

**A NEM-INVÁZÍV MINTAVÉTEL
MEGBÍZHATÓSÁGÁNAK ELEMZÉSE ÉS BETOLAKODÓ
EGYEDEK VIZSGÁLATA EGY PARLAGI SAS (*AQUILA
HELIACA*) POPULÁCIÓBAN**

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Készítette:
Jakab Szilvia
biológia, MSc II.

Témavezető:
Szabó Krisztián
tudományos segédmunkatárs
ÁTE, Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Társtémavezető:
Dr. Pásztory-Kovács Szilvia
tudományos munkatárs
ÁTE, Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. Populációk vizsgálata nem-invazív genetikai mintavétel segítségével	3
1.2. A nem-invazív genetikai mintavétel alkalmazhatósága ragadozómadarakban ..	6
1.3. Egyedi alapú populációdinamikai vizsgálatok a parlagi sasnál	7
1.4. A populációdinamikai vizsgálatok hibalehetőségei	8
1.5. Célkitűzések	10
2. Anyag és módszer	11
2.1. Mintavétel	11
2.2. A tollak preparálása és a DNS kivonása	13
2.3. Molekuláris ivarmeghatározás	14
2.4. Mikroszatellita genotipizálás	15
3. Eredmények	17
4. Diskusszió	20
5. Összefoglalás	24
6. Summary	25
7. Irodalomjegyzék	26
8. Köszönetnyilvánítás	31
9. Függelék	32

1. Bevezetés

1.1. Populációk vizsgálata nem-invazív genetikai mintavétel segítségével

Populációk vizsgálatakor egyes kérdések megválaszolásához elegendő az egyedek megfigyelése, azonban ez nem minden esetben nyújt elegendő információt, de mára már a molekuláris módszerek rohamos fejlődésével új lehetőségek jelentek meg (Wayne & Morin 2004). Természetes populációk felmérésére különböző típusú mintavételi módszereket dolgoztak ki, amelyek alapvetően két csoportba sorolhatóak, az egyedek direkt megfigyelése mellett a különböző típusú minták gyűjtése terjedt el, amellyel például DNS-alapú vizsgálatokat lehet elvégezni.

A destruktív mintavétel lényege, hogy a vizsgált egyedektől friss szövetmintákat vesznek (általában különböző szervekből), mely az egyed pusztulásával jár. A nem destruktív, invazív mintavételi módszerhez szükséges a vizsgálni kívánt egyedek megfogása, de a szövetminta begyűjtése során törekednek arra, hogy az egyednek ne okozzanak kritikus sérülést.

Jelenleg a legtöbbet alkalmazott módszer a nem-invazív mintavétel, amely során a vizsgált egyedek nem szenvednek sérüléseket, minimálisan vannak kitéve zavarásnak, illetve nincs hatással a viselkedésükre, vagy éppen nem szükséges az egyedek folyamatos megfigyelése. Fontos szempont még, hogy kevesebb időt és emberi részvételt igényel, továbbá költsége sok esetben alacsonyabb, mint a destruktív és invazív mintavételnek.

A nem-invazív mintavétel módszereit két nagy csoportba tudjuk sorolni: egyik esetben az egyedek megfigyelése a fő cél, és nem történik mintagyűjtés. Ilyen módszer a vadon élő állatok esetében például az egyedek kameraállásokkal történő megfigyelése (Boitani & Powell 2012). A másik módszer a nem-invazív genetikai mintavétel (NGM), amikor az egyedek által hátrahagyott nyomok kerülnek összegyűjtésre, és amit előszeretettel alkalmaznak DNS-alapú vizsgálatok elvégzéséhez (Taberlet et al. 1999).

Az NGM által lehetőség nyílik különböző típusú minták felhasználására. Mára már megnőtt azon kutatások száma melyeknek célja, hogy olyan mintatípusokat találjanak, amelyek megfelelőek az adott fajok DNS-alapú vizsgálataihoz. A legtöbbet alkalmazott minták a következők: bélsár, szőr/haj, tollak, vedlett bőr, tojás, tamponok, de folyamatosan jelennek meg újabb publikációk és ma már számos állatcsoport esetén vannak jól alkalmazható mintatípusok (Beja-Pereira et al. 2009). A legelterjedtebb mintatípus az ürülék (ezért erről található a legtöbb publikáció) és a szőr, mivel általában könnyen detektálhatóak. Gerincesek esetén még sok lehetőség van a nyál (Sundqvist et al. 2008, Beja-Pereira et al.

2009) a vizelet (Hausknecht et al. 2007) vagy a vedlett bőr felhasználásában (Swanson et al. 2006). Gerinctelenek, hüllők és kételtűek csoportjainál használatos például a vedlett bőr és a ki nem kelt tojás (Jones et al. 2008), továbbá készíthető kenet nyálkanyomokról (Kawai et al. 2004).

Az NGM azonban számos nehézséget hordoz magában. Egyik fő probléma a terepen történő mintagyűjtés módszerében rejlik. Megfontolandó még, hogy milyen mintatípus a legkedvezőbb és azt hogyan érdemes begyűjteni, hogy az a későbbiekben releváns információkkal szolgáljon a populációkról (Smith et al. 2003a). Minden NGM esetén problémát jelenthet, ha nem a célfajtól származó minta kerül összegyűjtésre (Mondol et al. 2009) emellett, ha alacsony egyedszámú populációt vizsgálunk, előfordulhat, hogy eleve csak kevés egyedtől sikerül mintát gyűjteni (Smith & Wang 2014).

Az egyik fő nehézség a minták eltérő megtalálási valószínűségén alapszik, például ha nagy az avarborítottság, illetve ha vizes élőhelyen történik a mintavétel (Arrendal et al. 2007, Boitani & Powell 2012). A minták megtalálási valószínűségét sokféleképpen növelték az utóbbi időszakban, például képzett nyomkövető kutyák segítségével (Smith et al. 2003b) vagy célzott helyeken történő mintavételezéssel (vadcsapások, pihenőhelyek), illetve kihelyezett csapdákkal (szőrscapdák) (Boitani & Powell 2012).

A vérvétel invazív mintavételi módszernek számít, mégis próbálkoznak olyan eljárások kidolgozásával, amellyel szinte minimális zavarással vérhez lehet jutni (Lecomte et al. 2006). Madaraknál megszokott módszer, hogy gyűrűzéskor vért vagy kitépett tollakat gyűjtenek, ha nincs mód nem-invazív mintavételezésre (McDonald & Griffith 2011, Katzner et al. 2012). Irányultak még kutatások arra nézve, hogy az egyedek viselkedését és túlélését mennyire befolyásolhatja, ha közvetlenül tollat veszünk tőlük (Harvey et al. 2006).

Madarak esetén a leggyakrabban gyűjtött NGM minta a vedlett toll (Rudnick et al. 2009) továbbá használtak már fel ürüléket (Baumgardt et al. 2013), valamint tojáshéjat is (Egloff et al. 2009). A tollak gyűjtése során is fontos korlátozó tényezők lehetnek a nehéz terepi viszonyok.

NGM esetén, a mintatípustól függően, általában kisebb mennyiségű és rosszabb minőségű DNS-hez jutunk. Ennek megoldása elsődlegesnek bizonyult és kezdetben sok vizsgálat irányult az adott mintatípusból történő sikeres izolálás fejlesztésére (Beja-Pereira et al. 2009). Ugyanakkor a DNS-alapú vizsgálatok alkalmazása során is merültek fel hibás eredmények, melyek kivizsgálásra és módosításra szorultak. Lényegében három fő probléma mutatkozott meg: a DNS degradációja, PCR inhibitorok valószínűsíthető jelenléte, illetve

ebből adódóan a genotipizálási hibák megjelenése (Taberlet & Luikart 1999). Ezek leggyakoribb okai a gyűjtés során fellépő rossz időjárási viszonyok és a kontamináció, szennyező anyagok jelenléte a mintákban, rossz mintatárolási módszerek és a nem megfelelő izolálási technikák alkalmazása (Buchan et al. 2005, Broquet et al. 2007, Beja-Pereira et al. 2009). Vedlett tollak esetén eleinte a cséve bazális csúcsát távolították el és használták fel DNS izolálására (Segelbacher 2002), később már a felső köldökben található visszamaradt vérrögöt ítélték meg jobb forrásként (Horváth et al. 2005). További vizsgálatok folytak annak kapcsán is, hogy a vedlett tollakat milyen körülmények között célszerű tárolni annak érdekében, hogy növeljék az izolálás sikerességét (Vili et al. 2013b). Továbbá Booms és mtsai (2008) azt javasolják, hogy érdemes a kisebb tollakat összegyűjteni, ha fészeknél történik a mintavétel, mivel azok nagy valószínűséggel frissen vedlett tollak.

A két fő genotipizálási hibaként az allélkiesést és a hibás allélek felszaporodását tartják számon, azonban ezek mellett még szóba jöhetnek a leolvasási hibák, illetve az adatfeldolgozás során felmerülő problémák (Taberlet et al. 1999). Az allélkiesés során a primerek kötőhelyén lévő mutációk miatt az adott lókusztra ténylegesen heterozigóta egyedeknél megeshet, hogy csak az egyik allél szaporodik fel a PCR során, így hibásan homozigótaként könyveljük el az egyedet (nullallél). Továbbá főleg dinukleotid mikroszatellita lókusztok vizsgálata során merült fel az a probléma, hogy sok műtermék is felszaporodott a PCR reakciókban, amelyeket hibásan allélként detektáltak (Taberlet & Luikart 1999). Megállapították, hogy a genotipizálás sikeressége legjobban a vizsgálandó genomszakasz hosszától függ (Broquet et al. 2007). Számos kutatás célkitűzése volt, hogy a különböző típusú minták felhasználhatóságát növeljék, így mára már a gyűjtési, izolálási és genotipizálási módszerek annyit fejlődtek, hogy az NGM alkalmazhatósága megközelíti a jobb minőségű mintákat is (Lathuilliere et al. 2001, Beja-Pereira et al. 2009).

Számos kutatási és tudományos területen van fontos szerepe az NGM-nek azáltal, hogy megkönnyíti az információ megszerzését vagy olyan kérdések megválaszolásához biztosít eszközöket, amelyekre korábban nem volt lehetőség. Ezek egyike az igazságügyi nyomozások területe, ahol lehetőség nyílt például orvvadászok azonosítására vagy haszonállatok predációjának vizsgálatára (Caniglia et al. 2010, 2013). Az NGM hasznosítható még ökológiai és evolúciós folyamatok értelmezésére, szaporodásbiológiai és viselkedésökológiai kérdések tanulmányozására, továbbá fontos eszköze a konzervációbiológiának (Schwartz et al. 2007). Lehetőséget ad még a populációk jellemzésére (például az egyedszám, a denzitás és az ivararány becslésére), továbbá alkalmas

populációs genetikai paraméterek, mint például a génáramlás vagy demográfiai jellemzők vizsgálatára is (Beja-Pereira et al. 2009).

A populációgenetikai és -dinamikai vizsgálatokhoz leggyakrabban sejtmagi mikroszatellita markereket alkalmaznak, amelyek által lehetőség van az egyedek egyedileg történő azonosítására, a DNS-profilok elkészítésére. Ezekkel a genetikai megjelölésekkel az egyedek sorsa követhető többszöri mintavételezéssel (Lukacs & Burnham 2005).

A jelölés-visszafogás módszerét számos populációdinamikai vizsgálatban használják (Mowat & Strobeck 2000, Marucco et al. 2009). A hagyományos eljárás az egyedek megfogásán, megjelölésén majd ismételt visszafogásán alapul. Ez az eljárás igencsak körülményes, illetve nehezen kivitelezhető a ritka és veszélyeztetett fajok esetében (Marucco et al. 2009). Az NGM és a genetikai markerek segítségével az egyedek sorsa könnyen nyomon követhető hosszabb időtávlatokban is, így a detektált genotípusok jól alkalmazhatóak a jelölés-visszafogás módszer keretei között. Alapvetően a következőképpen történik az alkalmazása: a mintavételezést követően a mintákat genotipizálják, majd a megegyező genotípusokat visszafogási eseményként határozzák meg (Lukacs & Burnham 2005). Ha egy populációról készül egy több évet felölelő fogástörténeti adatsor, akkor lehet becsülni populációra jellemző trendeket, túlélési valószínűséget, egyedszámot, ki- és bevándorlási valamint születési- és halálozási rátát (Lebreton et al. 1992, Cooch & White 2016).

1.2. A nem-invazív genetikai mintavétel alkalmazhatósága ragadozómadarakban

Madaraknál az egyedek jelölésére és követésére alkalmazott hagyományos módszerek (pl. a gyűrűzés, a szárnyjelölés, jeladó felszerelése vagy a direkt vizuális megfigyelés) idő- és költségigénye, illetve hatékonysága nagyban függhet a vizsgált fajtól. A hagyományos módszereket és az NGM-et társítva a madarak vizsgálata sokkal több információn alapul, alaposabb következtetések levonásához vezethet (Rudnick et al. 2009). Pontosabban megismerhetjük a populációk méretét, a túlélési arányokat, a mozgási mintázatokat (migráció, diszperzió, kóborlások), az élőhelyhasználatot, a szaporodási rendszereket, vagy éppen a költő- és telelő területek használatát (Booms et al. 2011).

Az egyedek diszperziós viselkedését és mintázatait vizsgálva jobb rálátást kaphatunk bizonyos populációdinamikai és populációszerkezeti jellegzetességekre (Booms et al. 2011). Egyes fajoknál megfigyelt jelenség, hogy a kikelésük és az első szaporodásuk ideje között van egy átmeneti vándorlási időszak (Greenwood & Harvey 1982). Ha ez távol esik a költő populációtól, akkor ezen időszak alatt nehéz vizsgálni az egyedeket hagyományos

módszerekkel. A kikelési és az első szaporodási hely is különbözhet, ez az elmozdulás a kikelési diszperzió. A másik diszperziós mechanizmus a szaporodási (madaraknál költési), amely az első szaporodást követő helyváltoztató mozgásokat fedi le (Greenwood & Harvey 1982). A diszperziós mozgások vizsgálatára lehetőség nyílt az NGM használatával (Booms et al. 2011). A populációk méretének meghatározása is fontos része a demográfiai vizsgálatoknak. Az olyan fajok esetén, ahol a fiatal egyedeknek van hosszabb diszperziós időszakuk, az egyedszámbebecslések általában csak a költő populációkat veszik figyelembe, mivel azok meghatározott helyen találhatóak, így mintázásuk könnyebb (Rudnick et al. 2009). A nem költő egyedek általában a költő populáció elterjedésén kívül tartózkodnak tömegesen, több közös táplálkozó illetve pihenőhelyen, melyeket általában felváltva használnak (Ferrer 1993). Ezeken a helyeken történő többszöri NGM alkalmazásával a nem költő egyedek is bevonhatóak a vizsgálatokba (Rudnick et al. 2008).

Ragadozómadarak esetén a hagyományos monitorozási módszerek nehézkesek és nem nyújtanak elegendő információt, mivel az egyedek mobilisek, nehezen lokalizálhatóak és a felnőtt egyedek befogása körülményes. Ebből adódóan az NGM alkalmazása a kutatásukban különösen nagy előnnyel járhat.

1.3. Egyedi alapú populációdinamikai vizsgálatok a parlagi sasnál

A parlagi sas (*Aquila heliaca*) a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) vörös listáján, mint sebezhető („vulnerable”, VU) szerepel és Magyarországon fokozottan védett. Jelenleg a felnőtt egyedek mortalitásának elsődleges ismert okai a mérgezés (33%), az áramütés (22%) és a gázolás (9%). Továbbá fontos veszélyforrás az emberi zavarás a költési szezonban (parlagisas.hu).

Elterjedési területe Nyugat-Európától Közép-Ázsiáig, Északnyugat-Kínáig és Szibériáig terjed. A szaporodó egyedek számát 25 000 és 100 000 közé becsülik (Birdlife International). Ennek a fajnak jelenleg Eurázsia középső területein találhatóak a legkiterjedtebb populációi. Oroszország és Kazahsztán területén a világ parlagisas-állományának a fele található meg.

A parlagisas-populációk, illetve -egyedek vizsgálata nehéz, mivel a felnőtt egyedeket rendkívül nehéz befogni vagy megjelölni, az ivari dimorfizmus csak a testméretben mutatkozik meg, továbbá gyakori jelenség a nagy távolságokra vándorlás, amelyet főleg fiataloknál, de költő madaraknál is megfigyeltek már (Rudnick et al. 2005). A nem-invazív mintagyűjtés segítségével az elmúlt években megnőtt a kutatások száma ezzel a fajjal

kapcsolatban. Egyelőre két fő területen monitorozzák több éve alaposan a fajt: Kazahsztánban és Oroszországban, illetve a Kárpát-medencében (Horváth et al. 2011).

A parlagi sas monogám faj (általában több szaporodási időszakot felölelően), jellemző rá a pár-, és territóriumhűség (Rudnick et al. 2005), továbbá az erős territoriális viselkedés. Élőhelye az erdős-sztyepp területek és olyan mezőgazdasági területek, ahol több facsoport is található. Az egyedek körülbelül négy éves korukban választanak párt maguknak. A költőpároknak általában több fészük is van, amelyeket a fák lombkoronájának magasabb szintjére építenek és egymást követő években felváltva használnak (Del Hoyo et al. 1994, Ferguson-Lees & Christie 2001).

Az Állatorvostudományi Egyetem Ökológiai Tanszékének Konzervációgenetikai Kutatócsoportja a parlagi sasok magyarországi állományfelméréséhez az egyedi alapú populációdinamikai vizsgálatokkal járul hozzá NGM által gyűjtött adatok alapján. Ezek a kelési és költési diszperzió, az éves cserélődés és a túlélés becslés. A kelési diszperzió esetében azt vizsgáljuk, hogy az egyedek a kikelési helyüktől milyen távolságra foglaltak vagy alapítottak territóriumot és szaporodtak először. Költési diszperzió vizsgálatánál azon egyedek számát vizsgáljuk, amelyek az évek során territóriumot váltottak, az éves cserélődésnél pedig az adott territóriumon belüli rezidens költő egyedek lecserélődését (Vili et al. 2013a), amely információt biztosít a populáció stabilitásáról (Rudnick et al. 2005). Mivel az egyedek magas szintű territóriumhűséget mutatnak az évek között, így az éves cserélődéshez használt adatok felhasználhatóak a felnőtt egyedek túlélésének becslésére (Rudnick et al. 2009). Ezeknél a vizsgálatoknál az optimális eset az, ha minden egyed és territóriumot sikerül megmintázni mindegyik évben a kutatás ideje alatt.

1.4. A populációdinamikai vizsgálatok hibalehetőségei

A nem-invazív mintagyűjtés sok információt szolgáltat a populációról, de egyben korlátozottat is, mivel az optimális mintavételezés kivitelezhetetlen. Tehát, a populációról kapott korlátozott információ és az a hibalehetőség, hogy nem a rezidens egyedek kerülnek megmintázásra, téves következtetések levonásához vezethet azon vizsgálatok esetén, ahol az egyedeket egyedileg azonosítjuk és territóriumhoz (fészekhez) kapcsoljuk.

Éves cserélődés vizsgálatánál azt figyeljük meg, hogy az adott fészeknél melyik egyed található meg a vizsgált években. Abban az esetben, ha nem a rezidens költő párt mintázzuk meg, hanem egy másik egyed vedlett tolla kerül begyűjtésre, a cserélődést felülbecsüljük, mivel (tévesen) megnő a cserélődési esetek száma.

A költési diszperzió vizsgálata során több olyan esetet is detektált a kutatócsoport, amikor adott egyed egymást követő években két fészek között oda-vissza mozgott (Vili et al. 2013a). Ezekben az esetekben is lehetséges, hogy nem a rezidens egyed vedlett tolla volt feldolgozva, ezáltal szintúgy felülbecslési hiba állhat fenn.

A túlélés becslés esetén akkor merülhet fel probléma, ha egy adott évet követően már nincs mintavétel a populációban. Ilyenkor, ha az adott fészeknél hibásan nem az előző évi költő egyedet találjuk meg, akkor az egyedet halottnak tekintjük, torzítva ezzel a becslést.

Az irodalomban több olyan eset is napvilágot látott, ami alátámasztja a hibás mintavételezés lehetőségét. A kelési diszperzió időszaka alatt a fiatal egyedek átmeneti területeken telepednek le, illetve hosszabb felfedező utakat tesznek megfelelő élőhely és szaporodási terület keresése érdekében (Penteriani & Delgado 2009), azonban az egyedek egy része nem biztos, hogy elhagyja a szülőpopulációt (Ferrer 1993). Ezenkívül fiatal, jeladós ibériai sasoknál (*Aquila adalberti*) megfigyelték, hogy az egyedek rendszeresen visszalátogatnak kelési területükre (Ferrer 1993).

Felnőtt költő madarak esetén is megfigyeltek már hosszabb távú utazásokat, amelyek egyes fajoknál nem lépték át a territórium határokat (Fernández et al. 2009, Pérez-García et al. 2013, Poessel et al. 2016), viszont bizonyos fajok esetén igen. Meyburg és mtsai (2007) a békászó sas (*Aquila pomarina*) vizsgálata során megfigyeltek betolakodási eseményeket (nem rezidens egyed jelenléte az adott territóriumnál). A kutatáshoz felnőtt egyedeket láttak el jeladókkal és fészkek alól gyűjtöttek vedlett tollakat, illetve terepi megfigyelést is végeztek. A jeladós madarak segítségével nyomon követhető volt azok mozgása a költési időszakban, a megfigyelésnek köszönhetően pedig a fészeknél megjelenő nem rezidens egyedeket tudták detektálni. Mindhárom vizsgálati módszer (vedlett toll, jeladó, megfigyelés) eredménye alátámasztotta, hogy költő tojó egyedek meglátogatnak a sajátjukon kívül más fészkeket is. Többször megfigyelték, hogy a rezidens költő egyed mellett a fészeknél tartózkodott egy idegen egyed, még a fióka nevelési időszakban is. Egy magyarországi sűrűn lakott rétisas (*Haliaeetus albicilla*) költőpopulációban a gyűjtött vedlett tollak 7 %-a nem a rezidens költőpárhoz tartozott (Nemesházi et al. in prep). Ibériai sasok műholdas adóevővel ellátott egyedeinél megfigyeltek olyan eseteket amikor más költőpárok territóriumán belül tartózkodtak (Ferrer et al. 2015). Detektáltak olyan esetet is, ahol három egyed - egy rezidens hím, egy idegen tojó, illetve hím - költött együtt több éven keresztül (González et al. 2006). Fehérfejű rétisasoknál (*Haliaeetus leucocephalus*) is folytak vizsgálatok betolakodási eseményekre fókuszálva (Turrin & Watts 2014).

Egy magyarországi jeladóval felszerelt költő parlagi sasnál (tojó) megfigyelték, hogy hosszabb ideig egy idegen fészeknél tartózkodott továbbá, hogy fészkelési időszakban több területet érintve repült (Horváth et al. 2013).

1.5. Célkitűzések

Elsődleges célunk volt a parlagi sasoknál rutinszerűen végzett nem-invazív mintavétel hibájának becslése, vagyis annak a vizsgálata, hogy a fészkek alól gyűjtött vedlett tollak milyen arányban származnak nem rezidens költőpártól. Továbbá az eddig ismert összes parlagisas-költés adatait (2000-2016) átnézve ellenőriztük, hogy volt-e olyan egyed az évek során, amelyet egy adott évben egynél több fészeknél azonosítottunk. Betolakodási események (idegen, nem rezidens egyed jelenléte az adott fészeknél) esetén a betolakodó ivarát és a rezidens egyedekhez való rokonsági viszonyát is megvizsgáltuk.

2. Anyag és módszer

2.1. Mintavétel

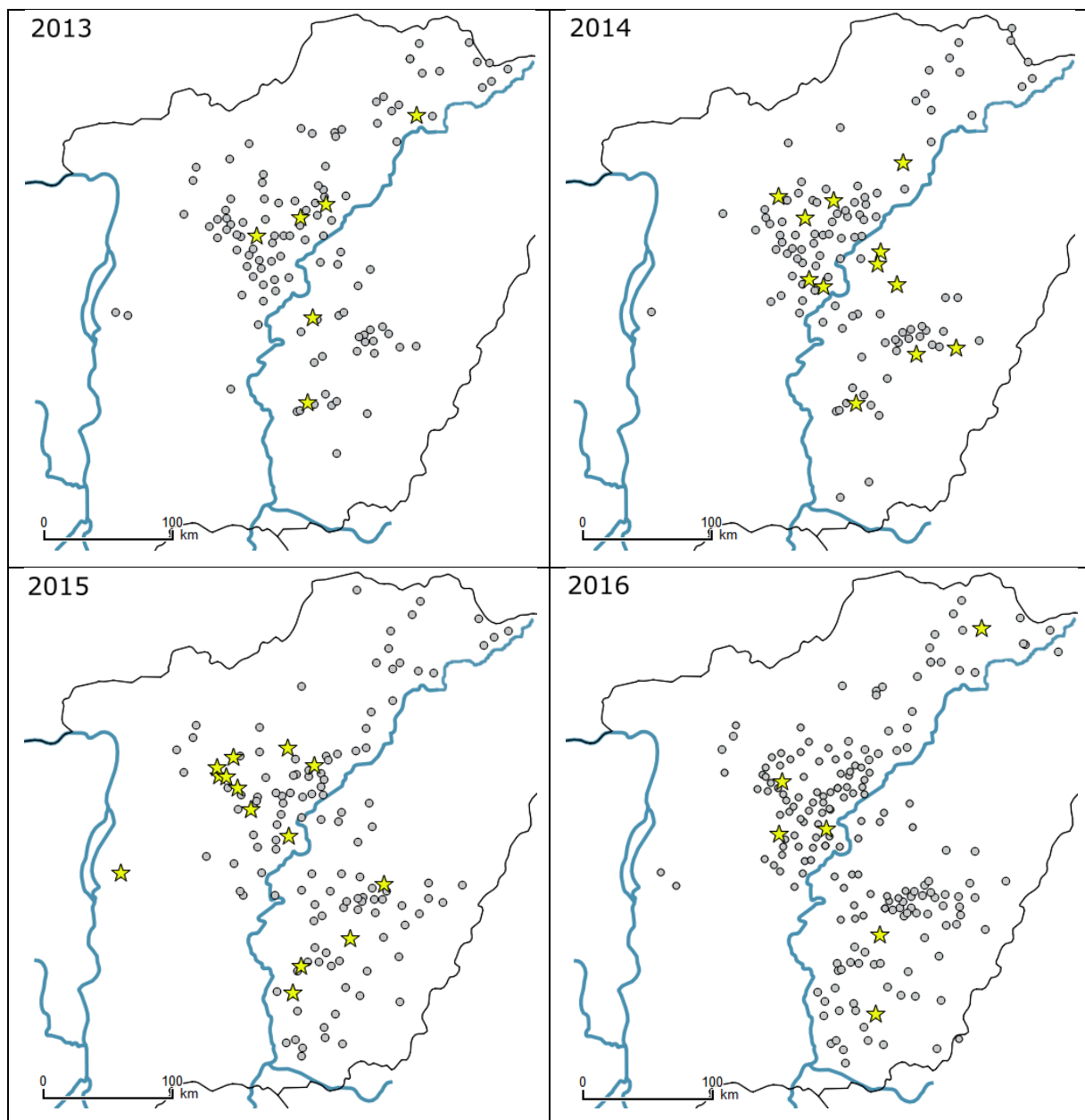
Kutatásunkhoz a mintákat a Parlagisas-védelmi Munkacsoport tagjai biztosították. A magyarországi parlagisas-állomány rutinszerű mintavételezése (a kétezres évek elejétől kezdődően) a következőképpen zajlik: vedlett tollak gyűjtése a fészkek alól és annak környékéről (100 m sugarú körben) és időnként a kiülőfák (olyan magas fák, amelyekről jól belátható az egyedek vadászterülete) alól, ezáltal mintázva a felnőtt egyedeket. A fészkek alól gyűjtött tollak nagy valószínűséggel a tojó egyedekhez tartoznak, mivel a kotlás végett több időt töltenek ott. A hím egyedek táplálékot keresnek és őrzik a territóriumot, ezért nagyobb a valószínűsége, hogy a kiülőfák alól gyűjtött minták között lesz hímhez tartozó is. A vedlett tollak gyűjtése általában a költési időszakban (június) és a vedlési időszak elején (július-szeptember) folyik. A mintázott fészkek és a megtalált vedlett tollak GPS-koordinátái lehetőség szerint mindig feljegyzésre kerülnek. A felnőtt egyedek mellett a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME) tagjai a 4-7 hetes fiókáktól két tokos tollat vesznek a hónaljtajékról (nem-destruktív mintavétel) az évenkénti gyűrűzéskor (június). A vedlett tollakat lezárható zacskóban tároljuk, sötét és száraz helyen, a fiókatollakat pedig alkoholban -20°C -on.

Ha a mintavételezés az adott fészkeknél ugyanabban a költési időszakban történik, akkor feltételezzük, hogy a talált vedlett tollak a rezidens költőpárhoz tartoznak, mivel monogám és erősen territoriális viselkedésű fajról van szó (Rudnick et al. 2009). Tehát, ha egy évben a lehető legtöbb foglalt fészkeknél történik mintavétel, jól felmérhető a költő egyedek jelenléte a populációban. Általában a populációdinamikai vizsgálatokhoz minimum egy tollat használunk fel, azonban ha elsöre a hím egyedet azonosítjuk, akkor egy következő toll is feldolgozásra kerül annak reményében, hogy az a tojó egyedhez tartozik. Ezzel a módszerrel lehetőség van több egyed megtalálására, így a mintaelemszám növelésére.

A jelenlegi vizsgálathoz olyan fészkeket választottunk a korábban megmintázott évekből, melyeknél minimum öt vedlett toll, illetve minimum egy fiókától származó tokos toll állt rendelkezésre. A 2013-2016 közötti időszakban 189 territóriumból volt legalább az egyik évből mintázott egyed. Ezek közül összesen 37 alkalmas fészket találtunk és választottunk ki (1. ábra). A vizsgált fészkek nem ismétlődtek az években. Annak érdekében, hogy a fészkekről elegendő előzetes információ álljon rendelkezésünkre, csak az elmúlt négy évben mintázott territóriumok közül válogattunk.

Betolakodó egyedek jelenlétének vizsgálatához ellenőriztük az ismert parlagisas-költési adatsort (2000-2016), amelyben 210 olyan terület található, ahonnan legalább egy évből egy minta genotipizálva van és ebben a 17 éves időszakban összesen 445 költő egyed lett azonosítva. A különböző területekből származó genotipizált egyedek mintáit ellenőrizve abban az esetben, ha két területnél ugyanazt az egyedet vagy egy területnél két különböző genotípusú azonos ivarú egyedet detektáltunk, akkor további vizsgálatokkal meghatároztuk, hogy melyik a rezidens, illetve a betolakodó.

1. ábra: A vizsgálathoz kiválasztott 37 fészek (2013-2016)



★ - általunk választott fészkek
 ● - összes mintázott fészkek

2.2. A tollak preparálása és a DNS kivonása

A gyűjtött vedlett tollakból megfelelő technikával megfelelő minőségű DNS nyerhető ki. A DNS-kivonás sikeressége érdekében általában a nagyobb tollakat: az elsőrendű evezőtollak (P), a farktollakat (T) és a szekunder és terciér evezőtollakat (ST) szoktuk feldolgozni. Felhasználhatóak még a kisebb tollak is: a vállfedő- (SH), az elsőrendű fedő- (PC), a nagyfedő- (GC) és a pehelytollak (C) (Vili et al. 2013b).

A tollat fejlődése során egy ér táplálja, ami az alsó köldökön át belép a tollszárba, és a felső köldöknél lép ki a toll külső felszínére, majd a tollfejlődés után visszahúzódik, ekkor a felső átlépésnél egy kis vérrögöt hagy maga után. Ebben a hátramaradt vérrögben elegendő mennyiségű DNS található, mivel a madarak vörösvérsejtjei tartalmazzák a sejtmagot.

A vedlett tollak preparálása a cséve felső köldök részében található vérrög eltávolításán alapszik (2. ábra) (Horváth et al. 2005). Ezt minden új tollon mindig steril papírlapon, steril pengével végezzük, hogy a kontaminációt elkerüljük.

Először a tollak felső köldök részét 99 %-os alkohollal átitatott törlőpapírral lemostuk, hogy a szennyeződéseket eltávolítsuk. Majd a felső köldökből kivágtuk szikével a vérrögöt tartalmazó területet, lehetőleg minél kisebbet, a kivágott toll darabka felső rétegét lefejtettük, hogy a vérrög a felszínre kerülhessen ezáltal növelve a kivonás sikerét. A fióka tollak esetében a tollak csévéjének utolsó maximum 0,5 cm-nyi szakaszát vágtuk le, majd daraboltuk fel és helyeztük ki száradni, hogy az alkohol elpárologjon. A tolldarabot mintakóddal ellátott eppendorf-csőbe helyeztük, majd – 20°C-on tároltuk felhasználásig.

2. ábra: Vedlett toll csévéjén található felső köldök területe a vérröggel



A vedlett és tokos tollakból a genomi DNS-t kereskedelmi kit (Genomic Tissue Kit; GenAid) segítségével vontuk ki.

Első lépésként a mintákhoz 20 µl Proteináz-K-t és 10 µl DTT-t adtunk, azért hogy, a fehérjék és a keratin elemesztődjön, ezáltal hozzáférhetővé váljon a DNS. Az emésztő puffer hozzáadása után a mintákat egy egész éjszakára vízfürdőbe helyeztük 60°C-on, hogy az enzimek megfelelően kifejthessék hatásukat.

A következő napon fizikai aprítás után lízispuffert mértünk hozzá, amely után minimum 20 percre visszahelyeztük a mintákat a vízfürdőbe. A következő lépésben a mintákat magas fordulatszámon a centrifugába helyeztük, hogy az el nem emésztődött szilárd fázisok a csövek aljába kerüljenek, majd a felülúszót átmértük az oszlopmembránra. Ennek a lépésnek a végén alkoholos közegben kötődik a DNS a membránhoz.

A következő lépésben mosó pufferek segítségével az emésztetlen és felesleges részecskéket lemostuk a membránról. A végső lépéshez az oszlopokat mintakóddal ellátott eppendorf-csövekbe helyeztük, majd nyitott kupakkal 20 percre egy szekrénybe helyeztük őket, hogy az alkohol teljesen elpárologjon. A száradás után felmelegített 50 µl euláló-puffert mértünk az oszlopokra és 5-10 percre visszahelyeztük a szekrénybe a mintákat, majd centrifugáltuk, végül ezt a lépést még egyszer megismételtük, hogy minél több DNS-t tudjunk leoldani a membránról. Az elkészült mintákat -20 °C-on tároltuk felhasználásig.

2.3. Molekuláris ivarmeghatározás

Az élővilágban számos olyan faj található, amelyeknél külső bélyegek alapján nem lehet meghatározni az ivart. Ezekben az esetekben ez molekulárisan megállapítható, melyhez a madarak esetén a módszert Fridolfsson és Ellegren (1999) dolgozta ki. Alapja a CHD1 génszakasz hosszúságának különbsége az ivari kromoszómákon, ez a szakasz kódolja a kromo-helikáz DNS-kötő fehérjét. A madarak esetén a tojó a heterogametikus ivar (ZW), míg a hím a homogametikus (ZZ).

A vizsgálatunkhoz a következő primerpárt használtuk: CHD1-i16 R és CHD1-i16 F (Suh et al. 2011), amelyek a Z kromoszómán egy 650 bp hosszúságú szakaszt, míg a W kromoszómán egy 430 bp hosszúságú szakaszt szaporítanak fel a PCR reakció során.

Az ivarmeghatározáshoz szükséges szakasz felszaporításához a következő PCR reakcióelegyet „Touchdown” PCR ciklussal (1. táblázat) alkalmaztuk: 17 µl végtérfogatban 0,065 µl DreamTaq enzim (Fermentas), 1,7 µl 10X DreamTaq Green puffer (Fermentas), 0,65 µl MgCl₂, 0,65 µl dNTP mix, 0,75-0,75 10 pM forward és reverz primer, 9 µl víz és kb. 10 ng emésztett genomi DNS.

Kezdeti denaturálás	95°C	2 p
---------------------	------	-----

Touchdown szakasz	I.	95°C	30 mp	9 ciklus
	II.	60-52°C	45 mp	
	III.	72°C	45 mp	
	I.	95°C	30 mp	28 ciklus
	II.	52°C	45 mp	
	III.	72°C	45 mp	

Végső extenzió	72°C	7 p
----------------	------	-----

I. denaturálás, II. anelláció, III. elongáció

1. táblázat: PCR ciklus az ivarmeghatározáshoz

Az eredményt agaróz-gélelektroforézissel értékeltük. A 2 %-os agaróz gélt EcoSafe (Pacific Image Electronics Co., Ltd) festékkel festettük, és 35-45 percig futattuk, majd a géllapot UV-fénnyel megvilágítva olvastuk le az ivarokat. A gélen a tojó egyedek esetén két PCR-termék látható: egy 450 bp körüli, és egy 650 bp körüli. A hím egyedeknél pedig csak 650 bp körül látható egy termék.

2.4. Mikroszatellita genotipizálás

Az egyedek azonosításához kilenc mikroszatellita lókuszt vizsgáltunk meg, melyek a rétisásra, az ibériai sásra és a parlagi sásra lettek kifejlesztve. A mikroszatelliták nagyon variábilisek, így az egyes lókuszon található allélek fajon belül egyedenként is eltérőek lehetnek, ezáltal lehetséges az egyedileg történő azonosítás és a DNS-profilok elkészítése. Az általunk vizsgált dinukleotid lókusztok a következők: Aa36, Aa39, Aa02, Aa43, Aa35, (Martinez-Cruz et al. 2001); Hal04 és Hal10 (Hailer et al. 2005). Továbbá vizsgáltunk még két tetranukleotid lókuszt, az IEAAAG09-t és az IEAAAG11-t (továbbiakban G-vel rövidítve) (Busch et al. 2005).

Az adott szakaszok felszaporításához multiplex PCR-t használtunk a következő lókuszt párokkal: Aa36-Aa39, Aa43-Aa35, G09-G11, Hal04-Hal10. Eltérő anellációs hőmérséklettel dolgoztunk a di- és a tetranukleotidok esetében és mindkét programnál „Touchdown” PCR-t használtunk (2. táblázat). A reakcióelegy a következő volt: 17 µl végtérfogatban 0,065 µl DreamTaq enzim (Fermentas), 1,7 µl 10X DreamTaq Green puffer (Fermentas), 0,65 µl MgCl₂, 0,65 µl dNTP mix, 0,75-0,75 10 pM a két lókuszt forward és reverse primerből, 10 µl víz és kb. 10 ng emésztett genomi DNS.

		Dinukelotid lókuszok			Tetranukleotid lókuszok		
Kezdeti denaturálás		95°C	2 p		95°C	2 p	
Touchdown szakasz	I.	95°C	30 mp		95°C	30 mp	
	II.	66-50°C	30 mp	17 ciklus	66-60°C	30 mp	7 ciklus
	III.	72°C	30 mp		72°C	30 mp	
	I.	95°C	30 mp		95°C	30 mp	
	II.	50°C	30 mp	21 ciklus	60°C	30 mp	31 ciklus
	III.	72°C	30 mp		72°C	30 mp	
Végső extenzió		72°C	7 p		72°C	2 p	

I. denaturálás, II. anelláció, III. elongáció

2. táblázat: PCR ciklusok a mikroszatellita lókuszokhoz

A pontos allélméreték leolvasását a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriuma végezte egy ABI 3130 típusú szekvenátorral. A fragmenshosszak elemzését a Peak Scanner (Applied BiosystemsTM) programmal végeztük, amely adott hosszúságú jelölt markerekhez (GS500LIZ) viszonyítva számolja ki a fragmensek hosszát. A genotipizálási hibák ellenőrzésére az ML-Relate szoftvert használtuk (Kalinowski et al. 2006). A mikroszatellita allélek várt és becsült heterozigócia fokát és az allélfrekvenciákat a GenAlEx programmal számoltuk ki (Peakall & Smouse 2012). A Hardy-Weinberg egyensúly és a markerek erejének (PI, PX) tesztelését is ezzel a programmal végeztük. A PI (Probability of Identity) annak a valószínűsége, hogy két véletlenszerűen kiválasztott egyed genotípusa megegyezik, a PI_{SIB} érték pedig a populációban található lehetséges testvérek jelenlétével korrigál. Két szülő (P1X) ,illetve csak egy szülő (P2X) ismeretében a kizárási valószínűség segítségével a szülő-utód valószínűség vizsgálható (Jones & Ardren 2003).

A betolakodási eseményt a következőképpen definiáltuk: az adott fészeknél olyan tollminta megtalálása, amely nem a rezidens költő egyedtől származik. A rezidens költő egyedeket az adott fészekben talált fiókák DNS-profilja alapján azonosítottuk. A betolakodásban érintett territóriumok közötti távolságokat a QGIS program segítségével számoltuk ki (<http://qgis.org/>). A betolakodó és rezidens egyedek közötti rokonsági fokokat az ML-Relate programmal becsültük, a nullalléles lókuszok okozta hibák korrigálásával (Kalinowski et al. 2006).

3. Eredmények

A használt mikroszatellita markerek segítségével az eddigi évek során (2011-2015) 245 db felnőtt parlagisas-egyedet genotipizáltunk meg. A korábbi genotípusok alapján az átlagosan megfigyelt heterozigócia 0,68 (standard hiba (se)=0,04) volt és egyik lókuszt sem tért el a Hardy-Weinberg egyensúlytól (függelék: 1. táblázat), az átlagos allélszám 3,69 (se=0,38; függelék: 2-3. táblázat) volt. A PI értéke 7×10^{-9} , a PI_{SIB} értéke pedig 5×10^{-4} volt. Két szülő ismeretében a kizárási valószínűség 0,998 és egy szülő ismeretében pedig 0,966 volt. Az általunk választott fészkek mintáinak 3,8 %-ában több mint két lókuszt felszaporítása sikertelen volt.

A kiválasztott 37 fészekből összesen 185 vedlett tollat dolgoztunk fel, és összegeztük, hogy milyen típusúak voltak, melyik időszakban, illetve honnan voltak gyűjtve (3. táblázat). A kiülőfa alól származó tollak fészektől való átlagos távolsága 1349 m (szórás (sd)=1581 m, max=5204 m) volt. 65 felnőtt egyedet azonosítottunk a vedlett tollak alapján, ezek közül 39 tojó volt, 26 pedig hím.

Toll típusa	%	Gyűjtés időszaka	%	Gyűjtés helye	%
P	16,30	fészkelés	57,61	fészkek	89,13
ST	31,52	vedlés	42,39	kiülőfa	10,86
T	20,11				
SH	14,67				
GC	2,72				
PC	7,61				
C	7,07				

3. táblázat: Feldolgozott vedlett tollak típusa, gyűjtési időszaka és helye

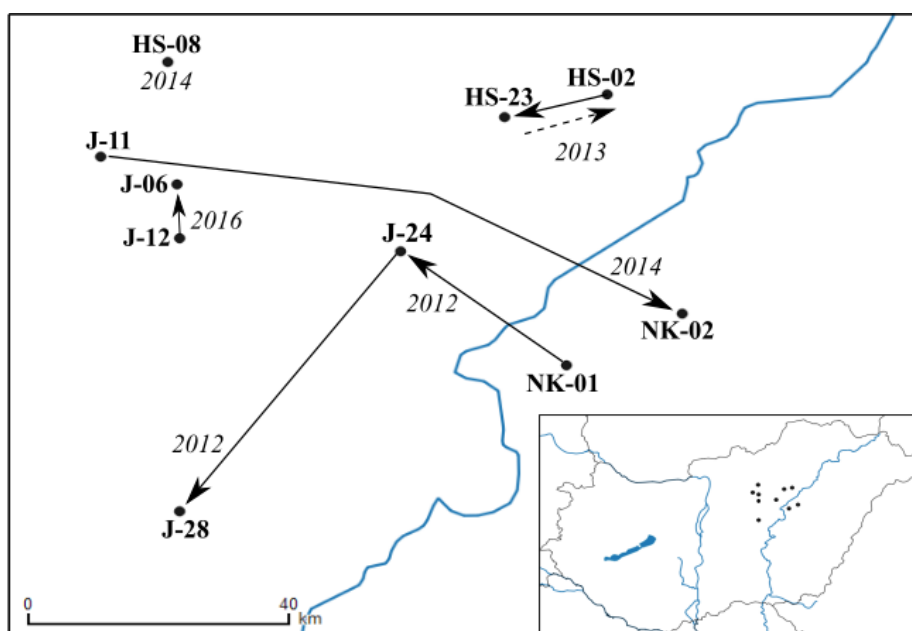
A kiválasztott 37 fészkek tollmintái alapján három betolakodási eseményt találtunk, vagyis a fészkek alól gyűjtött vedlett tollak ezekben az esetekben nem az adott territórium rezidens egyedeihez tartoztak (2,2%). Két esetben egy tollminta tartozott a betolakodóhoz, egy esetben pedig két minta. A kutatócsoport korábban genotipizált mintái között (2000-2016, 210 territórium, 450 költő egyed) további négy betolakodót találtunk (1 minta/betolakodó), tehát adott egyed tollát két territóriumnál is azonosítottuk ugyanabban az évben, és csak az egyik territóriumon volt rezidens (ezt fióka-genotípusok vagy korábbi költési események alapján tudtuk ellenőrizni).

Az összesen talált hét betolakodóból négy tojó és három hím volt. Ezeknek az egyedeknek a mintái közül három a költési időszakban (június), négy pedig a vedlési időszakban (július-szeptember) volt gyűjtve és egyik minta sem származott kiülőfa alól. A

betolakodókhöz tartozó minták közül egy elsőrendű evezőtoll, négy farktoll, egy szekunder/tercier evezőtoll, egy elsőrendű fedőtoll és egy nagyfedőtoll volt. Öt esetben azonosítani tudtuk, egynél pedig feltételezzük, hogy a betolakodó melyik territóriumban volt rezidens az érintett évben (4. táblázat, 3. ábra).

A kiválasztott fészkek közül az egyiknél (HS-02, 2013) az ötből a legelsőnek feldolgozott toll tartozott a betolakodóhoz (hím), a másik fészeknél (NK-02, 2014) a második minta (tojó), a harmadik fészeknél (J-06, 2016) pedig a negyedik és ötödik minta (hím). A HS-02 territóriumnál a rezidens hímet megtaláltuk 2012 és 2014 között, a betolakodót a populációban a 2013-as évben még nem találtuk meg egyik költő territóriumnál sem, mivel újonnan kiderült, hogy egy betolakodó egyedet azonosítottunk, azonban 2009-ben és 2015-ben a HS-23 territóriumban költött. A NK-02 territóriumnál a rezidens tojó 2004-2014-ig költött, a betolakodó tojó pedig a J-11 territóriumon költött 2007-2015-ig. A J-06-os territóriumon a rezidens hím 2013 óta költ, míg a betolakodó hím terepi megfigyelések alapján a J-12-es territóriumon költött az adott évben (továbbá 2006-ban, 2007-ben és 2015-ben genotípus alapján bizonyítottan). Az adatsorban talált esetek közül az egyik fészeknél (HS-23, 2013) két toll volt feldolgozva, az egyik a rezidens tojóhoz tartozott, a másik viszont a betolakodó hímhez, amely a HS-02 territóriumnál volt rezidens. A másik fészek (J-28, 2012) esetén pedig csak egyetlen toll volt feldolgozva (és gyűjtve is), amely a betolakodó egyedhez (tojó) tartozott, amely a J-24-es territóriumon volt rezidens 2011-2015-ig. A harmadik fészek (J-24, 2012) esetén három toll volt feldolgozva és az utolsó bizonyult betolakodó egyednek (tojó). Ennél a fészeknél a rezidens tojó 2011-2015-ig költött, a betolakodó tojó pedig az NK-01 territóriumnál volt rezidens 2004-2015-ig. A negyedik fészeknél (HS-08, 2014) az elsőként feldolgozott minta bizonyult betolakodónak (tojó), a további minták és a fióka ellenőrzése során a rezidens tojót is megtaláltuk. A betolakodó tojót a 2014-es évben illetve a korábbi évek költési adatai között sem találtuk meg. A vedlett toll alapján immature egyedről van szó, amely lehet, hogy még nem lépett be a költő populációba.

3. ábra: Betolakodásban érintett fészkek



A nyilak a betolakodás irányát mutatják, szaggatott vonal: feltételezett

A betolakodó saját territóriumára és a betolakodás helye közötti átlagos távolság 27 609 m volt (sd=22 819 m; 4. táblázat). Az átlagos legközelebbi fészektávolság (NND) a kiválasztott 37 fészekenél 7206 m (sd=7282 m, terjedelem: 12 – 45 387 m), míg a megfigyelt (n=7) betolakodásban érintett fészkek közül a betolakodó egyedek költő territóriumánál 4816 m (sd=2622) és a látogatott territóriumoknál pedig 6454 m (sd=5350 m) volt. A vizsgált fészkeknél a rezidens hímek és tojók közötti átlagos rokonsági fok 0,04 (n=24, se=0,01) volt, míg a betolakodók és a rezidens egyedek között 0,03 (n=14, se=0,002). Az átlagos fiókaszám a 37 fészkek esetén 1,73 (sd=0,6) volt, a látogatott fészkek esetén 1,57 (sd=1,1, n=7) volt, míg a betolakodó egyedek saját fészkeinél 2 (sd=0,7, n=5) volt (fiókagyűrzéskor feljegyzett adatok alapján).

Ivar	Betolakodó saját territóriumára	Betolakodás helye	Távolság a fészkek között (m)
tojó	NK-01	J-24	21 364
tojó	J-24	J-28	37 450
hím	HS-02	HS-23	10 794
hím	HS-23 (felt.)	HS-02	10 794
tojó	J-11	NK-02	62 295
tojó	nincs (felt.)	HS-08	-
hím	J-12	J-06	6 138

4. táblázat: Betolakodási események

4. Diskusszió

A nem-invazív genetikai mintavételezés sok előnnyel jár, de bizonyos esetekben korlátozott, esetleg téves információt is nyújthat a vizsgált populációkról. A minták feldolgozásában feltételezhető hibalehetőségek kiküszöbölésére számos vizsgálat irányult, azonban a gyűjtési módszerek javítása és optimalizálása már kevesebb vizsgálat tárgya.

A nagytestű ragadozómadarak – különösen a ritka és veszélyeztetett fajok – esetén a populációdinamikai vizsgálatokban alapvető szerepe van a nem-invazív mintavételnek. A territoriális fajok mintavételezésének az alapja, hogy a fészkek közelében gyűjtött vedlett toll a rezidens költőpár valamelyik tagjához tartozik. A parlagi sas monogám faj és erős territoriális viselkedés jellemzi, így rutinszerűen alkalmazott módszer a fészkek 100 m-es környékéről, illetve a kiülőfák alól történő mintagyűjtés.

Az általunk kiválasztott 37 fészkek (2013-2016) vizsgálata során 185 vedlett tollat dolgoztunk fel és a minták 98,8 %-a a rezidens egyedekhez tartozott. A minták között három betolakodót találtunk három különböző fészeknél. Kettőhöz egy, illetve egyhez két minta tartozott. A betolakodókhoz tartozó minták mindegyike fészkek alól volt gyűjtve, azonban az onnan gyűjtött tollak 96,3 %-a rezidens egyedekhez tartozott. Összességében a kiülőfák alól származó minták aránya alacsony (10,8 %, amely megegyezik a rutinszerű mintázás arányával) így nem biztosít elegendő információt a kiülőfák alól gyűjtött tollak megbízhatóságáról ezért fontos lenne ezt felmérni. A betolakodók mintái közül az egyik fészkelési a másik kettő pedig vedlési időszak alatt volt gyűjtve. A rutinszerű mintavételezés hasonló arányban folyik a két időszakban, így a három talált egyed mintái alapján úgy véljük, hogy a gyűjtés ideje nem befolyásolja a megbízhatóságot. A parlagi sas genetikai vizsgálataihoz általában a nagyobb evező-, szekunder és terciér evező-, illetve farktollakat (P, ST, T) szoktuk felhasználni. Az eredményeink azt mutatják, hogy a nagyobb tollak nagy valószínűséggel a rezidens egyedekhez tartoznak (96,8 %). Probléma esetleg akkor merülhet fel, ha egy fészeknél nem sikerül nagyobb tollakat gyűjteni. Egy magyarországi sűrűn lakott rétisas populációban viszonylag gyakori esemény a betolakodók jelenléte, melyeket többségében kisebb fedőtollak alapján detektáltak (Nemesházi et al, in prep), ezért a parlagi sasoknál is érdemes lenne ellenőrizni ennek a típusnak a megbízhatóságát. A téves mintázás alacsony valószínűsége miatt úgy véljük a rutinszerűen alkalmazott mintagyűjtési módszer biztonsággal alkalmazható, még ha vannak is betolakodó egyedek a populációban és a jövőben továbbra is érdemes a fészkek alól gyűjtött nagyobb vedlett tollakat felhasználni.

A nagy testű ragadozómadarak területhasználatának vizsgálatára a legmegfelelőbb módszer a jeladók alkalmazása. Ezeknek az eszközöknek a segítségével megbecsülhető az adott fajra jellemző „otthonterület” (home range) és a „magterület” (core-area). Az otthonterület azt a legkisebb terület jelenti, amelyen az egyed egy bizonyos valószínűséggel megtalálható, a magterület az, melyben idejük több mint 50%-át töltik (Worton 1995). Ezek lefedik azt a területet, amelyen az egyedek mindennapos tevékenységeiket végzik. A territórium vagy fészkelő terület az otthonterületen belül található és az egyedek védik azt a fajtársakkal és más fajokkal szemben (Newton 1979). Otthonterület-átfedések előfordulhatnak egyes fajoknál például amikor több egyed vadászik ugyanazon a területen eltérő időpontokban, vagy egy időpontban, de agresszív viselkedést nem mutatnak (Fernández et al. 2009). Az átfedéseknek, illetve maguknak az otthonterületeknek a méretét számos faktor befolyásolhatja (Newton 1979).

A nagytestű ragadozómadarak nagy változatosságot mutatnak az otthonterület-átfedések, illetve a betolakodások terén. A héjasas (*Aquila fasciata*) egyes egyedeinél erős határ húzódott az általuk használt területek között, alacsony átfedési aránnyal, akkor is, ha a költés megíúsult (Pérez-García et al. 2013), míg más egyedeinél nagyobb arányban fedték egymást (Bosch et al. 2010). A szirti sas (*Aquila chrysaetos*) esetén úgy találták, hogy gyakoriak az otthonterület-átfedések (Poessel et al. 2016). Egy nem költő (korábban költött) egyednél megfigyelték, hogy 8-9 szomszédos territóriumot lefedett az általa használt terület (Moss et al. 2014). Ezeknek a fajoknak az esetében nem voltak célzott megfigyelések betolakodási eseményekre fókuszálva. Ibériai sas felnőtt egyedeinek vizsgálatánál is megfigyelték, hogy az otthonterületek bizonyos arányban átfednek egymással, továbbá terepi direkt megfigyeléssel megállapították, hogy az egyedek erős territoriális viselkedést mutatnak a használt terület határain a fészkeknél (Fernández et al. 2009). Jeladós fiatal (nem költő) egyedek mozgásait követve megállapították, hogy azok behatolnak a költőterritóriumokba (Ferrer et al. 2015). Fehérfejű rétisas terepi megfigyelései során a felnőtt és a fiatal egyedek betolakodásait is vizsgálták. Megállapították, hogy a fiatal egyedek jobban megközelíthették a foglalt fészkeket, míg a felnőtt egyedek ellen erősebb válaszreakciót mutattak a rezidens egyedek (Turrin & Watts 2014). Általában számos ragadozómadár fajnál a szomszédos territóriumok egyedei egy bizonyos szintig tolerálják egymás jelenlétét, míg az idegen egyedeket elüldözik (Newton 1979). Egy héjasas populációban, ahol a legközelebbi fészkek távolság (7098 m) hasonló volt, mint az általunk vizsgált távolság (7206 m) megállapították, hogy negatív korreláció figyelhető meg a fészektávolság és a területhasználat átfedésének

aránya között (Bosch et al. 2010). Azonban a lehetséges betolakodási eseményekre nem terjedt ki a vizsgálat.

A betolakodások oka jelenleg még nem tisztázott, több különböző alapokon nyugvó elmélet van. Az egyik közös vonásuk az elméleteknek az, hogy számos fiatal egyed közelíti meg a foglalt fészkeket. A fiatal egyedek a szülő populációt mint átmeneti területet is használhatják, de csak rövidebb ideig, mivel a felnőtt költő egyedek elüldözik őket (Ferrer 1993). A másik oka lehet ezeknek a látogatásoknak, hogy felmérjék a lehetséges szaporodási esélyeket, a megüresedett territóriumokat vagy párokat (Ferrer 1993, Ferrer et al. 2015). Úgy tűnik, hogy az ibériai sasnál ezek a lehetőségek állnak fent, mivel a fiatal egyedek a szaporodási ciklus kezdete előtt látogattak a legtöbbit, amikor is még csatlakozhattak a költő populációhoz. A fehérfejű rétisas esetén a fiatal és a felnőtt betolakodó egyedeket is feljegyezték. A látogatások száma az egész szaporodási ciklus egészében egyenletesen megfigyelhető volt azonban egyik látogatási esemény sem vonta maga után a költés megüresülését (Turrin & Watts 2014). A felnőtt egyedek messzebbre repülésének, amely alatt akár betolakodhatnak más territóriumokba több elmélete is van. Például felmerült, hogy felmérik a környező territóriumokat, a szomszédos egyedeket és a lehetséges vadászterületeket vagy éppen az emberi zavarás játszhat közre (Fernández et al. 2009, Pérez-García et al. 2013). Egy magyarországi jeladós parlagi sas (költő tojó) a megüresült költése után több másik territóriumot is meglátogatott és terepi megfigyelések alapján egy másik territórium fészkeire be is ült (Horváth et al. 2013). Az általunk összesen talált hét betolakodó közül (37 kiválasztott fészek és a korábban genotipizált egyedek) négy tojó volt, közülük három rezidens volt egy másik fészeknél az adott évben és egy egyed a másik fészeknél sem azonosítottunk, a tollminta alapján valószínűleg immature madár. Eddig a békászó sas tojókról azt gondolták, hogy a költési időszakban nem hagyják el a fészek pár km-es környékét és tojó betolakodók esetén azt feltételezik, hogy a rezidens egyedek jobban tolerálják őket (Meyburg et al. 2007). Az általunk talált esetekben e téren nem tudjuk megmondani, hogy mi jellemző a parlagi sasra, mivel csak genetikailag lettek kimutatva a betolakodók.

Kimball és mtsai (2003) elmélete szerint a fiatal, nem költő egyedek egy költőpárhoz csatlakozva és azt segítve tapasztalatot szerezhetnek. Hipotézisük szerint ezek az egyedek a költőpár utódai, vagyis az aktuális fiókák rokonai. Az általunk talált betolakodók és rezidens egyedek között az átlagos rokonság 0,03 volt ($n=24$, $se=0,002$) amely alig tér el a rezidens egyedek közöttitől (0,04, $se=0,01$, $n=24$) tehát a betolakodók nem álltak közelebbi

rokonságban a rezidens egyedekkel vagy a fiókákkal. Az eddig publikált betolakodási esetek rokonsági hátterének vizsgálata szegényes, ezért ennek feltárására lényeges lenne a NGM alkalmazása.

A költés sikerességét számos faktor befolyásolhatja, többek közt az egyedek közötti interakciók. A populáció növekedésével együtt megnőhet a zavaró tényezőként jelenlévő költő, illetve nem költő egyedek száma, melyek hatására csökkenhet a szaporodási siker. Territoriális ragadozó madarak esetén a költés meghiúsulásának és sikerességének legérzékenyebb szakasza az inkubációs időszak (Newton 1979) vagy a kikelés utáni pár hét (Turrin & Watts 2014). A halászsas (*Pandion haliaetus*) egy fellendülő populációját vizsgálva megállapították, hogy az inkubációs időszak alatt a territoriális összetűzések hatásaként a kelési siker csökkent (Bretagnolle et al. 2008). Egy fehérfejű rétisas és egy ibériai sas populációban jelenlévő betolakodó egyedek hatása azonban ilyen téren nem érződött (Turrin & Watts 2014, Ferrer et al. 2015). Az elmélet ellentétéként figyelték meg, hogy a jó minőségű territóriumok (nagyobb fészekalj) gyakrabban látogatottak, amely feltételezi, hogy az egyedek képesek felmérni azt illetve, hogy a látogatás nem vonja maga után a költés meghiúsulását (Ferrer et al. 2015). Az általunk vizsgált parlagi sas-populációban úgy tűnik, hogy nem a költés sikertelensége vagy a territóriumon rossz minősége váltja ki a betolakodási eseményeket, mivel a betolakodó egyedek költő territóriumán az átlagos fióka szám (2) nagyobb volt, mint a látogatottnál (1,57). Az átlagos legközelebbi fészkek távolságok alapján elmondhatjuk, hogy a betolakodó egyedek sűrűbb költő területen találhatóak (NND=4816 m), mint a betolakodásban egyáltalán nem érintett territóriumok (NND=7428 m). Továbbá megfigyelhető, hogy az egyedek nem a közvetlen szomszédos fészkekhez repülnek.

Természetesen csak vedlett tollak alapján nem tudunk következtetéseket levonni a betolakodásokat illetően, mivel nem tudjuk, hogy a tollak pontosan mikor és hogyan kerültek oda a fészkekhez. Azonban az NGM-et egyéb vizsgálati módszerekkel alkalmazva, például jeladókkal, illetve direkt megfigyelésekkel már egy pontosabb képet kaphatunk az egyedi diszperziós mintázatokról. A három módszert összevetve rálátást kaphatunk, hogy ténylegesen vannak-e betolakodási események, illetve hogy azok milyen jellegűek.

5. Összefoglalás

Napjainkban egyre több DNS-alapú populációgenetikai vizsgálat nem-invazív mintavételen alapul. Ennek előnye, hogy nem szükséges az egyedek befogása, nem okoz sérülést és nem jár zavaró hatással, így különösen fontos a ritka, illetve veszélyeztetett fajok vizsgálatában. A parlagi sas (*Aquila heliaca*) a Természetvédelmi Világszövetség vörös listáján sebezhető („vulnerable”, VU) fajként van bejegyezve, Magyarországon pedig fokozottan védett. Veszélyeztetett helyzete miatt fontos a populációk minél alaposabb megismerése, melyhez jelentősen hozzájárulnak a nem-invazív mintákon alapuló populációdinamikai vizsgálatok, amelyekkel meg tudjuk becsülni az egyedek túlélési rátáját, a költési diszperziót és az éves cserélődés mértékét. Ezeknek a vizsgálatoknak az alapfeltétele, hogy a populációban található költő egyedek nagy részét évről évre azonosítsuk.

A parlagi sas szociálisan monogám faj és erős territoriális viselkedés jellemzi ezért a költés idején, a fészek környékén és a kiülőfák alól gyűjtött vedlett tollak nagy valószínűséggel a rezidens költő egyedekhez tartoznak. Néhány ragadozómadár-fajban azonban előfordult, hogy a foglalt fészek közelében észleltek nem-rezidens (betolakodó) egyedeket is. Ez megkérdőjelezheti a fészek alól gyűjtött tollakon alapuló egyedi azonosítás megbízhatóságát. Ugyan a legtöbb nem-invazív típusú mintának már tesztelték a laboratóriumi munkák során mutatott megbízhatóságát, a mintagyűjtés hibájának ellenőrzése még nem volt ilyen vizsgálat tárgya.

Elsődleges célunk az volt, hogy a territoriális ragadozómadarak fészekhez köthető DNS-alapú vizsgálataihoz rutinszerűen alkalmazott mintagyűjtési módszer megbízhatóságát ellenőrizzük a magyarországi parlagi sasok költőpopulációjában. Ehhez véletlenszerűen választottunk ki 37 fészket (2013-2016), és fészkenként öt felnőttől származó vedlett tollat és egy fiókatollat dolgoztunk fel. Molekuláris módszerekkel megállapítottuk a minták ivarát, majd kilenc mikroszatellita lókuszon meghatároztuk az egyedek DNS-profilját. A fészkekben mintázott fiókák DNS-profilja alapján azonosítottuk a rezidens egyedeket. Mindezek mellett a kutatócsoport által vizsgált nem-invazívan mintázott parlagisas-territóriumokon (2000-2016; n=189) talált egyedek DNS-profilját leellenőriztük, hogy találunk-e köztük betolakodókat.

A vizsgált 37 fészek között három olyan esetet találtunk, hogy a fészeknél gyűjtött egy-egy toll nem az adott teritórium rezidens egyedeihez tartozott. A több éves adatsorban további négy betolakodót találtunk. A hét betolakodóból (négy tojó, három hím) ötnél azonosítottuk, hogy melyik teritóriumban volt rezidens az adott évben.

6. Summary

Many population genetic studies are based on non-invasive sampling since it is beneficial in many aspects (no disturbance, harm or contact with the organism is needed). This method therefore provides a valuable opportunity to study rare and endangered species. The eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) is considered as vulnerable on the IUCN red list and highly protected in Hungary. Individual-based population genetic studies revealing survival rates, natal dispersal and annual turnover, are important to learn more extensively about the eagle population.

The eastern imperial eagle is socially monogamous and highly territorial. Naturally shed feathers collected under a given nest site should therefore represent the breeding birds occupying the given territory. However, in various raptors, observations of intruder individuals were recorded, making the accuracy of the shed feather-based identification questionable. Numerous laboratory methods were tested to improve the feasibility of non-invasive samples in DNA-based procedures, but the reliability of this kind of sampling was not yet tested.

Our primary aim was to check the reliability of the routinely used non-invasive feather sampling in a breeding population of eastern imperial eagles in Hungary. 37 nests were chosen between 2013 and 2016, with collecting five shed feathers and one plucked feather from the nestlings. Additionally, in all known imperial eagle territories (2000-2016; n=189) we looked up for intruder individuals that were recorded on more than one nest site in the same breeding season. Individual identification was made via genotyping on nine microsatellite markers. Resident birds on a given nest site were confirmed by the DNA-profiles of the nestlings.

In three nest sites (out of the 37), shed feathers were found that did not belong to the resident pair. Four other intrusion events were found when checking all known territories in the given period. Out of the seven intruders (four females, three males), five individual's original territory was discovered.

7. Irodalomjegyzék

- Arrendal, J., Vilà, C. and Björklund, M. 2007. Reliability of noninvasive genetic census of otters compared to field censuses. - *Conserv. Genet.* 8: 1097–1107.
- Baumgardt, J. A., Goldberg, C. S., Reese, K. P., Connelly, J. W., Musil, D. D., Garton, E. O. and Waits, L. P. 2013. A method for estimating population sex ratio for sage-grouse using noninvasive genetic samples. - *Mol. Ecol. Resour.* 13: 393–402.
- Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, P. C., Schwartz, M. K. and Luikart, G. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. - *Mol. Ecol. Resour.* 9: 1279–1301.
- Boitani, L. and Powell, R. A. 2012. *Carnivore Ecology and Conservation.* - Oxford University Press.
- Booms, T. L., Talbot, S. L., Sage, G. K., McCaffery, B. J., McCracken, K. G. and Schempf, P. F. 2011. Nest-site fidelity and dispersal of gyrfalcons estimated by noninvasive genetic sampling. - *Condor* 113: 768–778.
- Bosch, R., Real, J., Tintó, A., Zozaya, E. L. and Castell, C. 2010. Home-ranges and patterns of spatial use in territorial Bonelli's Eagles *Aquila fasciata*. - *Ibis (Lond. 1859)*. 152: 105–117.
- Bretagnolle, V., Mougeot, F. and Thibault, J. C. 2008. Density dependence in a recovering osprey population: demographic and behavioural processes. - *J. Anim. Ecol.* 77: 998–1007.
- Broquet, T., Ménard, N. and Petit, E. 2007. Noninvasive population genetics: A review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. - *Conserv. Genet.* 8: 249–260.
- Buchan, J. C. ., Archie, E. A., Van Horn, R. C., Moss, C. J. and Alberts, S. C. 2005. Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. - *Mol. Ecol. Notes* 5: 680–683.
- Busch, J. D., Katzner, T. E., Bragin, E. and Keim, P. 2005. Tetranucleotide microsatellites for aquila and *haliaeetus* eagles. - *Mol. Ecol. Notes* 5: 39–41.
- Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Galaverni, M. and Randi, E. 2010. Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy. - *Forensic Sci. Int. Genet.* 4: 334–338.
- Caniglia, R., Fabbri, E., Mastrogiuseppe, L. and Randi, E. 2013. Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. - *Forensic Sci. Int. Genet.* 7: 397–404.
- Cooch, E. G. and White, G. C. 2016. Program MARK: A gentle introduction.
- J Del Hoyo, J Sargatal, and A Elliot (eds.) 1994. *Handbook of the bird of the world. Vol.2: New world vultures to guineafowl* - Lynx Edicions.
- Egloff, C., Labrosse, A., Hebert, C. and Crump, D. 2009. A nondestructive method for obtaining maternal DNA from avian eggshells and its application to embryonic viability determination in herring gulls (*Larus argentatus*). - *Mol. Ecol. Resour.* 9: 19–27.
- Ferguson-Lees, J. and Christie, D. A. 2001. *Raptors of the world.* - Christopher Helm Publishers Ltd.

- Fernández, M., Oria, J., Sánchez, R., Gonzalez, L. M. and Margalida, A. 2009. Space use of adult Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*. - *Acta Ornithol.* 44: 17–26.
- Ferrer, M. 1993. Juvenile dispersal behaviour and natal philopatry of a long-lived raptor , the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*. - *Ibis (Lond. 1859)*. 135: 132–138.
- Ferrer, M., Morandini, V. and Newton, I. 2015. Floater interference reflects territory quality in the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti* : A test of a density-dependent mechanism. - *Ibis (Lond. 1859)*. 157: 849–859.
- González, L. M., Margalida, A., Sánchez, R. and Oria, J. 2006. Cooperative breeding in the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti* : a case of polyandry with male reversed sexual behaviour? - *Ibis (Lond. 1859)*. 148: 159–163.
- Greenwood, P. J. and Harvey, P. H. 1982. The natal and breeding dispersal of birds. - *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13: 1–21.
- Hailer, F., Gautschi, B. and Helander, B. 2005. Development and multiplex PCR amplification of novel microsatellite markers in the White-tailed Sea Eagle, *Haliaeetus albicilla* (Aves: Falconiformes, Accipitridae). - *Mol. Ecol. Notes* 5: 938–940.
- Harvey, M. G., Bonter, D. N., Stenzler, L. M. and Lovette, I. J. 2006. A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. - *J. F. Ornithol.* 77: 136–140.
- Hausknecht, R., Gula, R., Pirga, B. and Kuehn, R. 2007. Urine - a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. - *Mol. Ecol. Notes* 7: 208–212.
- Horváth, M., Martínez-Cruz, B., Negro, J. J., Kalmár, L. and Godoy, J. A. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. - *J. Avian Biol.* 36: 84–88.
- Horváth, M., Demeter, I., Fatér, I., Firmánszky, G., Kleszó, A., Kovács, A., Szitta, T., Tóth, I., Zalai, T. and Bagyura, J. 2011. Population dynamics of the eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) in Hungary between 2001 and 2009. - *Acta Zool. Bulg.* 63: 61–70.
- Horváth, M., Bagyura, J., Deák, G., Fatér, I., Firmánszky, G., Juhász, T., Klébert, A., Pongrácz, Á., Prommer, M., Szelényi, B. and Váczi, M. 2013. A Parlaxisas-védelmi és Mérgezés-megelőzési Munkacsoportok 2013. évi beszámolója. - *Heliaca*: 6–9.
- Jones, A. G. and Ardren, W. R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. - *Mol. Ecol.* 12: 2511–2523.
- Jones, R., Cable, J. and Bruford, M. W. 2008. An evaluation of non-invasive sampling for genetic analysis in northern European reptiles. - *Herpetol. J.* 18: 32–39.
- Kalinowski, S. T., Wagner, A. P. and Taper, M. L. 2006. ML-RELATE: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. - *Mol. Ecol. Notes* 6: 576–579.

- Katzner, T. E., Wheeler, M., Negro, J. J., Kapetanakis, Y., Dewoody, J. A., Horvath, M. and Lovette, I. 2012. To pluck or not to pluck: Scientific methodologies should be carefully chosen, not “one size fits all.” - *J. Avian Biol.* 43: 15–17.
- Kawai, K., Shimizu, M., Hughes, R. N. and Takenaka, O. 2004. A non-invasive technique for obtaining DNA from marine intertidal snails. - *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 84: 773–774.
- Lathuilliere, M., Ménard, N., Gautier-Hion, A. and Crouau-Roy, B. 2001. Testing the reliability of noninvasive genetic sampling by comparing analysis of blood and fecal samples in Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). - *Am. J. Primatol.* 55: 151–158.
- Lebreton, J.-D., Burnham, K. P., Clobert, J. and Anderson, D. R. 1992. Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals : A unified approach with case studies. - *Ecol. Monogr.* 62: 67–118.
- Lecomte, N., Gauthier, G., Bernatchez, L. and Giroux, J.-F. 2006. A nondamaging blood sampling technique for waterfowl embryos. - *J. F. Ornithol.* 77: 67–70.
- Lukacs, P. M. and Burnham, K. P. 2005. Review of capture-recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling. - *Mol. Ecol.* 14: 3909–3919.
- Martinez-Cruz, B., David, V. A., Godoy, J. A., Negro, J. J., O’Brien, S. J. and Johnson, W. E. 2001. Polymorphic microsatellite markers in the spider *Pholcus phalangioides* isolated from a library enriched for CA repeats. - *Mol. Ecol. Notes* 1: 255–257.
- Marucco, F., Pletscher, D. H., Boitani, L., Schwartz, M. K., Pilgrim, K. L. and Lebreton, J.-D. 2009. Wolf survival and population trend using non-invasive capture-recapture techniques in the Western Alps. - *J. Appl. Ecol.* 46: 1003–1010.
- McDonald, P. G. and Griffith, S. C. 2011. To pluck or not to pluck: The hidden ethical and scientific costs of relying on feathers as a primary source of DNA. - *J. Avian Biol.* 42: 197–203.
- Meyburg, B.-U., Meyburg, C. and Franck-Neumann, F. 2007. Why do female Lesser Spotted Eagles (*Aquila pomarina*) visit strange nests remote from their own? - *J. Ornithol.* 148: 157–166.
- Mondol, S., Ullas Karanth, K., Samba Kumar, N., Gopalswamy, A. M., Andheria, A. and Ramakrishnan, U. 2009. Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. - *Biol. Conserv.* 142: 2350–2360.
- Moss, E. H. R., Hipkiss, T., Ecke, F., Dettki, H., Standström, P., Bloom, P. H., Kidd, J. W., Thomas, S. E. and Hörnfeldt, B. 2014. Home-range size and examples of post-nesting movements for adult Golden Eagles (*Aquila chrysaetos*) in boreal Sweden. - *J. Raptor Res.* 48: 93–105.
- Mowat, G. and Strobeck, C. 2000. Estimating population size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recapture analysis. - *J. Wildl. Manage.* 64: 183–193.
- Newton, I. 1979. Population ecology of raptors. - T. & A.D. Poyser.

- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2012. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. - *Bioinformatics* 28: 2537–2539.
- Penteriani, V. and Delgado, M. del M. 2009. Thoughts on natal dispersal. - *J. Raptor Res.* 43: 90–98.
- Pérez-García, J. M., Margalida, A., Afonso, I., Ferreiro, E., Gardiazábal, A., Botella, F. and Sánchez-Zapata, J. A. 2013. Interannual home range variation , territoriality and overlap in breeding Bonelli ' s Eagles (*Aquila fasciata*) tracked by GPS satellite telemetry. - *J Ornithol* 154: 63–71.
- Poessel, S. A., Bloom, P. H., Braham, M. A. and Katzner, T. E. 2016. Age- and season-specific variation in local and long-distance movement behavior of golden eagles. - *Eur. J. Wildl. Res.* 62: 377–393.
- Rudnick, J. A., Katzner, T. E., Bragin, E. A., Rhodes, O. E. and DeWoody, J. A. 2005. Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. - *Mol. Ecol.* 14: 2959–2967.
- Rudnick, J. A., Katzner, T. E., Bragin, E. A. and DeWoody, J. A. 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: 667–676.
- Rudnick, J. A., Katzner, T. E. and Dewoody, J. A. 2009. Genetic analyses of noninvasively collected feathers can provide new insights into avian demogparhy and behavior. - In: *Handbook of Nature Conservation*. pp. 181–197.
- Schwartz, M. K., Luikart, G. and Waples, R. S. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. - *Trends Ecol. Evol.* 22: 25–33.
- Segelbacher, G. 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: Testing reliability of feather samples. - *Mol. Ecol. Notes* 2: 367–369.
- Smith, O. and Wang, J. 2014. When can noninvasive samples provide sufficient information in conservation genetics studies? - *Mol. Ecol. Resour.* 14: 1011–1023.
- Smith, T. B., Marra, P. P., Webster, M. S., Lovette, I., Gibbs, H. L., Holmes, R. T., Hobson, K. A. and Rohwer, S. 2003a. A call for feather sampling. - *Auk* 120: 218–221.
- Smith, D. A., Ralls, K., Hurt, A., Adams, B., Parker, M., Davenport, B., Smith, M. C. and Maldonado, J. E. 2003b. Detection and accuracy rates of dogs trained to find scats of San Joaquin kit foxes (*Vulpes macrotis mutica*). - *Anim. Conserv.* 6: 339–346.
- Suh, A., Kriegs, J. O., Brosius, J. and Schmitz, J. 2011. Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution. - *Mol. Biol. Evol.* 28: 2993–2997.
- Sundqvist, A. K., Ellegren, H. and Vilà, C. 2008. Wolf or dog? Genetic identification of predators from saliva collected around bite wounds on prey. - *Conserv. Genet.* 9: 1275–1279.

- Swanson, B. J., Kelly, B. P., Maddox, C. K. and Moran, J. R. 2006. Shed skin as a source of DNA for genotyping seals. - *Mol. Ecol. Notes* 6: 1006–1009.
- Taberlet, P. and Luikart, G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. - *Biol. J. Linn. Soc.* 68: 41–55.
- Taberlet, P., Waits, L. P. and Luikart, G. 1999. Noninvasive genetic sampling : look before you leap. - *TREE* 14: 323–327.
- Turrin, C. and Watts, B. D. 2014. Intraspecific intrusion at Bald Eagle nests. - *Ardea* 102: 71–78.
- Vili, N., Szabó, K., Kovács, S., Kabai, P., Kalmár, L. and Horváth, M. 2013a. High turnover rate revealed by non-invasive genetic analyses in an expanding eastern imperial eagle population. - *Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae* 59: 279–295.
- Vili, N., Nemesházi, E., Kovács, S., Horváth, M., Kalmár, L. and Szabó, K. 2013b. Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling. - *J. Ornithol.* 154: 587–595.
- Wayne, R. K. and Morin, P. A. 2004. Conservation genetics in the new molecular age. - *Front. Ecol. Environ.* 2: 89–97.
- Worton, B. J. 1995. Using Monte Carlo simulation to evaluate kernel-based home range estimators. - *J. Wildl. Manage.* 59: 794–800.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Szabó Krisztiánnak a sok jó tanácsot és támogatást. Dr. Pásztor-Kovács Szilviának köszönöm a sok segítséget és Dr. Kis Jánosnak a lelkes eszmecseréket. Köszönöm még az ÁTE, Konzervációgenetikai Kutatócsoport minden tagjának a támogatást.

Köszönet illeti Dr. Horváth Mártont, hogy biztosította a vizsgálat létrejöttének feltételeit, a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület Parlagisasvédelmi Munkacsoportját és a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumának munkatársait.

Végül köszönöm kedves csoporttársaimnak és családomnak a bátorítást.

9. Függelék

1. táblázat: Vizsgált mikroszatellita lókuszok megfigyelt (Ho) és várt (He) heterozigóciája

	<u>Ho</u>	<u>He</u>
Aa02	0,852	0,766
Aa35	0,787	0,818
Aa36	0,579	0,773
Aa39	0,738	0,777
Aa43	0,515	0,531
G09	0,565	0,574
G11	0,705	0,691
Hal04	0,727	0,734

2. táblázat: Vizsgált mikroszatellita lókuszok allélszámai (Na) és effektív allélszámai (Ne)

	<u>Na</u>	<u>Ne</u>
Aa02	6,000	4,266
Aa35	10,000	5,481
Aa36	6,000	4,405
Aa39	8,000	4,488
Aa43	8,000	2,133
G09	4,000	2,347
G11	5,000	3,240
Hal04	5,000	3,764
Hal10	5,000	2,541

3. táblázat: Vizsgált mikroszatellita lókuszok allélfrekvenciái

Aa02		Aa35		Aa36		Aa39		Aa43	
145	0,039	252	0,043	114	0,170	188	0,050	101	0,011
147	0,054	254	0,128	116	0,268	192	0,346	106	0,019
152	0,282	256	0,128	118	0,148	196	0,029	112	0,118
154	0,267	258	0,138	122	0,005	198	0,177	114	0,107
159	0,265	260	0,030	124	0,103	200	0,233	116	0,661
161	0,093	262	0,070	128	0,306	204	0,102	118	0,004
		264	0,119			206	0,060	120	0,077
		268	0,004			208	0,002	124	0,002
		276	0,011						
		278	0,330						

G09		G11		Hal04		Hal10	
477	0,213	319	0,002	152	0,144	231	0,075
481	0,049	327	0,139	154	0,420	235	0,048
485	0,139	331	0,456	156	0,107	239	0,502
489	0,599	335	0,197	158	0,205	241	0,365
		339	0,205	160	0,124	245	0,010