

SZENT ISTVÁN EGYETEM ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR

Ökológia Tanszék

**MAGYARORSZÁGI PARLAGI SASOK (*AQUILA HELIACA*) TÚLÉLÉSI
VALÓSZÍNŰSÉGEI ÉS SZAPORODÁSI RENDSZERE MIKROSZATELLITA
ALLÉLEK ALAPJÁN**

BSc szakdolgozat

Készítette: **Gyarmati Ádám**
SZIE-ÁOTK, biológia BSc

Témavezető: **Dr. Kövér Szilvia**
SZIE-ÁOTK, biológus

Társ-témavezető: **Szabó Krisztián**
SZIE-ÁOTK, biológus

Budapest

2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések és idegen szavak jegyzéke	2
2. Összefoglalás	4
3. Bevezetés	5
3.1. A parlagi sas és természetvédelmi helyzete	5
3.2. Nem-invazív mintavételezés	6
3.3. Mikroszatelliták és genotipizálási hibák	7
3.4. Rokonsági viszonyok vizsgálata	8
3.5. Jelölés-visszafogás	8
3.6. Célkitűzéseink	9
4. Anyag és módszerek	10
4.1. Tollak gyűjtése	10
4.3. PCR reakciók mikroszatellita lókuszokra és ivarmeghatározásra	12
4.4. Mikroszatellita lókuszok genotipizálása	14
4.5. Toll genotípusok egyesítése	14
4.7. Alléldiverzitás	15
4.8. Túlélési valószínűségek becslése	16
5. Eredmények	17
5.1. Általános eredmények	17
5.2. Mikroszatellita lókuszok	17
5.3. Becsült szülői jelenlétek	18
5.4. EPF események	19
5.5. Az anyai és apai eredetű allélek diverzitása	20
5.6. Túlélési valószínűségek	20
6. Diskusszió	24
7. Irodalomjegyzék, hivatkozások	28
8. Köszönetnyilvánítás	31
9. Summary	32

1. Rövidítések és idegen szavak jegyzéke

territórium - a költőpár által aktívan védett terület

nem-invazív mintavétel - az egyedek nem feltétlenül vannak jelen a mintavételnél, a vizsgálatban valamilyen általuk hátrahagyott nyomot használnak fel, mint például szőr vagy toll

replication slippage - tandem ismétlődő di/trinukleotid DNS-szekvenciák esetében gyakran előforduló mutáció-típus, amely di/trinukleotid egységek beékelődésével/kiesésével jár a DNS replikáció közben

unequal crossing over - az ismétlődő részeket tartalmazó homológ kromoszómák pontatlan párosodásából eredő duplikáció vagy deléción, amely több gént vagy rövidebb szakaszokat is érinthet

génkoverzió - a rekombináció során az egyik homológ duplaszálas törést szenved, amely a másik homológgról rekombinációval javítódik

pontmutáció - a DNS molekula egyetlen bázisa megváltozik a megkettőződéskor

bp - bázispár

(genetikai) marker - olyan általában rövid, nagy variabilitású DNS szakasz (pl. mikroszatellita), amely alkalmas egyedek megkülönböztetésére, valamint ismert a genomon belüli helyzete

PCR - "Polymerase Chain Reaction", polimeráz láncreakció

amplifikálás - PCR technológiát felhasználva egy adott DNS szakasz sokszorosítása

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

DNS-profil - általában rövid, ismétlődő, nagy variabilitású nem kódoló DNS szakaszok mintázata, amely jellemzi a vizsgálat egyedeit

overnight mélyhűtőbe helyezés - egy éjszakára mélyhűtőbe helyezés

rpm - "round per minute"

MRR - Mark Release Recapture, azaz jelölés-visszafogás

multiplex PCR - egy PCR reakció során egyszerre több szakasz felszaporítása, több primerpárral

fogástörténet - egy egyedhez tartozó adatsor, melyben 1-esek jelölik ha megfogtuk, és 0-ások ha nem fogtuk meg az egyedet adott mintavételezéskor

szexálás - ivarmeghatározás

nullallél - olyan allél, amely nem amplifikálható valamilyen okból, így az adott lókuszon az egyedet tévesen homozigótának ítéldhetjük

allélkiesés - híg, vagy rossz minőségű, töredezett DNS amplifikálása során a heterozigótáknál csak az egyik allél szaporodik fel

HWE - Hardy-Weinberg egyensúly

EPF - extra pár fertilizáció

PIC - "polymorphic information content", a lókuszek polimorfizmusának egyik mérőszáma

PI - "probability of identity", annak a valószínűsége, hogy a mintából két véletlenszerűen kiválasztott egyed genotípusa megegyezik

GOF - "goodness of fit", azaz illeszkedés-vizsgálat, ezzel ellenőrizhetjük, hogy egy modell illeszkedik-e az adatokra

c-hat érték - GOF tesztek által kapott érték, amely megmutatja, hogy a modell mennyire illeszkedik jól az adatokhoz. Ha ez az érték alacsony (egy és kettő közötti), akkor azzal érdemes korrigálni a kapott modelleket, így megbízhatóbb eredményt kapva

phi - túlélési valószínűség

p - fogási valószínűség

az egyed jelenléte - az egyedet az adott évben megfigyeltük (megmintáztuk vagy láttuk), fogástörténetében „1” szerepel az adott évre

SE - "standard error"

2. Összefoglalás

A parlagi sas (*Aquila heliaca*, SAVIGNY, 1809) egy territoriális, szociálisan monogám ragadozó madár. Habár a költőpárok száma Magyarországon nő, fontosnak találtuk, hogy információt szolgáltatassunk a fajvédelem számára, ezért megvizsgáltuk szaporodási rendszerüket egy 3 éves, és túlélési valószínűségeiket egy 10 éves, 135 territóriumról származó adatsoron. Mint minden más nagytermetű ragadozó madarat, a parlagi sast is nehéz befogni és gyűrűzni, ezért molekuláris módszereket alkalmaztunk egyedi azonosításukra. DNS-forrásként a fiókák hónaljából fészekmonitorozás alkalmával kitépelt tollakat, valamint a fészek környékén talált vedlett felnőtt tollakat használtuk. A tollakból kinyert DNS-ből meghatároztuk az ivarukat, valamint fölszaporítottunk 13 mikroszatellita lókuszt, melyből 10 bizonyult alkalmasnak az egyedi azonosításhoz. Ahol rendelkezésünkre állt az adott fészekből apai, anyai és fióka genotípus, ott EPF vizsgálatot végeztünk. Az öt vizsgált esetből egyben találtunk olyan mintázatot, ami EPF-re utalhat. A fiókák apai és anyai eredetű alléljainak diverzitásában a randomizációs (permutációs) teszt nem mutatott ki szignifikáns különbséget a várt heterozigócia és az átlagos lókuszonkénti allélszám alapján. Így összegezve, az alléldiverzitás és az EPF vizsgálat alapján genetikailag monogámnak vagy nagyon kevés EPF-re toleránsnak találtuk a fajt. Három év alatt a vedlett tollakból 191 költő madár 438 jelenlétét tudtuk kimutatni (jelenlét alatt értjük, hogy az egyedet az adott évben megfigyeltük, fogástörténetében „1” szerepel az adott évre). Mivel nem sikerült minden territóriumban vedlett hím és tojó tollat találni, a meg nem mintázott szülők jelenlétére a megmintázott fiókák genotípusából következtettünk, figyelembe véve a másik szülő genotípusát. Így anyasági-, apasági- és szülőpár-vizsgálatok segítségével összesen 12 becsült jelenlétet állapítottunk meg, az adott évben meg nem mintázott, de más évekből ismert genotípusú egyedekre. A becsült apai jelenlétekkkel kiegészített fogástörténeteket használva a hímek fogási valószínűségei megemelkedtek, így pontosabb túlélési valószínűség becslést kaptunk rájuk. A jelölés-visszafogás vizsgálat alapján a magyarországi parlagi sasok éves becsült túlélése $0,87 \pm 0,03$, amely nem függ sem az ivartól, sem a költési helyre becsült mérgezés veszélytől. Eredményeink eddig hiányzó alapvető információkat szolgáltatnak a magyarországi parlagi sas populációról a: túlélési valószínűség és szaporodási rendszer tekintetében. Emellett a rokonsági vizsgálatok és a mérgezés hatásának vizsgálata a gyakorlati természetvédelem számára felhasználható eredményeket adtak, melyek a további terepmunkák tervezését is segítik.

3. Bevezetés

3.1. A parlagi sas és természetvédelmi helyzete

A parlagi sas (*Aquila heliaca*, SAVIGNY, 1809) egy nagytermetű, -185–215cm szárnyfesztávolságú, 2500–4500g-os- territoriális, szociálisan monogám madár. A szexuális dimorfizmus csekély, habár a tojók, mint általában a madaraknál, valamivel nagyobbak, robosztusabbak.

A parlagisas-fiókák körülbelül tíz hetes korukban (Kovács et al., 2005) repülnek ki a fészekből. Kirepülésük után még a család együtt marad egy pár hónapig. A fiatal egyedek három-négy éves korukig kóborolnak, amíg ivarérettek nem lesznek. Ekkor párt és territóriumot választanak, majd a pár együtt, általában egy magas fa csúcsán, a táplálkozót erület közelében fészket épít. A tojásokra és a fiókákra általában a tojó vigyáz a fészekből, míg a hím távolabbról, a kiülő fájáról figyelve védelmezi a territóriumot és táplálékot keres. A parlagi sas legkedveltebb táplálékállata az ürge, hörcsög (parlagisas.hu) valamint a mezei nyúl. Enyhe teleken a költő madarak kitartanak fészkelő területükön, a fiatal, még nem ivarérett példányok kóborolnak, vonulnak (parlagisas.hu).

A parlagi sas eurázsiai elterjedésű, a sztyeppzónához kötődő ragadozó. Ázsián belül nagyjából a sztyeppzónát követve található meg. Európában három nagyobb állományát különböztethetjük meg: (Horváth et al., 2002): a Kárpát-medencei (Magyarország és Szlovákia) populáció, melynek állománya jól ismert és növekvő tendenciát mutat; a balkáni (Macedónia, Bulgária, Törökország), ahol elég kicsi és szétszóródott állományokat tartanak számon; valamint a kelet-európai (Ukrajna, Oroszország), amelyik a legnagyobbra becsült, habár elég kevés információnk van róla.

A parlagi sas világállománya kevesebb, mint 15 000 párra becsült. A Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) vörös listáján a sebezhető ("vulnerable", VU) kategóriába tartozik (BirdLife International, 2013).

A magyarországi populáció a vadászat, a háborúk és az ipari fellendülés következtében hanyatlásnak indult, a XX. század közepére elérve mélypontját (Bagyura et al., 2002). A hanyatlásban még szerepe volt, sőt ma is szerepe van az intenzív mezőgazdasági tevékenységnek (zavarás, mérgezés, gázolás). A 90-es évektől az intenzív fajvédelemnek,

valamint a mezőgazdasági művelésben bekövetkezett változásoknak köszönhetően hazánkban stabilizálódott számuk, sőt lassú növekedésnek indult. Magyarországi költőpár számukat napjainkban 150 körülire becsülik. A költőpárok száma országunk kivételével az egész világon csökkenő vagy stagnáló tendenciát mutat (Horváth et al., 2002). Hazánkban fokozottan védett, természetvédelmi értéke egymillió forint.

A parlagi sasokat veszélyeztető antropogén tényezők napjainkban: mérgezés, lelövés, gázolás, zavarás, élőhely elvesztése, áramütés, fészekrablás (parlagisas.hu). A halál okai közül a megkerült parlagi sas tetemek alapján a mérgezés a legjelentősebb (33%) (parlagisas.hu). A mérgezés legtöbbször az engedélyezett növényvédő és nem szelektív rágcsálóirtó szerek nem megfelelő használata és a nem engedélyezett vegyszerek miatt történik. Mivel a mérgezést a hazai parlagisas-populáció jelenlegi legnagyobb veszélyeztető forrásának gondoljuk, indokoltnak tartjuk a túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálatát.

Egy korábbi, vedlett tollakat felhasználó kutatás alapján egy Kazahsztánban található parlagisas-állomány egyedei genetikailag is monogámnak bizonyultak (Rudnick et al., 2005). Ugyanebben a kutatásban a populációra túlélési valószínűségeket is becsültek (0,84). A Kárpát-medencében még nem készült a parlagi sasok szaporodási rendszerére irányuló vizsgálat és túlélési valószínűséget sem becsültek. Viszont túléléssel kapcsolatos eredmények már születtek: Dr. Vili Nóra PhD értekezése alapján az átlagos évi kicserélődési ráta 27,5% és 35,5% közé esik két-nyolc éven át követett madarak adatai alapján. Így fontosnak találtuk, hogy hiányzó alapvető információkat szolgáltatassunk a magyarországi parlagi sas populációról: túlélési valószínűség és szaporodási rendszer. Emellett a rokonsági vizsgálatok és a mérgezés hatásának vizsgálatával a gyakorlati természetvédelem számára felhasználható eredményeket szeretnénk szolgáltatni, melyek a további terepmunkák tervezését is segíthetik.

3.2. Nem-invazív mintavételezés

Mivel a parlagi sas nagytermetű, valamint fokozottan védett madár, ezért különleges mintavételi eljárást igényel. A fiókákat (1. ábra) minden évben gyűrűzi a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME) és munkatársaik, de sajnos minimális az esélye annak, hogy később leolvassuk az egyedi kódot. Viszont a fiókák hónaljából tollat is tépnek, valamint a felnőttek vedlett tollait is összegyűjtik, amelyek segítségével az egyedeket azonosítani tudjuk a genotípusuk meghatározásával.

A vedlett tollak gyűjtése azért is preferált, mert egy nem-invazív mintavételezési módszer az egyedek azonosítására. A fióka tollak még frissek és tele vannak vérrel. A költő madarak tollainak pedig a felső köldöke (superior umbilicus) használható fel, amelyben értékes vérrög található (Horváth et al., 2005). A szerzett tollakból nyert DNS izolálásával és a megfelelő lókuszokon a mikroszatellita allélek meghatározásával a madarak egyedileg azonosíthatóak (Rudnick et al., 2008 és 2009).



1. ábra: Egy parlagi sas fióka.

3.3. Mikroszatelliták és genotipizálási hibák

A mikroszatelliták egy-hat bp hosszúságú, ismétlődő szakaszok a genomban, amiket eddig minden élőlényben sikerült izolálni (Li et al., 2002). Jelentőségük, funkciójuk még nem teljesen tisztázott (néhányra azonosítottak regulációs és organizációs funkciókat), általában közel neutrálisnak tekinthetők. Mutációs rátájuk $10^{-6} - 10^{-2}$ per lókusz per generáció, amely elég nagynek minősül bármely kódoló génszakasz mutációs rátájával összevetve. A mikroszatelliták ismétlésszáma változik a mutációk során. A mikroszatelliták ismert, jellemző mutációi a replication slippage, génkonverzió, unequal crossing over és a pontmutáció (Ellegreen 2004). A gyakran bekövetkező, ismétlésszámot csökkentő vagy növelő mutációk következtében a mikroszatellita lókuszok polimorffá válnak, amely az ismétlések számában, így az allélek hosszában nyilvánul meg. Ezen tulajdonságok a mikroszatellitákat ideális markerré teszik közeli rokonok, vagy biogeográfiai vizsgálatokban akár távoli rokonok vizsgálatához. Egy adott populációban azokat a mikroszatellita lókuszokat használhatjuk, amelyekre elég nagy változatosságot találunk. Itt a változatosság mérőszáma a heterozigócia mértéke, a lókuszonkénti allélszám (Jones et al., 2010) valamint a PIC érték.

A mikroszatellita allélek meghatározása során felléphetnek genotipizálási (leolvasási) hibák. Ha túl fragmentált a DNS, vagy híg a DNS oldat, előfordulhatnak allélkiesések. Ezt okozhatja például az, hogy annyira töredezett a DNS, hogy a kettő közül csak az egyik allél kerül bele a PCR reakcióelegybe. Ilyen esetben a heterozigóta egyedeket tévesen homozigótának ítéelhetjük. A PCR elegybe belekerülhetnek PCR-gátló anyagok is, vagy kontaminálódhatnak más DNS-sel. Ekkor előfordulhat, hogy egyik allél sem szaporodik fel. Az allélek amplifikálása során a polimeráz enzim hibái miatt többféle terméket kapunk: ezek közül legnagyobb mennyiségben a várt termék lesz jelen, de a pár mikroszatellita ismétléssel nagyobb és kisebb termékek (dadogás) zavarhatják a az allélhosszak leolvasását. Ezeket a genotipizálási problémákat a többszöri mintavételezéssel, amplifikálással illetve genotipizálással minimalizálni lehet.

3.4. Rokonsági viszonyok vizsgálata

A rokonsági viszonyok vizsgálatánál a DNS-profilokat ("genetic fingerprinting") használják két egyed biológiai szülő-leszármazott kapcsolatának determinálására. Az apasági tesztek során meggyőződhetnek arról, hogy az a hím-e a leszármazott biológiai apja, anyasági teszt során pedig, hogy az a nőstény-e a biológiai anyja. Ehhez minél több, minél változatosabb lókuszt áll rendelkezésre, annál biztosabban azonosítható a biológiai szülő a potenciális apák és anyák közül. A rokonsági viszonyok vizsgálatához nagy technológiai áttörést jelentett a mikroszatellita lókusztok felfedezése (Jones et al., 2010), mivel a mikroszatellita markerek könnyen elemezhető egy-lókusztos, kodomináns, hipervariabilis markerek (Avisé 2004 és Pemberton 2009).

3.5. Jelölés-visszafogás

A módszer -"mark release recapture", azaz jelölés-visszafogás- az első alkalommal befogott és megjelölt állatok visszafogásán és az újonnan fogottak megjelölésén alapul. Alapvetően populációméret, túlélési valószínűség, valamint születési, halálozási, ki- és bevándorlási ráták becsléséhez szokták használni. Régi hagyomány a madárgyűrűzési adatok ilyen jellegű elemzése. Madárgyűrűzéskor az egyedek egyedi azonosítót kapnak, amit visszafogáskor vagy visszalátáskor leolvasnak.

Minden alkalommal feljegyzik melyik állatokat fogták be (vagy látták), így minden egyedre kapnak egy fogástörténetet. A fogástörténeteket tartalmazó táblázatban minden egyes oszlop egy-egy mintavételi alkalmat és minden egyes sor egy-egy egyedet jelent. A fogástörténetekből becsülhetők meg a paraméterek, amelyek a látszólagos túlélési valószínűségek és a fogási valószínűségek. Például vegyük azt, hogy az egyik egyedet az első alkalommal megjelöltük, második alkalommal nem fogtuk be, harmadjára viszont igen, így a fogástörténete 101. Az alábbi összefüggés azt mutatja, hogy mekkora valószínűséggel (P) alakul ki ez a fogástörténet:

$$P = \Phi_1 * (1 - p_2) * \Phi_2 * p_3 ,$$

ahol a Φ_i -k az i -edik alkalomról az $i+1$ -edikre való túlélés valószínűségei, a p_i -k az egyes alkalmak fogási valószínűségei. A paramétereket a maximum likelihood (ML) módszerével becsülik meg (Amstrup et al., 2005).

3.6. Célkitűzéseink

Szakedolgozatom során szeretnénk kiértékelni a magyarországi parlagi sasok egyedi azonosításához használt 13 mikroszatellita lókuszt felhasználhatóságát. Mivel sok esetben nem találtuk meg mindkét költő madár tollát a territóriumokon, ezért a meg nem mintázott parlagi sas szülők jelenlétére következtettünk a megmintázott családtagok segítségével, hogy:

- kiegészítsük a fogástörténeteket a jobb túlélés becslések érdekében,
- a gyakorlati természetvédelem számára több információt szolgáltatassunk, melyek a további terepmunkák tervezését is segítik.

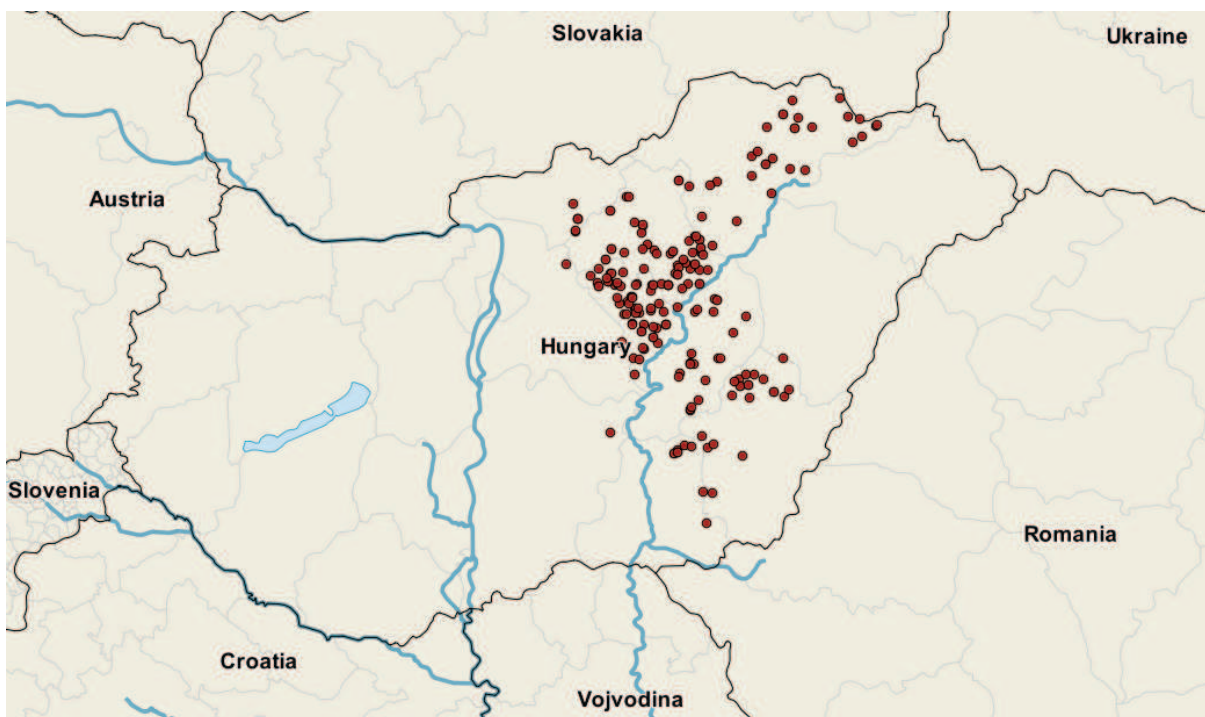
Fontosnak találtuk, hogy hiányzó alapvető információkat szolgáltatassunk a magyarországi parlagi sas populációról:

- a parlagi sas fészekaljak elemzésével, valamint az anyai és apai eredetű allélek diverzitásának összehasonlításával szeretnénk vizsgálni a hazai parlagi sasok szaporodási rendszerét,
- valamint szeretnénk egy megbízható becslést adni a magyarországi parlagi sasok túlélési valószínűségeire és vizsgálni, hogy ez függ-e az ivartól, illetve a költési helyen becsült mérgezési veszélytől.

4. Anyag és módszerek

4.1. Tollak gyűjtése

A parlagisas-tollak Magyarországról, főképp az Alföld és az Északi-középhegység területéről lettek gyűjtve (2. ábra). A Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME), a nemzeti parkok munkatársai és önkéntesek segítségével minden évben elvégzik a fészkek ellenőrzését és a fiókák gyűrűzését a hazai költőállomány nagy részén.



2. ábra: A 2011–2013-as gyűjtési helyek elhelyezkedése. Az ábra QGIS (QGIS Development Team, 2014) nevű programmal készült.

A monitorozást még azelőtt végzik, mielőtt a fiókák elérnék a nyolc-tíz hetes kort, mert olyankor már bármely kisebb zavarásra kiugorhatnak a fészkekből. A fészkek (és esetlegesen a kiülőfa) alól a költő madarak vedlett tollait összegyűjtötték. Előző évi tollat nem lehet találni a földön, mivel azok hónapok alatt szinte teljesen lebomlanak természetes körülmények között. Miután a fiókákat leeresztették a fészkekből, meggyűrűzték őket, lemérték pár fontos paraméterüket, majd a hónaljukból tollmintát vettek. Rögtön alkoholos eppendorf csőbe rakták fiókatollakat, mivel azok DNS tartalma könnyen roncsolódik.

A tollakat a Szent István Egyetem Biológiai Intézetébe (Budapest) szállították, ahol sor került a további folyamatokra. A költő madarak tollait száraz, hűvös helyen, a fiókatollakat alkoholban, -20°C -on tároltuk preparálásig.

Szakedolgozatomhoz a 2011–2013-ban gyűjtött felnőtt-és fiókatollakat használtuk fel. Ezen kívül, a korábbi mintázások alapján Vili és mtsai (2013) által genotipzált felnőtt költő madarak adatait is felhasználtuk a 2000–2006 periódusból.

4.2. DNS-izolálás

A következő eljárások lényege, hogy kinyerjük a tiszta DNS-t a madarak tollaiból. Az ehhez vezető út első lépéseként pedig ki kell preparálni a tollakból az értékes részeket.

A fiókatollakra és a költő madarak tollaira különbözik a módszer. A költő madarak tollait steril felületre helyeztük, majd alkohollal sterilizáltuk a csévét. Ezt követően kivágtuk a felső köldököt (superior umbilicus), amelyben értékes vérrög (Horváth et al., 2005) található. A darabkát egyes esetekben még több részre vágtuk, majd a vérrögöt felszínre hoztuk bemetszéssel. A darabokat eppendorf csőbe helyeztük. A fiatal madarak tollainál a felső köldök helyett az egész tollcséve végét lemetszettük.

A második lépés a tolldarabok emésztése, amely a sejtek és fehérjék bontásáért, így a DNS szabaddá tételéért felelős. A fiókatollakat áthelyeztük kiszáritás után új eppendorf csövekbe. Az eppendorf csövekbe $155\mu\text{l}$ dH_2O -t, $100\mu\text{l}$ proteináz-K puffert, $15\mu\text{l}$ proteináz-K-t (NaCl és EDTA alapú), $10\mu\text{l}$ 1,4-ditiotreitolt (DTT, 1M) és $15\mu\text{l}$ 20%-os szódium-dodecil-szulfátot (SDS) mértünk. A DTT a diszulfid hidakat bontotta, az SDS főleg a membránokat, a proteináz-K pedig a fehérjéket (hisztonok). Az összemérés után a mintákat 10 másodpercig vortex-eltük majd 56°C -os vízfürdőbe helyeztük 12–20 óráig.

A harmadik lépés a DNS-kivonás. Itt a már szabad DNS-t izoláltuk a többi anyagtól. Ezt is kétféleképpen, eleinte egy módosított kisózásos eljárással (Gemmel és Akiyama 1998), majd izoláló kit-ek segítségével végeztük. A kisózásos módszert azzal kezdtük, hogy az eppendorf csövekből minél több folyadékot átpipettáztunk egy másik csőbe. Ehhez adtunk $315\mu\text{l}$ NaCl (5M) oldatot és vortex-eltük. A csőbe mértünk $630\mu\text{l}$ kloroform-izoamil-alkoholt (24:1 arányú), hogy minél tisztább legyen a DNS, majd 20-szor átforgattuk a csöveget, ezután 10 percre 13.000 rpm sebességű centrifugába helyeztük őket. A DNS a felső folyadékrétegbe

került, amelyet átmértünk egy újabb eppendorf csőbe, amihez adtunk még 400µl izopropanolt. Ezt is megforgattuk 20-szor, hogy jól elkeveredjen az izopropanol, majd overnight -20°C-os mélyhűtőbe helyeztük, mert a hideg elősegíti a DNS kicsapódását. 10 perc 13.000 rpm sebességű centrifugázást követően óvatosan leszívtunk minél több folyadékot, elkerülve az eppendorf cső aljára fehér foltként kicsapódott DNS-t. Ehhez 800µl 70%-os etanolt adtunk, 10-szer átfordítottuk a csöveket majd 15 percre 13.000 rpm-en centrifugába raktuk. Ezt követően leszívtunk minél több alkoholt a mintáról, majd hagytuk hogy a minta teljesen kiszáradjon. Az eppendorf csövekben már csak a DNS található, ahhoz 50µl TE (10mM-es, Tris/HCl és 1mM-es EDTA) puffert adtunk, majd tároltuk a PCR reakciókig. A minták nagyobb részét különböző DNS-izoláló kitek (Thermo Scientific, Sigma és Qiagen) segítségével izoláltuk, centrifugát használva, a gyártó utasításai szerint.

A következő eljárás a mintákban található megfelelő DNS-szakaszok amplifikálása.

4.3. PCR reakciók mikroszatellita lókuszokra és ivarmeghatározásra

Vizsgálatunk szempontjából fontos tudnunk, hogy melyik toll melyik madárhoz, valamint hogy milyen ivarú madárhoz tartozik. Mivel ivaronként a tollak alakjában és színezetükben minimális különbség van, így genetikai alapon kellett döntenünk ivari hovatartozásukról.

Madaraknál a tojó a heterogametikus ivar (WZ), a hím pedig a homogametikus (ZZ). Található a W és a Z kromoszómán is egy változata a CHD1 génnek, amely a kromo-helikáz DNS-kötő fehérje kódolásáért felelős és a legtöbb madárfajban előfordul. A módszer lényege, hogy olyan szakaszokat amplifikálunk ezen gén intronjain belül, amelyek eltérő hosszúságúak a két kromoszómán (Fridolfsson és Ellegreen 1999). Mi a 2550F/2718R primer párokat használtuk erre a célra, így egy 600–700bp hosszú szakaszt kaptunk a PCR-reakció során mindkét ivarnál (Z kromoszóma), a tojóknál pedig még egy második, 400–450 bp hosszút is (W kromoszóma) (Horváth et al., 2005).

A DNS-profil elkészítéséhez a kiválasztott 13 mikroszatellita lókuszon a hatékonyabb munka érdekében multiplex PCR-t alkalmaztunk (1. és 2. táblázat). Az általunk használt lókuszok az Aa02, Aa27, Aa43, Aa56, Aa35, Aa36, Aa39, IEAAAG12, IEAAAG13, IEAAAG04, IEAAAG09, IEAAAG11, IEAAAG15 (Az IEAAAG inentől G-vel, az Aa pedig A-val lesz rövidítve.) a *Haliaeetus* vagy *Aquila* genusok genomjaira voltak tervezve. (Busch et al., 2005

és Martínez-Cruz et al., 2002) Ezek az oligonukleotidok a 3' végen fluorescens jelölést tartalmaztak (FAM-6, VIC, TET)

1. táblázat: PCR mixek és hozzájuk tartozó ciklusok.

Multiplex PCR	Szexálás	Tetra 12-13	Di 2-27	Di 43-56	Tetra 04-09	Tetra 11-15	Di 35-36-39
lókus 1	2550F-2718R	G12 (130bp)	Aa02 (160bp)	Aa43 (110bp)	G04 (240bp)	G11 (330bp)	Aa35 (250bp)
lókus 2		G13 (240 bp)	Aa27 (100bp)	Aa56 (250bp)	G09 (500bp)	G15 (110bp)	Aa36 (190bp)
lókus 3							Aa39 (120bp)
Primerek	2	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1, 5-1, 5-1, 5
H ₂ O	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	14,4
Taq puffer	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	2,5
Taq polimeráz	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,1
MgCl ₂	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	1
dNTP	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	1
DNS templát	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Végtérfogó	17	17	17	17	17	17	25
PCR ciklus	sex50, pwz	tetra66-60	di66-50	di66-50	tetra66-60	tetra66-60	di66-50

2. táblázat: PCR ciklusok.

PCR ciklus	sex50	di66-50	tetra66-60	p2wz
	95°C 2'	94°C 2'	94°C 2'	95°C 3'
	37 ciklus:	17 ciklus:	17 ciklus:	45 ciklus:
	95°C 30"	95°C 30"	92°C 30"	95°C 30"
	50°C 1'	66-50°C touchdown 30"	66-60°C touchdown 30"	56°C 30"
	72°C 1'	72°C 30"	72°C 30"	72°C 20"
	72°C 7'	21 ciklus:	21 ciklus:	72°C 5'
	10°C 20"	95°C 30"	92°C 30"	20°C 20"
		50°C 30"	60°C 30"	
		72°C 30"	72°C 30"	
		72°C 5'	72°C 5'	
		10°C 20"	20°C 30"	

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük (3. ábra). Az ellenőrzött mintákat mixekbe kevertük. Az egyik mixbe a G12, G13, A02, A27, A43, A56; a másikba pedig a G04, G09, G11, G15, A35, A36 és A39-es lókusok termékei kerültek egyenként.



3. ábra: Gélfotó egy szexálásról. Az első sorban ismert hosszú DNS szakaszok azaz a „létra” látható, a másodikban egy tojó, a harmadik és negyedik sorban egy-egy hím minta PCR-termékei.

4.4. Mikroszatellita lókuszok genotipizálása

Az ellenőrzött és mixekbe kevert PCR termékek hosszát kapilláris-elektroforézis segítségével határoztuk meg Abi 3130 automata szekvenátorral. A módszer lényege, hogy a fluoreszcensen jelölt minták mellett futnak meghatározott hosszúságú DNS szakaszok is, így az eltelt idő és a fluoreszcencia erőssége alapján a PCR-termékek hossza pontosan meghatározható. A kapilláris elektroforézisre a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában került sor. Az allélhosszak leolvasását a Peak Scanner nevű program segítségével ketten (Szabó Krisztián segítségével) egymástól függetlenül végeztük, majd ezek alapján határoztuk meg a konszenzus genotípust.

4.5. Toll genotípusok egyesítése

A genotipizálás során az adott évben adott territóriumon talált tollak genotípusát kaptuk meg. Így egy egyed (ha több évben is meg lett mintázva a tolla az adott fészekben) többször is meg lehet genotipizálva. Ezeket először kézzel, territóriumonként összenéztük és egyesítettük. Viszont egyes genotipizálási hibák és nullallélek előfordulásának esetén ezek minimálisan eltérőek lehetnek. Ez esetben ellenőriztük a genotípus leolvasásokat és feljegyeztük az esetleg így is megmaradó többféle allél lehetőséget adott lókuszra. Ki kellett hagynunk azokat a költő madarakhoz tartozó genotípusokat, amelyeknél nem tudtuk megállapítani a madár ivarát.

4.6. Fészekalj-elemzések

A fészekalj elemzéséhez a 2011–2013-as adatokat használtuk fel. Azokban a fészekben, ahol bizonyos évben nem tudtuk az egyik szülőt megmintázni (legtöbbször a hím), a fészekalj-elemzések során az adott évben megmintázott családtagok genotípusai segítségével tudunk következtetni a hiányzó szülőkre, valamint a megmintázott tojó-hím-fióka trió (innenről csak trió) genotípusa alapján eldöntöttük, hogy a megmintázott hím-e a genetikai apa. Ezeket kétféleképpen végeztük el: először kézzel, a mendeli szabályok alapján, majd a Cervus (Kalinowski et al., 2007) szoftver segítségével.

A potenciális szülők közül a LOD illetve Delta értékek alapján választottunk. A LOD érték annak a hányadosnak a logaritmus, amely számlálójában annak a valószínűsége van, hogy az adott egyed a leszármazott igazi apja vagy anyja, a nevezőjében pedig annak a valószínűsége,

hogy bármely másik egyed az igazi szülő. Ez az érték lehet pozitív, ha az adott egyed valószínűbb, hogy az igazi szülő, minthogy nem; valamint lehet negatív, ha valószínűbb, hogy nem ő az igazi szülő. A Delta érték a legvalószínűbb és a második legvalószínűbb szülő LOD értékének a különbsége. A programmal számított becslések kiértékeléséhez a LOD és Delta értékeket egyaránt figyelembe vettük.

4.7. Alléldiverzitás

Az alléldiverzitás vizsgálathoz 18 fészekalj állt rendelkezésre (olyan fészek, ahol adott évben mind az apa, mind az anya, valamint egy vagy több fióka is meg lett genotipizálva). Az anyai és apai eredetű allélek diverzitásának kiszámításához ki kell következtetnünk a fiókák és legalább egyik szülőjük segítségével, hogy melyik alléleket kapták a tojótól és melyikeket a hím-től (3. táblázat). Ezt kézzel, a mendeli szabályok alapján végeztük el. Abban az esetben, amikor ezt nem tudtuk pontosan eldönteni, az adott lókuszt kihagytuk. Mivel a testvérek genotípusa nem független, a több fiókás fészkekből véletlenszerűen választottunk ki egy fiókát. Ezt ötször csináltuk meg, így öt mintát kaptunk, melyek 18–18 fiókát tartalmaztak. Ezekben a mintákban egyik fióka sem testvére a másoknak. Mind az öt minta alapján kiszámoltuk a Cervus segítségével az alléldiverzizás mérőszámait, a várt heterozigóciát és az átlagos lókuszonkénti allélszámot. Az apai és anyai eredetű allélek diverzitását randomizációs (permutációs) teszttel hasonlítottuk össze, amelyet az R (R Development Core Team, 2008) nevű szoftverrel végeztünk.

3. táblázat: példa a fiókák apai és anyai eredetű alléljeire. A számok az allélhosszakat jelölik.

	A02	A43	A56	G04	G09	G11	G15	A35	A36	A39
hím	152 154	116 116	253 253	239 239	477 477	331 331	109 109	260 280	192 200	128 128
tojó	158 160	112 116	253 265	239 239	481 489	327 335	109 109	256 258	192 200	117
fióka	154 158	112 116	253 265	239 239	477 481	327 331	109 109	258 260	192 200	
apai eredetű allélek	154	116	253	239	477	331	109	260	0	128
anyai eredetű allélek	158	112	265	239	481	327	109	258	0	0

4.8. Túlélési valószínűségek becslése

A túlélési valószínűségek becsléséhez a 2000–2006 (Vili 2013), valamint a 2011–2013 között gyűjtött tollak alapján azonosított genotípusokat használtuk fel. Ez összesen 10 évet ölel fel egy négy éves megszakítással. Évente egy mintavételi alkalom volt.

A vizsgált parlagisas- populációt nyitottnak kell tekintenünk, mivel a kutatásban 10 év adatait használtuk fel, amely alatt számottevő populációméret-változás következhetett be, így elméletileg lehetséges a be- és kivándorlás, valamint a születés és a halálozás is. A nyitott populációs módszerek közül a csak élő visszafogásra hagyatkozó Cormack-Jolly-Seber modellt alkalmaztuk (Amstrup et al., 2005).

A túlélési és fogási valószínűségeket a MARK (White et al., 1999) nevű szoftverrel becsültük. A legbővebb modellekből indultunk ki mindig, amelyeknél külön túlélési valószínűségeket becsült a szoftver csoportonként és mintavételi alkalomként. Ezt a legbővebb modellt a MARK alapján $\phi(g^*t)p(g^*t)$ -vel jelöltük. A paraméterek a "phi", mint túlélési valószínűség és "p", mint fogási valószínűség. Ebben a jelölésben a "g" mutatja a paraméterek csoportfüggését, "t" az időfüggését, a "*" pedig az interakciót. Ha a paraméterekre konstans becslést (egyetlen becslés az összes mintavételi alkalomra és csoportra) kaptunk, azt "."-tal jelöltük. Kétféle csoportbeosztást használtunk: az egyikben a hímek és a tojók, a másikban a mérgezésnek kitett és nem kitett élőhelyek túlélési valószínűségeit becsültük.

A költőhelyeket két csoportra osztottuk: azokra amelyek 15km-es környezetében 2000–2006 vagy 2011–2013 időintervallumokban bizonyítottan sasmérgezés történt (territóriumok 38%-a), és azokra ahol nem tudunk ilyen eseményről (territóriumok 62%-a). Az ehhez szükséges adatokat (56 sas mérgezési adat) Deák Gábor (személyes közlés) szolgáltatatta, a Helicon Life+ pályázat által finanszírozott adatgyűjtésből.

Modellszelekciós módszerként az általános Akaike-féle információ kritériumot (*AIC*) használtuk (Amstrup et al., 2005). Ennek az értéke egyféle kompromisszumot képez a likelihood (*L*) és a paraméterszám (*P*) között. Segítségével megvizsgáltuk, hogy az adataink alapján fennáll-e a függés a látszólagos túlélési valószínűség és az ivarok illetve élőhelyek között.

5. Eredmények

5.1. Általános eredmények

A 2011–2013-as évek alatt 135 territóriumról gyűjtött 362 toll alapján 133 tojó, 58 hím és 44 fióka genotípust készítettünk el. A 44 fióka 18 territóriumról származott, összesen 27 költésből. A korábbi mintázások (2000–2006-os évek) 47 territóriumról származó adatát használtuk még fel, amely 72 tojó és 7 hím genotípust foglalt magába.

5.2. Mikroszatellita lókuszok

A vizsgált 13 mikroszatellita lókuszt a 2011–2013-as adatok alapján értékeltük. Ebből hármat, az A27, G12 és G13-as lókuszt ki kellett hagynunk, mivel a költő madarak tollainál ezek a lókuszok csak kevés esetben szaporodtak fel és genotipizálásuk is pontatlan volt. A több és jobb DNS-t tartalmazó fiókatollakra viszont működtek: az A27-es lókuszon három, a G12-esen kettő, a G13-ason pedig négy különböző allélt detektáltunk.

4. táblázat: allélok száma (k), adott lókuszra genotipizált egyedek száma a 191-ből (N), megfigyelt (H_{Obs}) és várt heterozigócia (H_{Exp}), PIC érték, HWE tesztelésének eredménye (NS = nem szignifikáns, S = szignifikáns, NT = nem tesztelt [Bonferroni korrekcióval]), nullallélek gyakorisága ($F[Null]$)

Lókusz	k	N	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	HWE	$F[Null]$
A02	6	186	0,833	0,774	0,736	NS	-0,0408
A43	5	143	0,469	0,475	0,446	NS	-0,0085
A56	6	140	0,407	0,401	0,381	NS	-0,0128
G04	4	190	0,263	0,253	0,241	NT	-0,0168
G09	4	183	0,536	0,58	0,528	NS	0,0418
G11	4	185	0,681	0,706	0,654	NS	0,0157
G15	2	185	0,232	0,276	0,237	NS	0,0846
A35	10	143	0,804	0,827	0,803	NS	0,0136
A36	7	185	0,73	0,774	0,739	NS	0,0285
A39	6	151	0,583	0,786	0,749	S	0,1483

Az A02, A43, A56, G04, G09, G11, G15, A35, A36 és A39-es lókuszok amplifikálása és genotipizálása a vizsgálathoz megfelelő szintű volt. A 191 költő madár 10 lókuszos

genotípusa alapján az átlagos allélszám lókuszonként 5,4. Az esetek 88,53%-ában meg tudtuk határozni az alléleket. Az átlagos várt heterozigócia 0,5852; valamint az átlagos PIC érték 0,5514. Két véletlenszerűen kiválasztott költő madár genotípusa (PI érték) 4×10^{-8} valószínűséggel egyezik. Az A39-es és G15-ös lókuszkokra a nullallélok becsült gyakorisága magasabb, mint 0,05; így azokra nullallél gyanúja merült fel, nem megbízhatóak rokonsági viszonyok vizsgálatára. Így a fészekalj-elemzéseknél nem vettük figyelembe a különbséget, ha csak ezeken a lókuszon volt különbség két genotípus között. A lókuszkokra vonatkozó további értékek a 4. táblázatban láthatók.

5.3. Becsült szülői jelenlétek

18 territóriumon tudunk elvégezni anyasági, apasági, vagy szülőpár-vizsgálatot. A kézi, mendeli szabályokon alapuló vizsgálat során 12 olyan szülő jelenlétére tudunk következtetni (4. és 6. ábra, 5. táblázat), amelyeket az adott évben nem mintáztunk. A Cervus program segítségével csak nyolc becsült szülői jelenlétezt találtunk (6. táblázat). Ezt a nyolc adatot a kézi számításokkal is megtaláltuk. Így kézi számítással négyel több becsült szülői jelenlétezt kaptunk. Ebből az egyik anyasági vizsgálatból származik, ahol a program két fióka és egy hím alapján egy valótlan, messzi territóriumban élő tojót adott ki eredményül. A maradék három jelenlétezt pedig szülőpár-vizsgálatnál nem tudunk következtetni a programmal.

5. táblázat: 2013-as fiókák és biztos anya, valamint 2011-es hím genotípus alapján a 2011-es hím a becsült apa 2013-ra (SZ-01-es territórium)

	A02	A43	A56	G04	G09	G11	G15	A35	A36	A39
hím 2011-ből	158 158		253 265	239 239	485 489	335 339	109 109		192 200	115 117
biztos anya	154 154	112 116	261/265 265	239 239	477 489	327 335	109 109	256 266	192 200	117 117
fióka 1	154 158	112 120	265 265	239 239	485 489	327 339	109 109		192	
fióka 2	154 158	116 116	253 261	239 239	485 489	335 339	109 109		192 192	
	jó	hiányzik	jó	jó	jó	jó	jó	hiányzik	jó	hiányzik

Az 6. táblázatban négy fióka anyasági vizsgálatának eredménye látható. Három fióka testvér (A354, A355 és A356), akiknek a legvalószínűbbre becsült anyjuk azonos. Erre a becsült anyára elég magas LOD és Delta értékek jöttek ki az elfogadáshoz. A negyedik fióka (1262) két legvalószínűbb becsült anyjának alacsony LOD és Delta értékei vannak, valamint a fiókatól elég távoli territóriumból valók. Így erre a fiókára egyik becsült anya sem reális, a valós anyától valószínűleg nem gyűjtöttünk tollat.

6. táblázat: anyasági vizsgálat ismert apa mellett; minden fiókára a két legvalószínűbb becsült anya, és a trióra vonatkozó értékek láthatók. A zöldeket elfogadtuk anyának. (l.=lókus)

fióka ID	apa ID	becsült anya ID	trió összehasonlított l.	trió nem egyező l.	trió LOD	trió DELTA
1262	hv03_1h	be?1_3t	7	1	2.57515963762897E+0000	4.69380552717813E-0002
1262	hv03_1h	hs22_3t	7	1	2.52822158235719E+0000	0.00000000000000E+0000
A354	be05_23h	be05_2t	7	0	1.10365069204030E+0001	4.64851741721635E+0000
A354	be05_23h	co?_1t	7	0	6.38798950318665E+0000	0.00000000000000E+0000
A355	be05_23h	be05_2t	7	0	9.57642410909463E+0000	4.64851741721636E+0000
A355	be05_23h	co?_1t	7	0	4.92790669187828E+0000	0.00000000000000E+0000
A356	be05_23h	be05_2t	7	0	4.56513519963087E+0000	6.97287074008422E-0001
A356	be05_23h	Be06_2t	7	0	3.86784812562245E+0000	0.00000000000000E+0000

Az egyik apasági vizsgálatnál (HS-13-as territórium) kicserélődést találtunk mindkét módszerrel (4. ábra). Ennél a territóriumnál 2012-ben megtaláltuk a hím szülő tollát, 2012 és 2013-ban pedig a tojó tollát. A tojó mindkét évre ugyanazt a genotípust mutatta. A vizsgálathoz egy fióka genotípusát használtuk 2013-ból. A Cervus a 2012-es hímhez negatív LOD értéket adott, vagyis valószínű, hogy nem az a hím a valódi apa 2013-ban. Kézi számítással pedig hét összehasonlítható lókuszt közül hármat találtunk amely nem összeegyeztethető a trióra.

HS-13	2011	2012	2013	HS-09	2011	2012	2013
hím		hs13_2h	CSERE!	hím	hs09_12h	hs09_12h	hs09_12h
tojó		hs13_23t	hs13_23t	tojó	hs09_123t	hs09_123t	hs09_123t
fióka			A377	fióka			A344

← Becsült jelenlét

4. ábra: Kicserélődés a HS-13-as territóriumon, valamint 2013-as becsült hím jelenlét a HS-09-es territóriumon


5.4. EPF események

Ahol rendelkezésünkre állt adott fészekaljából az anya, apa és fiókák genotípusa, ott megvizsgáltuk, hogy a rezidens hím -akinek a tollát begyűjtöttük- volt-e a genetikai apa. Ezt összesen hat territóriumon tudtuk megvizsgálni. Ebből a kézi, mendeli szabályokon alapuló számítások és a Cervus által adott becslések alapján négy territóriumon azt találtuk, hogy a szociális apa a legvalószínűbb genetikai apa egyben, azaz a tojó a hímhez hűségesebbnek bizonyult. Egy esetben nem tudtunk dönteni, mert kevés adat állt rendelkezésünkre. Itt ugyanis a szociális apa genotípusából csak két lókuszt sikerült genotipizálni. Egy esetben pedig (NK-01-es territórium) az adataink alapján EPF eseményt találtunk. Itt a kézi

számításnál mindkét fióka alapján a trió kilenc összehasonlítható lókusza közül hat összeegyeztethetetlen volt (7. táblázat). A két fiókára összesen hét nem egyező lókuszból csak az A39-es nem ad megbízható eredményt, mivel nullallél gyanús. A többi lókuszból az F(null) érték alapján megbízhatóan használható rokonság vizsgálatára. A program pedig a megmintázott (szociális) apára mindkét megmintázott fióka alapján negatív LOD értéket adott ki. Azonban nem zárhatjuk ki, hogy az eset hátterében az áll, hogy egy, a territóriumon átrepülő hímtől származik a toll és nem a rezidens hímtől.

7. táblázat: a szociális apa, a biztos anya és a fiókák genotípusai az NK-01-es territóriumon. A piros nyilak az EPF-re utaló lókuszeket jelölik

	A02	A43	A56	G04	G09	G11	G15	A35	A36	A39
szociális apa	154 158	112 116		239 239	489 489	331 339	109 117	264 280	192 192	128 128
biztos anya	152 154	116 116	253 261	239 239	489 489	335 339	109 117	266 266	198 198	119
fióka 1	152 152	116 116	253 253	239 239	485 489	327 339	109 117	258 266	198 198	117 119
fióka 2	154 158	116 120	253 253	239 239	481 489	327 339	109 117	262 266	198 198	117 119
	egyre jó	egyre jó	hiányzik	jó	nem jó	nem jó	jó	nem jó	nem jó	nem jó



5.5. Az anyai és apai eredetű allélek diverzitása

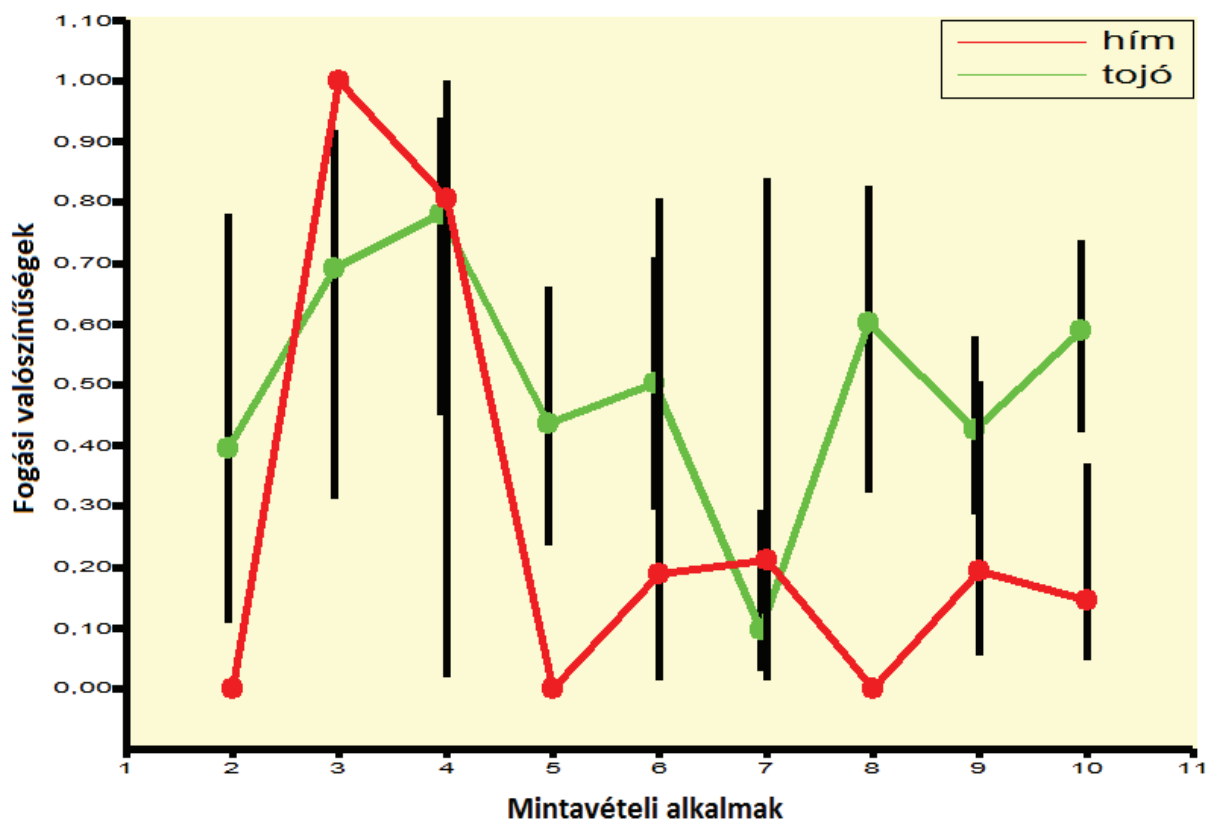
Az adataink alapján a hímek által adott allélek várt heterozigóciája $0,56 \pm 0,004$ és lókuszonkénti átlagos allélszáma $3,54 \pm 0,06$; a tojóké pedig $0,546 \pm 0,0066$, illetve $3,58 \pm 0,058$. A randomizációs teszt eredménye szerint az ivarok közötti különbség egyik mérőszámra sem szignifikáns (a várt heterozigóciára $p=0,1075$; a lókuszonkénti átlagos allélszámra pedig $p=0,6986$).

5.6. Túlélési valószínűségek

A 2000–2006-os adatokból 47 (Vili 2013), a 2011–2013-as gyűjtésből 127 territórium adata állt rendelkezésünkre. Ezekből összesen 185 tojó és 64 hím fogástörténetet tudunk elkészíteni a túlélési valószínűségek és a fogási valószínűségek becsléséhez.

Először csak a paraméterek ivar- és időfüggését vizsgáltuk. A legbővebb modell, amelyikben a paraméterek mind ivar-, mind pedig időfüggőek, megfelelt a GOF teszteknek, azaz

megfelelően illeszkedett a modell az adatokhoz. Az eredményeket korrigálva a kapott 1,67 c-hat értékkel, három legjobb modellt ($\phi[.]p[g^*t]$, $\phi[.]p[g]$ és $\phi[g]p[g]$) kaptunk eredményül. Ezek közül az egyiknél a fogási valószínűségek ivar és időfüggőek (5. ábra), a túlélés pedig konstans. A másik kettőnél az egyedek fogási valószínűsége ivarfüggő, valamint az egyiknél a túlélés konstans, a másiknál ivarfüggő. Mivel a három modell között nem volt kettőnél nagyobb AIC különbség, ezért átlagoltuk őket. Mivel ezek közül kettő konstans és egy csoportfüggő becslés a túlélési valószínűségekre, ezért kijelenthető, hogy az adataink alapján statisztikailag nincs szignifikáns különbség az ivarok túlélése között. Az átlagolás után kapott becslések a 8. táblázatban láthatók. A tojók túlélési valószínűségére $0,88 \pm 0,02$ (becsült érték \pm SE); a hímekére $0,90 \pm 0,07$ becslést adott a szoftver. Az 5. ábrán látszik, hogy az intenzívebben mintázott évek esetében (2011–2013) pontosabb becslést kaptunk a fogási valószínűségekre, kisebbek a konfidencia intervallumok. A hímek fogási valószínűségei elég alacsonyak, így a megbízhatóbb becslés érdekében elvégeztük az elemzést csak tojókra. Így kevesebb becslés mellett pontosabb becsléseket kaptunk.



5. ábra: $\phi[.]p(g^*t)$ modell fogási valószínűségei mintavételi alkalmakra és ivarokra bontva konfidencia intervallumokkal

8. táblázat: túlélési valószínűségek (phi) és fogási valószínűségek (p) ivaronként illetve mintavételi alkalmanként

	hím phi	tojó phi								
becslés	0,905084	0,8766864								
unconditional SE	0,0682114	0,0243736								
	hím p 1	hím p 2	hím p 3	hím p 4	hím p 5	hím p 6	hím p 7	hím p 8	hím p 9	
becslés	0,127836	0,3492116	0,3065422	0,127836	0,1697904	0,1748809	0,127836	0,1708289	0,1598229	
unconditional SE	0,0867124	0,3511238	0,3388827	0,0867124	0,1195308	0,1320322	0,0867124	0,0771294	0,0656926	
	tojó p 1	tojó p 2	tojó p 3	tojó p 4	tojó p 5	tojó p 6	tojó p 7	tojó p 8	tojó p 9	
becslés	0,4608952	0,5265635	0,5461094	0,4700534	0,4845113	0,3950058	0,5066198	0,4674919	0,5036144	
unconditional SE	0,1105954	0,1262634	0,1439	0,0690267	0,0662501	0,1657533	0,0920573	0,0576512	0,0709621	

A csak tojókra irányuló becslés legbővebb modellére (phi[t]p[t]) a GOF tesztek megfeleltek, az 1,44 c-hat értékkel korrigáltunk. A kapott legjobb modellnél (phi[.]p[t]) a túlélés konstans, a fogási valószínűség pedig időfüggő. A tojók túlélési valószínűségére kapott becslés $0,87 \pm 0,02$. A további becslések a 9. táblázatban láthatók.

9. táblázat: tojók túlélési valószínűségei (phi) és fogási valószínűségei (p) mintavételi alkalmanként

	tojó phi	tojó p 1	tojó p 2	tojó p 3	tojó p 4	tojó p 5	tojó p 6	tojó p 7	tojó p 8	tojó p 9
becslés	0,8672572	0,3958691	0,6932717	0,7822999	0,438643	0,5054501	0,0983029	0,6081072	0,4292745	0,5971403
SE	0,0240517	0,1927019	0,1612518	0,1189197	0,1076161	0,1052304	0,0567626	0,1305844	0,072249	0,0783148

A becslült szülői jelenlétek segítségével bővültek a fogástörténetek (6. ábra), így jobb becsléseket kaphatunk. Mivel főleg hím parlagi sasok jelenlétére sikerült következtetni és a hímek fogási valószínűsége volt nagyon alacsony, így ismét mindkét ivarra elvégeztük a vizsgálatot. A legbővebb modell megfelelt a GOF teszteknek, az 1,67 c-hat értékkel korrigáltunk. Mivel nem volt köztük kettőnél nagyobb AIC különbség, két legjobb modellt (phi[g]p[t] és phi[.]p[t]) kaptunk. Mindkettőnél időfüggő a fogási valószínűség, valamint az egyiknél a túlélés ivarfüggő, a másiknál konstans. Mivel a két modell közel egyformán jó, így átlagoltuk őket (10. táblázat). A hímek túlélési valószínűségére a kibővített fogástörténetekkel már sokkal pontosabb becslést kaptunk: $0,85 \pm 0,06$. Mivel a hímek fogástörténete kiegészült, így a szoftver a két ivarra már közös fogási valószínűségeket becslült.

0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1
0 0 0 0 1 1 1 1 1 0 0 1 0	0 0 0 0 1 1 1 1 1 0 0 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0

becsült jelenlétek nélkül
becsült jelenlétekkel

6. ábra: fogástörténetek becsült jelenlétekkel és anélkül

10. táblázat: túlélési valószínűségek (ϕ) ivaronként és visszafogási valószínűségek (p) mintavételi alkalmanként a becsült szülői jelenlétekkel együtt

	hím ϕ	tojó ϕ									
becslés	0,850343	0,8736601									
unconditional SE	0,0627798	0,0248116									
	p 1	p 2	p 3	p 4	p 5	p 6	p 7	p 8	p 9		
becslés	0,3577662	0,7132719	0,7846408	0,3753244	0,4675155	0,1100036	0,5386572	0,4080635	0,5515895		
unconditional SE	0,1915591	0,1653659	0,1232212	0,1036269	0,1050698	0,0609598	0,1350127	0,06867	0,0726953		

Az élőhelyekre vonatkozó becsléseket a megbízhatóbb eredmények érdekében a tojókra végeztük. A legbővebb modell megfelelően illeszkedett az adatokhoz, az 1,39 c-hat értékkel korigáltunk. A két legjobb modell ($\phi[g]p[t]$ és $\phi[.]p[t]$) között nincs kettő AIC különbség, így egyformán jónak számítanak. Mivel az egyiknél a túlélés csoportfüggő, a másikonál konstans, így kijelenthetjük, hogy az adataink alapján statisztikailag nincs szignifikáns különbség a kétféle élőhely túlélési valószínűségei között. Mindkettőnél időfüggő a fogási valószínűség. A két modellt átlagoltuk, a becslések a 11. táblázatban láthatók. Az adataink alapján a mérgezésnek kitett élőhelyek túlélési valószínűsége $0,86 \pm 0,03$; a mérgezés által nem befolyásolt élőhelyekre pedig $0,87 \pm 0,03$.

11. táblázat: élőhelyenkénti túlélési valószínűségek (ϕ) és mintavételi alkalmanként fogási valószínűségek (p) (élőhely 1=mérgezésnek kitett élőhelyek; élőhely 2=mérgezésnek nem kitett élőhelyek)

	élőhely 1 ϕ	élőhely 2 ϕ									
becslés	0,8611568	0,8708588									
unconditional SE	0,0302749	0,0255458									
	p 1	p 2	p 3	p 4	p 5	p 6	p 7	p 8	p 9		
becslés	0,3962781	0,6936541	0,7827917	0,4386002	0,5054257	0,0982908	0,607767	0,4290219	0,5969172		
unconditional SE	0,1896608	0,1585186	0,1168562	0,1058077	0,1034802	0,0558177	0,1284742	0,0710339	0,0770322		

6. Diszkusszió

Az általunk használt 10 mikroszatellita lókuszt (A02, A43, A56, G04, G09, G11, G15, A35, A36 és A39) megfelelő markerkészletnek bizonyult a megmintázott parlagi sasok egyedi azonosítására. Ezt bizonyítja a költő madarakra Cervus 3.0 szoftverrel becsült $PI=4 \times 10^{-8}$, amely a mintaszám (191) alapján elegendően kicsi az egyedi azonosításhoz. Valamint a vizsgálatok során felhasznált 10 lókuszt átlagos várt heterozigóciája (0,5852) és PIC értéke (0,5514) is elég magasnak bizonyult. A 0,5 PIC érték feletti lókusztok (Sharma et al., 2009) informatívnak számítanak. Egy korábbi parlagi sasokon végzett kutatás (Rudnick et al., 2005) kicsit magasabb várt heterozigóciájú (0,68) és átlagos lókuszonkénti allélszámú (7,9) mikroszatellita alléleket használt. Az A39-es és G15-ös lókusztokra a nullallélok becsült gyakorisága magasabb, mint 0,05; így azokra nullallél gyanúja merült fel, nem megbízhatóak rokonsági viszonyok vizsgálatára. Így a fészekalj-elemzéseknél nem vettük figyelembe a különbséget, ha csak ezeken a lókusztokon volt különbség két genotípus között. A többi lókuszt a becsült nullallél gyakoriság elhanyagolható, valamint a HWE is fenn áll. A negatív nullallél gyakoriságok hátterében az áll, hogy nagyobb lett a megfigyelt, mint a várt heterozigócia (Amer et al., 2005).

Mivel a parlagi sasok mintavételezése kora nyáron, a fiókák pár hetes korában történik, általában az anyától tudunk nagyobb valószínűséggel vedlett tollat szerezni, mivel ő tartózkodik többet a fészekben. A hímek tollait nehezebb megtalálni, mivel kevesebb időt töltenek a fészeknél, gyakran egy messzebb elhelyezkedő kiülő fán tartózkodnak. Ezt igazolják a hímek alacsony fogási valószínűségei is. Így elég fontos gyakorlatban használható eredmény, hogy a hímek jelenlétére a már megmintázott tojó és fiókák alléljainak segítségével következtetni tudunk. Minél több fióka áll rendelkezésünkre, annál nagyobb biztonsággal állapíthatjuk meg a becsült apát. A Cervus szoftvert főleg az anyasági és apasági vizsgálatoknál találtuk eredményesnek az adatainkkal. A becsült anyák és apák sokszor elérték a kritikus Delta értékeket, valamint ha több fióka állt rendelkezésünkre egy fészekből, sok esetben ugyanaz a legvalószínűbb becsült szülő jött ki a testvérekre. Ezekben az esetekben a döntéshozásnál még figyelembe kell venni, hogy a becsült madár milyen messzi territóriumából származik. Az adatainkból nem sikerült a szoftverrel szülőpárokra becsülnünk.

A fészekalj-elemzések során találtunk olyan territóriumokat, amelyek további mintavételezés során különös odafigyelést igényelnek. Ilyen territórium például az NK-01-es, ahol a genotípusok alapján a hím nem lehet szülője a fészekben mintázott fiókáknak. Ez akár EPF eseményre is utalhat. Itt két fióka alapján is a trió kilenc összehasonlítható lókusza közül hat összeegyeztethetetlen volt. Természetesen nem tudjuk kizárni annak a valószínűségét, hogy az egyetlen évben (2013) talált hím toll (amiről úgy gondoljuk, hogy a territóriumon költő szociális apa vedlett tolla) nem a rezidens hímtől származik, hanem egy odalátogató (akár immatur) egyedtől és a genetikai apát nem tudtuk megmintázni. Annak a valószínűsége, hogy egymás utáni két évben ugyanattól az odalátogató hímtől szerzünk tollat az ott élő genetikai apa helyett, elhanyagolható. Ezért, ha a következő évben (2014) is találunk tollat ugyanazon a territóriumon ugyanattól a már 2013-ban megmintázott hímtől, biztosak lehetünk a 2013-as EPF eseményben. Hasonlóan érdemes nagy intenzitással hím tollat keresni a HS-13-as territóriumon, ahol az adataink alapján hím csere-eseményt találtunk. Tojó tollakat az adataink alapján a HV-03-as territóriumon lenne fontos találni, mivel mind hím-, mind fióka-genotípusok rendelkezésünkre állnak korábbi évekből.

A parlagi sasok hosszú életűek és szociálisan monogámok költési időszakban és költési időszakok között is (Rudnick et al., 2005). A hímnél ezen felül elég nagy szülői ráfordítást figyeltek meg (Rudnick et al., 2005), például sokszor szállít a fiókáknak ételt. Ezen tulajdonságok alapján a "longevity" és "paternal care" hipotézisek (Neudorf, 2004) nulla, vagy nagyon kevés EPF-re toleránsnak jósolják a fajt. Mi hat esetből ötben tudtunk következtetésre jutni a párhűség kérdésében. Ebből négyszer találtuk a territóriumon megmintázott hímet a fiókák genetikai apjának. Egy alkalommal találtunk az adataink alapján EPF-re utaló genotípusokat. A kazahsztáni parlagi sasoknál (Rudnick et al., 2005) 86 költésből származó 166 fióka alapján találtak 3 EPF gyanús eseményre bizonyítékot. Ezeknél a szociális szülők egy-egy lókuszon nem egyeztek a fiókákkal, így úgy gondolták, hogy betudhatók nullalléleknek és genotipizálási hibáknak. Nálunk ettől több, mindkét fióka alapján hat lókuszos eltérés mutatkozott, amelyek közül csak egy lókuszos esetében feltételezhető a nullallélek zavaró hatása, így esetünkben az adott hím minta és a fiókák rokonsága kizárható. Viszont a hím genotípus származhat egy odalátogató hímtől is, így további információ szükséges az EPF esemény biztos kijelentéséhez. Egy másik módszerrel is vizsgáltuk a parlagi sasok szaporodási rendszerét, a fiókák anyai és apai eredetű alléljai diverzitásának összehasonlításával. A randomizációs teszt eredménye sem az átlagos lókuszonkénti allélszám ($p=0,6986$), sem a várt heterozigócia ($p=0,1075$) esetében nem volt

szignifikáns. Mivel az adataink alapján a fiókák apai és anyai eredetű alléljainak diverzitása nem különbözik, arra következtetünk, hogy nincs a populációban interszexuális szelekció, a tojók és hímek hűségesek egymáshoz. Sajnos az EPF és alléldiverzitás vizsgálatához kevés adatot tudunk felhasználni, így ezek az eredmények nem tekinthetők véglegesnek, további adatgyűjtés szükséges. Összegezve, a magyarországi parlagi sasok megfigyelt viselkedésük, hosszú életük, valamint az eddigi adataink alapján genetikailag monogámnak tekinthetők és maximum nagyon csekély EPF-re toleránsok.

Számos sas faj költő egyedeire becsülték már meg a túlélési valószínűséget. Az ibériai sasra (*Aquila adalberti*), amelyet sokáig a parlagi sas spanyol alfajának tekintettek, 0,918–0,986 közötti értéket becsülték (Ortega et al., 2009). A héjasasra (*Aquila fasciata*) pedig $\phi=0,87$ pontbecslést adtak (Hernández-Matías et al., 2011). A kazahsztáni parlagisas-populáció költő madaraira ezekhez hasonló eredményt találtak, az átlagos 16%-os kicserélődési ráta alapján $\phi=0,84$ -t becsülték (Rudnick et al., 2005). Egy másik kazahsztáni vizsgálatban (Katzner et al., 2006) pedig $0,90\pm 0,02$ túlélési valószínűséggel számoltak a modellezés során. Mi ezekhez hasonló, a hímekre $0,85\pm 0,06$ (becsült érték \pm SE); tojókra pedig $0,87\pm 0,03$ értéket kaptunk a becsült szülői jelenlétek segítségével. A tojókra többféleképpen is 0,87 körüli túlélési valószínűség jött ki, így ez egy robusztus becslés. Az ivarok túlélése között nem tudunk biológiailag releváns vagy statisztikailag szignifikáns különbséget kimutatni ($2>\Delta$ AIC). A hímekre kapott túlélés becslés a tojókéhoz képest pontatlanabb, mert a fogási valószínűségük sokkal alacsonyabb. A hímekre általában 0,2 alatti fogási valószínűséget becsültünk, míg a tojókra ez az érték általában 0,5 körüli lett. A becsült szülői jelenlétek segítségével a hímek visszafogása megnőtt, így a MARK a két ivarra már közös becslést adott a fogási valószínűségekre. Így a hímek jelenlétére való következtetés a fiókák és anyák segítségével hasznosnak bizonyult. A becsült fogási valószínűségek alapján elmondható, hogy az 2011–2013-as évek mintavételezése elég eredményes volt a tojók szempontjából, de a hím tollakat a nehézségek ellenére érdemes volna intenzívebben keresni.

Megvizsgáltuk a mérgezés hatását is a parlagi sas populációkra. Két részre osztottuk a territóriumokat: amelyek maximum 15km-es távolságában mérgezés történt az érintett években és ahol nem. Az adataink alapján a kétféle élőhely madarainak túlélése között nincs szignifikáns különbség ($2>\Delta$ AIC). A különbség iránya megfelel a vártnak, de mértéke biológiailag nem releváns és statisztikailag sem szignifikáns: a mérgezésnek kitett élőhelyekre az éves túlélés $0,86\pm 0,03$; a mérgezés által nem befolyásolt élőhelyekre $0,87\pm 0,03$. A jelenlegi

adataink alapján arra következtetünk, hogy a mérgezés nem befolyásolja nagy mértékben a magyarországi parlagi sasok túlélését. Sajnos összesen csak 56 sas mérgezési eset alapján tudtuk csoportosítani az élőhelyeket, így a kapott eredmények nem tekinthetők véglegesnek. Úgy gondoljuk, hogy érdemes volna folytatni a vizsgálatot több egyeddel és mérgezési adattal.

Összegezve, az adataink alapján a magyarországi parlagi sasok genetikailag monogámnak, vagy kevés EPF-re toleránsnak mondhatók. A hazai sasok túlélése nem különbözik ivaronként, valamint nem befolyásolt erősen a mérgezés által. A legpontosabb, robusztus becslés az éves túlélésre $0,87 \pm 0,03$. Érdemes volna folytatni a vizsgálatot több év és egyed bevonásával, hogy pontosabb eredményeket kapjunk a fajról.

7. Irodalomjegyzék, hivatkozások

Amer, J. et al. (2005): Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Soc Hort Sci* **130(3):348–354**

Amstrup SC, McDonald TL, Manly BFJ (2005) Handbook of capture–recapture methods. Princeton: Princeton University Press

Anna-Karin Fridolfsson and Hans Ellegreen (1999): A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* **30: 116–121**

Avise JC (2004) Molecular Markers, Natural History, and Evolution. *Sinauer, Sunderland, Mass.*

Bagyura, J. et al. (2002): Population increase of Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) in Hungary between 1980 and 2000. *Aquila* **107–108, p. 133–144**

BirdLife International 2013. *Aquila heliaca*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Letöltés ideje: **2014 április 25**

Busch J. D., Katzner T. E., Bragin E. A., Keims P. (2005): Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaeetus eagles. *Molecular Ecology Notes*, **5: 39-41**

Gemmel N., Akiyama S. (1998): An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissue. *Trends in Genetics* **12. vol. 338–339. p.**

Hans Ellegreen (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature* **5, p. 435–445**

HELICON, Conservation of Imperial Eagles in Hungary parlagisas.hu Letöltés ideje: **2014 április 25**

Hernández-Matías, A. et al., (2011): Effects of age, territoriality and breeding on survival of Bonelli's Eagle *Aquila fasciata*. *Ibis* **153(4), 846–857**

Horváth, M. et al. (2005): An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal Of Avian Biology*, **36:84–88**

Horváth M., Haraszthy L., Bagyura J. & Kovács, A. (2002): Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) populations in Europe. *Aquila* **107–108**, p. **193–204**.

Jones, A.G. et al. (2010): A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* **10** 6–30

Kalinowski, ST, Taper, ML & Marshall, TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**: 1099-1106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x>
Letöltés ideje: **2014 április 25**

Katzner, T.E. et al., (2006): Modelling populations of long-lived birds of prey for conservation: A study of Imperial Eagles (*Aquila heliaca*) in Kazakhstan. *Biological conservation* **132**, 322–335

Kovács András, Horváth Márton, Demeter Iván, Fülöp Gyula, Frank Tamás, Szilvácsku Zsolt (2005):Parlagisas-védelmi kezelési javaslatok. MME, Budapest.

Martínez-Cruz B., David V. A., Godoy J. A., Negro J. J., O'Brien A. J., Johnson W. E. (2002): Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes*, **2**: 323-326

Neudorf DLH (2004): Extrapair paternity in birds: understanding variation among species. *The Auk* **121**, 302–307

Ortega, E. et al., (2009): A demographic description of the recovery of the vulnerable Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*. *Oryx* **43(1)**, 113–121

Pemberton JM (2009) Wild pedigrees: the way forward. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **275**, 613–621.

QGIS Development Team, 2014. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org> Letöltés ideje: **2014 április 25**

R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. In: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

*Rudnick, J. et al. (2008): A non-invasive genetic evaluation of population size, natal philopatry, and roosting behavior of non-breeding Eastern Imperial Eagles (*Aquila heliaca*) in central Asia. *Conserv Genet* 9, p. 667–676*

Rudnick, J. et al. (2009): Genetic analyses of noninvasively collected feathers can provide new insights into avian demography and behavior In: Jason B. Aronoff: Handbook of nature conservation Nova science publishers chapter 6

*Rudnick, J. et. al (2005): Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Molecular Ecology* 14, p. 2959–2967*

*Sharma, M.V. et al. (2009): Molecular diversity and polymorphism information content of selected *Gossypium hirsutum* accessions. *Summaries of Arkansas Cotton Research* p 124–127*

Vili Nóra PhD értekezése (2013): Degradált biológiai anyagmaradványok alkalmazhatósága madárgenetikai és konzervációbiológiai vizsgálatokban

White, G.C. and K. P. Burnham. 1999. Program MARK: Survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46 Supplement, 120-138.

*You-Chun Li et al. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11, p. 2453–2465*

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Kövér Szilviának és társ-témavezetőmnek, Szabó Krisztiánnak a türelmet, lelkesítést, valamint a vizsgálatban és a dolgozat megírásában nyújtott rengeteg segítséget.

Nagyon szépen köszönöm Dr. Pásztory-Kovács Szilviának és Nemesházi Edinának, hogy mindent félretéve segítettek és lelkesítettek.

Köszönet jár Dr. Vili Nórának és a Biológiai Intézet munkatársainak. Külön szeretném megköszönni a témabeszámolókon adott tanácsokat.

Köszönet illeti a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület Parlagisasvédelmi Munkacsoportját és a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumának munkatársait.

Végül köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy bíztak bennem és támaszt nyújtottak. Köszönöm a sok szeretetet és lelkesítést.


9. Summary

The Imperial eagle (*Aquila heliaca*, SAVIGNY, 1809) is a territorial, socially monogamous raptor. Although the number of mating pairs are increasing in Hungary, we found it important to provide information for protection of the species, so we analysed their genetic mating system in a three year period and their probability of survival with data from ten years and 135 territory. Like most raptors, it is challenging to capture and band Imperial eagles, thus we used molecular techniques to identify them. As DNA source, we collected feathers directly from chicks (on monitoring occasions) and we also collected naturally shed feathers from adults. With the DNA retrieved from feathers we genetically sexed them and we amplified 13 microsatellite loci, from which 10 were suitable for identification. Where father, mother and offspring genotypes were available, we examined EPF's. From five analysed cases we found one that could refer to EPF. We used randomisation test on diversity of the offspring's alleles given by the father and mother which did not show significant differences in expected heterozygosity or mean number of alleles per locus. To sum up, our data on allele diversity and EPFs implied that the Hungarian Imperial eagle is genetically monogamous or it is tolerant to very low number of EPF occasions. In the past three years we could identify 191 adult eagles with 438 encounters (encounter means that we collected feathers from an individual in a certain year and in encounter history it will stand as a "1"). Though we could not collect feathers from all adults present at the time, we used parentage analysis to identify missing paternal encounters. With maternity, paternity and parent pair analysis we could identify 12 adults, from whom we could not collect feathers in the respective years but their genotypes were available from other years. With the help of these adult male encounters, the male capture probabilities increased, so we received more accurate survival probabilities for them. The mark release recapture study showed that the Hungarian Imperial eagle's yearly survival probability is $0,87 \pm 0,03$, which is not affected by gender or poisoning. Our results provide missing information on the Hungarian Imperial eagle population: survival probabilities and mating system. Furthermore, parentage analysis and examination of the effect of poisoning on survival provide results that can be important for protection in practice and can help organize field studies and monitoring.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Kövér Szilvia kijelentem, hogy Gyarmati Ádám „Magyarországi parlagi sasok (*Aquila heliaca*) túlélési valószínűségei és szaporodási rendszere mikroszatellita allélek alapján” c. szakdolgozatának tartalmát ismerem, az abban foglaltakkal egyetértek, és a dolgot benyújtásra, illetve védeésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2014. április 24.



Dr. Kövér Szilvia
tudományos munkatárs
SzIE-ÁOTK

HuVetA - SZIA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: GYARMATI ADAM

Elérhetőség (e-mail cím): gyarmatiadaam@freemail.hu ; gyarmatiadaam@gmail.com

A feltöltendő mű címe: MAGYARORSZÁGI PARLAGI SASOK (AQUILA HELIACA)

TÜLELESI VALÓSZÍNŰSÉGEI ÉS SZAPORODÁSI RENDSZERE MIKROSZATELITA FÉLÉK ALAPJÁN

A mű megjelenési adatai: BUDAPEST, 2014

Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA 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 és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a 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/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi 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),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

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

Budapest, 2014. év04.....hó27.....nap

Gyarmati Adalék

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, 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 Állatorvos-tudományi Kar 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.*

A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.