

Cross-species testing
of macaw microsatellite
markers in related
parrot species

Z- Örkényi*
K. Szabó

Állatorvostudományi Egyetem
Budapest, Molekuláris Ökológia
Kutatócsoport, Zoológiai Tanszék,
H-1078 Budapest, István utca. 2.

*e-mail: orkenyiz13@gmail.com

Arapapagáj mikroszatellita-markerek rokon fajok közötti tesztelése

Örkényi Zoltán*, Szabó Krisztián

ÖSSZEFOGLALÁS

A papagájfajok szabadon élő, ill. fogságban tartott populációinak monitorozásához szükség van megfelelő felbontást adó genetikai markerek alkalmazására, amelyek *de novo* kifejlesztése azonban költséges. Ehelyett érdemes a már meglévő, közel rokon fajokra kifejlesztett "cross-species" markereket használni. A szerzők célja egy olyan mikroszatellita-markerkészlet kialakítása volt, amely eredményesen alkalmazható az Araformák (*Arinae*) alcsaládba tartozó fajokban. Ehhez tíz, kéksárga ara (*Ara ararauna*) és sárgaszárnyú ara (*Ara macao*) fajokra tervezett lokuszt teszteltek 12 papagájfaj 149 egyedén, amelyek többnyire polimorfnek bizonyultak, így a legtöbb megvizsgált fajban alkalmasak genotipizálásra. A tesztelt markereket alkalmazva megállapítható, hogy az *A. ararauna*, *A. macao* és *A. chloropterus* fajok magyarországi tenyészállományai nem beltenyésztettek.

SUMMARY

Background: In the last few decades, microsatellites have become the most widely used genetic markers in genotyping. As an alternative to their expensive *de novo* marker development, cross-species utilisation of microsatellite primer sets features a highly cost-effective solution. The success of this method depends on several factors, one of which is probably the evolutionary distance between the source species and the target species.

Objectives: The authors present a cross-species amplification study in *Arinae* parrots. First, they tested whether microsatellite markers originally developed for *Ara ararauna* and *Ara macao* are applicable to a wider range of parrot taxa. Moreover, using the tested markers, they assessed the extent of inbreeding in Hungarian captive-bred populations of three *Ara* species.

Materials and Methods: Published PCR protocols were available for all markers in the original species. After performing conventional PCR reactions, products were visualized on agarose gel. This step was followed by capillary electrophoresis to determine exact amplicon sizes and thus, to identify alleles in each species.

Results and Discussion: The majority of the loci were successfully amplified in most of the species, showing high variability even in the most distantly related taxa. The ratio of closely related individuals in the tested three *Ara* species was relatively low, with no sign of inbreeding in any of the bred populations, maybe due to the incidental international import of birds to the local aviculture.

A papagájalakúak (*Psittaciformes*) a madarak osztályának egyik igen változatos rendjét képviselik. Több, mint 400 faj tartozik közéjük, amelyeket a legfrissebb filogenetikai vizsgálatok három családsorozatba (*Strigopoidea*, *Cacatuoidea* és *Psittacoidea*) osztanak [1, 2]. Jelenleg élő fajaik közel harmada valamelyik fenyegetett kategóriába tartozik a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) Vörös Listáján [3]. Ezt az is indokolja, hogy fajaik száma gyorsabban apad a többi, hasonló madárrendben megfigyeltékhez képest [4]. Fenyegetett helyzetük elsősorban antropogén hatásokra vezethető vissza. Ezek között szerepel a folytonos élőhelypusztítás, ami túlnyomóan a fészkelésre alkalmas faodvak, valamint a megfelelő táplálkozóhelyek számának csökkenéséért felelős [5, 6]. A természetes élőhelyek kultúrnövény-ültetvényekké történő átalakítása miatt pedig számos papagájfaj természetes étrendje mellett az itt termesztett kultúrnövényeket is dézsmálja. E jelenség sokszor olyan konfliktushoz vezet gazda és állat között, amely nem ritkán a madarak kilövésével végződik [7, 8].

*A papagájalakúak
rendkívül változatos
rendet alkotnak*

A papagájok szín pompás tollaik, kiváló hangutánzó képességük és megkapó természetük miatt népszerű hobbiállatnak számítanak, azonban a kereskedelemben kapható egyedeknek csupán elhanyagolható része származik tenyésztett állományokból, nagyobb részük illegális befogásból és kereskedelemről eredeztethető [8–11]. Szintén az ember felelős egyes idegenhonos inváziós fajok papagájok élőhelyére történő behurcolásáért, amelyek gyakran a bennszülött fajok predátoraivá avagy kompetitoraivá válnak [12].

A molekuláris ökológia fejlődése nagyban hozzájárult ahhoz, hogy még jobban megismerhessük mind a vadon élő, mind a fogságban tartott papagájok fajait. A genetikai markerek segítségével pontos filogenetikai fákat készíthetünk, nyomon követhetjük az egyes fajok korai diverzifikációját és recens populációk variabilitását is. Továbbá lényeges egyedi és populációs szintű információkat kaphatunk az állatokról, amelyek fontosak lehetnek a fajok védelméhez, vagy éppen bővíthetjük általuk a rég kihalt papagájfajokról szerzett ismereteinket is [13].

A MIKROSZATELLITA-MARKEREK HASZNÁLATÁNAK ELŐNYEI

Ahhoz, hogy az egyes fajok populációi képesek legyenek változó körülmények között is fennmaradni, elengedhetetlen, hogy kellő mértékű genetikai variabilitással rendelkezzenek. Ennélfogva a konzervációbiológia egyik legfontosabb célja a genetikai diverzitásnak a fajok, ill. populációk közötti és azokon belüli felmérése. Ehhez ma már számos molekuláris módszer áll rendelkezésre, amelyek közül az egyik legelterjedtebb a mikroszatellita-markerek alkalmazása [14].

Ezen DNS-régiók, egyéb néven STR-ek (short tandem repeats) vagy SSR-ek (simple sequence repeats) olyan repetitív DNS-szakaszok, amelyeken belül bizonyos, 1–6 nukleotid hosszúságú motívumok ismétlődnek. A legtöbb élőlény genomjában nagy számban fordulnak elő, és nagy mutációs rátájuknak köszönhetően több alléllal rendelkeznek egy adott populációban (az egyes allélok legtöbbször a szekvenciában megfigyelhető ismétlődések számában különböznek). Ezért jóval kevesebb lokusz használata is elég lehet egyedi vagy populációs szintű különbségek detektálására, szemben a kevésbé polimorf genetikai régiók alkalmazásával.

Az autoszomás STR-ek biparentálisan, rekombinálódva öröklődnek, így jobban használhatók leszármazási vagy populációgenetikai vizsgálatokban, mint a haploid és uniparentális lokuszok. Mivel általában rövid szakaszok, olyan esetekben is sikeresen azonosíthatóak, amikor mindössze csekély mennyiségű (ún. low-copy number) vagy fragmentált DNS-minta áll rendelkezésre.

A populációk genetikai diverzitásának, esetleges beltenyésztettségének felmérésére gyakran használnak mikroszatellita-markerek genotipizálásával nyert adatokat [15–17]. Papagájokat érintő genetikai változatosságot monitorozó vizsgálatokra a következő okok miatt lehet szükség: a tenyésztők kíváncsiak állatállományuk

*A konzervációbiológia
egyik legfontosabb
célja a genetikai
diverzitásnak a fajok,
ill. populációk közötti és
azokon belüli felmérése*

*A mikroszatellita-
markerek
genotipizálásával a
populációk genetikai
diverzitását lehet
vizsgálni*

genetikai minőségére és beltenyésztettségének mértékére; a veszélyeztetett fajok visszatelepítési programjainak részeként a visszajuttatandó állomány ellenőrzése céljából; ill. annak megállapítására, hogy egy fogságban tartott állomány egyedei valóban legális módon, regisztrált tenyészetekből származnak, vagy illegálisan befogott madarakból [15, 16].

MIKROSZATELLITA-MARKEREK FAJOK KÖZÖTTI („CROSS-SPECIES”) ALKALMAZÁSA

A PCR-primereket általában a repetitív régiókat határoló (ún. flanking) DNS-szakaszokhoz tervezik [18], amelyek közel rokon fajok esetében a mikroszatellitáknál gyakran konzerváltak. Ez a tulajdonság teszi lehetővé, hogy egy adott fajra kifejlesztett primerpár alkalmazható lehet közel rokon fajok esetében is [19–21]. Ezáltal lehetővé válhat, hogy ezen „fajok közötti” vagy „cross-species” markerek használata a költséges, munka- és időigényes *de novo* mikroszatellitamarker-fejlesztés alternatívája legyen. Már számos kutatást végeztek a mikroszatellita-markerek „cross-species” alkalmazhatóságának tesztelésére, amelyek segíthetnek abban, hogy milyen tényezőket érdemes figyelembe venni annak érdekében, hogy egy adott fajban leírt markerkészlet más faj egyedein is sikeresen működjön [14, 19–24].

A fajok közötti amplifikáció sikerességét, ill. a detektált polimorfizmust számos tényező befolyásolja: (1.) Általában negatívan hat a sikerességre az ún. "forrás" faj (source species; amelyekre az adott primert kifejlesztették) és a kereszt-tesztelésben résztvevő fajok, más néven célfajok („target” species) közötti filogenetikai távolság. (2.) Minél nagyobb fokú variabilitás figyelhető meg egy adott mikroszatellita lokusznál az eredeti fajban, a célfajok annál nagyobb körében detektálható polimorfizmus. (3.) Ha a forrás- és célfajban egymástól függetlenül (homopláziásan) kialakultak a PCR primerek bekötését lehetővé tevő genomi régiók, akkor az aspecifikus „PCR-műtermékek” felszaporodását okozhatja, és ezáltal a marker célfajban való alkalmazását is megnehezíti. Ezekkel ellentétben a lokusz ismétlődő motívumának típusa (pl. di-, tri-, vagy tetranukleotid), ill. struktúrája (pl. tökéletes, tökéletlen vagy összetett) nem befolyásolja a célfajokban az amplifikáció sikerességét [22].

SAJÁT VIZSGÁLAT

Tíz, egy-egy arafajra specifikusan kifejlesztett mikroszatellita-marker variabilitását tesztelték 12 rokon papagájfajban

Munkánk célja egy olyan mikroszatellita-markerkészlet kialakítása volt, amely alkalmas lehet finom felbontású genetikai adatok generálására (pl. populációgenetikai vagy igazságügyi vizsgálatokban) az *Arinae* alcsaládba tartozó fajok szélesebb skáláján. Ehhez tíz, egy-egy arafajra specifikusan kifejlesztett mikroszatellita-marker variabilitását teszteltünk 12 rokon papagájfajban. Emellett a tesztelt markerek segítségével megvizsgáltuk három kedvelt arafaj magyarországi tenyészállományának genetikai diverzitását és esetleges beltenyésztettségét.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A VIZSGÁLT FAJOK KIVÁLASZTÁSA

A keresztamplifikációkat az *Arinae* alcsalád egyes fajain végeztük, magyar tenyésztők madaraiból származó toll- és vérmintákon, amelyeket az Állatorvostudományi Egyetem Zoológiai Tanszékén működő AQUILABOR szolgáltató laboratóriumba küldtek molekuláris ivarmeghatározás céljából. Az egyes minták vizsgálatba történő beválogatásánál a következő szempontokat tartottuk szem előtt: (1.) Mindegyik faj az *Arinae* alcsalád tagja legyen, de (2.) lehetőleg minél nagyobb taxonómiai skálát fedjenek le a minták. (3.) Minden fajból álljon rendelkezésre kellően nagy mintaszám. (4.) Az egy fajba tartozó minták lehetőleg különböző tenyésztőktől származzanak, ezzel elkerülendő, hogy a vizsgált egyedek rokonságban álljanak egymással. A felsorolt kritériumok betartásával kilenc nem 12 fajának 149 egyedén végeztük el az analíziseket.

Sárgaszárnyú arában,
ill. kéksárga arában
leírt mikroszateellitákat
amplifikáló primereket
használtak

MOLEKULÁRIS MUNKÁK

Vizsgálatunkhoz sárgaszárnyú arában, ill. kéksárga arában leírt mikroszateellitákat választottunk [25, 26]. Ezen markerek ismétlődő motívumaikat tekintve egységesen dinukleotid ismétlődéseket tartalmaznak, és többnyire 100–300 bázispár hosszúságú PCR-termékeket adnak.

A felhasznált markerek amplifikációját a publikációkban leírt, vagy némileg módosított (pl. touchdown) PCR-programokkal végeztük, majd a kapott termékeket agaróz-gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A forward irányú primerek fluoreszcens jelöléssel voltak ellátva, lehetővé téve a keletkezett PCR-termékek kapilláris-elektroforézissel történő vizualizációját, ezáltal az allélméreték pontos meghatározását [27].

Az agaróz-gélelektroforézis alapján pozitívnak bizonyult PCR-termékek kapilláris-elektroforézise ABI 35000xl szekvenátor segítségével történt. Az egyes allélek azonosítását (vagyis az amplitonok pontos méreteit) az OSIRIS program segítségével állapítottuk meg [28]. Az esetleges genotipizálási hibák detektálása az ML-Relate és Micro-Checker szoftverek bevonásával történt [29, 30].

A BELTENYÉSZTETTSÉG MÉRÉSE A KIVÁLASZTOTT FAJOKBAN

Azon fajok (*Ara macao*, *Ara ararauna*, *Ara chloropterus*) esetében, ahol kellő mennyiségű, a hazai tenyészállományt megfelelően reprezentáló mintával rendelkezünk, a beltenyésztettséget is felmértük. Ehhez megállapítottuk a rokon és nem rokon madarak arányát (ML-Relate programmal; [29]), a megfigyelt (H_o) és a várt heterozigócia (H_e) értékét (Arlequin használatával; [31]), valamint a beltenyésztettségi index (F_{is}) értékeket (Fstat programmal; [32]).

EREDMÉNYEK

A MARKEREK „CROSS-SPECIES” ALKALMAZHATÓSÁGA A CÉLFAJOKBAN

Szinte az összes
megvizsgált fajban
és az összes vizsgált
markerben sikeres
amplifikáció történt

Szinte az összes megvizsgált fajban és az összes vizsgált markerben sikeres amplifikáció történt a PCR során, mindössze két fajnál nem kaptunk egy, ill. két lokuszon terméket. A többi esetben viszont legalább egy allélt sikerült detektálni markerenként. Az esetek túlnyomó hányadában lokuszonként legalább két allélt detektálni tudtunk, azaz viszonylag tág taxonómiai keretek között variábilisnak bizonyultak a vizsgált markerek. A 12 fajból ötben találtunk legalább egy monomorfnek mutató markert. Az egyes fajokban a 10 lokusz átlagos allélszáma 2,1 és 9,8 között mozgott. A részletes „cross-species” adatokat az 1. és 2. táblázat tartalmazza.

A Micro-Checker program alkalmazásával nem sikerült kimutatni „dadogás” vagy „large allele dropout” miatti genotipizálási hibákat egyik fajban és egyik lokuszbán sem. Null-allélek előfordulása viszont több esetben is gyanítható volt.

BELTENYÉSZTETTSÉG HÁROM ARA FAJBAN

Három arafajban
a vártnál
nagyobb mértékű
beltenyésztettséget
figyeltek meg

Két fajnál (*Ara ararauna* és *Ara chloropterus*) a megfigyelt heterozigócia (H_o) nagyobbak adódtak a Hardy-Weinberg-egyensúly esetén várthoz (H_e) képest, míg az *Ara macao*-ban is csak igen kevés volt kisebb a H_o , mint a H_e . Ez jól jelzi, hogy nincs beltenyésztettség egyik vizsgált faj hazai állományában sem. A beltenyésztettségi index (F_{is}) értékei is ezt támasztották alá, amelyek vagy negatív, vagy igen kis ($F_{is} = 0,022$) értékeket mutattak. A vizsgált minták között a rokonoknak tekinthető (szülő-utód, testvér vagy féltestvéri viszonyoknak megfelelő kategóriájú) egyedek mindhárom fajnál jelentős kisebbségben voltak, amely összhangban van a beltenyésztés kis fokával, és a minták genetikai függetlenségét is alátámasztja. A null-allélek jelenléte sem befolyásolta az analízist (a homozigótáknak a valószínűségeknél nagyobb aránya okozhat beltenyésztettségre hasonlító értékeket), ugyanis csak az *Ara macao*-nál találtunk egy valószínűsíthetően null-alléles lokuszt. A beltenyésztettségi vizsgálat eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

1. TÁBLÁZAT. A vizsgált Ara ararauna markerek „cross-species” alkalmazhatósága a célfajokban

N = mintaelemszám, N_a = allélszám, H_o = megfigyelt heterozigócia. A null-alléket tartalmazó lokuszok félkövéren, csillaggal (*) vannak jelölve. A félkövérrrel kiemelt három Ara faj szerepet a beltenyésztettség-vizsgálatban. A szürke cellákban a forrásfajok eredeti publikációiban [26] szereplő értékei vannak feltüntetve

TABLE 1. Cross-species performance of the tested Ara ararauna STR markers in the related parrot species

(N = sample size, N_a = observed number of alleles, H_o = observed heterozygosity). Loci containing null alleles are marked with asterisk (*) and bold. The three Ara species marked bold were included in the inbreeding study. Values in the gray cells refer to the values described in the original publications [26]

Faj (N)	Locus	UnaCT43	UnaCT21	UnaCT32
Kéksárga ara (<i>Ara ararauna</i>) 49	N_a H_o	9 0,88	11 0,87	8 0,62
Kéksárga ara (<i>Ara ararauna</i>) 20	N_a H_o	10 0,85	8 1	10 0,9
Zöldszárnyú ara (<i>Ara chloropterus</i>) 21	N_a H_o	4 0,75	7 0,9	11 0,75
Sárgaszárnyú ara (<i>Ara macao</i>) 17	N_a H_o	10 0,88	10 0,75	7 0,81
Maracana-ara (<i>Primolius maracana</i>) 10	N_a H_o	5 0,5	7 0,8	5 0,7
Sárganyakú ara (<i>Primolius auricollis</i>) 10	N_a H_o	4 0,5	7 0,9	3 0,3
Jandaya-aratinga (<i>Aratinga jandaya</i>) 10	N_a H_o	1* 0	4* 0,5	3 0,5
Északi törpeara (<i>Diopsittaca nobilis</i>) 10	N_a H_o	6* 0,71	3 0,63	5 0,75
Aranyhomlokú aratinga (<i>Eupsittula aurea</i>) 9	N_a H_o	6 0,78	8 0,78	3 0,13
Molina-papagáj (<i>Pyrrhura molinae</i>) 11	N_a H_o	6* 0,55	9 0,73	1* 0
Rozsdássapkás papagáj (<i>Pionites leucogaster</i>) 10	N_a H_o	6 0,9	1* 0	1* 0
Bronzszárnyú papagáj (<i>Pionus chalcopterus</i>) 10	N_a H_o	2* 0	2 0,33	-* -
Sárgahomlokú amazon (<i>Amazona ochrocephala</i>) 11	N_a H_o	6 0,73	1* 0	2 0,78

2. TÁBLÁZAT. A vizsgált *Ara macao* markerek „cross-species” alkalmazhatósága a célfajokban

N = mintaelemszám, N_a = allélszám, H_o = megfigyelt heterozigócia. A null-alléket tartalmazó lokuszok félkövéren, csillaggal (*) vannak jelölve. A félkövérral kiemelt három *Ara* faj szerepet a beltenyésztettség-vizsgálatban. A szürke cellákban a forrásfajok eredeti publikációiban [25] szereplő értékei vannak feltüntetve

TABLE 2. Cross-species performance of the tested *Ara macao* STR markers in the related parrots species

(N = sample size, N_a = observed number of alleles, H_o = observed heterozygosity). Loci containing null alleles are marked with asterisk (*) and bold. The three *Ara* species marked bold were included in the inbreeding study. Values in the gray cells refer to the values described in the original publications [25]

Faj (N)	Locus	SCMA27	SCMA12	SCMA22	SCMA44	SCMA01	SCMA28	SCMA19
Sárgaszárnyú ara (<i>Ara macao</i>) 40	N_a H_o	14 0,95	13 0,85	18 1	13 0,85	16 0,7	22 0,95	15 0,95
Kéksárga ara (<i>Ara ararauna</i>) 20	N_a H_o	15 0,89	13 0,95	4 0,53	7 1	8 0,9	13 0,9	10 0,9
Zöldszárnyú ara (<i>Ara chloropterus</i>) 21	N_a H_o	12 0,95	10 0,9	9 0,85	7 0,92	12 0,81	10 0,95	10 0,95
Sárgaszárnyú ara (<i>Ara macao</i>) 17	N_a H_o	10 1	9 0,76	12 1	9 0,83	10* 0,69	10 0,82	10 0,88
Maracana-ara (<i>Primolius maracana</i>) 10	N_a H_o	7 0,8	7 0,9	3 0,3	4* 0,3	9 0,9	7 0,78	4 0,8
Sárganyakú ara (<i>Primolius auricollis</i>) 10	N_a H_o	6 0,7	5 0,7	6* 0,6	2* 0,5	6 0,7	5 0,7	3 0,3
Jandaya-aratinga (<i>Aratinga jandaya</i>) 10	N_a H_o	9 0,9	10 1	1* 0	5 0,8	3* 0,2	10 1	4 0,6
Északi törpeara (<i>Diopsittaca nobilis</i>) 10	N_a H_o	6 1	6 0,88	2 0,13	7 1	2 0,43	7 0,88	4 0,38
Aranyhomlokú aratinga (<i>Eupsittula aurea</i>) 9	N_a H_o	5* 0,44	9* 0,67	5* 0,7	5* 0,4	8 0,9	9 0,8	7 0,89
Molina-papagáj (<i>Pyrrhura molinae</i>) 11	N_a H_o	1* 0	4 0,82	2 0,55	5 0,64	9 1	4 0,82	1* 0
Rozsdásappkás papagáj (<i>Pionites leucogaster</i>) 10	N_a H_o	7 0,9	12 1	1* 0	6 0,7	2 0,3	10 0,9	4 0,6
Bronzszárnyú papagáj (<i>Pionus chalcopterus</i>) 10	N_a H_o	2* 0,1	6* 0,22	1* 0	2* 0	2* 0,5	4* 0,17	-* -
Sárgahomlokú amazon (<i>Amazona ochrocephala</i>) 11	N_a H_o	1* 0	9* 0,64	3 0,8	10 1	-* -	9* 0,89	1* 0

3. TÁBLÁZAT. Beltenyésztettségi mutatók a vizsgált három *Ara* fajban(N = mintaszám, H_o = megfigyelt heterozigócia, H_e = várt heterozigócia, F_{is} = beltenyésztettségi koefficiens)**TABLE 3.** Inbreeding indicators in the three studied *Ara* species(N = sample size, H_o = observed heterozygosity, H_e = expected heterozygosity, F_{is} = inbreeding coefficient)

Faj	N	H_o	H_e	F_{is}	A közel rokoni szintű kapcsolatokkal rendelkező egyedek aránya	Valószínűsíthető null-alléles lokuszok száma
Kéksárga ara (<i>Ara ararauna</i>)	20	0,88	0,83	-0,064	13%	0
Zöldszárnyú ara (<i>Ara chloropterus</i>)	21	0,87	0,84	-0,036	12%	0
Sárgaszárnyú ara (<i>Ara macao</i>)	17	0,84	0,86	0,022	20%	1

MEGVITÁTÁS

A vizsgált markerek megfelelők bizonyultak széles körű vizsgálatokhoz

Kutatásunk egyik célkitűzése volt, hogy megvizsgáljuk, hogy *Ara macao* és *Ara ararauna* fajokra kifejlesztett mikroszatellita-markerek „cross-species” alkalmazhatósága hogyan alakul az *Arinae* alcsaládból választott papagájfajok körében. A tesztelt lokuszok nem mutattak jelentős fajspecifitást, hanem széles rokonsági körben sikeresen keresztamplifikálhatók voltak, ráadásul a célfajok jelentős hányadában polimorfnek mutatkoztak, azaz legalább két (de a legtöbb esetben több) alléllal bírtak.

Madarakban a mikroszatellita-markerek „cross-species” alkalmazhatósága állatcsoportonként eltérő sikerű lehet. Ezt támasztja alá egy 2007-es tanulmány [33], amiben a keresztamplifikálható lokuszok aránya családokon belül, nemek között nagyjából 60% volt, ezekből 55% polimorfizmust is mutatott. Így egyáltalán nem számít meglepőnek, hogy taxonómiaileg sokkal szűkebb, alcsaládszintű keresztamplifikációknál ilyen nagy arányban találtunk polimorfizmust mutató markereket. Amikor jákóban (*Psittacus erithacus*) leírt mikroszatellitákat teszteltek afrikai, amerikai és ausztráliai papagájfajokon, azt tapasztalták, hogy a megvizsgált 32 faj (22 különböző genuszból) 71%-ánál sikeresnek mutatkozott a keresztamplifikáció. A 12 lokuszból pedig legalább hétnél (58%) polimorfizmust is regisztráltak, nemcsak az afrikai, hanem amerikai és ausztrál papagájok körében is, amelyek fejlődése körülbelül 30,6, ill. 41,4 millió éve vált el afrikai rokonaikétól [34].

A keresztamplifikáció sikere, valamint a forrás- és célfajok evolúciós szétválásának ideje közötti viszonyt sok állatcsoportban kimutatták (madarakban különösen széles fajspektrumot vizsgálva) [19, 22, 23], így a genetikai távolság általánosan hasznos előre jelzője lehet a „cross-species” tesztek sikerének [19, 22, 35].

Hasonlóan a mi eredményeinkhez, a forrás- és célfajok közti filogenetikai távolság növekedésével a null-allélek gyakoriságának gyors ütemű emelkedését is megfigyelték [36], amely jelenség ugyanúgy okozhatja a (megfigyelhető) variabilitás csökkenését, limitálva a markerek alkalmazhatóságát a forrásfajtól távolabb eső fajokban.

Vizsgálatunkban valószínűsíthetően azért voltak sikeresek a keresztamplifikációs tesztek, mivel a kis evolúciós távolság miatt a célfajokban is be tudnak kötni a forrásfajra tervezett primerek. Ráadásul valószínűleg a lokuszok ismét-

lődő motívumokat tartalmazó részeiben sem történt jelentős differenciálódás, amely a variabilitásbeli különbségek fokozott mértékét okozta volna a forrás- és célfajok között. A célfajok polimorfizmusának magas foka mindazonáltal annak eredménye is lehet, hogy az esetleges műtermékeket tévesen valódi allékként azonosítjuk, amely egy lehetséges genotipizálási hiba a mikroszateellitáknál. Ezt csak a kapott PCR-termékek szekvenálásával lehet kiszűrni, amelyre jelen munkánk keretei között nem került sor. Összefoglalásként ugyanakkor kijelenthető, hogy a tesztelt markerek alcsalád szintű „cross-species” alkalmazásra nagy valószínűséggel megfelelnek.

A fogságban tenyésztett állatok körében gyakran előfordul a beltenyésztettség, ami az egyedek fitneszcsökkenését okozhatja („inbreeding-depression”), ha nem is mindig oly erőteljesnek mutatkozva, mint vadon élő fajtársaiknál [37]. Ezért is volt érdekes kideríteni, hogy néhány előszeretettel tartott papagájfaj esetén számíthatunk-e az említett negatív hatások feltűnésére hazai viszonylatban. A vizsgált markerek segítségével végzett variabilitásvizsgálat egyik *Ara* fajban sem detektált számottevő beltenyésztettséget. Ennek hátterében az állhat, hogy a hazai tenyésztők kiterjedt nemzetközi kapcsolataik révén sok tenyészmadarat külföldről szereznek be.

**Számottevő
beltenyésztettséget
egyik fajban sem
figyelték meg**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás az Állatorvostudományi Egyetem Zoológiai Tanszékén működő AQUILA-BOR szolgáltató laboratórium finanszírozásával zajlott. A beküldött minták nélkül a vizsgálat nem valósulhatott volna meg, ezért köszönet illeti az vizsgálatba bevont madarak tulajdonosait is.

IRODALOM

- Joseph L, Toon A, Schirtzinger EE, Wright TF, Schodde R (2012) A revised nomenclature and classification for family-group taxa of parrots (Psittaciformes). *Zootaxa* 3205:26. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3205.1.2>
- Provost KL, Joseph L, Smith BT (2018) Resolving a phylogenetic hypothesis for parrots: implications from systematics to conservation. *Emu – Austral Ornithology* 118:7–21. <https://doi.org/10.1080/01584197.2017.1387030>
- Oláh G, Bankovics A (2022) A papagájalakúak (Psittaciformes) rendjéhez tartozó fajok magyar nevei. *Állattani Közlemények* 107:109–174. <https://doi.org/10.20331/AIKoz.2022.107.1-2.5>
- Oláh G, Butchart SHM, Symes A, Guzmán IM, Cunningham R, Brightsmith DJ, Heinsohn R (2016) Ecological and socio-economic factors affecting extinction risk in parrots. *Biodivers Conserv* 25:205–223. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-1036-z>
- Vergara-Tabares DL, Cordier JM, Landi MA, Oláh G, Nori J (2020) Global trends of habitat destruction and consequences for parrot conservation. *Global Change Biol* 26:4251–4262. <https://doi.org/10.1111/gcb.15135>
- Laurance WF, Lovejoy TE, Vasconcelos HL, Bruna EM, Didham RK, Stouffer PC, Gascon C, Bierregaard RO, Laurance SG, Sampaio E (2002) Ecosystem Decay of Amazonian Forest Fragments: a 22-Year Investigation. *Conserv Biol* 16:605–618. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01025.x>
- Chapman TF (2007) An endangered species that is also a pest: a case study of Baudin's Cockatoo *Calyptorhynchus baudinii* and the pome fruit industry in south-west Western Australia. *J Roy Soc Western Australia* 90:33–40
- White NE, Dawson R, Coghlan ML, Tridico SR, Mawson PR, Haile J, Bunce M (2012) Application of STR markers in wildlife forensic casework involving Australian black-cockatoos (*Calyptorhynchus* spp.). *Forensic Science International: Genetics* 6:664–670. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.10.003>
- Wright TF, Toft CA, Enkerlin-Hoeflich E, Gonzalez-Elizondo J, Albornoz M, Rodríguez-Ferraro A, Rojas-Suárez F, Sanz V, Trujillo A, Beissinger SR, A. VB, A. XG, Brice AT, Joyner K, Eberhard J, Gilardi J, Koenig SE, Stoleson S, Martuscelli P, Meyers JM, Renton K, Rodríguez AM, Sosa-Asanza AC, Vilella FJ, Wiley JW (2001) Nest Poaching in Neotropical Parrots. *Conserv Biol* 15:710–720. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.015003710.x>
- Pillay K, Dawson DA, Horsburgh GJ, Perrin MR, Burke T, Taylor TD (2010) Twenty-two polymorphic microsatellite loci aimed at detecting illegal trade in the Cape parrot, *Poicephalus robustus* (Psittacidae, AVES). *Mol Ecol Res* 10:142–149. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02673.x>
- Pain DJ, Martins TLF, Boussekey M, Diaz SH, Downs CT, Ekstrom JMM, Garnett S, Gilardi JD, McNiven D, Primot P, Rouys S, Saoumoé M, Symes CT, Tamungang SA, Theuerkauf J, Villafuerte D, Verfaillies L, Widmann P, Widmann ID (2006) Impact of protection on nest take and nesting success of parrots in Africa, Asia and Australasia. *Anim Conserv* 9:322–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2006.00040.x>
- Oláh G, Theuerkauf J, Legault A, Gula R, Stein J, Butchart S, O'Brien M, Heinsohn R (2018) Parrots of Oceania – a comparative study of extinction risk. *Emu – Austral Ornithology* 118:94–112. <https://doi.org/10.1080/01584197.2017.1410066>

13. Olah G, Smith BT, Joseph L, Banks SC, Heinsohn R (2021) Advancing Genetic Methods in the Study of Parrot Biology and Conservation. *Diversity* 13:521. <https://doi.org/10.3390/d13110521>
14. da Silva HE, Presti FT, Wasko AP, Pinhal D (2015) Development of microsatellite markers for Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) and their cross-amplification in other parrot species. *BMC Research Notes* 8:736. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1749-9>
15. Willows-Munro S, Kleinhans C (2020) Testing microsatellite loci for individual identification of captive African grey parrots (*Psittacus erithacus*): a molecular tool for parentage analysis that will aid in monitoring legal trade. *Conserv Genet Resour* 12:489–495. <https://doi.org/10.1007/s12686-019-01127-6>
16. Coetzer WG, Downs CT, Perrin MR, Willows-Munro S (2017) Testing of microsatellite multiplexes for individual identification of Cape Parrots (*Poicephalus robustus*): paternity testing and monitoring trade. *PeerJ* 5:e2900. <https://doi.org/10.7717/peerj.2900>
17. Shahsavarani H, Rahimi-Mianji G (2010) Analysis of genetic diversity and estimation of inbreeding coefficient within Caspian horse population using microsatellite markers. *Afr J Biotechnol* 9:293–299.
18. Wright JM, Bentzen P (1995) Microsatellites: genetic markers for the future. In: Carvalho GR, Pitcher TJ (eds) *Molecular Genetics in Fisheries*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 117–121
19. Primmer CR, Møller AP, Ellegren H (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol Ecol* 5:365–378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00092.x>
20. Turi O, Wagenhoffer Z, Battay M, Lehotzky P, Zorkóczy O (2023) Mikroszatellita-markerek tesztelése dámszarvasok egyedi azonosítása céljából. *Magy Állatorvosok Lapja* 145:183–192. <https://doi.org/10.56385/magvallorv.2023.03.183-192>
21. Zsinka B, Vili N, Szabó K, Tisza Á, Csonka V, Pásztory-Kovács S (2024) Mikroszatellita-markerkészlet fejlesztése parlagi sasok (*Aquila heliaca*) egyedi azonosításához rokon fajokban leírt markerek segítségével. *Magy Állatorvosok Lapja* 146:357–365. <https://doi.org/10.56385/magvallorv.2024.06.357-365>
22. Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *J Avian Biol* 36:348–360. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03465.x>
23. Galbusera P, van Dongen S, Matthysen E (2000) Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conserv Genet* 1:163–168. <https://doi.org/10.1023/A:1026587024065>
24. Gebhardt KJ, Waits LP (2008) Cross-species amplification and optimization of microsatellite markers for use in six Neotropical parrots. *Mol Ecol Resour* 8:835–839. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02083.x>
25. Olah G, Heinsohn RG, Espinoza JR, Brightsmith DJ, Peakall R (2015) An evaluation of primers for microsatellite markers in Scarlet Macaw (*Ara macao*) and their performance in a Peruvian wild population. *Conservation Genet Resour* 7:157–159. <https://doi.org/10.1007/s12686-014-0317-2>
26. Caparroz R, Miyaki CY, Baker AJ (2003) Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Mol Ecol Notes* 3:441–443. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00475.x>
27. Jiraskova A, Lenicek M, Vitek L (2010) Simultaneous genotyping of microsatellite variations in HMOX1 and UGT1A1 genes using multicolored capillary electrophoresis. *Clin Biochem* 43:697–699. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.01.006>
28. Goor RM, Hoffman D, Riley GR (2021) Novel Method for Accurately Assessing Pull-up Artifacts in STR Analysis. *Forensic Sci Int Genet* 51:102410. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102410>
29. Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ml-relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol Ecol Notes* 6:576–579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x>
30. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: soft-ware for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
31. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
32. Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered* 86:485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
33. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations - BARBARÁ - 2007 - Molecular Ecology - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x>. Accessed 5 Apr 2023
34. Taylor TD, Parkin DT (2007) Characterization of 12 microsatellite primer pairs for the African grey parrot, *Psittacus erithacus* and their conservation across the Psittaciformes. *Mol Ecol Notes* 7:163–167. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01566.x>
35. Vámosi R (2020) Mikroszatellita lokuszok kereszt-amplifikációjának sikeressége a fajok genetikai távolságának függvényében. *Állatorvostudományi Egyetem*
36. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation | Molecular Biology and Evolution | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/mbe/article/24/3/621/2925626>. Accessed 7 Apr 2023
37. Swinnerton KJ, Groombridge JJ, Jones CG, Burn RW, Mungroo Y (2004) Inbreeding depression and founder diversity among captive and free-living populations of the endangered pink pigeon *Columba mayeri*. *Anim Conserv* 7:353–364. <https://doi.org/10.1017/S1367943004001556>

Közlésre érke.: 2024. máj. 25.