

SZENT ISTVÁN EGYETEM ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR

Ökológia Tanszék

**A PARLAGI SAS (AQUILA HELIACA) ÉS A PUSZTAI SAS (AQUILA
NIPALENSIS) HIBRIDIZÁCIÓJÁNAK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA**

Készítette: Jakab Szilvia
BSc. szakdolgozat

Témavezető: Dr. Pásztory-Kovács Szilvia
SZIE-ÁOTK, biológus

Társtémavezető: Dr. Horváth Márton
Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület

Budapest

2015

Tartalomjegyzék

1.Bevezetés.....	3
1.1. Hibridizáció.....	3
1.1.1.Általános jellemzők.....	3
1.1.2.Izolációs mechanizmusok.....	3
1.1.3.Hibridizáció kialakulásának lehetséges helyszínei.....	4
1.1.4.Hibridizáció kialakulásának lehetséges okai.....	4
1.1.5.Hibridizáció következményei.....	5
1.1.6.Hibrid zónáról általánosan.....	7
1.1.7.Hibrid egyedek detektálása.....	8
1.2.Hibridizáció a Vágómadárfélék családjában (Accipitridae).....	9
1.3.Vizsgált fajok.....	10
1.3.1.A parlagi sas (<i>Aquila heliaca</i>) általános jellemzése.....	10
1.3.2.A pusztai sas (<i>Aquila nipalensis</i>) általános jellemzése.....	11
1.4.Célkitűzések.....	11
2.Anyag és Módszer.....	13
2.1.Minták.....	13
2.2.Toll preparálás.....	16
2.3.DNS kivonás.....	17
2.4.Ivarmeghatározás.....	17
2.5.Szekvenálás.....	18
2.6.Mikroszatellita fragmentanalízis.....	21
3.Eredmények.....	24
3.1.Szekvenálás.....	24
3.2.Mikroszatellita fragmentanalízis.....	27
4.Diszkusszió.....	34
5.Összefoglalás.....	38
6.Summary.....	39
7.Irodalomjegyzék, hivatkozások.....	40
8.Köszönetnyilvánítás.....	46
9.Függelék.....	47

1. Bevezetés

1.1. Hibridizáció

1.1.1. Általános jellemzők

A hibridizáció folyamatáról akkor beszélünk, ha két genetikailag nemrég elkülönült taxon szaporodik egymással (Mayr 1963).

Linné korától kezdődően foglalkoztatta a tudósokat a hibridizáció kérdésköre (Mayr, 1963). Az első kutatások és megfigyelések következtetései alapján elterjedt nézetté vált, hogy a fajok keveredése a gén készlet vesztéséhez és az izolációs mechanizmusok eltűnéséhez vezethet (Mallet, 2005). Ezeket a korábbi elképzeléseket Rhymer (1996) kutatási támasztották alá, aki megállapította, hogy számos taxon kihalásához a hibridizáció vezetett. A 90'-es évektől kezdődően a kutatók véleménye megváltozott (Nolte & Tautz, 2010) és elterjedtté váltak azon elméletek miszerint a hibridizáció bizonyos esetekben nem vezet a populációk esetleges csökkenéséhez, hanem részét képezheti bizonyos evolúciós folyamatoknak. Például növelheti a genetikai változatosságot a fajokban, erősítheti, vagy gyengítheti az izolációs mechanizmusokat a fajok között továbbá új fajok vagy ökotípusok megjelenését segítheti elő (Petit, Bretagnolle, & Felber, 1999).

A természetben általában magas azoknak a taxonoknak a száma, amelyek hibridizálnak egy másikkal, ennek ellenére egy adott populációban kevés hibrid egyed található (Mallet, 2005). A hibridizáció legtöbb esetben közel rokon taxonok között történik (Seehausen, 2004). Az állatvilágban nem olyan jelentős a hibridizáló taxonok száma, mégis vannak olyanok, amelyeken belül magas a gyakorisága, például a madarak között (P R Grant & Grant, 1992)

1.1.2. Izolációs mechanizmusok

Természetes körülmények között a fajok elválását bizonyos izolációs mechanizmusok segítették elő az evolúció folyamata során, melyeket barriereknek nevezünk (Futuyma, 2013) Ha ezek az izolációs mechanizmusok nem fejlődtek ki megfelelően akkor az érintkező populációk keveredhetnek egymással (Haavie et al., 2004)

Alapvetően kétféle fő izolációs barrieret különítünk el, a premating és a posztmating barriereket (Mayr, 1963).

A premating barrierék alapjául olyan mechanizmusok szolgálnak, amelyek megakadályozzák a gaméták átjutását egyik taxonból a másikba (Futuyma, 2013). Ide soroljuk az ökológia izolációt, amely meggátolja két taxon vagy populáció találkozását, például az eltérő élőhelyek következtében. Fontos mechanizmus még a szezonális izoláció, amikor két taxon vagy populáció a szaporodási időszakában tér el egymástól. A premating barrier közé soroljuk még az olyan topográfiai gátakat,

amelyek térben választják el egymástól a két taxont vagy populációt (Mayr, 2002).

A posztamating barriereket két fő csoportra bonthatjuk attól függően, hogy mire hatnak. Az egyik csoport meggátolja a gaméták fúzióját, ha esetleg bekövetkezik a párosodás. Ezekben az esetekben a gaméták egy belső genetikai inkompatibilitás hatása miatt pusztulnak el, vagy egyáltalán nem olvadnak össze (Arnold, 1992)

A posztmating barrierek másik csoportja a kialakult zigótára hat, vagy a megszületett hibrid egyedekre, azáltal, hogy ellentét alakul ki a fenotípus és a környezet között vagy belső inkompatibilitás (Arnold, 1992). A megszületett hibrid egyedeknek az életképességük és a szaporodóképességük alacsonyabb mint a tiszta szülői fajoké. Általában a heterozigóta egyedek szenvednek hátrányt a homozigótákhoz képest (Haldane, 1992). Rendszerint az ivari kromoszómákhoz kötött génekkel kapcsolatban lépnek fel problémák, ugyanis a taxonok keveredése következtében több káros recesszív inkompatibilis allél jelenhet meg a kromoszómán, és a heterogametikus ivarokban csak egy egészséges génkópia található meg (Turelli & Begun, 1997). Maguknak a hibrid egyedeknek az életképességét két fő erő befolyásolja. Az egyik az endogén szelekció, amely környezettől független, és a hibrid egyed sikere a genotípustól függ. A másik szelekciós erő, az exogén esetében a környezet változatosságától függ az egyedek sikeressége, más szóval az eltérő genotípusú egyedek más-más környezetben lehetnek sikeresek (Jiggins, Salazar, Linares, & Mavarez, 2008).

1.1.3. Hibridizáció kialakulásának lehetséges helyszínei

A hibridizáció szimpatrikus populációk esetén ritkábban játszódik le, mivel az eleve egymás közvetlen közelében élő populációk esetében nagyobb a valószínűsége, hogy teljes mértékben kialakult a taxonok közötti izoláció (Randler 2006). Ritkább esetekben az ilyen területeken belül ott következhet be a hibridizáció ahol az adott populáció alacsony egyedsűrűségű, ebből kifolyólag a lehetséges partnerek száma alacsony. Tehát a perifériás szakaszokon vagy azokon a területeken, amelyek távolabb esnek a taxon fő elterjedési területétől (Seehausen, 2004).

A hibridizáció allopatrikus populációk között is megtörténhet. Az allopatrikus populációk elterjedési területei nem fedik egymást. Ilyen esetekben egyértelműen csak akkor lehetséges a hibridizáció, ha a taxonok elterjedési területei egy kis szakaszon érintkeznek vagy közel egymás mellett futnak. Ekkor a két terület közötti szakaszra vándorló egyedek között jöhet létre szaporodás (Jacobsen and Omland 2011).

1.1.4. Hibridizáció kialakulásának lehetséges okai

Mint már korábban említettem a természetben általában a fajok között megfelelő barrierek

alakultak ki, annak érdekében, hogy teljesen elkülönüljenek. A hibridizációhoz számos ok vezethet, melyek nagy része a barrierék megszűnéséhez, vagy megváltozásához vezethető vissza.

Sok eset köthető az olyan antropogén tevékenységekhez, amelyek az élőhely megváltoztatásával járnak (Mallet, 2005). Az élőhely zavaráson kívül a klímaváltozás az egyik fő oka annak, hogy számos populáció elterjedési területe megváltozik, ezáltal átfedésbe kerülhetnek egymással vagy a populációk száma csökkenhet. Jó példa erre a jelenségre a fekete gólyatöcs (*Himantopus novaezelandiae*) és a fehérfejű-gólyatöcs (*Himantopus leucocephalus*) közötti hibridizáció (Steeves, Maloney, Hale, Tylianakis, & Gemmell, 2010). Ezen fajok esetében az emberi tevékenység— erdőirtás, parti és folyami területeket módosítása— következtében az elterjedési területeken belül megnőtt a vizenyős területek mennyisége, amely a fehérfejű-gólyatöcsnek kedvezett. A hibridizáló egyedek számának megnövekedéséhez a környezet megváltozása mellett hozzájárult még, hogy a fekete gólyatöcs populáció ivararánya egy időben a hímek felé tolódott, ezáltal hiány lépett fel a szaporodási lehetőségek számában és számos egyed a másik fajt volt kénytelen választani (Pierce, 1984).

A madarak hibridizációja viszonylag jól kutatott terület. Számos esetben találták az éneken való hasonlóságot a hibridizáció kiváltó okának (Qvarnström, 2006). Ugyanakkor egy másik faj énekének megtanulása vagy a saját és másik faj énekének keveredése is vezethet hibridizációhoz (Peter R. Grant & Grant, 2014). Az ének tanulásával kapcsolatos okok mellett bizonyos taxonoknál megfigyelték, hogy a faj felismerés tévesztése vezetett a másik fajjal való szaporodáshoz (Wirtz, 1999). Ez abban az esetekben fordulhat elő, ha a faj felismerésben hasonlóak a vizuális és akusztikus kulcsingerek (Randler, 2002). Továbbá olyankor is bekövetkezhet másik fajjal való szaporodás, amikor egy másik fajban kialakul egy olyan jelleg ami szupernomális ingerként hat és a párválasztással kapcsolatos (Randler, 2002).

A természetben több olyan eset ismert, amikor az egyik faj túlságosan elszaporodik, vagy egy háziasított, vagy módosított fajta kikerül a természetbe ahol invazívvá válva kiszorítja az őshonos fajt és a további hibridizáció drasztikusan csökkenti az őshonos populáció méretét (Koen, Bowman, Lator, & Wilson, 2014a).

1.1.5. Hibridizáció következményei

Az irodalomban általánosan úgy vélekednek (Judith M. Rhymer & Simberloff, 1996; (Abernethy 1994) (Allendorf et al. 2001) (Steeves et al., 2010) , hogy a hibridizáció hátrányos következményeket von maga után. A legfőbb probléma, hogy az esetek nagy részében a hibrid egyedek fitness csökkenést szenvednek.

A szülői populációk hibridizáció által keveredett genetikai állományában olyan új

génkombinációk (hibrid inkompatibilitási gének) jelenhetnek meg, amelyek miatt az egyed sterillé vagy életképtelenné válhat (Maheshwari & Barbash, 2011). A Haldane-szabály is ezt támasztja alá, mely kimondja, hogy a heterozigóta hibrid egyedek szenvednek hátrányt a homozigótákhoz képest (Haldane, 1992).

A hátrányos következmények már több esetben vezettek bizonyos taxonok kihalásához (Allendorf et al., 2001). Többen úgy vélik, hogy a konzerváció biológiában kiemelten fontos lenne foglalkozni a hibridizációval, mivel, ha egy ritka veszélyeztetett faj kerül kapcsolatba egy gyakori elterjedtebb fajjal, akkor a ritkább faj eltűnhet (Allendorf et al., 2001). Jól megfigyelt példa a tőkés récék (*Anas platyrhynchos*) esete, amelyek elterjedtek és több keskenyebb elterjedésű endemikus közel rokon fajjal hibridizálnak (Judith M. Rhymer & Simberloff, 1996). Például Új Zélandra is bekerült ez a faj ahol veszélyezteti a szemöldökös récét (*Anas superciliosa superciliosa*) (J.M. Rhymer, Williams, & Braun, 1994) vagy Hawaiiion a hawaii récét (*Anas wyvilliana*) (Judith M. Rhymer & Simberloff, 1996). Az ilyen esetekben fontos, hogy felfedezzék, hogy a veszélyeztetett faj hibridizál-e.

A hátrányos végkifejletek mellett feljegyeztek számos esetet, amikor előnyös következményekkel járt a hibridizáció. A két faj genomjának keveredése által nem csak káros génkombinációk jöhetnek létre, hanem adaptív előnyösek is. Ezáltal olyan genotípusú egyedek születhetnek, melyek egy folyamatosan változó, extrém vagy zavart élőhelyen sikeresebbekké válhatnak, mint a tiszta szülői populációk (Seehausen 2004). A megfelelő genotípusú egyedek akár egy új élőhelyet is elfoglalhatnak, amelyet a tiszta populációk nem tudtak és ott stabilizálódhat egy hibrid populáció (Nolte and Tautz 2010). Például a Boglárkalepkéfélék (*Lycaenidae*) családjába tartozó két faj kereszteződéséből született hibrid egyedek egy extrém környezetet foglaltak el. Míg a *Lycaeides melissa* a szárazabb élőhelyeken fordul elő, addig a *L. idas* nedvesebb területeken, a hibrid populáció pedig az alpesi területek található meg (Gompert 2006). Fontos megjegyezni, hogy többnyire a szülői populációk élőhelyén és elterjedésén kívül lehet több esélye a túlélésre a hibrid egyedeknek mivel ott kisebb a szülői populációkkal való versengés mértéke.

Az új génkombinációk mellett a populációkban jelen lévő csekély számú hibrid egyed, mely visszakereszteződik a szülői populációkhoz, biztosíthat egy magasabb fokú genetikai változatosságot (Mallet, 2005). A visszakereszteződések által az introgresszió folyamata jöhet létre, mely magába foglalja bizonyos genom részek és allélek egyik fajból a másik történő beépülését. Ennek a folyamatnak a következtében általában genetikailag inkompatibilis lókuszok jöhetnek létre, mégis hosszabb távon változatosságot tarthat fent, vagy egyes beépült lókuszok jól működhetnek az új genetikai háttérben (Borge, Lindroos, Nádvorník, Syvänen, & Saetre, 2005).

Az adaptív előnyös génkombinációk és az introgresszió folyamata által új fajok is kialakulhatnak, melyet hibrid speciációnak nevezünk. Homoploid hibrid speciációról akkor beszélünk amikor egy új reprodukív izolált populáció megalakul kromoszóma szám változás nélkül (Coyne and Orr 2004). Allopolyploid speciáció akkor áll fent, hogy ha a kialakult populációban kromoszóma szám változás következett be, ami egyben megfelelő posztzigotikus barrier (Abbott, 2013). Mára már a fejlett molekuláris technikáknak köszönhetően egyes fajoknál megállapították a hibrid eredetet. Például az olasz veréb (*Passer italiae*), a berki veréb (*Passer hispaniolensis*) és a házi veréb (*Passer domesticus*) keveredéséből alakulhatott ki közel két millió évvel ezelőtt (Brelsford 2011). Egy másik példa egy amerikai poszáta, a *Dendroica auduboni* eredete, amely a *D. coronata* és *D. nigrifrons* fajok hibridizációjából alakulhatott ki (Brelsford, Milá, & Irwin, 2011).

A genotípusok változatossága mellett bizonyos esetekben a hibrid egyedek fenotípusos változatossága nem csak hogy eltér mindkét szülői populációtól, de azok lehetséges kombinációinál is több változat jöhet létre (Nolte & Tautz, 2010). A számos új fenotípus közül gyorsan kisselektálódnak az életképtelen változatok, így viszonylag hamar stabilizálódhatnak az adott környezetben megfelelőek (Abbott, 2013).

1.1.6. Hibrid zónáról általánosan

Hibrid zónának nevezzük az olyan területeket ahol genetikailag elkülönült populációk lépnek kapcsolatba és szaporodnak egymással, ezáltal kevert származású egyedeket létrehozva (Harrison, 1993).

Endler (1997) szerint a hibrid zóna többféleképpen változhat a hibrid egyedek fitneszétől függően.

Ha az első generációs hibrid egyedeknek kisebb a fitnesze, mint a tiszta utódoké, vagy a szülői egyedeké akkor a hibrid zóna fennmaradásának ideje a hibridek ellen ható szelekciótól függ. Ha ez a szelekció erős, akkor keskeny zóna alakul ki, amely csak viszonylag rövid ideig állhat fent (Barton and Hewitt 1985). Ebben az esetben beszélhetünk a „reinforcement” folyamatáról (Dobzhansky 1940), mely szerint a két populáció között megerősödnek a prezigotikus barrierok a csökkent hibrid fitnesz folytán. Néhány területen hibridizációt figyeltek meg az örvös légykapó (*Ficedula albicollis*) és a kormos légykapó (*Ficedula hypoleuca*) között (Borge et al. 2005). Az egyik ilyen terület Közép és Kelet-Európa ahol a Pleisztocéni eljegesedés megszűnése miatt újra érintkeztek egymással a fajok, körülbelül 10 000 évvel ezelőtől kezdődően. A másik terület pedig Svédország keleti felénél található két szigetet foglalja magába, Gotlandot és Ölandot, ahol közel 150 évvel ezelőtt kezdett el érintkezni egymással a két faj (Lundberg and Alatalo 2010). A két területen a hibridizáció mértéke és a hibrid egyedek fitnesze eltérő. Az adatokból arra a

következtetésre jutottak, hogy Európa területén erősebbek a pre-, és posztmating barrierek, mivel azoknak a kifejlődéséhez több idő állt rendelkezésre, mint a szigeteken. Az európai megfigyelt populációkban alacsonyabb volt a kelési sikeresség kevert párok esetén, mint a szigetek területén, továbbá a szigeten lévő hibrid egyedek sokkal termékenyebbnek bizonyultak és a hibridizáció gyakorisága is magasabb volt (Borge et al. 2005).

Abban az esetben, ha a hibrid utódok fitnessze magasabb a hibrid zónában, mint a tiszta utódoké, vagy a szülői egyedeké akkor kétféle hibrid zóna alakulhat ki. Ha a hibridek visszakereszteződnek a szülői egyedekhez, akkor egy úgy nevezett hibrid tömeg („hybrid swarm”) jön létre, melyben csak hibrid egyedek, visszakereszteződött egyedek és hibridek utódai vannak jelen (Seehausen 2004). Ha úgy alakul, hogy zónán belül csak hibrid egyedek és azok utódai vannak jelen, a körülményeknek megfelelően egy új faj alakulhat ki (Koen et al. 2014b).

Ha a hibrid egyedeknek a fitnessze majdnem azonos a tiszta utódokéval, vagy a szülői egyedekéval, akkor a hibrid zóna viszonylag állandóan jelen lehet a két populáció között és egy szélesebb területen helyezkedhet el (Futuyma 2013). Alapvetően a zónáknak a kiterjedtsége attól függ, hogy mekkora területet foglal el a hibridek számára előnyös élőhely (Futuyma 2013).

A genotípusok alapján Harrison (1997) két típusra osztotta a hibrid zónákat. Ahol egy hibrid tömeg alakul ki azt unimodális zónának nevezte, ahol pedig a szülői populációra hasonlító genotípusok vannak többségben, bimodális zónának nevezte el.

1.1.7. Hibrid egyedek detektálása

1960-as évekig morfológiai karakterek alapján történt a hibrid egyedek detektálása (Allendorf et al., 2001). Számos esetben a hibrid egyedeket nehéz beazonosítani, főleg az olyan állatfajoknál ahol a szülői tiszta populációk nem nagyon különböznek morfológiailag egymástól (posztátfélék, kis emlősök). Továbbá, ha a hibridek szaporodóképesek és az introgresszió jelensége is fent áll, akkor a visszakereszteződött egyedeket még nehezebb elkülöníteni (Váli, 2010). Valamint azt várnánk, hogy a hibridek fenotípusosan egy köztes állapotot mutatnak, viszont gyakran nem így van (Allendorf et al., 2001). Ugyanakkor a madarak között figyelték meg, hogy azoknál a fajoknál ahol az egyedek világos, színes tollazatúak, a hibrideket könnyebben lehet detektálni (Mallet, 2005).

A molekuláris módszerek fejlődésével, a detektálás is biztosabb lett. Általában valamilyen nukleáris génszakaszt és mitokondriális szakaszt vizsgálnak meg (Schwenk, Brede, & Streit, 2008). A mitokondriális szakasz viszonylag konzervatív, de sokkal több másolatban van jelen a sejtekben, ennél fogva nagyobb valószínűséggel található benne több polimorf hely. Mivel anyai öröklődésű, ezért az anyai leszármazás is megfigyelhető általa. Egymagában azonban nem ad sok információt,

ezért szükséges hozzá még nukleáris génszakaszt is vizsgálni (Mallet, 2005) azon belül is olyan lókuszokat, amelyeken az allélek egyediek a fajokban (Anderson & Thompson, 2002). Egy másik lehetőség ha SNP-vel („egyponos nukleotid-polimorfizmus”—single-nucleotide polymorphism) együtt mikroszatellita lókuszokat is megfigyelnek ezáltal az F1 hibrideket jól el lehet különíteni a tiszta fajoktól és a visszakereszteződött egyedektől (Váli, 2010).

1.2. Hibridizáció a Vágómadárfélék családjában (Accipitridae)

A Vágómadárfélék családjába tartozó fajok között eddig nem sok hibridizáló fajt figyeltek meg (Short, 1969) és ezek között is kevés az alaposan felmért hibridizáció (Váli, 2010). Az ölyvek közül például ismert, hogy a prériölyv (*Buteo swainsoni*) és a rőt farkú ölyv (*Buteo jamaicensis*) Észak-Amerikában (Hull et al., 2007), a pusztai ölyv (*Buteo rufinus cirtensis*) és egerészölyv (*Buteo buteo*) pedig a Gibraltári-szoros környékén szaporodik egymással (Elorriaga & Muñoz, 2013).

Az *Aquila* nemzetségbe tartozó fajok közül eddig a fekete sas (*Aquila clanga*) és a békászó sas (*Aquila pomarina*) közötti hibridizáció van feltérképezve alaposan (Helbig, Seibold, et al., 2005). A két faj elválása közel egy millió évvel ezelőtt történt (Seibold, Helbig, Meyburg, Negro, & Wink, 1996). A fajok elterjedése szemiszimpatikus, tehát vannak egymással átfedést mutató szaporodó területei Lengyelország keleti részében, Ukrajnában, Fehéroroszországban és a Balti országokban (Váli & Lõhmus, 2004). A kutatáshoz mitokondriális DNS-t és SNP-t vizsgáltak. A vizsgált minták közül sikerült olyanokat detektálni, amelyek valószínűleg visszakereszteződött egyedekből származnak, tehát megállapították, hogy a hibrid tojó egyedek szaporodóképesek. Ezen kívül aszimmetrikus mitokondriális génáramlást figyeltek meg, mivel csak a békászó sas „populációban” találtak fajtól eltérő haplotípusokat. Ez alapján arra következtettek, hogy a két faj között nincs kialakulva teljes izoláció és az aszimmetrikus génáramlás miatt nem minden hibrid egyed fertilis. Későbbi kutatások kimutatták, hogy a párok közel 80%-a egy fekete sas tojóból és egy békászó sas hímből áll. Ennek az aszimmetrikus hibridizációnak a fordított szexuális dimorfizmus lehet az oka, mely a ragadozó madarakra jellemző. E szerint a tojók nagyobbak, mint a hímek. Ezen két faj esetében a fekete sas tojói nagyobbak, mint a békászó sasé, ezért a békászó sas hímek a náluk sokkal nagyobb fekete sas tojót választják (Helbig, Seibold, et al., 2005). A méretbeli különbségek mellett megfigyelték, hogy a fekete sas hímek nagy része nem tud megfelelő territóriumot foglalni, viszont a békászó sasok igen (Váli, 2010).

A mi kutatásunk szempontjából fontos, hogy a pusztai sas (*Aquila nipalensis*) hibridizál az ázsiai szavanna sassal (*Aquila rapax vindhiana*). Spanyolországban egy fogságból szabadult pusztai sas hím alkotott párt egy ibériai sassal (*Aquila adalberti*). Fontos megjegyezni, hogy az ibériai sas a

parlagai sastól közel 1 millió évvel ezelőtt vált szét (B Martínez-Cruz, Godoy, & Negro, 2007a).

Jelenleg egy eset van publikálva, hogy a parlagi sas hibridizál egy másik fajjal. Romániában készült egy fotó egy egyedről amely kevert jellegeket mutatott, és a szakértők megállapították, hogy szirti sas és parlagi sas jellegeket hordoz (Corso and Forsman 2008).

1.3. Vizsgált fajok

1.3.1. A parlagi sas (*Aquila heliaca*) általános jellemzése

A parlagi sas (*Aquila heliaca*; Savigny, 1809) viszonylag elterjedt Eurázsia középső területein mégis a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) vörös listáján sebezhető („vulnerable”, VU) fajként tartják számon, mivel élőhelye folyamatosan csökken, e mellett számos egyed pusztul el mérgezésekben, áramütésben, a fiatalabb egyedek vonatbalesetben és egyéb emberi tevékenységek miatt (imperialeagle.hu). Jelenleg a szaporodó egyedek számát 2500 és 10000 közé becsülik (Birdlife International, 1999). Elterjedési területe Nyugat-Európától Közép-Ázsiáig és Észak-nyugat Kínáig és Szibériáig terjed (Ryabtsev and Katzner 2007).

A felnőtt egyedekre jellemző a sötét barna tollazat a vállakon fehér folttal. A nyakszirti tollak fakó aranyszínűek, a farktollak töve pedig szürkés árnyalatú, az evező- és a faroktollak diffúzan keresztsávosságúak. A fiatalokra kezdetben jellemző, hogy a testük homokszínű alapon sötét csíkozott és fehér csúcsok vannak a tollakon, később fakóbb színűek és mintázatuk is gyengébb (Mullarney et al. 2011). A parlagi sas monogám faj és körülbelül négy éves korukban választanak párt maguknak. Élőhelyeként az erdős-sztyepp területeken kívül a fásabb mezőgazdasági földek szolgálnak, ahol a magasabb fák tetejére építik nagy fészkeiket. Egy párnak több fészke is van, melyeket felváltva használnak általában 1-2 fiókát nevelnek. Fő táplálék forrása a kisemlősök közül az ürge fajok (*Spermophilus spp.*) és a hörcsögök (*Cricetinae*), továbbá fogyaszt még kisebb hullóket ritkábban dögöket (Del Hoyo, Sargatal, and Elliot 1994). Elterjedésének nyugatibb területein ezek a fő táplálékforrások visszaszorulóban vannak a csökkenő populációik végett ezért más táplálékhoz kellett adaptálódniuk ezen állományoknak (Horváth et al. 2010). Például Magyarországon felmérték a parlagi sas populációk táplálék fogyasztását és megfigyelték, hogy térben és időben is változik. A magasabb régiókban hörcsögöt (*Cricetus cricetus*), a nyílt alföldi területeken pedig mezei nyulat (*Lepus europaeus*) fogyasztottak a legtöbbet. Azonban volt olyan év amikor szinte csak madarakkal, legfőképp fácánnal táplálkoztak (Horváth et al. 2010).

A parlagi sas Európai állományát három fő csoportja bonthatjuk: a Kárpát-medencei (Magyarország, Szlovákia), a balkáni (Macedónia, Bulgária, Törökország) és a Kelet-Európai (Oroszország, Ukrajna, Kaukázus) (Horváth et al. 2002). A Kárpát-medencei régióban közel 120-150 költő pár található. Törökország európai területén 30-50 költő pár (Demerdzhiev 2011),

Északnyugat-Anatólia területén pedig 50 territórium található. Oroszország és Kazahsztán területén található a világ parlagi sas populációjának a fele. Oroszországban 3000-3500 költő párt becsülnek (Karyakin 2011). Az Altaj-hegység területén a becsült költő párok száma 800-900 közé tehető. A hegység területén a megtalált fészkek olyan erdős hegyoldalokon helyezkednek el, melyek a sztyeppés völgyekre néznek (I. V. Karyakin, Nikolenko, & Bekmansurov, 2009).

1.3.2. A pusztai sas (*Aquila nipalensis*) általános jellemzése

A pusztai sas (*Aquila nipalensis*, Hodgson, 1833) hasonló elterjedéssel bír, mint a parlagi sas, de legfőképp Mongólia és Közép-Kína területétől egészen Európa keleti területéig fordul elő (Clark 2005). Jelenleg az állományok csökkenek, viszont még nem tartják veszélyeztetett fajnak. Jelenleg (Birdlife International, 2013-as utolsó adat) 160000 egyedre becsülik a szaporodó állományt.

A fiatal madarakra jellemző, hogy az evezők sötétek, csíkozottak, fehér hátsó szárnyél és farkvégszallagjuk van, az alsó karfedők sárgásfehér végei jól látható, összefüggő sávot alkotnak. Az öreg egyedekre jellemző a sötétbarna tollazat és a szárnyakon és fark tollakon húzódó erős sávozottság, sötét hátulsó szárnyél és farkvégszallag. Továbbá a tarkón található egy vöröses barnás folt (Mullarney et al. 2011).

Élőhelyeként a mezőgazdasági, sztyeppi és félsivatagi területeket tartják számon. A parlagi sassal ellentétben ez a faj régebben a talajra újabban bokrokra ritkább esetekben alacsonyabb fákra építi fészket és 1-4 fiókat nevel. Táplálék forrásaként kisebb és közepes testű emlősök, madarak, halak és dögök szolgálnak (Tingay, Sureda, and Gilbert 2008). Mongóliában például a fő táplálék forrása egy egér fajta (*Lasiopodomys brandtii*). Pakisztánban megfigyelték, hogy mindkét faj táplálék preferenciája az adott körülményekhez képest változni tud (Khan et al. 1996).

1.4. Célkitűzések

A kutatás kezdetén már korábban is kapott a kutatócsoport jelentéseket, melyekben a Nemzetközi Parlagisas-védelmi Munkacsoport tagjai már felfigyeltek olyan egyedekre melyek az általánostól eltérő jelleget mutattak. A 2012-es évben viszont találtak Törökország – Anatólia tartományában egy fészket, melyben egy parlagi fenotípusú és egy pusztai fenotípusú pár volt. A fiókák parlagi fenotípusúak voltak, azonban egyéb jellegekkel is rendelkeztek, amik a parlagi sas fiókákra nem jellemző, például a csíkos evezőtollak és az egyszínű testtollak.

Több forrásból is értesültünk, hogy a terepi megfigyelések során detektáltak eltérő fajú költő párokat és olyan egyedeket, melyek morfológiailag egy köztes állapotot mutattak. Szakdolgozatom célja az, hogy DNS-alapú vizsgálatokat használva találjak bizonyítékot, amely alátámasztja ezen terepi megfigyeléseket miszerint a két sas faj a természetben keveredik egymással.

Jelen dolgozatban a molekuláris módszerekkel való kimutatásra kerestünk megfelelő markereket és azokat vizsgáltuk meg alaposabban. Több nukleáris génszakaszt vizsgáltunk meg, továbbá mitokondriális szakaszt és kilenc mikroszatellita lókuszt.

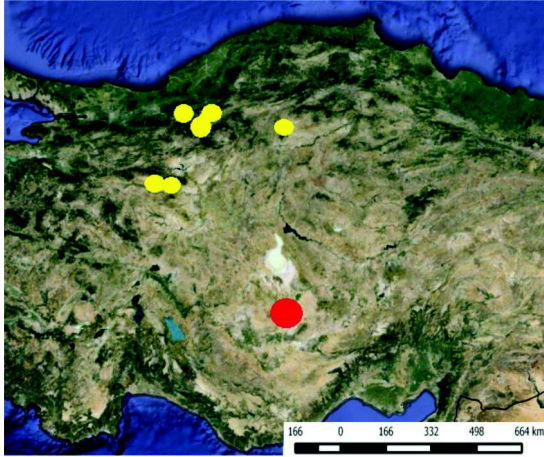
2. Anyag és Módszer

2.1. Minták

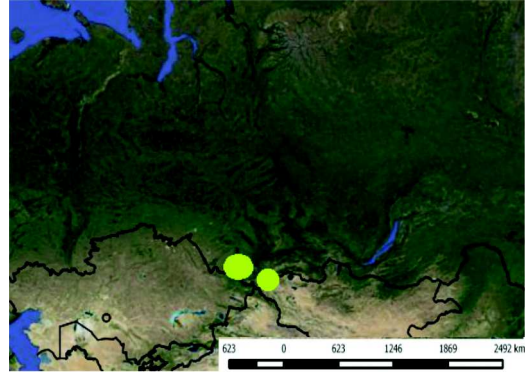
A kutatásunkhoz szükséges vizsgálatokhoz a mintavételezést a Nemzetközi Parlagisas-védelmi Munkacsoport (IIEWG) tagjai végezték. A mintagyűjtéshez az úgynevezett nem-invazív módszert alkalmazták (Taberlet and Luikart 1997). Ennek lényege, hogy a felnőtt madarak befogása általi zavarás és stressz okozás nélkül is hozzájuthassunk DNS-t szolgáltató mintákhoz. Az általános eljárás szerint a felnőtt madaraktól a vedlett tollakat gyűjtik össze a fészkek és a kiülőfák (olyan magas fa, amiről a madarak jól belátják a vadászterületeket) alól. A fészkek környékén inkább a tojó tollai találhatóak meg, mert a kotlás miatt több időt tölt a fészeknél, amíg a hím őrzi a territóriumot. Ezen kívül szükséges még gyűjteni a kiülő fák alól is, mert ott nagyobb valószínűséggel találhatunk hím által hullajtott tollakat is (Vili, 2009a). Mindemellett a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME) tagjai által elvégzett évenkénti gyűrűzéskor (június – július eleje) a 4-7 hetes fiókák hónaljtajékáról húznak ki egy tollat. Ez nem-destruktív mintavételezési módszer, mivel ebben az esetben a fióka nem sérül meg és nincs kitéve újabb stressznek a gyűrűzés mellett.

A mintáinkat két fő területről gyűjtötték, melyek Törökország, Anatólia tartományának körülbelül 25 000 km²-es területe (1. ábra) és Oroszország, Altaj területe (2. ábra). A törökországi mintázott területtől közel 400 km-re található néhány pusztai sas költő pár (piros jelölés az 1. ábrán).

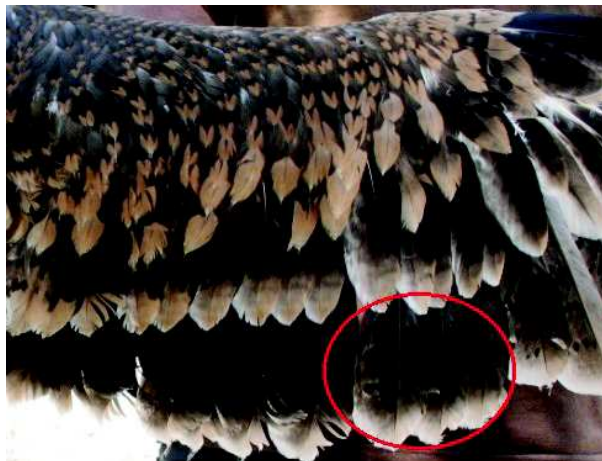
Az International Imperial Eagle Working Group (IIEWG) munkatársai terepen már korábban is megfigyeltek néhány olyan madarat, amely fenotípusosan a parlagi és a pusztai sasra is jellemző bélyegeket hordozott. Törökország-Anatólia tartományában észleltek egy fészket, ahol egy parlagi és egy pusztai fenotípusú pár költött, továbbá a fiókák parlagi fenotípusúak voltak, viszont érdekes más jellegeket is mutattak például a csíkos mintázatú evezőtollak és az egyszínű test tollak (3. ábra).



1.ábra: Törökország mintavételezési helyszínek
(sárga-parlagi sas fészkek; piros-feltételezett pusztai sas fészkek BirdLife International 2001-es adatai alapján)



2.ábra: Oroszország mintavételezési helyszínei



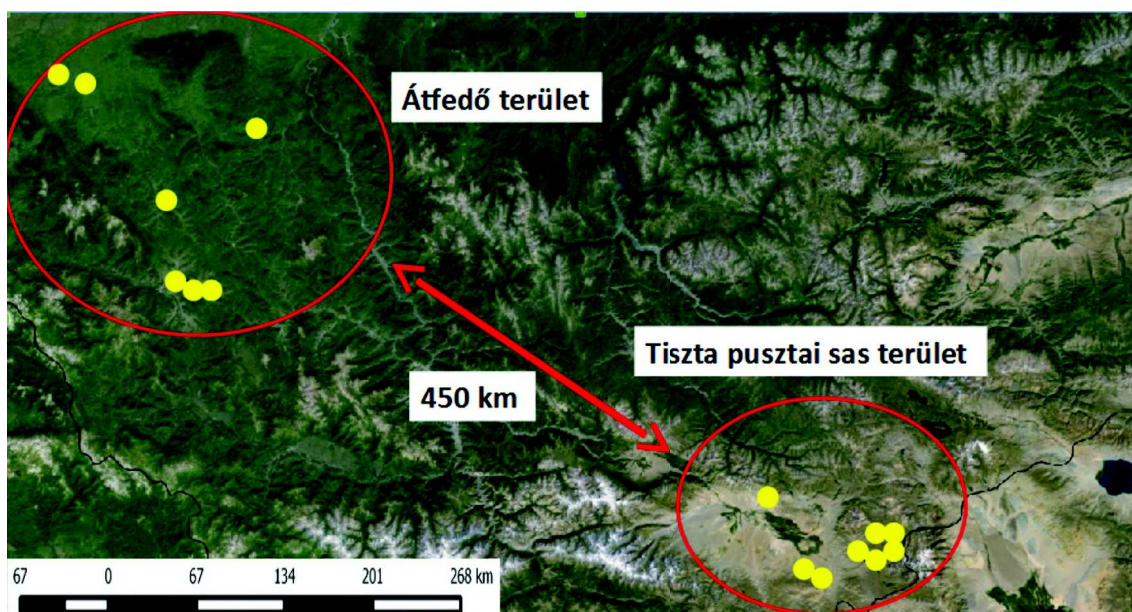
3.ábra: fióka szárny kevert jellegekkel

Ezen fészkekből két egymás utáni évből (2012 és 2013) rendelkezünk mintákkal. 2012-ben a fészkekben két halott fiókát találtak, sajnos az egyik tetem már annyira degradálódott, hogy nem lehetett DNS-t izolálni belőle. 2013-ban két élő fiókája volt a párnak és mindkettőtől sikerült mintát venni. Mindezek mellett mindkét évből gyűjtöttek vedlett felnőtt tollakat, fontos megjegyezni, hogy ebben az esetben csak a fészkek közvetlen közeléből, hogy biztosan csak ettől a pártól származzanak a minták.

A hibrid fészkek mintáin kívül Törökország-Anatólia tartományából egyéb parlagi sas költő

pároktól is gyűjtöttek tollakat, évek szerint a következő felosztásban: 2007-ből 2 db, 2009-ből 9 db, 2011-ből 2 db, 2012-ből 15 db, 2013-ból 12 db.

Oroszország Altaj területéről két jól elkülönült térségből sikerült mintákat gyűjteni (4. ábra).



4.ábra: Oroszország mintavételezési helyszíneinek közelebbről

Az délebbi területen csak pusztai sas költőpárok voltak találhatóak. Feltételezzük, hogy ezen térség egy tiszta pusztai sas populációnak az élőhelye. A másik területen a két faj elterjedésének határán vegyesen találhatóak pusztai és parlagi sas költőpárok. Feltételezzük, hogy ez a terület hibrid zóna lehet.

A tiszta pusztai sas populáció és a feltételezett hibrid zóna légvonalban közel 450 km-re helyezkedik el egymástól továbbá egy topográfiai barrier, egy magashegység is elválasztja őket. A tiszta pusztai sas területről 18 db mintát gyűjtöttek. A feltételezett hibrid zónából 7 pusztai sas és 11 parlagi sas mintát kaptunk. Az összes oroszországi vedlett és fióka tollak a 2014-es évből származnak.

A törökországi és oroszországi mintákon kívül sikerült még megszernünk két-két pusztai sas tollat a Xantus János Állatkerttől (Győr) és a Budakeszi Vadasparktól. Mindemellett a kutatócsoport korábbi években folyó populáció-genetikai és dinamikai kutatásai révén 22 Macedóniában költő parlagi sas egyed DNS profilja állt rendelkezésünkre és közel 700 egyedé a Kárpát-medence területéről, melyek közül 9 lókuszra teljes profilúakat kiválasztottunk és néhány összehasonlító elemzésben (egyéb területként feltüntetve) felhasználtunk.

Az eredmények értékeléséhez és magához a munkafolyamatokhoz elengedhetetlen volt, hogy felcímkézzük a tollakat. Minden tollra ráírtuk az egyedi azonosító kódot, a területnek és a fajnak megfelelően.

2.2. Toll preparálás

A molekuláris módszerekhez a felnőtt vedlett tollakból és a fióka tollakból izoláltuk a DNS-t. A tollak között a következő három minőségi típust különítjük el: rossz (0) hogy ha a tollnak a csévéje és köldök része súlyosan megsérült, közepes (1) ha a cséve sérült, de a köldök rész nem vagy kevésbé és jó (2) minőségű egy toll, ha a cséve és köldök rész sértetlen (Vili et al., 2013). Vizsgálataink során kizárólag a jó (2) minőségű tollakat használtuk fel.

A preparálásra alkalmas lehetséges tolltípusok a nagyfedő, kézevező, kézevező fedő, karevező, faroktoll és vállfedő tollak. A kutatásunkhoz elsősorban a kézevező és faroktollakat használtuk fel a sikerebb DNS-kivonás érdekében (Vili et al., 2013). A tollakat felhasználásig fészkenként elkülönítve száraz helyen tároltuk.

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. Mivel a madarak vörösvérsejtjei tartalmazzák a sejtmagot, a vérrögből elegendő mennyiségű DNS nyerhető (Horváth, Martinez-Cruz, Negro, Kalmár, & Godoy, 2005). A vérrög (5. ábra) kipreparálását a vedlett tollakból mindig steril papírlapon végeztük. A kimetszéshez használt szikét és csipeszt minden alkalommal alkohollal és hőkezeléssel sterilizáltuk annak érdekében, hogy a kontaminációt elkerüljük. A folyamat elején alkohollal átitatott törlőpapírral lemostuk a felső köldök részt, hogy a szennyeződések eltávolítsuk. A következő lépésben kivágtuk a felső köldök, lehetőség szerint egy vékonyabb darabját, hogy később az emésztés lépésében a folyadék teljesen ellephesse. Ez után szikével a felső rétegeket lefejtettük, hogy a vérrög a felszínre kerülhessen, szintúgy az emésztés elősegítésére. A kis toll darabkákat pedig kóddal ellátott eppendorf-csőben tároltuk -20°C -on a felhasználásig.

A fióka tollakat alkoholban, -20°C -on tároltuk a felhasználásukig. Közvetlenül a DNS-kivonás előtt az eppendorf-csőből eltávolítottuk az alkoholt és a tollakat a csövek szájába helyeztük, hogy elpárologhasson a maradék alkohol. A preparáláshoz mindegyik tollat külön papírlapra és parafilmre helyeztük és a felnőtt tollakhoz hasonlóan sterilizált szikét és csipeszt használtunk. A tollak csévéjének végét vágtuk le és apróztuk fel, emellett próbáltunk több kisebb kötőszöveti darabkát is kiemelni. Ezeket az új eppendorf-cső szájába helyeztük, hogy tovább száradhassanak.



5.ábra: Tollon található felső köldök kiemelve

2.3. DNS kivonás

A tollakból történő DNS kivonásához a Geneaid által gyártott Genomic DNS Kit (Tissue)[©] instrukcióit követtük kisebb-nagyobb változtatásokkal.

Első lépésben a mintákhoz 20 µl Proteináz-K-t és 10 µl DTT-t adtunk, annak érdekében, hogy elemésződjenek a fehérjék és a keratin, hogy később hozzáférhessünk a nukleinsavhoz. Utána emésztő puffert mértünk hozzá, majd egy éjszakára 60 C° -os vízfürdőbe helyeztük, hogy az enzimek kellőképp kifejthessék hatásukat.

A következő fő lépésben a lízis-puffer hozzáadása után az emésztett folyadék felülúszóját leszívtuk és egy oszlopmembránra helyeztük. Annak érdekében, hogy a felső réteg szemcse mentes legyen a mintákat centrifugába helyeztük maximum fordulatszámon. Az oszlopra való átmérés során figyelni kellett, hogy semmilyen apró szemcse ne kerüljön át, mert az eltömíti a membránt. Ezen lépés végén a folyadékban található DNS molekulák alkoholos közegben a membránhoz kötődnek.

A harmadik fontos lépés során kétféle mosó puffer segítségével az emésztetlen és felesleges részecskéket eltávolítottuk a membránról. Mindkét mosó puffer hozzáadása után a mintákat a centrifugába helyeztük maximum fordulatszámon.

A végső lépéshez az oszlopokat kóddal ellátott steril eppendorf-csövekbe helyeztük és 20 percre nyitott kupakkal egy szekrénybe raktuk, hogy az alkohol teljes mértékben elpárologjon. Miután megbizonyosodtunk, hogy alkohol nem maradt a membránon, rámértünk előre felmelegített 50 µl euláló-puffert, majd zárt kupakkal inkubáltuk 5-10 percig. Az idő lejártá után a centrifugába helyeztük, majd az utolsó lépést megismételtük. A mintákat felhasználásig -20 C°-on tároltuk.

2.4. Ivarmeghatározás

Az élővilágban számos olyan faj található, amelyeknek külső bélyegek alapján nehéz meghatározni a nemét. Ilyen esetekben szükséges molekuláris ivar-meghatározás. Ehhez egy módszert fejlesztett ki Fridolfsson és Ellegren (1999), ami általánosan alkalmazható a madárfajokra, a futómadarak kivételével. A vizsgálat a CHD1 génszakasz vizsgálatán alapul (Fridolfsson & Ellegren, 1999). Ezen szakasz kódolja a kromo-helikáz DNS-kötő fehérjét, amely az ivari kromoszómákon eltérő hosszúságúak. A madaraknál a heterogametikus ivar a tojó (ZW), a hím pedig a homogametikus (ZZ).

Fridolfsson és Ellegren (1999) által leírt 2550F/2718R primer pár használata esetén a CHD1 gén a Z kromoszómán 450 bázispár (bp) hosszú, a W kromoszómán pedig 700 bp hosszú szakaszt szaporít fel.

Kutatásunk vége felé a nagyobb a hatékonyság érdekében egy másik primer párt használtunk,

a CHD1-i16F és CHD1-i16R elnevezésűt, amelynél a Z kromoszómán egy 430 bp hosszúságú, a W kromoszómán egy 650 bp hosszúságú szakasz szaporodott fel (Suh, Kriegs, Brosius, & Schmitz, 2011).

A DNS felszaporításhoz a következő PCR reakcióelegyet alkalmaztuk: 0,065 µl DreamTaq enzim (Thermo Scientific™), 1,7 µl DreamTaq puffer, 0,65 µl MgCl₂ ugyanennyi dNTP mix, 9 µl H₂O, µl 2 primer mix és végül 3 µl DNS. A „touch down” PCR alkalmazásával kezdetben alacsony annealációs hőmérsékleten nagy mennyiséget szaporítunk fel a kívánt termékből, ezáltal a folyamat elején kevés, viszont specifikus termékünk lesz. Majd egyre emelve a hőmérsékletet csak specifikusan a kívánt termékek szaporodnak fel (1. táblázat).

1.táblázat: PCR ciklus az ivarmeghatározáshoz

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

I. denaturálás, II. annealáció, III. elongáció

Az eredményt agaróz-gélelektroforézissel értékeltük ki. A 1,8 %-os agaróz gélhez festéket (GelRed™, Biotium) adtunk majd 100 V-on 45-50 percig futtattuk. A géllapot UV-fénnyel világítottuk meg, először fényképet készítettünk róla, majd UV fény alatt kiértékeljük, később a fénykép alapján ellenőriztük az eredményeket. A tojó egyedeknél két darab gél csík látható egy 450/430 és egy 700/650 bp-nál. A hímeknél pedig egy csík a 700/650 bp-nál. A vizsgálatainkhoz az ivarmeghatározás azért szükséges, mert az összehasonlító elemzésekbe szeretnénk volna minél több egyed bevonni, így tudtuk növelni a mintaelemszámot, ha egy territóriumból a hímet és tojót is azonosítottuk.

2.5. Szekvenálás

Sok esetekben a hibrid egyedeket nehéz vizuálisan megkülönböztetni a tiszta fajú egyedektől. Azonban ma már számos molekuláris módszer alkalmazható a hibrid egyedek detektálásához. A kutatásunkhoz két fő eljárást alkalmaztunk, bizonyos genom szakaszok szekvenálását és

mikroszatellita-fragmentanalízist.

Az egyik vizsgált szakasz a mitokondriális kontroll régió volt. Ezen szakaszcól fontos tudni, hogy fajon belül is változatosságot mutat, ennél fogva több haplotípusa is megtalálható egy-egy populációban. Az egyik ok, hogy a választásunk erre a szakaszra esett, hogy a kutatócsoport korábbi kutatásainak köszönhetően jól feltérképezett a parlagi sas populációkban (Vili, 2009b). A másik ok, hogy a két faj kontroll régiója között 13 bp különbség van, ami alapján jól elkülönülnek (2. táblázat) (Helbig, Kocum, Seibold, & Braun, 2005). Azért fontos, hogy mitokondriális szakaszt is vizsgáljunk, mert csak anyai ágon öröklődik. Így a haplotípus meghatározása alapján eldönthető, hogy az adott egyednek milyen az anyai leszármazása.

**2.táblázat: Az eddig ismert parlagi és pusztai sas mitokondriális haplotípusai a polimorf helyekkel és a génbanki azonosítókkal (a pontok a referencia szekvenciával- első szekvencia-
való egyezést jelentik)**

		Variábilis pozíciók																										
		1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3																										
		3 4 4 5 5 7 9 1 1 3 4 4 4 1 2 3 3 3 3 4 4 4 8 2 2 2																										
		1 2 5 4 9 5 6 1 8 4 4 5 9 9 7 2 7 8 9 0 3 8 8 4 8 9																										
Haplotípus	Génbaki szám	1	2	5	4	9	5	6	1	8	4	4	5	9	9	7	2	7	8	9	0	3	8	8	4	8	9	
Parlagi sas	E	AJ574880.1*	A	T	A	T	G	C	A	T	C	G	G	C	A	C	A	A	C	T	T	T	A	C	C	T	A	C
	D	AJ567367.1	T
	F	AJ574881.1*	A	.	.	.	T
	G	AJ574882.1*	G	.	T	G
	H	AJ574883.1*	G	.	T	C
	I	AJ574882.1*	G	.	T
	J	AJ574885.1*	T	G	A
	K	EU433560.1**	.	.	G	.	.	G	.	T	G
	L	EU433561.1**	G
	M	KC555570.1	G	.	T	G	.	.	.	C
	N	KC555571.1	G
	P	KC555572.1	.	.	G	.	.	G	.	T
	Q	KC555573.1	G	.	T	A	G
R	KC555574.1	C	
S	KC555575.1	A	
Pusztai sas	1	AJ781268.1***	G	A	.	C	A	T	.	C	.	.	A	G	T	.	G	.	T	C	C	.	.	G	C	.	.	
	2	AJ781269.1***	G	A	.	C	A	T	.	C	.	.	A	G	T	.	G	.	T	C	C	C	.	.	G	C	.	.
	3	AJ781270.1***	G	A	.	C	A	T	.	C	.	.	A	G	T	.	G	.	T	C	C	.	.	G	C	.	.	

* Martinez-Cruz,B., Godoy,J.A. and Negro,J.J. 2004

** Vili et al. 2009

*** Martinez-Cruz,B. and Godoy,J.A.

A mitokondriális kontroll régió felszaporításához a következő reakcióelegyet alkalmaztuk: 0,1 µl DreamTaq enzim, 2,5 µl DreamTaq puffer, 1 µl MgCl₂ és ugyanennyi dNTP mix, 13,4 µl H₂O, 2 µl AID1-forward primer és ugyanennyi FboxR-reverse primer (Martinez-Cruz, Godoy, & Negro, 2004), végül 6 µl DNS. Az amplifikáláshoz használt PCR-ciklus a 6.táblázatban látható.

A nukleáris gének közül a RAG-1 gén egy szakaszát és az adenilát-kináz egy szakaszát választottuk. A génbankban található RAG-1 szekvencia alapján a két faj között 6 bp különbség

található (3.táblázat) (Helbig, 2005). A RAG-1 vizsgálatához, a polimorfizmusok figyelembevételével, saját tervezésű primer pár segítségével egy közel 400 bp hosszú szakaszt szaporítottunk fel, ami a variábilis pozíciók nagyobb részét tartalmazta (4. táblázat).

3. táblázat: Génbankban található szekvenciák variábilis pozíciói és génbanki azonosítói a RAG-1 génnél

	bp	13	69	925	1145	1177	1192	Génbanki szám
Parlagi sas		A	A	G	C	T	A	EU345534.1
Pusztai sas		G	G	A	T	C	G	EU345540.1

4.táblázat: Általunk tervezett primerek által felszaporított szakasz variábilis pozíciói a RAG-1 génnél

	bp	70	290	322	337	Génbanki szám
Parlagi sas		G	C	T	A	EU345534.1
Pusztai sas		A	T	C	G	EU345540.1

A RAG-1 általunk választott szakaszának PCR-rel történő felszaporításához a következő reakcióelegyet használtuk (PCR-ciklus a 6.táblázatban): 0,2 µl DreamTaq enzim, 5 µl DreamTaq puffer, 2 µl MgCl₂ és ugyanennyi dNTP mix, 26,8 µl H₂O, 4 µl forward primer és ugyanennyi reverse primer végül pedig 6 µl DNS.

Az adenilát-kináz1 gén (AK), 6-os exon (508 bp) szakaszának publikált szekvenciája alapján a két faj között számos különbség van (Helbig, 2005). Ezen szakaszra is terveztünk egy primer párt, mely közel 200 bp hosszúságú szakaszt szaporított fel, amelyben 3 variábilis pozíció volt fellelhető (5.táblázat). A génbanki szekvenciában látható deléció különbséget mi nem detektáltuk egyértelműen fajok közötti különbségnek, ezért a továbbiakban ezt a pozíciót nem vizsgáltunk.

5. táblázat: Általunk felszaporított szakasz variábilis pozíciói és a szekvenciák génbanki azonosítói az AK génnél

	bp	148	217	218	Génbanki szám
Parlagi sas		G	A	G	AJ601473.1
Pusztai sas		A	-	-	AJ601474.1

Az adenilát-kináz kiválasztott szakaszának a PCR-rel történő felszaporításához a következő reakcióelegyet használtuk (PCR-ciklus a 6.táblázatban): 0,2 µl DreamTaq enzim, 5 µl DreamTaq puffer, 2 µl MgCl₂ és ugyanennyi dNTP mix, 26,8 µl H₂O, 4 µl forward primer és ugyanennyi reverse primer végül pedig 6 µl DNS.

6. táblázat: PCR-ciklusok a szekvenálásukhoz szükséges szakaszok felszaporításához

	MITOKONDRIÁLIS CR			ADENILÁT-KINÁZ		
Kezdeti denaturálás	94°C	5 p		94°C	3 p	
I.	94°C	30 mp		94°C	30 mp	
II.	60°C	30 mp	35 ciklus	55°C	45 mp	38 ciklus
III.	72°C	45 mp		72°C	45 mp	
Végső extenzió	72°C	5 p		72°C	7p	

	RAG-1			
Kezdeti denaturálás	94°C	3 p		
Touch-down szakasz	I.	94°C	30 mp	
	II.	65-57°C	45 mp	18 ciklus
	III.	72°C	45 mp	
	I.	94°C	30 mp	
	II.	57°C	45 mp	20 ciklus
	III.	72°C	45 mp	
Végső extenzió	72°C	7 p		

I. denaturálás, II. anelláció, III. elongáció

A szekvenáláshoz szükséges PCR-reakciókat a Konzerváció-Genetikai kutatócsoport laborjában végeztük, viszont a szekvenálás folyamatát a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriuma végezte el. Ott egy ABI 3130 típusú automata szekvenátorral dolgoztak, kapilláris-elektroforézissel. A szekvenciákat a Staden program (Staden, 1996) segítségével olvastuk le, majd a MEGA6 programmal (Kumar, Tamura, & Nei, 1994) rendeztük össze és határoztuk meg a haplotípusokat. A mitokondriális DNS kontroll régiójának haplotípus-hálózatát a Network programmal határoztuk meg Median-joining módszerrel (Bandelt, Forster, & Röhl, 1999).

2.6. Mikroszatellita fragmentanalízis

Kilenc mikroszatellita lókuszt vizsgáltunk, melyek eredetileg részben a réti sasra (*Haliaeetus albicilla*), részben az ibériai sasra (*Aquila adalberti*) és a parlagi sasra lettek kifejlesztve és fluoreszcens jelöléssel voltak ellátva (FAM-6, HEX, VIC). Az egyes lókuszon található allélek fajoként és egyedenként is eltérnek ezért az egyedek egyedileg azonosíthatók (Rudnick, Katzner, Bragin, Rhodes, & DeWoody, 2005). Az általunk feltárt dinukleotid lókuszon az Aa27, Aa43, Aa39, Aa02, Aa36, Aa56, Aa35 (B Martínez-Cruz, Godoy, & Negro, 2002). Ezen kívül a tetranukleotid lókuszon közül a következőket elemeztük: IEAAAG09, IEAAAG11 (továbbiakban G-vel rövidítve) (Busch, Katzner, Bragin, & Keim, 2005). A kutatásunkhoz az Aa02-es lókuszon kiemelkedően fontosnak bizonyult. Az eredmények alapján ez a lókuszon a pusztai sasokra nem működik, ezért ez a

faj könnyen detektálható.

A felszaporítás multiplex PCR-t alkalmaztunk a következő lókuszt párokkal: Aa02-Aa35, Aa43-Aa56, Aa36-Aa39, G11-G09 eltérő annealációs hőmérséklettel dolgoztunk a di- és a tetranukleotidok esetén (7. táblázat) mindkét esetben „touch-down” PCR-rel. A szükséges reakcióelegy: 0,065 µl DreamTaq enzim, 1,7 µl DreamTaq puffer, 0,65 µl MgCl₂ és dNTP mix, 1-1 µl lókuszonként a forward és reverse primer mixekből, 9 µl dH₂O és végül 3 µl DNS.

A lókuszt leolvasását Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriuma végezte ABI 3130 típusú szekvenátorral. A fragmenshosszokat a Applied Biosystems Peak Scanner nevű programjával olvastuk le, ami a fragmens-hosszokat az ismert hosszúságú jelölt méret markerhez viszonyítva számítja ki. A genotipizálási hibákat a Micro-checker szoftverrel ellenőriztük (Oosterhout, Hutchinson, Wills, & Shipley, 2004).

7.táblázat: PCR ciklus a mikroszatellita fragmentanalízishez

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

I. denaturálás, II. annealáció, III. elongáció

A mikroszatellita lókusztokra a Hardy-Weinberg egyensúlyt és a kiegyensúlyozatlan kapcsoltságot („linkage disequilibrium” - LD) a Genepop programmal teszteltük (Raymond & Rousset, 1995). A Genalex programmal (Peakall & Smouse, 2006) számoltuk ki a mikroszatellita allélek várt és becsült heterozigócia fokát és a populációk közötti széttagoltságból fakadó heterozigócia csökkenés mértékét, a fixációs indexet (F_{st}). A törökországi megfigyelt hibrid egyed elkülönülését a törökországi parlagisas-költőpopulációtól, valamint az oroszországi feltételezett „hibrid zónában” költő pusztai sasok elkülönülését a kizárólag pusztai sas territóriumos területtől a STRUCTURE (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) és a Geneland (Guillot, Mortier, & Estoup, 2005) programokkal vizsgáltuk. Mindkét program genetikailag különböző populációk meghatározására alkalmas egyedi genotípusok alapján, bayes-i megközelítéssel (Pritchard et al.,

2000). Azért ezeket a programokat használtuk, mert ezek az egyedeket csoportokba sorolják és becslik annak a valószínűségét, hogy az egyed milyen arányban tartozik egy adott populációhoz, így a feltételezett hibrid egyedeket mindkét faj populációjához nagyobb százalékban fogja besorolni. A STRUCTURE modellünk a következő volt: admixture, uncorrelated (az allélgyakoriságok nem korrelálnak egymással), 600 000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) lépéssel és 200 000 lépéses burnin periódussal, egymástól 10 független futást végeztünk minden egyes lehetséges populációméretre (K). A független futások eredményeit átlagoltuk és modellek likelihood értékei, valamint a Delta K (az a becsült populációszám (K), aminél a legnagyobb ugrás van a likelihood értékben) alapján határoztuk meg a legvalószínűbb populációszámot.

A Geneland program, a STRUCTURE-től eltérően, a csoportok elkülönítésénél figyelembe veszi a populációk közötti földrajzi távolságot is (Guillot et al., 2005). A következőképpen futtattuk a programot: 200 000 iterációval, melyből minden 200-dik eredménye lett csak figyelembe véve (ritkítás: 200) és 10 független futást végeztünk minden egyes lehetséges populációszámra (K).

3. Eredmények

3.1. Szekvenálás

A pár mintával (a törökországi hibrid fészkek összes egyede, egy kárpát-medencei parlagi sas, kettő törökországi parlagi sas, kettő állatkertből származó pusztai sas) történő előzetes szekvenálások eredményei alapján a RAG-1 szakasz szembetűnően eltért a Helbig (2005) által közölt szekvenciáktól: a polimorfizmusok megvannak ugyan az egyedek között, viszont a parlagi sasok és a pusztai sasok nem különülnek el (8. táblázat). Mivel ez a génszakasz nem alkalmas a fajok elkülönítésére, nem tudtuk használni a hibrid egyedek detektálására, ezért továbbiakban nem használtuk.

8. táblázat: A RAG-1 génszakasz polimorf helyein található nukleotidok

bp	70	290	322	337	Génbanki szám
Parlagi sas	G	C	T	A	EU345534.1
Pusztai sas	A	T	C	G	EU345540.1

Parlagi sas - Kárpát-medence	A	C	T	A
Parlagi sas - Törökország	A	C	T	A
Pusztai sas - állatkerti	A	C	T	A
hibrid gyanús hím - hibrid fészkek	A	C	T	A
Parlagi sas - hibrid fészkek	A	C	T	A
fióka - hibrid fészkek	A	C	T	A

Az adenilát-kináznak a génbankban található szekvenciája alapján a parlagi sasnak a 148. pozíciónál egy guanin található, míg a pusztai sasnak egy adenin. A mi eredményeink szerint is guanin található a parlagi sasokban, viszont a pusztai sasok ennél a pozíciónál heterozigóták (A és G) (9. táblázat). Bár eltérnek az eredményeink az eddig közöltektől (Helbig, 2005), mégis lehet őket használni a két faj elkülönítésére. Az is látható, hogy ténylegesen nem lehet különbséget tenni egy pusztai sas és egy esetleges hibrid egyed között.

9. táblázat: Az adenilát-kináz 6-os exonjának szakaszán lévő polimorf helyek, nukleotidok és a közölt szekvenciák (első két sor) génbanki azonosítói

	bp	148	Génbanki szám
Parlagi sas		G	EU345534.1
Pusztai sas		A	EU345540.1

Parlagi sas - Kárpát-medence	G
Parlagi sas - Törökország	G
Pusztai sas - állatkerti	R (A és G)
hibrid gyanús hím - hibrid fészkek	R (A és G)
Parlagi sas - hibrid fészkek	G
fióka - hibrid fészkek	G
Parlagi sas – orosz	G
Parlagi sas – orosz	G
Pusztai sas – orosz – tiszta	R (A és G)
Pusztai sas – orosz – kevert	R (A és G)

A mitokondriális kontroll régió előzetes vizsgálatait során megállapítottuk, hogy a variábilis pozíciók egyeznek a korábban közöltekkel, a két faj haplotípusai jól elkülönülnek egymástól, 14 pozícióban különböznek (10. táblázat, 6. ábra).

A törökországi feltételezett hibrid fészkek minden egyedére elkészültek a mitokondriális kontroll régió szekvenálásai. A parlagi fenotípusú tojó E parlagi haplotípussal rendelkezett, míg a pusztai fenotípusú hím M parlagi haplotípussal. Ebből arra következtettünk, hogy a fészkek hím egyede egy hibrid. Későbbiekben ezt még más eredményeink is megerősítik. A többi Törökországban költő parlagi sas mintáink E, G, I, K és M haplotípusok közül kerültek ki (10-11. táblázat és 6. ábra).

Az oroszországi kevert területről származó összes parlagi sas E haplotípussal rendelkezett. Ezen a területen található pusztai sasok közül 1 db 2-es haplotípusú és 1 db általunk talált haplotípusú egyedet találtunk. A tiszta pusztai sas területen számos új, még nem közölt haplotípust detektáltunk (10-11. táblázat és 6. ábra). Az állatkerti madarakban azonosítottunk egy új polimorf helyet (248. pozíció), amely egy új haplotípust különít el (10-11. táblázat).

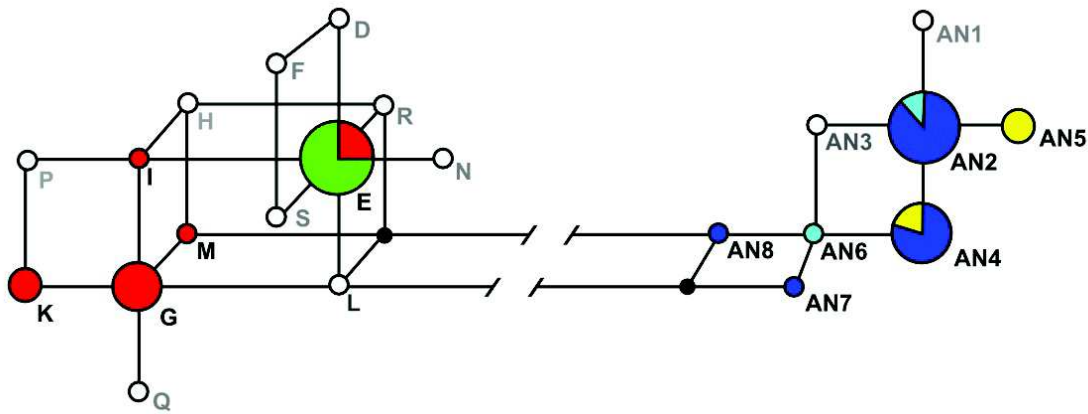
10.táblázat: Talált haplotípusok

Haplo-típus	Variábilis pozíciók																					Génbanki szám							
	3	4	4	5	5	7	9	1	1	3	4	4	4	1	2	3	3	3	3	4	4		4	8	2	2	2	3	3
Parlagi sas	E	A	T	A	T	G	C	A	T	C	G	G	C	A	C	A	A	C	T	T	T	A	C	C	T	A	C	AJ574880.1	
	G	G	.	T	G	AJ574882.1
	I	G	.	T	AJ574882.1
	K	.	.	G	.	.	G	.	T	G	EU433560.1
	M	G	.	T	G	.	.	.	C	KC555570.1
Pusztai sas	2	G	A	A	C	A	T	A	C	C	G	A	G	T	C	G	~	T	C	C	C	A	C	G	C	A	C	AJ781269.1	
	4*	~	T	
	5*	~	T	
	6*	~	.	T	T	
	7*	~	.	T	T	T	.	.	.	
	8*	G	~	.	T	.	T	.	.	.	T	.	.	.	

* általunk talált haplotípusok

11.táblázat: Talált haplotípusok területekre bontva

Haplo-típus	Törökország-Anatólia	Oroszország kevert-parlagi sas	Oroszország kevert-pusztai sas	Oroszország tiszta pusztai sas	Állatkerti pusztai sas
Parlagi sas	E	2	6	-	-
	G	4	-	-	-
	I	1	-	-	-
	K	2	-	-	-
	M	1	-	-	-
Pusztai sas	2	-	-	1	6
	4*	-	-	-	4
	5*	-	-	-	-
	6*	-	-	1	-
	7*	-	-	-	1
	8*	-	-	-	1



6. ábra: Haplotípus hálózat, a 10-11.táblázat adatai alapján, Network programmal számolva, median-joining módszerrel

- piros – törökországi parlagi sasok
- zöld – oroszországi parlagi sasok
- türkiz – oroszországi kevert területen pusztai sasok
- kék – oroszországi tiszta pusztai sasok
- sárga – állatkerti pusztai sasok
- fehér – más populációkban előforduló haplotípusok
- fekete – nódusz – nem valós haplotípus
(a töréspont között 13 mutáció van)

3.2. Mikroszatellita fragmentanalízis

A hibrid fészkek egyedeinek alléljai leolvasása és összerendezése után megállapítottuk, hogy a parlagi fenotípusú tojó egyed csak olyan allélekkel rendelkezett, amelyek eddig csak parlagi sasokban voltak megtalálhatóak. A pusztai fenotípusú hím egyed alléljainak feljegyzése után azt a következtetést vontuk le, hogy ebben az egyedben parlagi és pusztai sasokra jellemző allélek egyaránt megtalálhatóak voltak. Továbbá megvizsgáltuk az Aa02-es lókusz alléljeit, ami nem működik pusztai sasokra. A fészkek hím egyedének mégis felszaporodott ez az allél, amit valószínűleg a parlagi sas anyjától kaphatott. Így további bizonyítékot találtunk arra nézve, hogy a hím egyed hibrid.

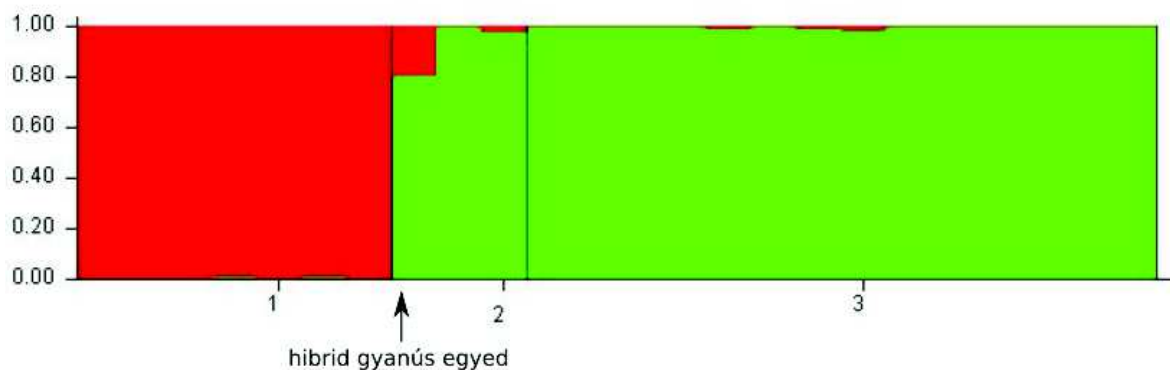
A fiókák mikroszatellitái alapján megállapítottuk, hogy ténylegesen ők a pár utódai mindkét évben. Mindkét évből származó mintáinkat összevetetve arra jutottunk, hogy a fészeknél nem történt cserélődés, mindkét évben ugyanaz a pár költött ott.

Törökországból a hibrid-fészken kívül gyűjtött összes mintára elkészült a mikroszatellita-fragmentanalízis. Az allélek feltérképezése után megállapítottuk, hogy a törökországi parlagi sas populációban 8 olyan allél van, amelyet még nem találtunk meg a kárpát-medencei parlagi sasok között, és eddig a pusztai sasok között sem. Ez után megfigyeltük az allél egyezéseket, és meghatároztuk, hogy a 27 mintánkból 3 db egyezés van, tehát összesen Törökországból 24 madarat

mintáztunk meg.

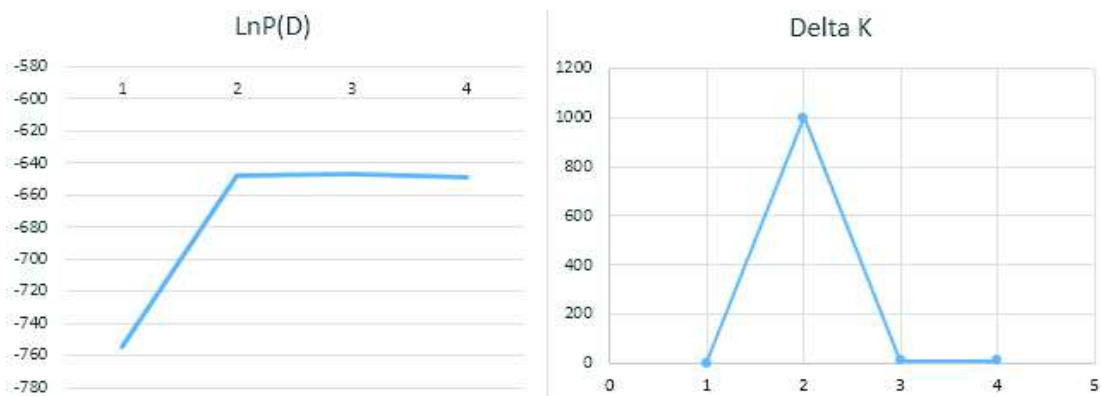
Az oroszországi feltételezett hibrid zónából 3 pusztai sas fenotípusú mintára készültek el a mikroszatellita futások. Ezen 3 minta feltérképezett alléljai között találtunk 3 olyan allélt, amely az eddigi eredmények alapján parlagi sasokra jellemző, emellett a tiszta területről származó minták feltérképezésekor sem találtuk meg. A 3 pusztai sas fenotípusú mintán kívül még 7 parlagi sas fenotípusú mintára készültek el a mikroszatellita futások. Ebből a 7 mintából 1-ben találtunk 1 olyan allélt, amely eddig a pusztai sasokra jellemző. A tiszta pusztai sas területen találtunk 15 olyan allélt, amelyet még más parlagi sas populációban nem (Függelék, 2.táblázat).

A Genepop elemzések alapján Bonferroni korrekció után nincs eltérés a Hardy–Weinberg egyensúlytól és nincs egyenlőtlen kapcsoltság a lókuszok között. A STRUCTURE-rel történő oroszországi minták elemzésekor (kevert terület, parlagi sas: $n=7$; kevert terület, pusztai sas: $n=3$; tiszta pusztai sas terület: $n=14$) $K=2$, vagyis két jól elkülönülő csoportot kaptunk eredményként ($\ln P(D) = -646.7$; $\Delta K = 998.82$), ebből arra következtettünk különbséget lehet tenni a parlagi sasok és a pusztai sasok között (7-8. ábra). Azonban a kevert területen élő pusztai sasok közül egy egyed az eredmények alapján hibrid lehet, mert 20% valószínűséggel tartozik a parlagi sas állományhoz.



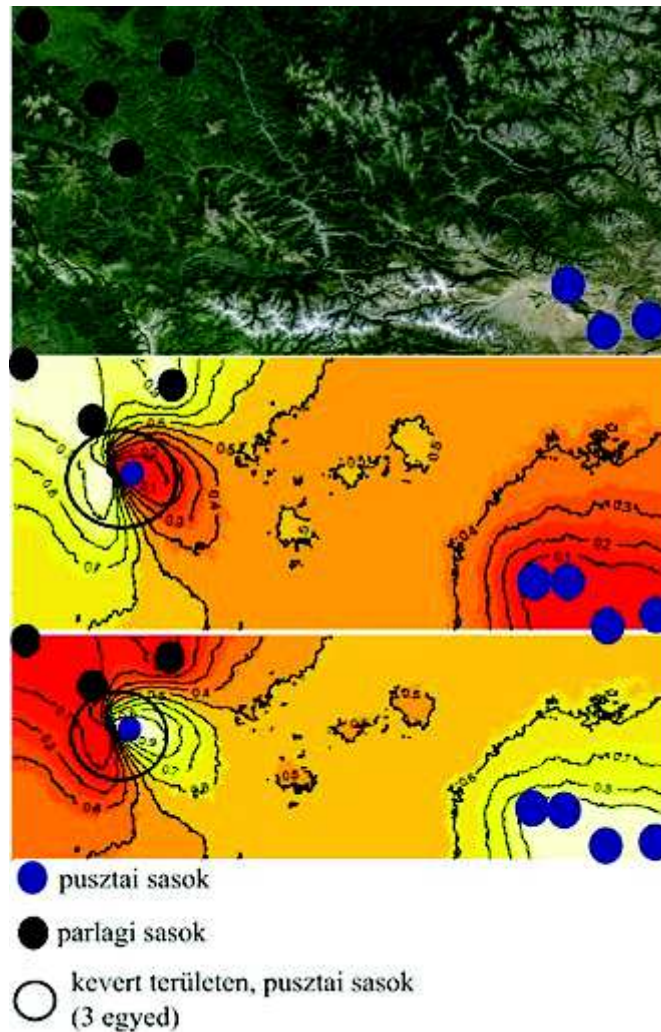
7. ábra:STRUCTURE eredménye oroszországi mintákra. Az ábra mutatja, hogy az egyedek milyen valószínűséggel tartoznak az adott csoportba (itt:piros-parlagi sas, zöld-pusztai sas)

- 1 – Oroszország, kevert terület, parlagi sasok**
- 2 – Oroszország, kevert terület, pusztai sasok**
- 3 – Oroszország, tiszta terület, pusztai sasok**



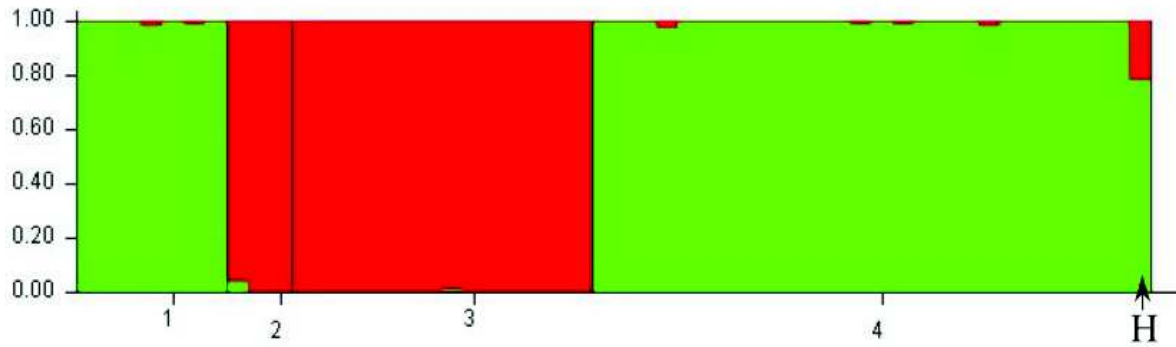
8. ábra: STRUCTURE eredménye oroszországi mintákra: a modell likelihood értékek (LnP(D)) és a Delta K változása a csoportok számának függvényében (K=2 a legvalószínűbb)

Genelanderrel elemezve az oroszországi mintákat ugyancsak megállapítható, hogy két jól elkülönülő klaszter van, továbbá a kevert területen található pusztai sasok közül kettőt sorol a parlagi sasok klaszterébe (> ~60 % valószínűséggel) (9. ábra).



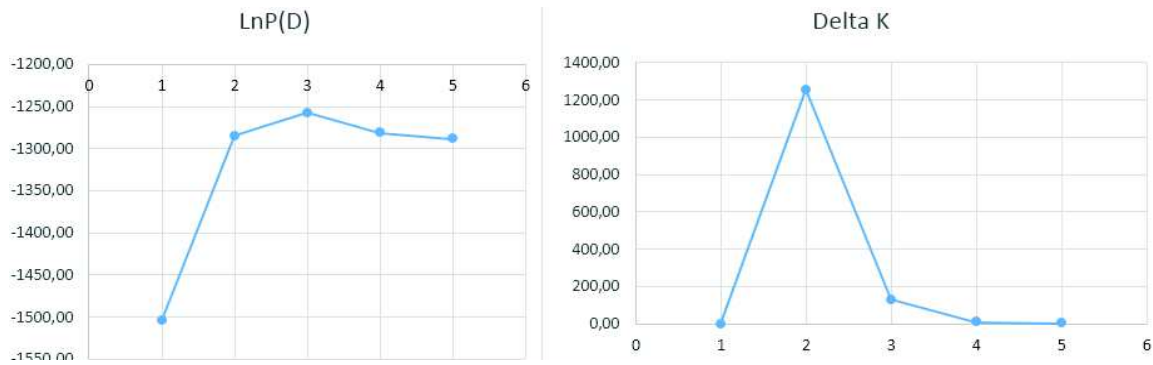
9. ábra: Geneland eredmények az oroszországi mintákra. A vonalak mutatják, hogy a pixelek és az egyes egyedek milyen valószínűséggel tartoznak a különböző klaszterekhez (fehér-: > 90 %, piros: < 10 %). Felső ábra: mintavételezés térképe, középső ábra: klaszter 1, alsó ábra: klaszter 2

Ha az oroszországi minták mellé a törökországi mintákat (n=26) is hozzátettük, ugyancsak 2 csoportot állapított meg a program ($\ln P(D) = -1256.7$; $\Delta K = 1254.62$), tehát itt is látszódik, hogy a két faj szépen elkülönül (10-11. ábra).



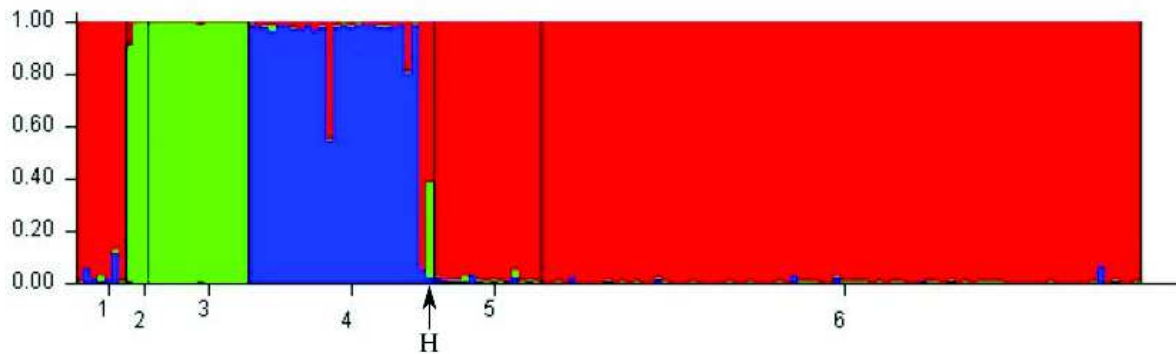
10. ábra: STRUCTURE eredménye oroszországi és törökországi mintákra. Az ábra mutatja, hogy az egyedek milyen valószínűséggel tartoznak az adott csoportba (itt:zöld-parlagi sas, piros-pusztai sas)

- 1 – Oroszország, kevert terület, parlagi sasok**
- 2 – Oroszország, kevert terület, pusztai sasok**
- 3 – Oroszország, tiszta terület, pusztai sasok**



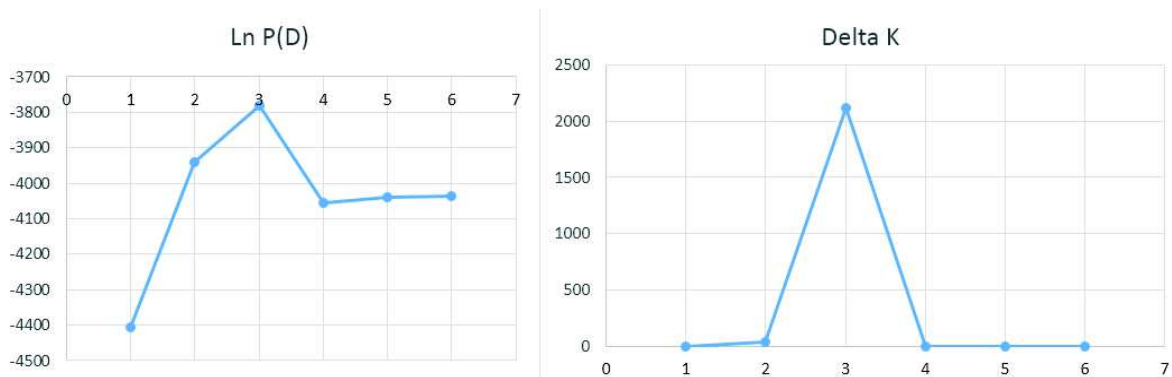
11. ábra:STRUCTURE eredménye oroszországi és törökországi mintákra: a modell likelihood értékek (LnP(D)) és a Delta K változása a csoportok számának függvényében (K=2 a legvalószínűbb)

Ha az eddigi populációkhoz még hozzá vettük az egyéb területekről származó parlagi sasokat akkor 3 csoportot (Ln P(D)= -3779.6; Delta K=2119,87) különített el a program (12-13. ábra).



12. ábra: STRUCTURE eredménye oroszországi, törökországi és egyéb mintákra. Az ábra mutatja, hogy az egyedek milyen valószínűséggel tartoznak az adott csoportba (itt:piros-parlagi sas(Oroszország, Kárpát-medence, Macedónia); zöld-pusztai sas; kék-parlagi sas(Törökország))

- 1 – Oroszország, kevert terület, parlagi sasok**
- 2 – Oroszország, kevert terület, pusztai sasok**
- 3 – Oroszország, tiszta terület, pusztai sasok**
- 4 – Törökország, parlagi sasok**
- 5,6 – Egyéb területek, parlagi sasok (5-Macedónia, 6-Kárpát-medence)**



13. ábra: STRUCTURE eredménye oroszországi, törökországi és az egyéb mintákra: a modell likelihood értékek (LnP(D)) és a Delta K változása a csoportok számának függvényében (K=3 a legvalószínűbb)

A számított fixációs index (F_{st}) értékeket a alapján a tiszta pusztai sas területen található madarak jobban elkülönültek a parlagi sasoktól, mint a kevert területen élő pusztai sasok (12. táblázat).

12.táblázat: Genalex programmal számított páronkénti F_{st} értékek az összes vizsgált populációra (kiemelve az oroszországi területek értékei)

F_{st} értékek

	1	2	3	4	5	
1	0,000					
2	0,210	0,000				
3	0,228	0,191	0,000			
4	0,081	0,199	0,200	0,000		
5	0,208	0,299	0,297	0,215	0,000	
6	0,054	0,212	0,209	0,080	0,181	0, 00

1 – Oroszország, kevert terület, parlagi sasok

2 – Oroszország, kevert terület, pusztai sasok

3 – Oroszország, tiszta terület, pusztai sasok

4 – Törökország, parlagi sasok

5 – Macedónia, parlagi sasok

6 – Kárpát-medence, parlagi sasok

4. **Diszkusszió**

A vizsgálat kezdetén úgy gondoltuk, hogy a hibridizáció detektálására két nukleáris gén szakasz, egy mitokondriális szakasz és 9 mikroszatellita lókuszt megfelelő lesz. A génbankban található szekvenciák közül a RAG-1 és az adenilát-kináz (Helbig, 2005) voltak azok a gének, amelyeknél a polimorf helyek alapján elkülönült a két faj. Azonban az előzetes vizsgálataink alapján a RAG-1 gén nem bizonyult használhatónak a két faj elkülönítésére, mivel a publikált variábilis pozíciókban megegyeztek a nukleotidok a két faj általunk szekvenált egyedeiben, annak ellenére, hogy ezek az egyedek egymástól több ezer km-re lévő populációkból származtak. Tehát feltehetően a publikált polimorfizmus fajon belüli különbségeket mutat, nem pedig fajok közötti eltéréseket. Így ez a szakasz a hibrid egyedek detektálására sem alkalmas, ezért a továbbiakban elvetettük ennek a markernek a használatát. Az általunk felszaporított adenilát-kináz szakaszában is voltak eltérések a génbanki szekvenciához képest. Mi csak egy polimorf helyet találtunk (148. pozíció) ami alapján elkülöníthető a két faj. A parlagi sasokban mindig guanin volt, míg a pusztai sasokban mindig dupla csúcsot láttunk a szekvenciákban (A és G). Sajnos a hibrid egyedek detektálására ez a marker sem tűnik alkalmasnak, mivel a törökországi költő pár hibrid hím egyede is heterozigóta volt ezen a polimorf helyen, ugyanúgy mint a pusztai sasok, így nem tudunk különbséget tenni egy hibrid egyed és egy pusztai sas között. Helbig és munkatársai (2005) a szekvenciák meghatározásához összesen 2 madárból származó mintát használtak, melyek Izraelből és Kazahsztánból származtak, ez lehet annak az oka, hogy vannak eltérések a mi szekvencia eredményeinkhez képest. További mintákat kellene szekvenálni ahhoz hogy megfigyelhessük, hogy milyen a polimorfizmus a pusztai sasban. Abban az esetben ha mindig csak heterozigótákat detektálunk lehet, hogy a génnek több változata van a genomon belül (bár erre nem találtunk publikált adatot), vagy lehet egy pszeudogén ebben a fajban.

A Törökországban található kevert költő pár hím egyede pusztai sas fenotípusú. Az eredmények bizonyítják, hogy a hím eleve egy hibrid egyed mivel M parlagi mitokondriális haplotípusa van és két olyan mikroszatellita allélja amely a pusztai sasokra jellemző. Továbbá a STRUCTURE elemzések eredményei is ezt bizonyítják (10.-12. ábra, 'H' jelölés). Mivel a hibrid fészek összes egyedének mikroszatellita lókusztai feltérképezésre kerültek, megfigyeltük, hogy az egymást követő két évben nem cserélődtek a költő pár tagjai és mindkét évben neveltek két-két fiókát. Bár az első évben mindkét fióka elpusztult, a második évben sikeresen kirepültek. Tehát a hibrid egyed szaporodóképes és a fiókáinak tovább adta a parlagi és a pusztai sasokra is jellemző alléleket. Ezt bizonyítja az Aa02-es lókuszt, ami nem szaporodik fel a pusztai sasokban és a hím egyed ezen a lókuszon 159-es alléllal homozigóta. A pár tojó tagja ezen a lókuszon homozigóta a

154-es allélel. Az egyik 2013-as fióka ezen a lókuszon heterozigóta egy 154-es allélel és egy 159-es allélel, a másik fióka pedig homozigóta a 154-es allélel. Ebből arra következtettünk, hogy a homozigóta fióka a hibrid hím egyedtől a rosszul működő allélt kapta, amely nem szaporodik fel az amplifikálás során, továbbá a heterozigóta fióka mutatja, hogy a hímekben van működő allél amelyet a parlagi sas anyjától örökölhettek. Érdekes megfigyelés, hogy a STRUCTURE elemzések azt mutatták, hogy a költő pár egyedei keleti származású madarak lehetnek, mivel az oroszországi mintákkal egy csoportba tartoznak (tojó: 10%-ban a török populáció, 90%-ban keleti klaszter; hím: 40%-ban pusztai sas, 58%-ban keleti klaszter, 2%-ban török populáció; 12. ábra).

Megfigyeltük még, hogy az egyik oroszországi kevert területen található pusztai sas a STRUCTURE és a Geneland eredményei alapján hibrid egyednek tűnik (7.-9. ábra). A többi STRUCTURE ábrával összevetve is feltűnik, hogy ezt az egyedet a modellek 20%-ban a parlagi sashoz sorolják. A mitokondriális DNS kontroll régiója szerint pusztai haplotípussal rendelkezik ez az egyed. Ebben az esetben sem lehet kizárni, hogy ez az egyed hibrid, mivel az apa lehet egy parlagi sas. Az ivarmeghatározás alapján egy tojóról van szó. További vizsgálatok lennének szükségesek, mert ebből a territóriumából csak ez az egy fióka mintánk van, tehát jelenleg a szülőket sem tudjuk feltérképezni. Ebben az évben mindenképpen kellene gyűjteni mintát a felnőtt madaraktól, ezt javasolni fogjuk az orosz kollégáknak. A terület közvetlen közelében ahonnan ez a minta származik egy parlagi sas pár költ.

A Geneland által végzett elemzések szerint a két mintavételi hely földrajzi távolságának figyelembevétele miatt egy pontban eltérnek az eredmények a STRUCTURE elemzésekhez képest. Az oroszországi kevert területen található 3 pusztai sasnál látható egy határ és a 3 madár közül egyet sorol pusztai sasok klaszterébe és kettőt sorol a közelben lévő parlagi sasok klaszteréhez (9. ábra).

Az F_{st} értékek alapján az oroszországi kevert területen található parlagi sasok és pusztai sasok között kisebb a genetikai távolság mint a parlagi sasok és a tiszta területen előforduló pusztai sasok között (12. táblázat).

A STRUCTURE ábrákat összevetve elmondhatjuk, hogy a parlagi és pusztai sasok a 9 mikroszatellita lókuszon alapján szépen elkülönülnek egymástól. Ezenkívül láthatjuk, hogy a pusztai sasok egészen homogén állományt mutatnak. Továbbá megfigyelhető, hogy a törökországi parlagi sasok teljes mértékben eltérnek az oroszországi madaraktól és az egyéb területekről származóktól (12. ábra). Továbbá általánosan megfigyelt mintázat, hogy a Balkáni parlagi sas populációk eltérnek a Keleti populációktól és a Kárpát-medencei populációk jobban hasonlítanak a keletiekre. Ezt támasztják alá a mitokondriális DNS kontroll régiójának haplotípusai is, mivel a törökországi

populációban E, G, I, K, és M haplotípusok kerültek elő (6. ábra). A korábbi vizsgálatok alapján a Kárpát-medencei populációkban D, E, G, I, K, L, és S haplotípusok fordulnak elő (Nóra et al. 2009, Vili 2009b, Vili and Szabó 2013). Az orosz populációkban csak az E haplotípust találtuk meg. Ez a haplotípus a török populációkban 20%-ban található meg, a Kárpát-medencei populációkban pedig több mint 50%-ban fordul elő, ami tovább erősíti a kárpát-medencei és az oroszországi populációk hasonlóságát. Ennek oka az lehet, hogy a jégkorszakban két fő területre koncentráldott a túlélő parlagi sasok állománya, az egyik terület a Balkáni-félsziget, a másik pedig a Kaukázus környéke (Kovács et al. in prep.). Az F_{st} értékek alapján is a Kárpát-medencei parlagi sasok genetikailag közelebb állnak a keleti területen előfordulókhhoz, mint a közelebb fekvő balkáni populációkhoz (12. táblázat).

Eddig nem sokan mérték fel a pusztai sasok genetikai állományát, így például kevés adat van a haplotípusokra nézve (Martinez-Cruz, B. & Godoy, J.A.). Jelenleg összesen 3 haplotípus szekvenciája található meg a génbankban. A 18 tiszta pusztai sas területről származó mintákból nekünk 14-ből sikerült DNS-t kivonni. Ebből a 14 mintából 2 új pusztai sas haplotípust (7-es és 8-as) határoztunk meg és az ismert haplotípusok közül csak a 2-est. Két állatkerti pusztai sast is megvizsgáltunk és mindkettőnek eddig nem publikált haplotípusa volt (4-es és 5-ös). Továbbá a kevert területről származó pusztai sasokban találtunk még egy újabb haplotípust (6-os) (11. táblázat).

Sokáig vélték úgy az irodalomban, hogy az ibériai sas (*Aquila adalberti*) a parlagi sasnak egy alfaja, mivel csak kisebb eltérések vannak a táplálék bázisban és a szaporodás biológiájukban, továbbá a felnőtt tollazatban is kevés különbség figyelhető meg (Begoña Martínez-Cruz and Godoy 2007). A genetikai vizsgálatok eredményei alapján csak 1 millió éve váltak el egymástól (B Martínez-Cruz et al., 2007a). Egyes vizsgálatok szerint még később váltak szét (B Martínez-Cruz et al., 2007b). Viszont a nagy földrajzi távolság miatt feltehetőleg nincs recens génáramlás, ezért is érdekes, hogy mi találtunk bizonyítékot hibridizációra egy parlagi sas és egy távolabbi rokona között, amivel az ibériai sassal ellentétben van közös költő területe. Továbbá érdekes, hogy megfigyelték Spanyolországban, hogy egy kiszabadult pusztai sas együtt költött egy ibériai sassal. Az *Aquila* genuson belül jól kutatott a békászó és fekete sas hibridizációja (Váli and Löhmus 2004, Váli 2010, Helbig, Seibold, et al. 2005), ezért is lenne érdemes vizsgálni a hibridizáció mértékét és következményeit más *Aquila* fajok esetében is.

Törökországban egy régebbi adat (Birdlife International 2001) alapján található egy kisebb izolált pusztai sas populáció. Ezt az adatot ellenőrizni kell és a Nemzetközi Parlagi Sas Védelmi Munkacsoport tagjai javaslatunk alapján, jelenleg most mérik fel a lehetséges pusztai sas költő

párokat. Mint már korábban említettem a parlagi sasoknak sérülékeny ('VU') a státusza a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) vörös listáján, ezért fontos lenne, hogy a lehetséges hibridizációt figyelembe vegyék a védelmi programokban. A hibridizáció megfelelő vizsgálatához mindenféleképpen több nukleáris markert (például SNP-eket) kellene bevonni úgy mint a békászó és fekete sas vizsgálatában (Váli, 2010). Oroszország területén egy biztos és stabil állománya található a parlagi sasnak. Így, ha esetleg van egy hibrid zóna vagy kialakulóban van, megfelelő helyszíne lehet annak megfigyelésére, hogy a fajok közötti különbségek hogyan alakulnak és maradnak fent az idő során (Hewitt 1988), esetleg hogyan tűnnek el. Ehhez azonban további minták szükségesek a feltételezett hibrid zónából és a tiszta parlagi sas költő területekről.

5. Összefoglalás

A hibridizáció már régen foglalkoztatja a kutatókat, viszont főleg a molekuláris technikák megjelenésétől kezdtek el kutatni annak hatásait és az evolúcióban betöltött szerepét.

A parlagi sas (*Aquila heliaca*, Savigny, 1809) és a pusztai sas (*Aquila nipalensis*, Hodgson, 1833) közötti lehetséges hibridizációról eddig nem jelent meg publikáció. A Nemzetközi Parlagisavédelmi Munkacsoport tagjaitól már több jelentés is érkezett, hogy láttak kevert jellegekkel rendelkező egyedeket. Törökországban a terepi munka során felfigyeltek egy kevert költő párra, mely egy parlagi fenotípusú tojóból és egy pusztai fenotípusú híméből állt. A két faj közötti hibridizáció vizsgálata azért is érdekes lehet, mert például Oroszországban a két faj elterjedésének határán együtt költöttek parlagi és pusztai sas párok.

Mintáink Törökország – Anatólia tartományból (25 db parlagi sas és 1 db feltételezett hibrid) és Oroszország, Altaj-hegység területéről származtak (11 db parlagi sas és 25 db pusztai sas). Oroszországban az egyik területen együtt költöttek parlagi és pusztai sas párok, a másik területen pedig csak pusztai sas párok vannak.

Célunk az volt, hogy a terepi megfigyeléseket igazolva megfelelő markereket találjunk a két faj elkülönítésére és a hibrid egyedek detektálására. Nukleáris génszakaszok közül a RAG-1-et és az adenilát-kinázt vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a RAG-1 szakasszal nem tudjuk a fajokat elkülöníteni, míg az adenilát-kinázzal igen, viszont a hibrid egyedek nem lehet detektálni ezzel a szakasszal sem. A mitokondriális kontroll régió alapján a két faj megfelelően elkülöníthető és a hibrid egyedek anyai leszármazása megállapítható. A Törökországban megfigyelt kevert költő pár fenotípusosan pusztai hím egyede parlagi haplotípussal rendelkezett. A publikált haplotípusok mellett a pusztai sasokban találtunk 5 új haplotípust. A gén szakaszokon kívül vizsgáltunk még 2 tetra és 7 dinukleotid mikorszatellita lókuszt. Az egyed alapú vizsgálatok eredményei alapján bizonyosságot nyert, hogy a törökországi kevert pár hím egyede hibrid. Továbbá az oroszországi kevert területen is találtunk egy hibrid gyanús pusztai sas egyedet.

Mindenféleképpen érdemes lenne az oroszországi és a törökországi területeket jobban feltérképezni és a terepen jobban odafigyelni a kevert jellegeket mutató egyedekre, azoktól mintát venni és elemezni. Jelenleg nincs adat arról, hogy milyen kiterjedt lehet a hibridizáció a két faj között.

6. Summery

For a long time researcher investigate the question of hybridization, especially since the molecular techniques have been improved. Due to these improvements it is possible to study it's effects and role in the evolutionary processes.

Any proof of hybridization between the Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*, Savygny, 1809) and the Steppe Eagle (*Aquila nipalensis*, Hodgson, 1833) hasn't been published yet. Some observations about individuals with mixed phenotypic traits were reported by the members of the International Imperial Eagle Working Group. For example in Turkey they have found a mixed pair, with an Imperial Eagle phenotypic female and a Steppe Eagle phenotypic male. Furthermore for instance in Russia several breeding pairs breed at the edge of the species's distributional area, therefore studies of their possible hybridization would be also interesting.

Samples were collected from Turkey-Anatolia (n=25 Imperial Eagles and one putative hybrid) and from Russia (Altaj Mountains: n=11 Imperial Eagle and n=25 Steppe Eagle). Imperial and Steppe Eagle breeding territories also can be found at an overlapping area of Altaj Mountains, from where 450 km far breed only Steppe Eagle pairs. We had samples from both sites.

The aim of our study was to improve genetic marker set to distinguis the species and to detect the apperance of hybrids confirming the field observations. Nuclear markers, parts of RAG-1 and the adenylate-kinase genes were sequenced. Our results showed that the species cannot be separated by the RAG-1, only by using the adenylate-kinase genes, however this marker cannot be used to detect hybrids. Haplotypes of the mitochondrial control region were very different between the species, so the maternal lineage for each individual can be determined. The male of the mixed pair in Anatolia with Steppe Eagle phenotype had Imperial Eagle characteristic haplotype. Trough our research we have found five new haplotypes among the steppe eagles. Using two tetra and seven dinucleotide microsatellite loci we determined the DNA-profiles of each bird. Based on microsatellites the individual based analyses confirmed that the male of the mixed pair in Turkey can be considered as a hybrid. Furthermore we found another putative hybrid among the Russian Steppe Eagles at the mixed area.

It will be important to monitoring the breeding pairs at the Russian overlapping and at the Turkish area, because currently there is no data about how widespread is the hybridization among this two species.

7. Irodalomjegyzék, hivatkozások

- Abbott, A. et al. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.
- Abernethy, K. (1994). The establishment of hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*). *Molecular Ecology*, 3(6), 551–562.
- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P., & Wenburg, J. K. (2001). The problems with hybrids setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(11), 613–622.
[http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X)
- Anderson, E. ., & Thompson, E. A. (2002). A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, 160, 1217–1229.
- Arnold, M. L. (1992). Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Reviews*, 23, 237–261.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Barton, N. H., & Hewitt, G. M. (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 16, 113–148.
- Borge, T., Lindroos, K., Nádvorník, P., Syvänen, A.-C., & Saetre, G.-P. (2005). Amount of introgression in flycatcher hybrid zones reflects regional differences in pre and post-zygotic barriers to gene exchange. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(6), 1416–24.
<http://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00964.x>
- Brelsford, A., Milá, B., & Irwin, D. E. (2011). Hybrid origin of Audubon’s warbler. *Molecular Ecology*, 20(11), 2380–2389. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05055.x>
- Brelsford, A. (2011). Hybrid speciation in birds: allopatry more important than ecology? *Molecular Ecology*, 20, 3705–3707.
- Busch, J. D., Katzner, T. E., Bragin, E., & Keim, P. (2005). Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaeetus eagles. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 39–41.
- Clark, W. S. (2005). Steppe Eagle *Aquila nipalensis* is monotypic. *The Bulletin of the British Ornithologists’ Club*, 125, 149–153.
- Corso, A., & Forsman, D. (2008). A hybrid Imperial eagle x Golden eagle in Romania.
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Sinauer Associates.
- Del Hoyo, J., Sargatal, J., & Elliot, A. (1994). *Handbook of the birds of the World. Vol.2. Falconiformes to Galliformes*. Lynx Edicions.
- Demerdzhiev, D. A., Stoychev, S. A., Terziev, N. G., & Angelov, I. D. (2011). Status of the eastern Imperial eagle (*Aquila heliaca*) in the European part of Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, 87–

- Dobzhansky, T. (1940). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press.
- Elorriaga, J., & Muñoz, A.-R. (2013). Hybridisation between the Common Buzzard *Buteo buteo* and the North African race of Long-legged Buzzard *Buteo rufinus cirtensis* in the Strait of Gibraltar: prelude or prelude to colonisation? *Ostrich: Journal of African Ornithology*, 84(1), 41–45. <http://doi.org/10.2989/00306525.2013.772922>
- Fridolfsson, A.-K., & Ellegren, H. et al. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 30, 116–121.
- Futuyma, D. J. (2013). *Evolution* (3. ed.). State University of New York at Stony Brook.
- Gompert, Z., Fordyce, J. A., Forister, M. L., Shapiro, A. M., & Nice, C. C. (2006). Homoploid hybrid speciation in an extreme habitat. *Science*, 314, 1923–1925.
- Grant, P. R., & Grant, B. R. (1992). Hybridization of bird species. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054), 193–197. <http://doi.org/10.1126/science.256.5054.193>
- Grant, P. R., & Grant, R. B. (2014). *40 Years of Evolution: Darwin's Finches on Daphne Major Island*. Princeton University Press.
- Guillot, G., Mortier, F., & Estoup, A. (2005). GENELAND: A computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 712–715. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x>
- Haavie, J., Borge, T., Bures, S., Garamszegi, L. Z., Lampe, H. M., Moreno, J., ... Saetre, G.-P. (2004). Flycatcher song in allopatry and sympatry - convergence, divergence and reinforcement. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(2), 227–237. <http://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2003.00682.x>
- Haldane, J. B. S. (1992). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics*, 12, 101–109.
- Harrison, R. G. (1993). *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press.
- Helbig, A. J. (2005). A multi-gene phylogeny of aquiline eagles (Aves: Accipitriformes) reveals extensive paraphyly at the genus level. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(1), 147–164. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.10.003>
- Helbig, A. J., Kocum, A., Seibold, I., & Braun, M. J. (2005). A multi-gene phylogeny of aquiline eagles (Aves: Accipitriformes) reveals extensive paraphyly at the genus level. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(1), 147–64. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.10.003>
- Helbig, A. J., Seibold, I., Kocum, A., Liebers, D., Irwin, J., Bergmanis, U., ... Bensch, S. (2005). Genetic differentiation and hybridization between greater and lesser spotted eagles (Accipitriformes: *Aquila clanga*, *A. pomarina*). *Journal of Ornithology*, 146(3), 226–234. <http://doi.org/10.1007/s10336-005-0083-8>
- Hewitt, G. M. (1988). Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology*

& *Evolution*, 3(7), 158–167.

- Horváth, M., Haraszthy, L., Bugyura, J., & Kovács, A. (2002). Eastern Imperial eagle (*Aquila heliaca*) populations in Europe. *KvVM Természetvédelmi Hivatal*, 107, 193–204.
- Horváth, M., Martinez-Cruz, B., Negro, J. J., Kalmár, L., & Godoy, J. A. (2005). An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*, 36(1), 84–88.
- Horváth, M., Szitta, T., Firmánszky, G., Solti, B., Kovács, A., & Moskát, C. (2010). Spatial variation in prey composition and its possible effect on reproductive success in an expanding Eastern Imperial Eagle (*Aquila Heliaca*) population. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 56(2), 187–200. Retrieved from http://actazool.nhmus.hu/56/2/AZH_56_2_Horvath.pdf
- Hull, J. M., Savage, W., Smith, J. P., Murphy, N., Cullen, L., Hutchins, A. C., & Ernest, H. B. (2007). Hybridization among buteos: Swainson's Hawks (*Buteo Swainsoni*) × Red-Tailed Hawks (*Buteo Jamaicensis*). *The Wilson Journal of Ornithology*, 119(4), 579–584. <http://doi.org/10.1676/06-154.1>
- Jacobsen, F., & Omland, K. E. (2011). Increasing evidence of the role of gene flow in animal evolution: hybrid speciation in the yellow-rumped warbler complex. *Molecular Ecology*, 20, 2236–2239.
- Jiggins, C. D., Salazar, C., Linares, M., & Mavarez, J. (2008). Hybrid trait speciation and *Heliconius* butterflies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1506), 3047–3054. <http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0065>
- Karyakin, I. V., Nikolenko, E. G., & Bekmansurov, R. H. (2009). Imperial Eagle in the Altai Mountains.
- Karyakin, I. V., Nikolenko, E. N., Levin, A. S., & Kovalenko, A. V. (2011). Imperial eagle in Russia and Kazakhstan: population status and trends. *Acta Zoologica Bulgarica*, 95–104.
- Khan, A. A., Khan, R., Ullah, A., & Ali, M. (1996). Conservation perspectives of the Imperial *Aquila heliaca* and Steppe eagle *Aquila nipalensis* in Pakistan. *Eagle Studies*, 459–461.
- Koen, E. L., Bowman, J., Lalor, J. L., & Wilson, P. J. (2014a). Continental-scale assessment of the hybrid zone between bobcat and Canada lynx. *Biological Conservation*, 178, 107–115.
- Koen, E. L., Bowman, J., Lalor, J. L., & Wilson, P. J. (2014b). Continental-scale assessment of the hybrid zone between bobcat and Canada lynx. *Biological Conservation*, 178, 107–115. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.07.016>
- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (1994). MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 189–191.
- Lundberg, A., & Alatalo, R. V. (2010). *The Pied flycatcher*. T & AD Poyser.
- Maheshwari, S., & Barbash, D. a. (2011). The genetics of hybrid incompatibilities. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 331–355. <http://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132514>

- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 229–237. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.010>
- Martinez-Cruz, B., Godoy, J. a, & Negro, J. J. (2004). Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology*, 13(8), 2243–55. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02220.x>
- Martínez-Cruz, B., Godoy, J. a, & Negro, J. J. (2002). Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology ...*, 323–326. <http://doi.org/10.1046/j.1471-8278>
- Martínez-Cruz, B., Godoy, J. a, & Negro, J. J. (2007a). Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish imperial eagle. *Molecular Ecology*, 16(3), 477–486. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03147.x>
- Martínez-Cruz, B., Godoy, J. a, & Negro, J. J. (2007b). Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish imperial eagle. *Molecular Ecology*, 16(3), 477–86. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03147.x>
- Martínez-Cruz, B., & Godoy, J. A. (2007). Genetic evidence for a recent divergence and subsequent gene flow between Spanish and Eastern imperial eagles. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 170. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-7-170>
- Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution*.
- Mayr, E. (2002). *What Evolution is*. Basic Books.
- Mullarney, K., Grant, P. J., Svensson, L., & Zetterström, D. (2011). *Madárhatározó*. Budapest: Park Könyvkiadó.
- Nolte, A. W., & Tautz, D. (2010). Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends in Genetics : TIG*, 26(2), 54–58. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2009.12.001>
- Nóra, V., B, H. M., Szilvia, K., Chavko, J., Erzsébet, H., Lajos, K., ... Kalmár, E. H. L. (2009). Alternative sampling methods in avian genetic studies: sexing, microsatellites based individual identification and mtDNA analyses of eastern imperial eagles (*Aquila heliaca*), 131, 426–435.
- Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: Genetic Analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *The Australian National University, Canberra, Australia*, 6(1), 288–295.
- Petit, C., Bretagnolle, F., & Felber, F. (1999). Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. *TREE*, 14, 306–311.
- Pierce, R. J. (1984). The changed distribution of stilts in New Zeland. *Notornis*, 31(March), 7–18.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using

- multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Qvarnström, A. et al. (2006). Song similarity predicts hybridization in flycatchers. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(4), 1202–1209.
- Randler, C. (2002). Avian hybridization, mixed pairing and female choice. *Animal Behaviour*, 63(1), 103–119. <http://doi.org/10.1006/anbe.2001.1884>
- Randler, C. (2006). Behavioural and ecological correlates of natural hybridization in birds. *Ibis*, 148(3), 459–467. <http://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2006.00548.x>
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49(6), 1280–1283.
- Rhymer, J. M., & Simberloff, D. (1996). Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 83–109. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>
- Rhymer, J. M., Williams, M. J., & Braun, M. J. (1994). Mitochondrial analysis of gene flow between New Zealand mallards (*Anas platyrhynchos*) and Grey ducks (*A. superciliosa*). *The Auk*, 111, 970–978.
- Rudnick, J. a, Katzner, T. E., Bragin, E. a, Rhodes, O. E., & 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. *Molecular Ecology*, 14(10), 2959–2967. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02641.x>
- Ryabtsev, V. V., & Katzner, T. E. (2007). Severe declines of Eastern Imperial Eagle *Aquila heliaca* populations in the Baikal region, Russia: a modern and historical perspective. *Bird Conservation International*, 17(03), 197–209. <http://doi.org/10.1017/S0959270907000755>
- Schwenk, K., Brede, N., & Streit, B. (2008). Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363, 2805–2811.
- Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4), 198–207. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.003>
- Seibold, I., Helbig, A. J., Meyburg, B.-U., Negro, J. J., & Wink, M. (1996). Genetic differentiation and molecular phylogeny of European Aquila Eagles according to cytochrome b nucleotide sequences. *Meyburg B-U. & R.D. Chancell (eds) Eagle Studies*.
- Short, L. L. (1969). Taxonomic aspects of avian hybridization. *The Auk*, 86, 84–105.
- Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Staden, Rodger*, 5(3), 233–241.
- Steeves, T. E., Maloney, R. F., Hale, M. L., Tylanakis, J. M., & Gemmill, N. J. (2010). Genetic analyses reveal hybridization but no hybrid swarm in one of the world's rarest birds. *Molecular Ecology*, 19(23), 5090–100. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04895.x>

- Suh, A., Kriegs, J. O., Brosius, J., & Schmitz, J. (2011). Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 28(11), 2993–2997. <http://doi.org/10.1093/molbev/msr147>
- Taberlet, P., & Luikart, G. (1997). Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 41–55.
- Tingay, R. E., Sureda, N., & Gilbert, M. (2008). Steppe Eagle (*Aquila nipalensis*) foraging behavior in Mongolia: A combined use of diversionary and covert ambush tactics? *Journal of Raptor Research*, 42(2), 155–156. <http://doi.org/10.3356/JRR-07-52.1>
- Turelli, M., & Begun, D.-J. (1997). Haldane's rule and X-chromosome size in *Drosophila*. *Genetics*, 147, 1799–1815.
- Väli, Ü. et al. (2010). Widespread hybridization between the Greater spotted eagle *Aquila clanga* and the Lesser spotted eagle *Aquila pomarina* (Aves: Accipitriformes) in Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 100, 725–736.
- Väli, Ü., & Lõhmus, A. (2004). Nestling characteristics and identification of the lesser spotted eagle *Aquila pomarina*, greater spotted eagle *A. clanga*, and their hybrids. *Journal of Ornithology*, 145(3), 256–263. <http://doi.org/10.1007/s10336-004-0028-7>
- Vili, N. (2009a). Alternative sampling methods in avian genetic studies: sexing, microsatellites based individual identification and mtDNA analyses of eastern imperial eagles (*Aquila heliaca*). *Magyar Állatorvosok Lapja*, 131, 426–435.
- Vili, N. et al. (2009b). Genetic structure of the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population in Slovakia. *Raptor Protection of Slovakia*, (3), 21–28.
- Vili, N., Nemesházi, E., Kovács, S., Horváth, M., Kalmár, L., & Szabó, K. (2013). Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling. *Journal of Ornithology*, 154(2), 587–595. <http://doi.org/10.1007/s10336-013-0932-9>
- Vili, N., & Szabó, K. et al. (2013). High turnover rate revealed by non-invasive genetic analyses in an expanding eastern imperial eagle population. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 59(3), 279–295.
- Wirtz, P. (1999). Mother species–father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Animal Behaviour*, 58, 1–12.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Pásztory-Kovács Szilviának a sok türelmet és segítséget amellyel hozzájárult jelen dolgozat létrejöttéhez. Továbbá köszönöm Szabó Krisztiának és Nemesházi Edinának, hogy segítettek elsajátítani a labormódszerek fortélyait. Valamint köszönöm még társtémavezetőmnek, Dr. Horváth Mártonnak.

Köszönet illeti még a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület Parlaxisvédelmi Munkacsoportját és a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumának munkatársait

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak a támogatást.

9. Függelék

1. táblázat: Oroszországi minták: megfigyelt (H_o) és várt (H_e) heterozigócia értékek

Populáció	Lókusz	H_o	H_e
1	Aa02	1,000	0,755
	Aa34	0,857	0,837
	Aa36	0,714	0,673
	Aa39	1,000	0,786
	Aa43	0,429	0,459
	G09	0,714	0,571
	G11	0,714	0,541
	Aa56	1,000	0,714
	Aa27	0,167	0,375
2	Aa02	0,000	0,000
	Aa34	0,000	0,667
	Aa36	0,333	0,611
	Aa39	1,000	0,778
	Aa43	0,333	0,611
	G09	1,000	0,611
	G11	0,667	0,722
	Aa56	0,667	0,500
	Aa27	0,667	0,722
3	Aa02	0,000	0,000
	Aa34	0,462	0,734
	Aa36	0,714	0,724
	Aa39	0,786	0,816
	Aa43	0,786	0,776
	G09	0,917	0,722
	G11	0,357	0,768
	Aa56	0,786	0,694
	Aa27	0,250	0,219

1 – Kevert terület, parlagi sasok

2 – Kevert terület, pusztai sasok

3 – Tiszta terület, pusztai sasok

2. táblázat: Oroszországi minták: lókuszonkénti allélgyakoriságok

Lókuszt	Allél	1	2	3
		N=7	N=3	N=14
Aa02	152	0,36	0,00	0,00
	154	0,21	0,00	0,00
	159	0,14	0,00	0,00
	161	0,21	0,00	0,00
	163	0,07	0,00	0,00

Aa35	250	0,07	0,00	0,00
	252	0,14	0,00	0,00
	254	0,21	0,00	0,00
	256	0,14	0,00	0,00
	258	0,14	0,00	0,00
	264	0,00	0,33	0,00
	266	0,00	0,00	0,04
	268	0,21	0,00	0,00
	270	0,00	0,33	0,19
	272	0,00	0,33	0,35
	274	0,07	0,00	0,31
	276	0,00	0,00	0,12

Aa36	112	0,00	0,17	0,25
	114	0,21	0,00	0,00
	116	0,50	0,50	0,04
	118	0,07	0,33	0,36
	120	0,00	0,00	0,04
	122	0,14	0,00	0,04
	124	0,07	0,00	0,29

Aa39	173	0,00	0,00	0,04
	183	0,00	0,00	0,07
	185	0,00	0,17	0,18
	187	0,00	0,17	0,21
	189	0,00	0,17	0,29
	191	0,00	0,33	0,04
	192	0,14	0,00	0,00
	194	0,29	0,00	0,00
	196	0,29	0,00	0,00
	197	0,00	0,00	0,11
	198	0,07	0,00	0,00
	200	0,14	0,17	0,00
	204	0,07	0,00	0,00
	207	0,00	0,00	0,07

Lókuszt	Allél	1	2	3
		N=7	N=3	N=14
Aa43	101	0,00	0,00	0,04
	106	0,00	0,00	0,14
	108	0,00	0,17	0,18
	110	0,00	0,50	0,36
	112	0,14	0,33	0,18
	114	0,07	0,00	0,00
	116	0,71	0,00	0,11
	120	0,07	0,00	0,00

G09	477	0,14	0,50	0,21
	481	0,29	0,17	0,00
	489	0,57	0,00	0,38
	493	0,00	0,00	0,29
	506	0,00	0,33	0,08
	510	0,00	0,00	0,04

G11	327	0,14	0,17	0,29
	331	0,07	0,33	0,07
	335	0,14	0,00	0,32
	339	0,64	0,33	0,07
	343	0,00	0,17	0,18

Aa56	251	0,07	0,17	0,11
	253	0,14	0,00	0,04
	254	0,00	0,00	0,04
	255	0,00	0,17	0,43
	257	0,00	0,67	0,32
	259	0,07	0,00	0,07
	261	0,36	0,00	0,00

Aa27	92	0,00	0,33	0,88
	96	0,00	0,17	0,00
	98	0,25	0,33	0,13
	100	0,75	0,17	0,00
	102	0,00	0,00	0,00

1 – Kevert terület, parlagi sasok

2 – Kevert terület, pusztai sasok

3 – Tiszta terület, pusztai sasok