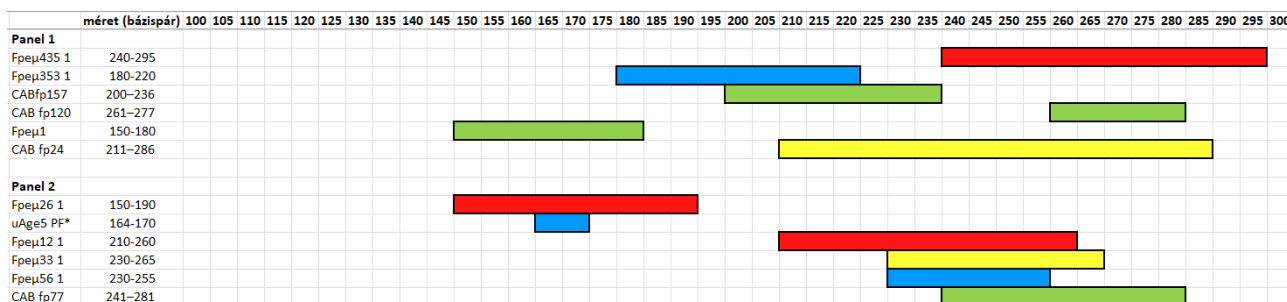
	CABfp24	CABfp77	CABfp120	CABfp157	Fpeu1	Fpeu12_1	Fpeu26_1	Fpeu33_1	Fpeu56_1	Fpeu353_1	Fpeu435_1	uAge5_PF*
N	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
N _a	13	8	5	8	9	10	9	10	10	7	16	6
H _o	0,792	0,813	0,208	0,833	0,813	0,771	0,792	0,688	0,833	0,563	0,354	0,583
H _e	0,777	0,811	0,569	0,803	0,762	0,831	0,759	0,791	0,759	0,650	0,792	0,651
HWE	nem	nem	nem	igen	nem	nem	nem	nem	igen	nem	nem	nem

16. táblázat: Mintaelemszám (N), Allélszám (N_a), megfigyelt heterozigócia (H_o), várt heterozigócia (H_e) és Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) fennállása lokuszonként, szirti sasoknál

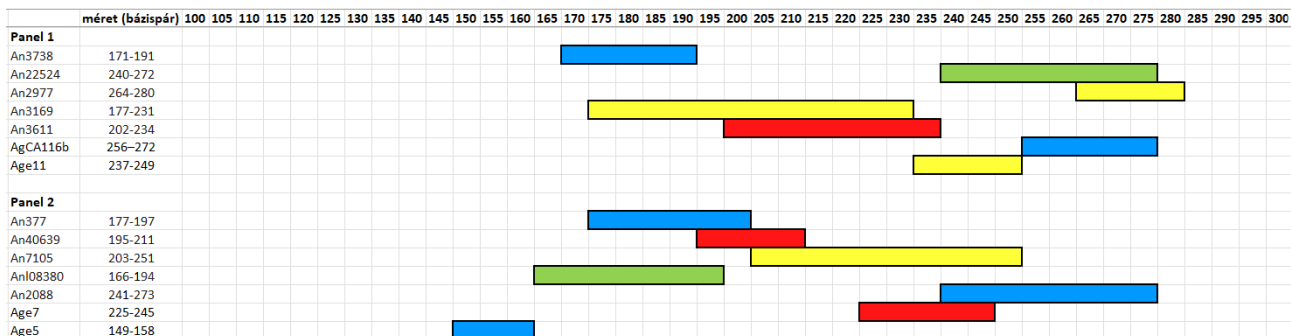
	Aa02	Aa39	Aa43	Aa53	AQJ71	AQJ72	AQJ79	AQJ84	AQJ88	IEAAG09	IEAAG11
N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
N _a	3	7	10	3	8	11	5	6	5	2	9
H _o	0,409	0,773	0,727	0,227	0,864	0,818	0,591	0,636	0,545	0,409	0,773
H _e	0,487	0,806	0,805	0,208	0,755	0,794	0,738	0,791	0,500	0,474	0,850
HWE	igen	nem	nem	igen	igen	nem	igen	nem	igen	igen	igen

Panelek

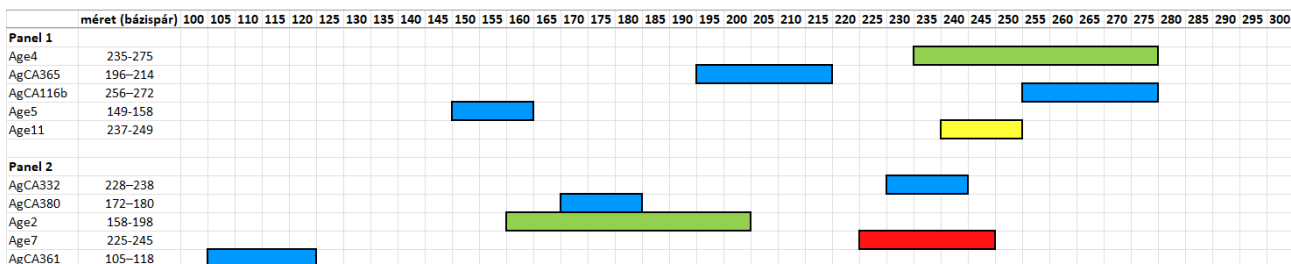
A kapilláris elektroforézishez külön mixet állítunk össze a PCR-termékekből. Egy mixben olyan PCR-termékek szerepelhetnek, amelyekben a fragmensek várható hosszai csak akkor fedhetnek át, ha különböző színű fluoreszcens jelöléssel láttuk el őket a PCR összekészítése során. Egy-egy ilyen mixet panelnek hívunk, és a könnyebb áttekinthetőség miatt grafikus formában dolgozunk velük. A készletekhez tartozó paneleket a 6-9. ábrákon láthatjuk.



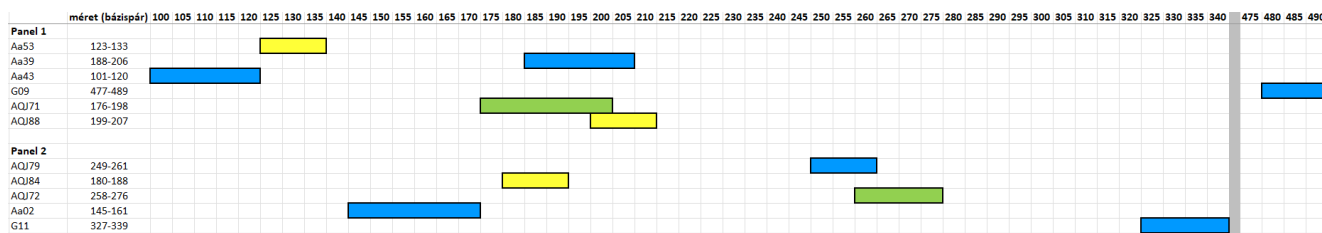
6. ábra: Panelek vándorsóllyom-markerekhez. Az első oszlopban a markereket, utána a markerek által felismert fragmens várható hosszát láthatjuk. A színes dobozok az egyes fragmenseket vizualizálják. A dobozok színe a fluoreszcens festéstől függ.



7. ábra: Panelek karvalymarkerekhez. Az első oszlopban a markereket, utána a markerek által felismert fragmens várható hosszát láthatjuk. A színes dobozok az egyes fragmenseket vizualizálják. A dobozok színe a fluoreszcens festéstől függ.



8. ábra: Panelek hémajamarkerekhez. Az első oszlopban a markereket, utána a markerek által felismert fragmens várható hosszát láthatjuk. A színes dobozok az egyes fragmenseket vizualizálják. A dobozok színe a fluoreszcens festéstől függ.



9. ábra: Panelek szirti sas-markerekhez. Az első oszlopban a markereket, utána a markerek által felismert fragmens várható hosszát láthatjuk. A színes dobozok az egyes fragmenseket vizualizálják. A dobozok színe a fluoreszcens festéstől függ.

Duplexek

Ahol lehetőségünk volt rá, a markereket párosával, duplexek formájában is megvizsgáltuk.

Az egyes párosításokat a 17. táblázat tartalmazza.

17. táblázat: Duplexek fajok szerint

Vándorsólyom (<i>Falco peregrinus</i>)	Karvaly (<i>Accipiter nisus</i>)	Héja (<i>Accipiter gentilis</i>)	Szirti sas (<i>Aquila chrysaetos</i>)
Fpeμ435_1 + Fpeμ353_1	An3738 + An22524	Age2 + Age4	Aa36+Aa39
uAge5_PF* + Fpeμ56_1	An2977 + An3169	AgCA380 + AgCA116b	
Fpeμ145_1 + CAB fp77	An22524 + An377	AgCA365 + AgCA361	
Fpeμ26_1 + Fpeμ12_1	An2977 + An3738	Age5 + Age11	
CAB157 + CAB120		Age5 + Age7	
		Age7 + 11	

A duplexek felhasználhatósága változó volt, és egyértelműen kiderült, hogy a költségeink jelentős csökkentéséhez multiplexek összeállítására lesz szükség. A multiplexek optimalizálását a kutatócsoport többi tagja fogja majd elvégezni a jövőben.

Következtetések

A természetvédelem napról napra fontosabb szerepet tölt be a tudományban, a köztudatban, sőt, már a törvényhozásban is [29, 31]. Megjelent az igény a védett állatokat és növényeket érintő bűnügyi és igazságügyi vizsgálatokban a molekuláris és genetikai módszerek bevezetésére, ugyanis ezekkel az eszközökkel nagyon pontos és megbízható eredményeket kaphatunk [64]. Azonban a jól működő igazságügyi vizsgálatokhoz szükség van standard módszerek és protokollok felállítására, hogy az eredmények hosszútávon is összehasonlíthatók és következtetések legyenek. Belokon és munkatársai [92] nemrégiben zajlott kutatásukban az egyik ehhez szükséges első lépést tették meg, ugyanis északi sólyomra (*Falco rusticolus*), kerecsensólyomra (*F. cherrug*) és vándorsólyomra (*F. peregrinus*) teszteltek egy univerzális, 15 markerből álló mikroszatellita markerkészletet, amelyben a mieinktől eltérő markereket használtak. Ők összesen 161 egyedben (80 északi sólyom, 72 kerecsensólyom és 9 vándorsólyom) tesztelték a készletüket. A markerek közül nem mindegyik volt polimorf, így a végső készlet 10-12 markerből állt, fajtól függően. Északi sólymok esetében a készletük PI értéke 1.4×10^{-6} , PI_{sibs} értéke 4.4×10^{-3} ; kerecsensólyomokra PI 2.1×10^{-7} , PI_{sibs} 2.1×10^{-3} ; vándorsólyomokra pedig PI 4.7×10^{-7} , PI_{sibs} 1.7×10^{-3} volt.

Jelen vizsgálatban összesen 76 mikroszatellita marker használhatóságát teszteltük ragadozómadarakban, elsősorban vándorsólyom, valamint északi sólyom, Feldegg-sólyom, héja, karvaly és szirti sas esetében, ugyanis ezek a fajok engedélyezettek solymászatra Magyarországon. Vizsgálataink alapján négy kisebb markerkészletet állítottunk össze (összesen 48 marker), melyek alkalmasak sólyom-fajok, héja, karvaly és szirti sas genotipizálására, egyedi azonosítására.

A készletek összeállításánál több szempontot is figyelembe vettünk, úgymint az allélok száma; Hardy-Weinberg fennállása lokuszonként; nullallélok jelenléte lokuszonként; megfigyelt és várt heterozigócia. Azonban az utóbbi kettő között erős összefüggés van. Mivel jelen vizsgálat során tenyésztett fajokkal foglalkoztunk, az egyedek között közeli rokoni kapcsolatok állnak fenn, sőt egyes esetekben a beltenyésztettség is nagy szerepet játszik. Ebből kifolyólag, például a MicroChecker esetében a nullallélok jelenlétének ellenőrzéséhez szükséges számítások feltételei nem teljesülnek kivétel nélkül, így pontatlan eredményeket kaphatunk. Például vándorsólymok esetében a 12 lokusból a MicroChecker szerint 9 lokusz nullalléllal terhelt volt, azonban azt gondoljuk, ez a homozigóták magasabb

arányából adódik, aminek valójában a beltenyésztettség, és nem a nullallélok jelenléte az oka.

Egyedi és szülő-utód azonosítás

A sólyom-fajok azonosításához szükséges készlet a legnagyobb jelentőségű, mivel a magyar sólymások főleg vándorsólymokat tartanak. Ebből a fajból kaptuk a legtöbb mintát, ezért itt a kiválasztott markereket több szempontból is vizsgáltuk és ellenőriztük. A kapott eredmények alapján a markerek felbontása nagyon jó, a kiválasztott 12 lokusz segítségével nagyon pontosan megállapíthatjuk egy egyed genotípusát; a kapott PI érték $7,12 \times 10^{-17}$ volt, ami azt jelenti, hogy annak valószínűsége, hogy két egyed genotípusa véletlenül megegyezik nagyjából 10^{17} egyedből 7-szer fordulna elő. Mivel ezt az eredményt befolyásolják a vizsgált egyedek közötti rokonsági kapcsolatok, azt ezt figyelembe vevő, szigorúbb becslést is elkészítettük, ami szerint hozzávetőleg 10^6 egyed között 3 genotípusa egyezne meg. Más hasonló készletek eredményeivel összehasonlítva ezek az értékek kiemelkedően kicsik, ez is tükrözi, az összeállított készlet megbízhatóságát és pontosságát. A szülő-utód azonosításhoz számolt PX-értékek közelítették az egyet, így a készlet ebből a szempontból is alkalmazhatónak bizonyult.

Vándorsólymoknál rendelkezésünkre állt hat olyan egyed mintája is, amelyeknél ismertek voltak a rokonsági kapcsolatok. Ezekkel a mintákkal a készlet szülő-utód vizsgálatra való alkalmasságát élesben is tesztelhetjük; ezek a tesztek sikerrel zárultak, a kapott eredmények nem mondtak ellent az előzetes információknak.

A sólymok készletét nem csak vándorsólymokon, hanem északi sólymokon is tesztelni tudtuk, az eredményeink alapján ebben az esetben is kijelenthető, hogy a készlet nagyon jól alkalmazható egyedi azonosításra.

A sólyom-készlettel genotipzáltuk a beérkezett három Feldegg-sólyom egyed mintáját, valamint a készletet két nem-sólymásmadár fajon; vörös vércsén és kék vércsén is teszteltük. A készlet az előbb felsorolt fajok mindegyikében jól működött.

Accipiter-fajok esetében eleinte szintén egy közös készletet szerettünk volna felállítani, azonban a rokonfajokra leírt markerek nagyon bizonytalanul működtek, ami miatt végül elvetettük a közös készlet ötletét, és helyette külön állítottunk fel egy-egy készletet héják és karvalyok egyedi azonosításához. Ez is jól mutatja, hogy ugyan a két faj közeli rokonságban

áll, a genetikai távolság mégis elég nagy ahhoz, hogy a rokonfajokra leírt markerek jóval pontatlanabban működjenek.

Héják esetében megfelelő volt a mintaszám statisztikai elemzések elvégzéséhez is. A héják készletéhez tartozó PI-érték $2,03 \times 10^{-11}$, a PI_{sibs} $1,08 \times 10^{-4}$ volt. A szülő-utód azonosításhoz számolt PX-értékek közelítették az egyet.

Kevés minta érkezett be karvalyok esetében, a vizsgálat során öt egyed (két tesztminta és solymász-állomány 3 egyede) mintáival dolgoztunk. Az összeállított karvalykészlettel el tudtuk végezni az egyedi azonosítást, azonban további eredményeket nem tudunk megállapítani a karvalyokkal kapcsolatban.

Szirti sasok készleténél a 11 markerből 6-ot eredetileg nem szirti sasra írtak le, azonban ezek a markerek is jól működtek a mintáinkon, így kijelenthető, hogy a markerek rokon fajokon való tesztelése sikerrel zárult. A készlet PI értéke $1,89 \times 10^{-10}$, PI_{sibs} értéke $1,63 \times 10^{-4}$ lett, a genotipizálás során megbízhatóan működött. A PX értékek itt is közelítették az egyet.

A teljes készlet tehát az egyedi azonosítás mellett szülő-utód kapcsolatok és rokonsági viszonyok vizsgálatára is alkalmas vándorsólymok, északi sólymok, héják és szirti sasok esetében egyaránt.

Duplexek

A duplexek költség-, idő- és energiahatékonysága nagy előnyt jelent, ezért ahol csak lehetőség volt rá, a markereket duplex-felállásban is teszteltük, eredményeink változóak voltak. A markerkészlet teljes optimalizálásához sokkal szerencsésebb lenne multiplexeket létrehozni, ezek összeállítását a kutatócsoport munkatársai fogják elvégezni a jövőben.

Beltenyésztettség

A készletekkel ezen kívül sikerült felmérnünk az egyes fajok állományainak beltenyésztettségét is.

A vándorsólymoknál több külföldi eredmény is elérhető a beltenyésztettséggel kapcsolatban. Ezeket az eredményeket minden esetben a mieinktől eltérő markerekkel kapták, a mintázott madarak között fogságban tartott és/vagy vadon élő egyedek szerepeltek.

Bryndová és munkatársai [93] a Cseh Köztársaságban hasonlították össze a vadonélő vándorsólymokat a fogságban tartott társaikkal. 16-16 egyed adataiból a fogságban tartott madarak esetében az F_{IS} -érték 0,264, míg a vadonélő madarak esetében az F_{IS} -érték 0,139

lett; a fogságban tartott egyedeké kicsivel kevesebb, mint a duplája a vadonélő egyedekéhez képest.

Egy valamivel frissebb kutatásban Mengoni és munkatársai [94] a Nyugat-Palearktikus régióban mérték fel a vadonélő vándorsólyom populációkat. Ők 65 egyed mintájával dolgoztak, ebből 9 Észak-Spanyolországból, 8 a Cseh Köztársaságból, 5 Észak-Olaszországból és 42 Dél-Olaszországból (ebből 41 Szicíliából) származott. A kapott F_{IS} értékek a következők voltak: Cseh Köztársaság: -0,056; Spanyolország: 0,082; Olaszország: 0,071; Szicília: 0,053.

Az ilyen típusú vizsgálatok közül a legfrissebb során Weaving és munkatársai [95] az Egyesült Királyságban végeztek átfogó kutatást a vándorsólyom-konzerváció kapcsán. Ebben az esetben összesen 53 vadonélő brit madár mintáját hasonlították össze 30 brit tenyésztett madár, valamint 30 német és 30 ír vadonélő madár mintájával. Az F_{IS} -értékek a következők szerint alakultak: Egyesült Királyság vadonélő: 0,003; Egyesült Királyság tenyésztett: 0,114; Írország: 0,029; Németország: 0,008. Itt is a legnagyobb F_{IS} -érték a tenyésztett madaraknál lépett fel.

A mi vizsgálatunkban azt vártuk, hogy a vándorsólymok esetében kapjuk a legmagasabb értékeket. Eredményeink nem mondtak ellent a feltételezéseinknek, vándorsólymoknál az F_{IS} értéke 0,206 lett, ami 20,6%-os beltenyésztettséget jelent. A 20,6% azt jelenti, hogy az egyes egyedekben az IBD (Identical by Descent) allélok száma 20,6%; illetve, hogy a teljes állományban az IBD allélok aránya 20,6%. Ez az érték már elég magas ahhoz, hogy megmutatkozzon a beltenyésztés káros hatása.

Északi sólymok esetében az F_{IS} értékekére 0,112-t, azaz 11,2%-ot kaptunk a beltenyésztettség értékére. Ez a szám már jóval alacsonyabb a vándorsólymokhoz képest, azonban még mindig elég magasnak tekinthető.

Héják esetében Takaki és munkatársainak [77] egy valamivel régebbi vizsgálatában nézték a beltenyésztettséget. A minták Japán és Közép-Ázsia területéről származnak, 100 madár Japánból és 33 madár Közép-Ázsiából. Ők akkor azt találták, hogy a Japán populációkban az F_{IS} értéke átlagosan 0,038; míg a Közép-Ázsiai populációkban 0,017 volt.

A magyar héja-állomány beltenyésztettsége 9,5%-os ($F_{IS} = 0,095$) lett. Feltételezésünk szerint a vándorsólymok és héják állománya között azért lehetséges ennyire nagy különbség a beltenyésztettséget illetően, mert a vadon élő héják solymászok általi befogása sokáig

engedélyezett volt, azonban az új rendelet már ezt is tiltja (136/2022. (IV. 7.) Kormányrendelet (a 348/2006. (XII. 23.) Kormányrendelet módosítása)). Ebből azt várjuk, hogy a jövőben a héják beltenyésztettségének mértéke is növekedni fog.

Bielikova és munkatársai Szlovákiában mérték fel a szirti sasok beltenyésztettségét, ők vadonélő (50 minta) és fogságban tartott (89 minta) egyedekből származó eredményeket hasonlítottak össze. Itt az F_{IS} -értékek a két csoport esetében nagyon közeliak voltak, átlagosan mindkettő 0,11 körül volt.

A mi vizsgálatunkban a szirti sasoknál kaptuk a legkisebb beltenyésztettséget, 8,3%-ot ($F_{IS} = 0,083$). Ennek valószínűsíthető oka az, hogy a szirti sasok meglehetősen ritkák az itthoni solymászmadarak között, így a tenyésztők gyakran külföldről hoznak haza egyedeket, így viszonylag nagy a genetikai diverzitás.

Összefoglalás

Napjainkban a természetvédelem egyre nagyobb szerepet játszik a törvényhozásban is. Kiváló példa erre az idén áprilisban kiadott 136/2022. (IV. 7.) Kormányrendelet (a 348/2006. (XII. 23.) Kormányrendelet módosítása), melynek értelmében Magyarországon kötelezővé vált a solymászmadarak genetikai azonosítása, vagyis az egyedek leszármazásának igazolására alkalmas, genetikai markereken alapuló laborvizsgálat eredményének benyújtása.

Jelen kutatás elsődleges célja tehát olyan genetikai markerkészletek összeállítása volt, mely lehetővé teszi a Magyarországon solymászatra engedélyezett madárfajok, vagyis héja (*Accipiter gentilis*), karvaly (*A. nisus*), szirti sas (*Aquila chrysaetos*), Feldegg-sólyom (*Falco biarmicus*), északi sólyom (*F. rusticolus*) és vándorsólyom (*F. peregrinus*) egyedi azonosítását, szükség esetén az egyedek leszármazásának vizsgálatát. Továbbá a készletekkel genotipizált tenyészmadarak rokonsági viszonyainak felmérésére és az állományok beltenyésztettségének becslésére is lehetőség nyílik.

A készlet összeállításához mikroszatellita-markereket, másnéven STR-eket (Short Tandem Repeats – rövid tandem ismétlődések) használtunk. Az előzetes tesztekhez összesen 76 markert választottunk ki, ezekből 24 *Falco*-fajokra, 20 *Aquila*-fajokra és 32 *Accipiter*-fajokra specifikus. Minden markert legalább három és legfeljebb kétszázkilencvenhárom azonos fajba tartozó egyed mintáján teszteltük. Emellett további két fajon is teszteltük a készletünket, kék vércsén (*Falco vespertinus*) és vörös vércsén (*Falco tinnunculus*), ezek Magyarországon előforduló ragadozómadárfajok.

A tesztek eredményeit gélelektroforézissel ellenőriztük, a pontos allélhosszokat kapilláris elektroforézis segítségével állapítottuk meg. A markerek kiválasztásánál figyelembe vettük az azonosított allélok számát, PI-értékeket (Probability of Identity – identitási valószínűség), a Hardy-Weinberg egyensúly fennállását, valamint a megfigyelt és várt heterozigóciát is. Emellett, egyes esetekben a leszármazás megállapíthatóságát is teszteltük – erre azért volt lehetőség, mert szerepeltek bizonyítottan szülő-utód rokonságban álló egyedekből származó minták a tesztminták között.

A végső készletek 12 *Falco*-markerből, 11 *Aquila*-markerből, és 20 *Accipiter*-markerből állnak, amelyek a jelenlegi adataink alapján kellően nagy felbontással rendelkeznek az

egyedek biztos elkülönítéséhez. Az egyes készletekkel a hazai solymásmadár-állomány beltenyésztettségét is sikerült felmérnünk.

Summary: Testing of microsatellite markers in closely related raptor species

Nowadays nature conservation plays more and more important role in legislation. The newest Hungarian Government Decree (136/2022. (IV. 7.) Kormányrendelet (a 348/2006. (XII. 23.) Kormányrendelet módosítása) is an outstanding example of this fact. According to this, every bird used in falconry ought to be identified with genetical markers, which means, that falconers must present a certificate to the Hungarian authorities about every bird they own.

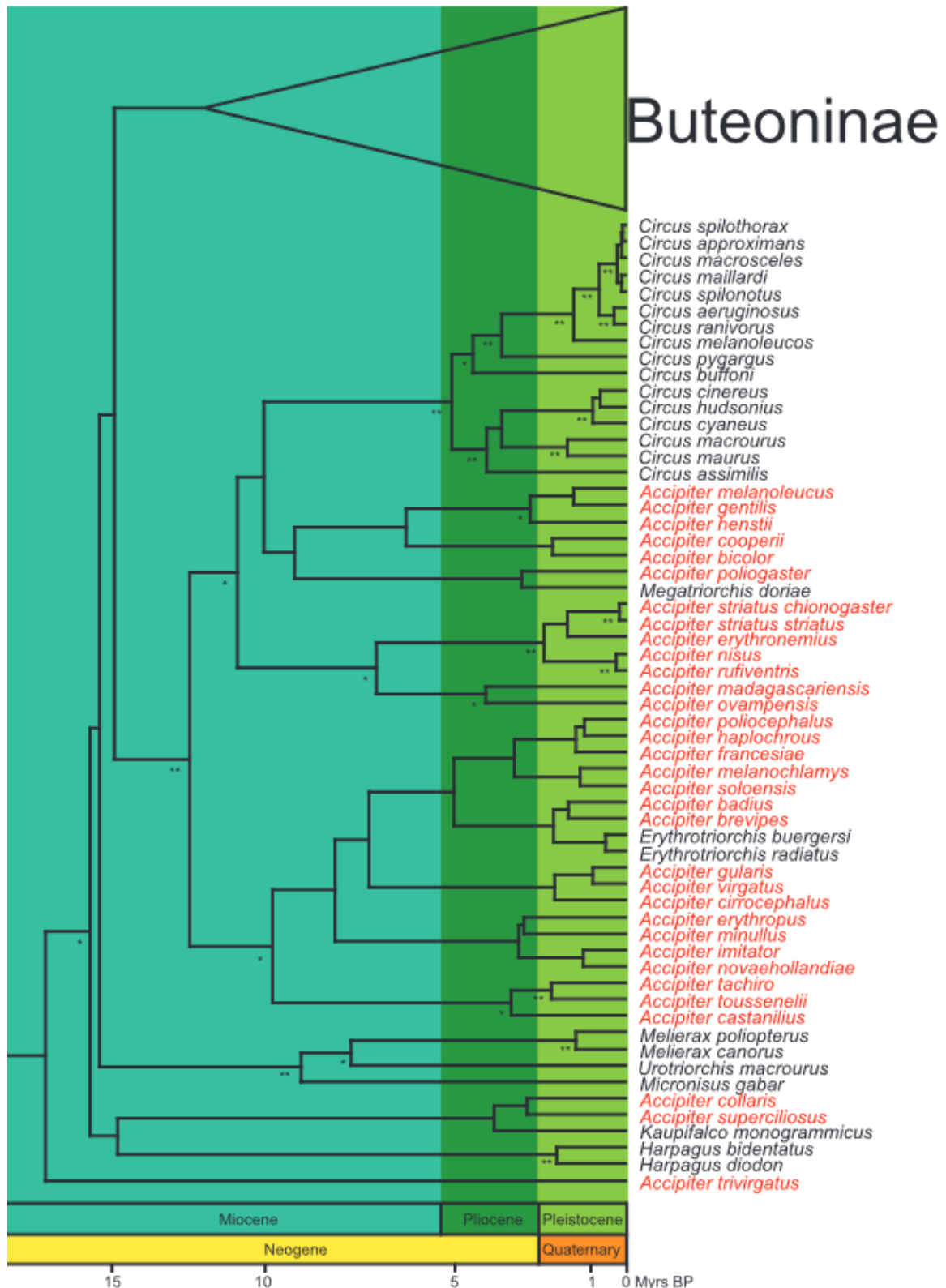
In this study our primary goal was to set up a genetical marker set, which can be used for identifying individual birds kept by falconers. By Hungarian laws, the species northern goshawk (*Accipiter gentilis*), eurasian sparrowhawk (*A. nisus*), golden eagle (*Aquila chrysaetos*), lanner falcon (*Falco biarmicus*), gyrfalcon (*F. rusticolus*) and peregrine falcon (*F. peregrinus*) are allowed to use in falconry, therefore these were the target species in our research. Additionally, with the new set, we can identify genetic lineages and it also enables the survey of the extent of inbreeding in the raptor breeding stocks.

To compile the marker set, we chose microsatellite-markers or STRs (Short Tandem Repeats). In the first stage we have tested altogether 76 markers, from which 24 were *Falco sp.* specific, 20 were *Aquila sp.* specific and 32 were *Accipiter sp.* specific. Every marker was tested on 3-293 samples from the same species. Besides the falconry-allowed species, we tested the markers on two additional closely related species occurring in Hungary: common kestrel (*F. tinnunculus*) and red-footed falcon (*F. vespertinus*).

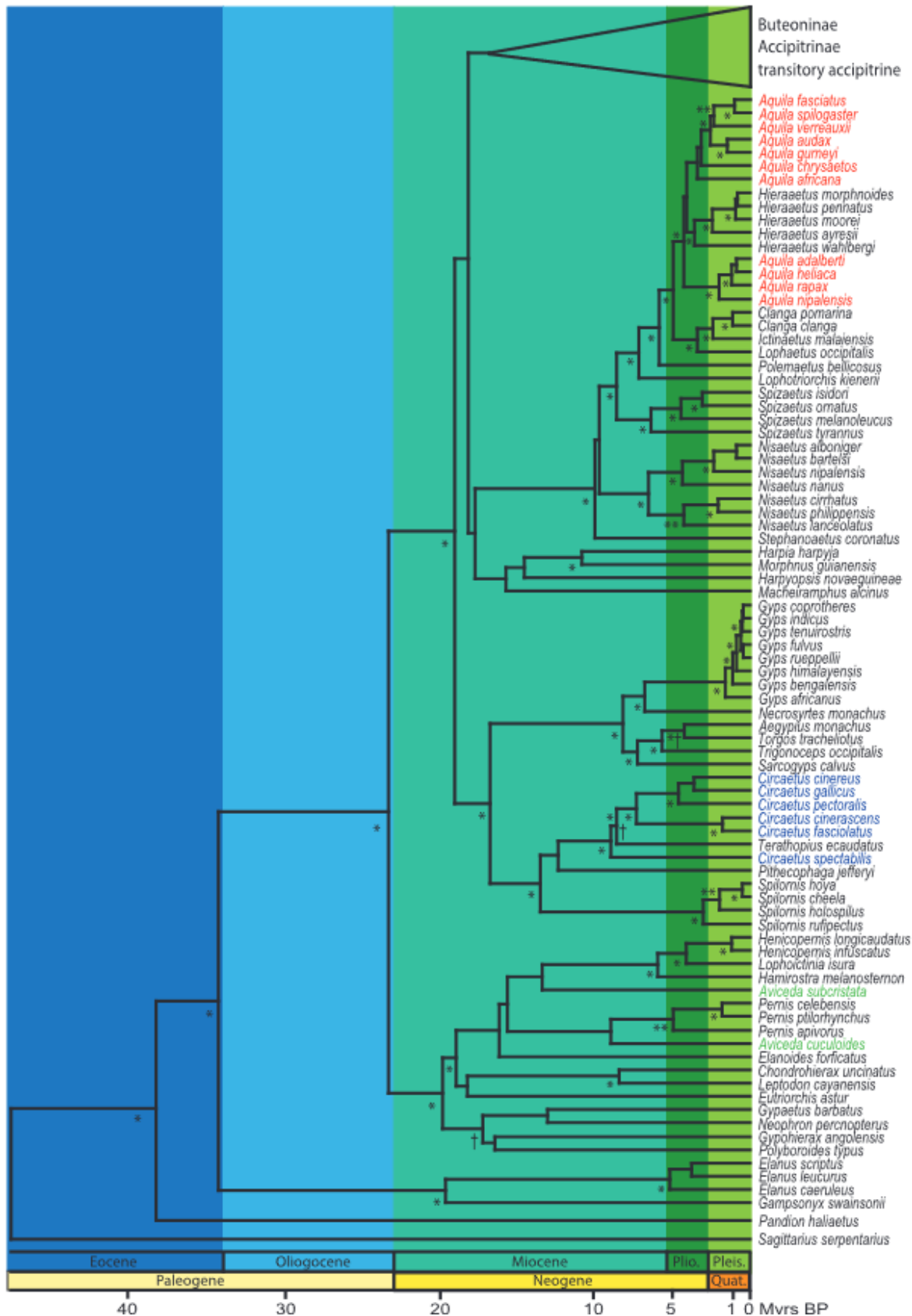
We examined the PCR-products with gel electrophoresis, the exact allele-lengths were determined with capillary electrophoresis. During marker selection, we took into consideration the number of identified alleles, the Hardy-Weinberg Equilibrium by locus, the expected and observed heterozygosity, as well as the PI-values (Probability of Identity). In addition, we were able to test the ascertainability of lineages, for we had samples from individuals with verified ancestor-descendant relationships.

The final marker sets are including 12 *Falco*-markers, 11 *Aquila*-markers and 20 *Accipiter*-markers. Based on our current data, these markers have sufficiently great resolution for certain identification of individuals. With these marker sets, we were able to determine the inbreeding coefficients of the target species' stocks.

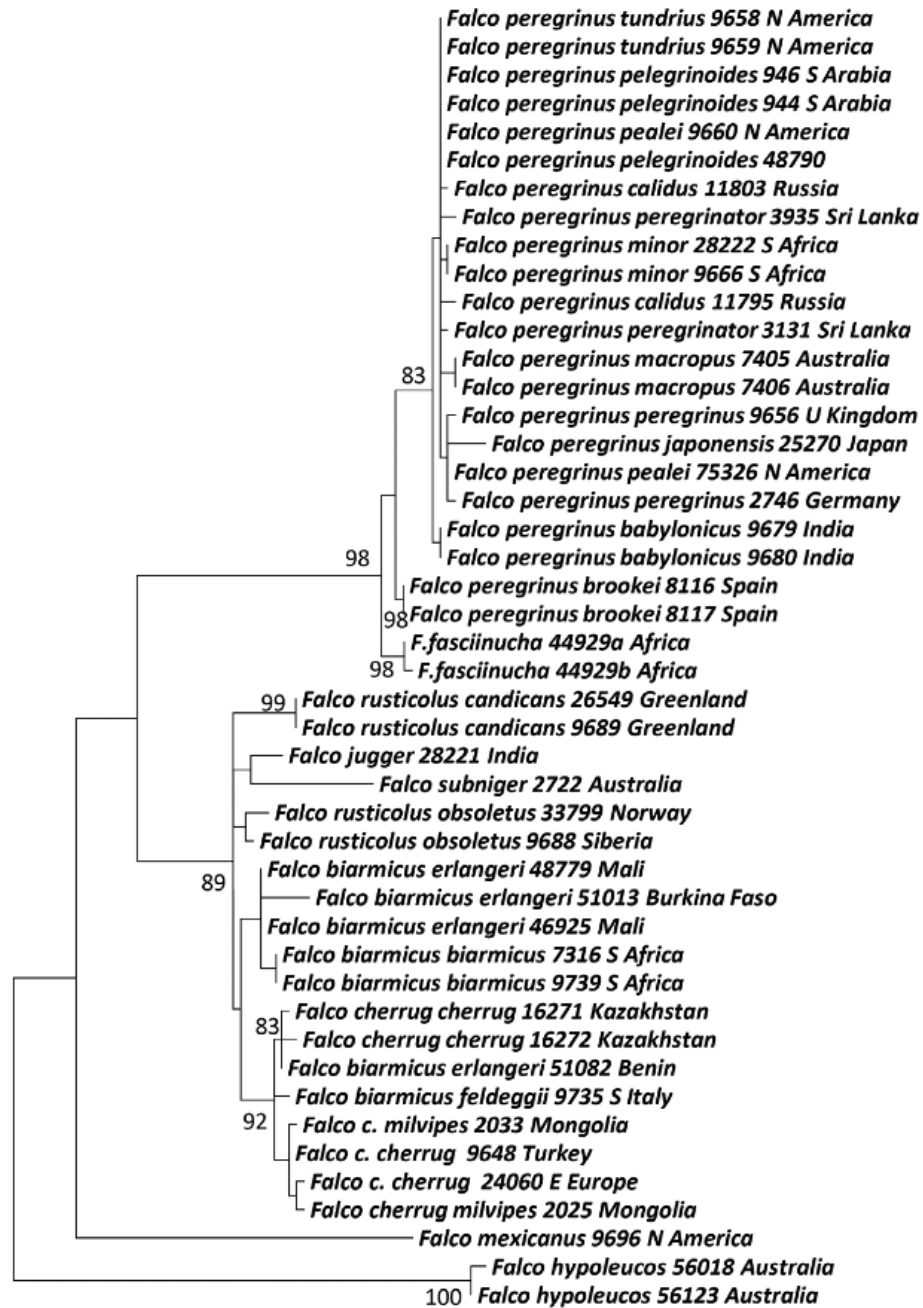
Melléklet



1. ábra: *Accipitriformes* törzsfája 1. – *Accipiter gentilis* és *nisus*. Forrás: Mindell D, Fuchs J, Johnson J (2018) Phylogeny, Taxonomy, and Geographic Diversity of Diurnal Raptors: *Falconiformes*, *Accipitriformes*, and *Cathartiformes*. Figure 1.2b. In: *Birds of Prey: Biology and conservation in the XXI century*. pp 3–32 http://doi.org/10.1007/978-3-319-73745-4_1



1. ábra: Accipitriformes-törzsfa 2. – *Aquila chrysaetos*. Forrás: Mindell D, Fuchs J, Johnson J (2018) Phylogeny, Taxonomy, and Geographic Diversity of Diurnal Raptors: *Falconiformes*, *Accipitriformes*, and *Cathartiformes*. Figure 1.2c. In: Birds of Prey: Biology and conservation in the XXI century. pp 3–32 http://doi.org/10.1007/978-3-319-73745-4_1



2. ábra: *Falco*-fajok törzsfája. Forrás: Wink M (2018) Phylogeny of *Falconidae* and phylogeography of Peregrine Falcons. Figure 4. *Ornis Hungarica* 26:27–37. <https://doi.org/10.1515/orhu-2018-0013>

Irodalomjegyzék és források

1. Griffiths R, Tiwari B, Becher SA (1992) The identification of sex in the starling *Sturnus vulgaris* using a molecular DNA technique. *Mol Ecol* 1:191–194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00175.x>
2. Vitorino LC, Borges Souza UJ, Jardim TPFA, Ballesteros–Mejia L (2019) Towards inclusion of genetic diversity measures into IUCN assessments: a case study on birds. *Anim Biodivers Conserv* 317–335. <https://doi.org/10.32800/abc.2019.42.0317>
3. Stiller J, Zhang G (2019) Comparative Phylogenomics, a Stepping Stone for Bird Biodiversity Studies. *Diversity* 11:115. <https://doi.org/10.3390/d11070115>
4. Taylor HR, Kearns AM (2021) Showcasing the application of genetics for the conservation management of austral birds. *Emu - Austral Ornithol* 121:1–9. <https://doi.org/10.1080/01584197.2021.1932948>
5. 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>
6. Gousy-Leblanc M, Yannic G, Therrien J-F, Lecomte N (2021) Mapping our knowledge on birds of prey population genetics. *Conserv Genet* 22:685–702. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01368-9>
7. McClure CJW, Westrip JRS, Johnson JA, Schulwitz SE, Virani MZ, Davies R, Symes A, Wheatley H, Thorstrom R, Amar A, Buij R, Jones VR, Williams NP, Buechley ER, Butchart SHM (2018) State of the world’s raptors: Distributions, threats, and conservation recommendations. *Biol Conserv* 227:390–402. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.08.012>
8. Donázar JA, Cortés-Avizanda A, Fargallo JA, Margalida A, Moleón M, Morales-Reyes Z, Moreno-Opo R, Pérez-García JM, Sánchez-Zapata JA, Zuberogoitia I, Serrano D (2016) Roles of Raptors in a Changing World: From Flagships to Providers of Key Ecosystem Services. *Ardeola* 63:181–234. <https://doi.org/10.13157/arla.63.1.2016.rp8>
9. Raine AF, Gauci M, Barbara N (2016) Illegal bird hunting in the Maltese Islands: an international perspective. *Oryx* 50:597–605. <https://doi.org/10.1017/S0030605315000447>
10. Di Vittorio M, Rannisi G, Di Trapani E, Falci A, Ciaccio A, Rocco M, Giacalone G, Zafarana M, Grenzi S, La Grua G, Scuderi A, Palazzolo F, Cacopardi S, Luiselli L, Merlino S, Lo Valvo M, López-López P (2018) Positive demographic effects of nest surveillance campaigns to counter illegal harvest of the Bonelli’s eagle in Sicily (Italy). *Anim Conserv* 21:120–126. <https://doi.org/10.1111/acv.12381>
11. Johnson RN (2011) Conservation Genetics and Wildlife Forensics of Birds. In: *Wildlife Forensics*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 293–325
12. Wolfes R, Máthé J, Seitz A (1991) Forensics of birds of prey by DNA fingerprinting with 32P-labeled oligonucleotide probes. *ELECTROPHORESIS* 12:175–180. <https://doi.org/10.1002/elps.1150120213>
13. Beasley J, Shorrocks G, Neumann R, May CA, Wetton JH (2021) Massively parallel sequencing and capillary electrophoresis of a novel panel of falcon STRs: Concordance with minisatellite DNA profiles from historical wildlife crime. *Forensic Sci Int Genet* 54:None. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102550>
14. Nakayama SMM, Morita A, Ikenaka Y, Mizukawa H, Ishizuka M (2019) A review: poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally. *J Vet Med Sci* 81:298–313. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0717>
15. Viner TC, Hamlin BC, McClure PJ, Yates BC (2016) Integrating the Forensic Sciences in Wildlife Case Investigations: A Case Report of Pentobarbital and Phenytoin Toxicosis in a Bald Eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *Vet Pathol* 53:1103–1106. <https://doi.org/10.1177/0300985816641176>

16. Prummel W (1997) Evidence of hawking (falconry) from bird and mammal bones. *Int J Osteoarchaeol* 7:333–338. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1212\(199707/08\)7:4<333::AID-OA374>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1212(199707/08)7:4<333::AID-OA374>3.0.CO;2-7)
17. Burgoyne J (2019) Imagining nature and nobility in law and literature: Siete partidas (Alfonso X), Libro de la montería (Alfonso XI), and Libro de la caza (Juan Manuel). *Roman Q* 66:114–123. <https://doi.org/10.1080/08831157.2019.1637214>
18. Oggins RS (1981) Falconry in Anglo-Saxon England. *Mediaevalia* 7:173–208
19. Wallace LV (2012) Representations of Falconry in Eastern Han China (A.D. 25-220). *J Sport Hist* 39:99–109. <https://doi.org/10.5406/jsporthistory.39.1.99>
20. Wakefield S (2012) Falconry as heritage in the United Arab Emirates. *World Archaeol* 44:280–290. <https://doi.org/10.1080/00438243.2012.669644>
21. Grenet S (2019) Heritage of display: interculturality and cultural diplomacy in the 2010 UNESCO falconry file. *Int J Herit Stud* 25:553–564. <https://doi.org/10.1080/13527258.2018.1512145>
22. Granati G, Cichella F, Lucidi P (2021) High-Tech Training for Birds of Prey. *Animals* 11:530. <https://doi.org/10.3390/ani11020530>
23. Fischer D, Hampel MR, Lierz M (2014) [Monitoring the success of veterinary treatment in rehabilitated and released birds of prey using radiotelemetry]. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* 42:29–35. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1623740>
24. Holz PH, Naisbitt R, Mansell P (2006) Fitness Level as a Determining Factor in the Survival of Rehabilitated Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*) and Brown Goshawks (*Accipiter fasciatus*) Released Back into the Wild. *J Avian Med Surg* 20:15–20
25. Rodríguez B, Siverio F, Siverio M, Rodríguez A (2019) Falconry Threatens Barbary Falcons in the Canary Islands Through Genetic Admixture and Illegal Harvest of Nestlings. *J Raptor Res* 53:189. <https://doi.org/10.3356/JRR-17-96>
26. Ali A, Khan AA (2019) Trapping Techniques and Lure (Bait) Used in Capturing of Falcons in Punjab, Pakistan. *Pak J Zool* 52:. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2020.52.1.sc4>
27. Shobrak MY (2015) Trapping of Saker Falcon *Falco cherrug* and Peregrine Falcon *Falco peregrinus* in Saudi Arabia: Implications for biodiversity conservation. *Saudi J Biol Sci* 22:491–502. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.024>
28. Rivas-Salvador J, Aguilera-Alcalá N, Tella JL, Carrete M (2021) Assessing the introduction of exotic raptors into the wild from falconry. *Biol Invasions* 23:1131–1140. <https://doi.org/10.1007/s10530-020-02425-z>
29. Didarali Z, Kuiper T, Brink CW, Buij R, Virani MZ, Reson EO, Santangeli A (2022) Awareness of environmental legislation as a deterrent for wildlife crime: A case with Masai pastoralists, poison use and the Kenya Wildlife Act. *Ambio* 51:1632–1642. <https://doi.org/10.1007/s13280-021-01695-8>
30. Burnside E, Pamment N, Collins A (2021) “If it flies, it dies”: Profit, workplace pressure and Bird of Prey persecution. *J Rural Stud* 86:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2021.05.016>
31. Valverde I, Espín S, Gómez-Ramírez P, Sánchez-Virosta P, García-Fernández AJ, Berny P (2022) Developing a European network of analytical laboratories and government institutions to prevent poisoning of raptors. *Environ Monit Assess* 194:113. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09719-2>
32. Front | CITES. <https://cites.org/eng>. Accessed 5 Mar 2023
33. CMS | Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals. <https://www.cms.int/en>. Accessed 5 Mar 2023

34. The IUCN Red List of Threatened Species. In: IUCN Red List Threat. Species. <https://www.iucnredlist.org/en>. Accessed 5 Mar 2023
35. International) BI (BirdLife (2020) IUCN Red List of Threatened Species: *Accipiter gentilis*. IUCN Red List Threat Species
36. *Agentilis* status report. https://natureart12.eionet.europa.eu/article12/summary?period=3&subject=Accipiter+gentilis&reported_name=. Accessed 5 Mar 2023
37. (2015) Héja. In: Magy. Madártani És Termvéd. Egyes. <https://www.mme.hu/magyarorszagmadarai/madaradatbazis-accgen>. Accessed 5 Mar 2023
38. BI (BirdLife (2021)) IUCN Red List of Threatened Species: *Accipiter nisus*. IUCN Red List Threat Species
39. *Anisus* status report. https://natureart12.eionet.europa.eu/article12/summary?period=3&subject=Accipiter+nisus&reported_name=. Accessed 5 Mar 2023
40. (2015) Karvaly. In: Magy. Madártani És Termvéd. Egyes. <https://www.mme.hu/magyarorszagmadarai/madaradatbazis-accnis>. Accessed 5 Mar 2023
41. BI (BirdLife (2021)) IUCN Red List of Threatened Species: *Aquila chrysaetos*. IUCN Red List Threat Species
42. *Achrysaetos* status report. https://natureart12.eionet.europa.eu/article12/summary?period=3&subject=Aquila+chrysaetos&reported_name=. Accessed 5 Mar 2023
43. HU species report. https://cdr.eionet.europa.eu/Converters/run_conversion?file=/hu/eu/art12/envxa7nqg/HU_birds_reports_20191022-133656.xml&conv=612&source=remote#A091_B. Accessed 5 Mar 2023
44. BI (BirdLife (2021)) IUCN Red List of Threatened Species: *Falco biarmicus*. IUCN Red List Threat Species
45. *Fbiarmicus* status report. https://natureart12.eionet.europa.eu/article12/summary?period=3&subject=Falco+biarmicus&reported_name=. Accessed 5 Mar 2023
46. BI (BirdLife (2021)) IUCN Red List of Threatened Species: *Falco rusticolus*. IUCN Red List Threat Species
47. *Frusticolus* status report. https://natureart12.eionet.europa.eu/article12/summary?period=3&subject=Falco+rusticolus&reported_name=. Accessed 5 Mar 2023
48. BI (BirdLife (2021)) IUCN Red List of Threatened Species: *Falco peregrinus*. IUCN Red List Threat Species
49. *Fperegrinus* status report. https://natureart12.eionet.europa.eu/article12/summary?period=3&subject=Falco+peregrinus&reported_name=. Accessed 5 Mar 2023
50. (2015) Vándorsólyom. In: Magy. Madártani És Termvéd. Egyes. <https://www.mme.hu/magyarorszagmadarai/madaradatbazis-falper>. Accessed 5 Mar 2023

51. Horváth MB, Martínez-Cruz B, Negro JJ, Kalmár L, Godoy JA (2005) An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *J Avian Biol* 36:84–88. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03370.x>
52. 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>
53. Weigmann H-D (1968) Reduction of disulfide bonds in keratin with 1,4-dithiothreitol. I. Kinetic investigation. *J Polym Sci [A1]* 6:2237–2253. <https://doi.org/10.1002/pol.1968.150060819>
54. Ramel C (1997) Mini- and microsatellites. *Environ Health Perspect* 105:781–789. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s4781>
55. Tautz D, Schlötterer C (1994) Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev* 4:832–837. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0959-437X(94)90067-1)
56. Biscotti MA, Olmo E, Heslop-Harrison JS (Pat) (2015) Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res* 23:415–420. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9499-z>
57. Senan S, Kizhakayil D, Sasikumar B, Sheeja TE (2014) Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview. *Not Sci Biol* 6:1–13. <https://doi.org/10.15835/nsb619199>
58. 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>
59. Kesselring H, Hamann E, Stöcklin J, Armbruster GFJ (2013) New microsatellite markers for *Anthyllis vulneraria* (*Fabaceae*), analyzed with Spreadex gel electrophoresis. *Appl Plant Sci* 1:1300054. <https://doi.org/10.3732/apps.1300054>
60. Jiraskova A, Lenicek M, Vitek L (2010) Simultaneous genotyping of microsatellite variations in HMOX1 and UGT1A1 genes using multicolored capillary electrophoresis. *Clin Biochem* 43:697–699. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.01.006>
61. Hodel RGJ, Segovia-Salcedo MC, Landis JB, Crowl AA, Sun M, Liu X, Gitzendanner MA, Douglas NA, Germain-Aubrey CC, Chen S, Soltis DE, Soltis PS (2016) The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. *Appl Plant Sci* 4:1600025. <https://doi.org/10.3732/apps.1600025>
62. Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9:615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
63. Bagshaw ATM (2017) Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. *Genome Biol Evol* 9:2428–2443. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx164>
64. Linacre A (2021) Animal Forensic Genetics. *Genes* 12:515. <https://doi.org/10.3390/genes12040515>
65. Caballero IC, Bates JM, Hennen M, Ashley MV (2016) Sex in the City: Breeding Behavior of Urban Peregrine Falcons in the Midwestern US. *PLOS ONE* 11:e0159054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159054>
66. Scherer J, Wink M, Schröder U, Vences M (2021) Newly developed microsatellite markers for the Eurasian Sparrowhawk, *Accipiter nisus* (Linnaeus, 1758), with a preliminary assessment of its genetic variation. *Biodivers J* 12:391–402. <https://doi.org/10.31396/Biodiv.Jour.2021.12.2.391.402>
67. Busch JD, Katzner TE, Bragin E, Keim Paul (2005) Tetranucleotide microsatellites for *aquila* and *haliaeetus* eagles. *Mol Ecol Notes* 5:39–41. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00823.x>

68. Huang Y, Tu J, Cheng X, Tang B, Hu X, Liu Z, Feng J, Lou Y, Lin L, Xu K, Zhao Y, Li N (2005) Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. *Genet Sel Evol* 37:455. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-37-5-455>
69. López-Urbe MM, Green AN, Ramírez SR, Bogdanowicz SM, Danforth BN (2011) Isolation and cross-species characterization of polymorphic microsatellites for the orchid bee *Eulaema meriana* (*Hymenoptera: Apidae: Euglossini*). *Conserv Genet Resour* 3:21–23. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9271-9>
70. Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *J Avian Biol* 36:348–360. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03465.x>
71. 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>
72. Dawson RJG, Lisle Gibbs H, Hobson KA, Yezerinac SM (1997) Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79:506–514. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.190>
73. Rutkowski R, Rejt Ł, Tereba A, Gryczyńska-Siemiątkowska A, Janic B (2010) Population genetic structure of the European kestrel *Falco tinnunculus* in Central Poland. *Eur J Wildl Res* 56:297–305. <https://doi.org/10.1007/s10344-009-0320-1>
74. Martínez-Cruz B, David VA, Godoy JA, Negro JJ, O'Brien SJ, Johnson WE (2002) Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Mol Ecol Notes* 2:323–326. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00231.x>
75. Naito-Liederbach AM, Sato Y, Nakajima N, Maeda T, Inoue T, Yamazaki T, Ogden R, Inoue-Murayama M (2021) Genetic diversity of the endangered Japanese golden eagle at neutral and functional loci. *Ecol Res* 36:815–829. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12246>
76. Topinka JR, May B (2004) Development of polymorphic microsatellite loci in the northern goshawk (*Accipiter gentilis*) and cross-amplification in other raptor species. *Conserv Genet* 5:861–864. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-1973-7>
77. Takaki Y, Kawahara T, Kitamura H, Endo K, Kudo T (2009) Genetic diversity and genetic structure of Northern Goshawk (*Accipiter gentilis*) populations in eastern Japan and Central Asia. *Conserv Genet* 10:269–279. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9567-4>
78. Haughey CL, Sage GK, DeGange GR, Sonsthagen SA, Talbot SL (2016) Development of novel microsatellite markers for the Northern Goshawk (*Accipiter gentilis*) and their utility in cross-species amplification. *Avian Biol Res* 9:195–199
79. Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour* 12:456–463. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x>
80. ECO SAFE Manual. <http://www.biocenter.hu/pdf/ecosafe.PDF>. Accessed 4 Apr 2023
81. Peak Scanner™ Software v1.0. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4381867>. Accessed 2 Mar 2023
82. OSIRIS - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/osiris/overview/>. Accessed 2 Mar 2023
83. Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>

84. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
85. Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
86. Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
87. Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered* 86:485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
88. Chen JJ (2010) The Hardy-Weinberg principle and its applications in modern population genetics. *Front Biol* 5:348–353. <https://doi.org/10.1007/s11515-010-0580-x>
89. Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol Ecol* 10:249–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x>
90. Jamieson A, C S Taylor St (1997) Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim Genet* 28:397–400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1997.00186.x>
91. Wright S (1965) The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution* 19:395–420. <https://doi.org/10.2307/2406450>
92. Belokon MM, Belokon YS, Nechaeva AV, Sylvestrov NA, Sarychev EI, Beme IR (2022) Genetic Identification and Relationship Analysis of Captive Breeding Falcons. *Russ J Genet* 58:705–717. <https://doi.org/10.1134/S1022795422060023>
93. Bryndová M, Putnova L, K. K, P. B, Urban T (2012) Genetic differences between wild and captive populations of the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and the saker falcon (*Falco cherrug*) living in the Czech Republic. *J Agric Sci Technol B ISSN 2161-6264* 2:642–651
94. Mengoni C, Zuberogoitia I, Mucci N, Boano G, Urban T, Guzzo E, Sarà M (2018) Genetic variability in Peregrine Falcon populations of the Western Palaearctic region. *Ornis Hung* 26:12–26. <https://doi.org/10.1515/orhu-2018-0012>
95. Weaving A, Jackson HA, Nicholls MK, Franklin J, Vega R (2021) Conservation genetics of regionally extinct peregrine falcons (*Falco peregrinus*) and unassisted recovery without genetic bottleneck in southern England. *Conserv Genet* 22:133–150. <https://doi.org/10.1007/s10592-020-01324-z>

A képek forrásai

1. ábra:(A) (<https://www.flickr.com/photos/bcicel/>) - A feltöltő saját munkája, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12765564>
- (B) Áthozva a hu.wikipedia projektből a Commonsba., 2008. szeptember 10. (eredeti feltöltésének dátuma), CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32917307>
- (C) Golden Eagle 4aUploaded by Magnus Manske, CC BY 2.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21115944>
- (D) Flickr here, CC BY 2.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1580786>
- (E) Flickr: Gyr falcon - Falco rusticolus - Fálki, CC BY 2.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18525962>
- (F) A feltöltő saját munkája, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=38755194>

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Vili Nórának és Dr. Szabó Krisztiánnak, hogy mindenben támogattak, türelmesen kijavították a hibáimat, és meglátásaikkal, ötleteikkel jobbá tették ezt a dolgozatot.

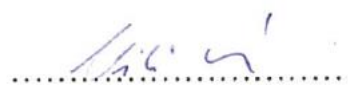
Köszönet illeti a Magyar Solymász Egyesületet és a Magyar Ifjak Reform Solymász Alakulatát, a tenyésztőket és tulajdonosokat, amiért hozzájárultak a munkámhoz a madaraik mintáival.

Köszönet jár mindenkinek a laborból a sok segítségért, könnyebbé tettétek az életemet.

Hálával tartozom családomnak, mert mindig számíthatok rájuk, és nyugalmat biztosítottak nekem ezekben a nehéz időkben.

Alulírott Dr. Vili Nóra, mint témavezető és Dr. Szabó Krisztián, mint társtémavezető igazolom, hogy Németh Dorina Mercédesz biológia alapszakos hallgató „Mikroszatellita markerek rokonfajok közötti tesztelése solymászmadarokban” című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2023 április 28.



Témavezető



Társ-témavezető

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név:Németh Dorina Mercédesz.....
Elérhetőség (e-mail cím):...nemeth.dorina2001@gmail.com.....
A feltöltendő mű címe:... Mikroszatellita markerek rokonfajok közötti tesztelése
solymászmadarokban.....
A mű megjelenési adatai:...Budapest, 2023.....
Az átadott fájlok száma:1.....

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).

Beleegyeznek, 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 HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2023. év ...04.....hó ...28...nap

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutjra 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, szolgáltatassa, 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.