

Állatorvostudományi Egyetem
Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Extra-pár fertilitás vizsgálata egy telepesen költő ragadozó madárnál

Készítette: Bertók Péter

Témavezető: Szabó Krisztián

Állatorvos-tudományi Egyetem, Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Budapest

2017

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1 Az extra-pár fertilizáció jelensége és lehetséges evolúciós magyarázatai	3
2.2 A fajon belüli fészekparazitizmus jelensége.....	6
2.3 Mikroszatellita markerek és „cross-species” alkalmazásuk	7
3. Célkitűzések.....	8
4. Anyag és módszerek	10
4.1 A vizsgált faj.....	10
4.2 A felhasznált minták.....	11
4.3 Az apasági vizsgálatokhoz felhasznált genetikai markerek kiválasztása	11
4.4 DNS kivonás vér-, és tollmintákból.....	12
4.5 A PCR reakciók	14
4.6 A markerek polimorfizmusának megállapítása, genotipizálás	15
4.7 A markerkészlet leíró statisztikái.....	16
4.8 Az extra-pár fiókák azonosítása.....	17
5. Eredmények.....	17
5.1 A kiválasztott markerek polimorfizmusa kék vércsében és a nullallél-gyakoriságok	17
5.2 A markerkészletünk megbízhatósága.....	21
5.3 Az extra pár fiókák azonosítása	22
6. Diskusszió.....	23
7. Összefoglalás	28
8. Summary	29
9. Köszönetnyilvánítás	30
10. Irodalomjegyzék	31

1. Bevezetés

Az állatvilágban számtalan rendkívüli példát láthatunk a különböző szaporodási rendszerekre, de monogámiával csak az állatfajok kis hányadában találkozhatunk. Ezzel szemben a madaraknál igen gyakorinak tekintették, ami különlegességnek számított az állatvilágban. A madárfajok több, mint felénél állapítottak meg monogám szaporodási rendszert.

További megfigyelések viszont számos madárfajnál kétségbe vonták ezt az elméletet. Több monogámnak hitt madár esetében tapasztalták, hogy a már párt választott egyedek nem a párjukkal létesítenek szexuális kapcsolatot. A modern molekuláris módszerek megjelenésével pedig bizonyítani is tudták, hogy e párosodások eredményeképp némely fióka biológiailag nem a tojó által választott szociális apától származik.

A jelenséget extra-pár fertilizációnak (innenről röviden EPF) nevezték el, és számos madárfaj esetében sikerült kimutatni. Az EPF számos kérdést von maga után, elsősorban a vele járó előnyökkel kapcsolatban. Miért éri meg a hímeknek monogám szociális kapcsolatot fenntartani párjukkal, ha olyan utódokat is fel kell nevelniük, amelyek nem az övék? Továbbá miért teszik ki magukat a tojók más hímekkel való párzásnak, ha ezzel utódjaik számát nem tudják növelni? Telepesen költő madarak esetében is gyakori az EPF, tovább növelve a hátrányok számát, amelyeket a kolóniákban való szaporodás jelent. Így az EPF, a költőtelepek evolúcióját vizsgáló kutatásokban is nagy szerepet kap.

Ahhoz, hogy jobban megérthessük az EPF jelenlétének és kialakulásának okait, minél több információra van szükség az EPF meglétéről és mértékéről az egyes madárfajokban. Szakdolgozati munkám során az EPF mértékét vizsgáltam molekuláris módszerekkel egy monogám, telepesen költő, ragadozó madárnál, a kék vércsénél (*Falco vespertinus*). A kék vércse Magyarországon fokozottan védett, valamint a faj extra-pár viselkedéséről igen keveset tudunk, ezért találtuk érdekesnek ezen a fajon elvégezni vizsgálatunkat.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az extra-pár fertilizáció jelensége és lehetséges evolúciós magyarázatai

Az állatvilágban számos szaporodási rendszert figyelhetünk meg, amelyek a gerincesek körében a legszembetűnőbbek (pl.: Dunbar 1982). Azonban még a gerincesek körében is ritkán láthatunk példát valódi monogámiára, vagyis arra, mikor egy bizonyos állatfaj egyedei egy szaporodási időszak, vagy akár egész életük során egyetlen párt választanak maguknak, és ez idő alatt csak ezzel az egyeddel párosodnak (Wittenberger and Tilson, 1980). Ez még az ember esetében sem általános.

Ezért számítottak e téren különlegesnek a madarak, mivel az emlősökkel és más gerincesekkel ellentétben a madárfajok nagy részéről azt feltételezték, hogy monogám szaporodási rendszerben élnek (Lack, 1968). Az elmúlt évtizedek eredményei alapján viszont ez az elmélet megdőlni látszik. Számos monogám szaporodási rendszerben élő madárfaj esetében, ragadozó,- és énekes madarak esetében egyaránt észleltek páron kívüli, vagyis extra-pár kopulációkat (innenről röviden EPC)(pl.: Birkhead et al., 1990; Ewen et al., 2004; Negro et al., 1992). Az EPC során az egyedek a választott párjuktól eltérő egyeddel párosodnak (McKinney et al., 1984; Birkhead et al., 1987), amely némely esetben azt eredményezheti, hogy a tojó által lerakott tojások egy részét egy páron kívüli hím termékenyíti meg, míg a tojások többségét a tojó által választott hím. Ez azért lehetséges, mert a tojó madarak képesek a spermát hosszabb ideig tárolni (Tienhoven, 1983), így a tojásrakás idején a tojások a tojásban tárolódó különböző eredetű hímivarsejtekkel termékenyítődnek meg, a legutóbbi párzásból származóval a legnagyobb valószínűséggel (McKinney et al., 1984). Ezt a jelenséget nevezzük EPF-nek, mely során extra-pár hímek sikeresen termékenyítenek meg tojást. EPF alkalmával a választott vagyis szociális apák tudtukon kívül nevelik fel a fiókákat amelyek biológiailag másik hímtől származnak (Westneat et al., 1990).

Az EPC-k esetében nem egy ún. „besurranó-őrző” (sneakers-guarders) szaporodási rendszerről beszélünk, amelyben az egyes hímek szerepe állandó és vagy őrző vagy besurranó szerepet töltenek be (Parker, 1990). Ebben a rendszerben az „őrző” hímek párt választanak és igyekeznek minél több besurranók általi kopulációt megakadályozni, míg a „besurranó” hímek az „őrzők” területére lopakodnak be, hogy a nőtényükkel párosodhassanak, ezek az alternatív szaporodási stratégiák halaknál, hüllőknél és

emlősöknél is előfordulnak (Dunbar, 1982). Az EPC-k során a választott és extra-pár hímek szerepe nem állandó. A választott hím ugyanúgy párosodhat másik hím nőtényével, mint az ő párjával párosodó extra-pár hím, amelynek szintén lehet már választott párja (Parker, 1990).

Mára már az EPF a viselkedésökológia egyik legnépszerűbb kutatási témája. Az EPF jelenléte monogám szaporodási rendszerekben számos kérdést von maga után. Többek között, miért vesznek részt az egyedek EPC-kben, ha már kialakult egy stabil monogám rendszer? Mivel a hímeknek érdekesebb, minél több partnerrel párosodni az utódok számának növelése érdekében, így ez a hímek részéről viszonylag könnyen választ adhatna a kérdésünkre. Bár számos esetet ismerünk, mikor a hímek kényszerítik a tojókat EPC-re (McKinney et al., 1984; Ewen et al., 2004), a tojók csaknem ugyanolyan gyakran, ha nem gyakrabban, aktív kezdeményezők az extra-pár magatartásnak (Wagner, 1993; Double and Cockburn, 2000). Ez azért érdekes, mert egyrészt sem a pázások sem a partnerek száma nem növeli a tojó utódai létszámát (Bateman, 1948; Forstmeier et al., 2014). Valamint a tojó kockáztatja a hím „bosszúját” („male retaliation”), amely fiókákról való gondoskodás mértékének csökkenésében nyilvánulhat meg (pl.: fészek elhagyása) (Cezilly and Nager, 1995). Továbbá az extra-pár hímek nem nyújtanak se táplálkozás-, se gondoskodás-beli segítséget a tojónak (Villarroel et al., 1998; Forstmeier et al., 2014). Így feltételezhető, hogy a tojók valamiféle egyéb természetű adaptív előnyhöz jutnak az EPF által (Griffith et al., 2002), és csak akkor vállalják az EPF-el járó kockázatokat, ha a hímek általi visszavágásból származó költség alacsony (Møller and Curie, 2000; Arnold and Owens, 2002).

További kérdéseket vet fel az extra-pár viselkedés témájában az EPF ráták igen nagy varianciája, mely nem csak fajok, de egy fajba tartozó populációk között is tapasztalható (Petrie and Kempenaers, 1998; Griffith et al., 2002). Egyes fajoknál a fiókák akár 70%-a extra-pár hímtől származhat, míg másoknál eddig egyáltalán nem fedeztek fel extra-pár utódokat (Petrie and Kempenaers, 1998; Neudorf, 2004). A szociálisan monogám rendszerben élő madarak átlagos EPF rátája 10-20% között mozog (Griffith et al., 2002; Petrie & Kempenaers, 1998; Westneat & Sherman, 1997). Amennyiben feltételezzük, hogy az extra-pár magatartás irányítói főleg a tojók, akkor ez a variancia a számukra elérhető haszon és költség mértékének eltéréseiből adódhat (Petrie and Kempenaers, 1998; Griffith et al., 2002). Bár a pontos okok még ma sem teljesen tisztázottak, de feltételezhető, hogy a fajok közötti különbségek okai inkább evolúciósak, mintsem ökológiaiak (Arnold and Owens, 2002; Griffith et al., 2002). Ezek a különbségek a már évmilliók óta elvált madártaxonok között, a nagymértékben különböző szaporodási-, és életmenet-stratégiákból

adódhatnak. A „gyorsan” élő, nagy mortalitási rátájú, és a fiókák nevelésébe kevesebbet fektető hímekkel rendelkező fajok esetében nagyobb arányban fordulnak elő EPC-k és EPF-ek, mivel ezeknél a fajoknál a hím hiánya a fiókák nevelésekor csak kis mértékben csökkenti a tojók szaporodási sikerét (Arnold and Owens, 2002; Neudorf, 2004). Ezt igazolják például a *Falco* nemzetségbe tartozó nappali ragadozómadarak, amelyek hímjei tojásrakáskor és a fiókák nevelésekor nagy szerepet vállalnak a tojó és az utódok etetésében és gondozásában (Ille et al., 2002), és az EPF ráták igen alacsonyak náluk (Korpimäki et al., 1996; Negro et al., 1996; Villarroel et al., 1998).

A fajokon belüli, populációk közötti variancia megértéséhez, előbb a tojók EPF-ből származó lehetséges előnyeit érdemes jobban figyelembe venni. Számos hipotézis áll rendelkezésünkre az EPF adaptív funkciójáról, amelyek magyarázatot adhatnak a jelenség előnyös voltára (Petrie and Kempnaers, 1998; Akçay and Roughgarden, 2007; Forstmeier et al., 2014). A hipotézisek többsége indirekt, vagyis a fiókák minőségében megjelenő előnyöket tételeznek fel, de a direkt, tojó számára közvetlen előnyök sincsenek teljesen kizárva. A direkt előnyök általában valamiféle etetés-, vagy fészekvédelem-beli segítséget tételeznek fel az extra-pár hím részéről (Petrie and Kempnaers, 1998; Forstmeier et al., 2014). Esetleg az EPC-ért cserébe az extra-pár hímek megengedik a tojóknak, hogy a territóriumokon keressenek táplálékot (Petrie and Kempnaers, 1998).

A legnépszerűbb hipotézisek szerint az EPF adaptív funkciója, hogy genetikai előnyöket biztosít az extra-pár fiókáknak. Ezen hipotézisek lényege, hogy a tojók EPF segítségével genetikailag jobb minőségű extra-pár fiókákat hoznak világra, melyek túlélése és szaporodási sikere jobb, mint a páron belüli fiókáké (Petrie and Kempnaers, 1998; Foerster et al., 2003; Akçay and Roughgarden, 2007; Puurtinen et al., 2009). Ezt a tojók többféle stratégiával is elérhetik. Egyrészt, amennyiben képesek a tojók a hímek genetikai minőségét fenotípusos vagy viselkedésbeli jellegek alapján megítélni, akkor a párjuknál jobb minőségű hímmel létesített EPC, jobb minőségű fiókákat eredményezhet. A szakirodalomban ez az ún. „good genes” hipotézisként ismert (Akçay and Roughgarden, 2007; Forstmeier et al., 2014). A tojók nemcsak „jobb” génekkel növelhetik extra-pár fiókáik minőségét, hanem a genetikai diverzitás növelésével is, a beltenyésztettség elkerülése végett. Mivel a monogám rendszerekben a szexuális partnerek száma korlátozott, így amennyiben a tojó esetleg rokonságban áll az általa választott hímmel, a fiókáik túlélése a beltenyésztettség miatt romolhat. Genetikailag kevésbé hasonló hímekkel létesített EPC-k, kevésbé beltenyésztett fiókákat eredményezhetnek, így a tojók növelhetik néhány fiókájuk túlélési esélyét (Foerster et al., 2003). Habár ezek a hipotézisek kielégítő magyarázatot adhatnának az EPF

jelenségére, az esetek csaknem felében nem sikerült őket alátámasztani (Akçay and Roughgarden, 2007; Forstmeier et al., 2014; Reid et al., 2015). Így kellő bizonyíték híján, az EPF adaptív funkciója még mindig nem tisztázott.

Egy másik megközelítés alapján az EPF nem magyarázható adaptív funkciókkal, mivel a tojók számára maladaptív és a jelenséget ún. genetikai kényszerek okozhatják. A genetikai kényszerek pleiotrópia formájában jelenhetnek meg, vagyis egy gén vagy több kapcsolt gén egyaránt vált ki előnyös és hátrányos hatásokat. EPF esetében elképzelhető, hogy ilyen hátrányos hatás a tojók extra-pár magatartása, de az ehhez társuló előnyös hatás miatt mégis fennmarad a populációkban (Forstmeier et al., 2014).

Az EPF jelensége a kolóniák, költőtelepek evolúciós kutatásaiban is nagy jelentőséggel bír. A költőtelepek abból a szempontból evolúciós rejtvénynek számítanak, hogy az egyedek a fitneszük rovására szaporodnak magas denzitású területeken (Danchin and Wagner, 1997). Az EPC-k felfedezésével az EPF is belépett a kolonialitás feltételezett költségei közé (Moller and Birkhead, 1993), mivel a fészkelőhelyen lévő denzitás növekedésével az EPF aránya is nő (Westneat & Sherman, 1997). Egyes feltételezések szerint viszont az EPF nagy szerepet játszhatott a kolóniák kialakulásában. A tojók által aktívan keresett EPC-k vezethettek az egyedek csoportosulásához a fészkelőhelyeken (Wagner, 1993). Továbbá egyes kutatások szerint a tojók az extra-pár viselkedéssel próbálják a kolóniában található hímeket kooperációra készíteni. Mivel lehetséges, hogy a közeli fészkekben saját fiókáik is vannak, ezért az extra-pár hímek kevésbé agresszívan lépnek fel a behatóló szomszédokkal, valamint segítik egymás fészkeinek védelmét a ragadozókkal szemben (Eliassen and Jørgensen, 2014; Sheldon and Mangel, 2014).

A fentiekből megállapítható, hogy az EPF jelenlétére a monogám szaporodási rendszerekben, még korántsem sikerült biztos lábakon álló magyarázatot adni. A jelenség megértéséhez és a különböző hipotézisek alátámasztásához további kutatások, eredmények szükségesek. Minél több, életmódjukban és ökológiájukban különböző madárfaj EPF-re vonatkozó adatait kellene begyűjteni, hogy átfogóbb képet kapjunk a madarak e különös szaporodásbeli magatartására és hogy megérthessük evolúciós hátterét.

2.2 A fajon belüli fészekparazitizmus jelensége

Eddig csak azokról az extra-pár madárfiókákról volt szó, melyek biológiai apja nem a fészkekhez tartozó szociális apa. Azonban meg kell említeni azokat az eseteket is, mikor a fészkekhez tartozó anya nem a biológiai anyja fiókáknak. Ilyenkor beszélünk fajon belüli-

vagyis intraspecifikus fészekparazitizmusról („intraspecific brood parasitism”, innentől röviden IBP), amely során a tojók, akár csak a kakukk, más egyedek fészkébe tojják tojásukat, de a kakukktól eltérően nem másik faj fészkébe, hanem egyik fajtársukéba (Petrie and Moller, 1991). Parazitizmus, mivel a tojást más fészkébe lerakó tojóknak úgy nő fel egy vagy több fiókájuk, hogy nem kell gondoskodniuk róluk, míg a gazda pár időt és energiát áldoz olyan fiókák felnevelésébe, amelyek biológiailag nem is tőlük származnak.

Mára már számos példát ismerünk IBP-re a madárfajok körében (Yom-tov, 2001), énekesmadarak (Birkhead et al., 1990) és ragadozómadarak között is (Negro et al., 1996). Fészekhagyó fajok esetében viszont gyakoribb, mint fészeklakókéban, mivel egy fészekhagyó fióka nevelése kisebb költséggel jár, mint egy fészeklakóé, így az IBP ellenes stratégiák is kevésbé kidolgozottak. Továbbá a magas fekunditású fajoknál is magasabb általában az IBP ráta, mivel ezek a fajok amúgy is sok fióka felnevelésére specializálódtak, így eggyel több fióka nevelése nem kerül nagy költségbe (Sorenson, 1992; Arnold and Owens, 2002).

2.3 Mikroszatellita markerek és „cross-species” alkalmazásuk

Ma már tudjuk, hogy még a monogám szaporodási rendszerben élő madárfajok többségénél is található extra-pár fiókák. Azonban a modern molekuláris technikák megjelenése nélkül még most is csak találgatnánk. A megfigyelt EPC-k számából nem lehet az EPF mértékét kellő pontossággal megbecsülni, mert bár a kettő között található szignifikáns kapcsolat, azonban ez nem elegendő az extra-pár fiókák populációbeli arányának meghatározásához (Dunn and Lifjeld, 1994; Birkhead and Møller, 1995).

Ahhoz, hogy meg tudjuk állapítani egy fiókáról, hogy a fészekhez tartozó szülőktől származik, apasági, illetve anyasági tesztek szükségesek, amelyek a szülőkből és fiókáikból vett DNS minták összehasonlításával végezhetők el. A DNS minták összehasonlításához DNS-profilokat kell készíteni minden egyedről. A DNS profilokat lehetőleg minél több és minél változatosabb – vagyis minél több alléllal rendelkező – lókuszokból kell összeállítani, hogy a szülőket minél biztosabban ki lehessen zárni, mint az adott fióka biológiai szülőjét. Ehhez hasonló rokonsági viszonyok felderítéséhez manapság mikroszatellita lókuszokat alkalmaznak (Jones et al., 2010).

A mikroszatellita lókuszok 1-6 bázispár hosszúságú nukleotid szakaszok ismétlődései, amelyek nagy számban fordulnak elő a genomban és minden eddig vizsgált élőlényben

előfordulnak. Funkciójuk nem tisztázott, többnyire neutrálisnak mondhatóak (Li et al., 2002). A mikroszatelliták ún. hipervariábilis lókuszok, rendkívül változatosak, vagyis nagy allélszámmal rendelkeznek, amely az átlagosnál nagyobb mutációs rátájuknak köszönhető. Ezért ideálisak rokonsági viszonyokat feltáró vizsgálatokban. A mutációk során a mikroszatellita motívumok ismétlődéseinek száma változik meg, így különböző hosszúságú allélek alakulnak ki (Li et al., 2002; Ellegren, 2004).

Az egyes fajok egyedeinek genetikai azonosításához az adott fajra kidolgozott speciális markerkészletet alkalmazták. Azonban nem minden mikroszatellita marker fajra specifikus. Számos mikroszatellita lókusz előfordul és variábilisnek is mutatkozik közeli rokon fajokban, így bizonyos fajokra kidolgozott markerek használhatók taxonómiaiailag közel álló fajok genetikai vizsgálataiban (Primmer et al., 2005). Ezt a módszert „cross-species amplification” -nek, vagyis fajok közötti felszaporításnak nevezik, és rendkívül hasznos abban az esetben, ha egy adott fajra még nem elérhető kidolgozott markerkészlet. Madarak esetében is gyakran alkalmaznak „cross-species amplification” -t, és legtöbbször a másik fajban is polimorfnek bizonyulnak a felhasznált lókuszok. Nappali ragadozómadarakon, többek között a sólyomfélék családjába tartozó fajokon több esetben is sikeresen alkalmazták ezt a technikát (Dawnay et al., 2009; Nesje et al., 2000; Nesje & Røed, 2000; Padilla et al., 2009).

3. Célkitűzések

Szaktervezésemben az EPF mértékét vizsgálom egy telepesen költő, nappali ragadozó madárnál, a kék vércsénél (*Falco vespertinus*), mikroszatellita markerek segítségével. A kék vércse Magyarországon fokozottan védett madaraink egyike, eszmei értéke 500 000 Ft. Fészkelőhelyeik és vadászterületeik folyamatos pusztulása nagy mértékben veszélyezteti az állomány fennmaradását az országban. Ebből kifolyólag a magyar kék vércse populációk védelme érdekében költséges védelmi programok léptek érvénybe és állományaik állandó megfigyelés alatt állnak (<http://falconproject.eu>), így számos információ áll rendelkezésünkre a szaktervezésemben vizsgált populáció fészkeljairól. Azért is érdemes volt ezt a fajt vizsgálnunk, mert a kék vércse EPF mértékéről tudomásunk szerint nincs információ a szakirodalomban, annak ellenére, hogy számos lehetőség kínálkozik számukra EPC-re (Ille et al., 2002), valamint az általunk vizsgált populációnál is figyelték meg EPC-ket. Továbbá nem hanyagolható el az IBP lehetősége, amelyet a genetikai vizsgálatok során

felfedezhetünk. Csakúgy, mint az EPF mértékéről, a kék vércse IBP-ről sincs elérhető információnk, így vizsgálatunk további célja volt az IBP mértékének meghatározása.

Vizsgálatunkban az egyedek genotipizálását, és az apasági viszonyok feltárását mikroszatellita DNS markerekkel végeztük. Azonban, mint fentebb említettem, a kék vércsék extra-pár viselkedése kevésbé kutatott téma, így a szakirodalomban kék vércsék számára kidolgozott markerkészlet nem elérhető. Az apasági viszonyok megismeréséhez viszont nélkülözhetetlen egy markerkészlet, amely segítségével a megfelelő valószínűséggel állapíthatjuk meg egy szociális apáról, hogy nem a biológiai apa. Egy ilyen markerkészlet nem csak a mi, de más kék vércsékkel foglalkozó genetikai kutatásban is hasznosnak bizonyulhat.

Szakedolgozatomban tehát három fő eredmény elérése volt a cél:

- Egy optimális markerkészlet kifejlesztése, amely segítségével lehetséges az apasági viszonyokat feltárni ebben a fajban.
- A vizsgált kékvércse-populáció EPF arányának megállapítása a különböző években.
- A vizsgált kékvércse-populáció IBP arányának megállapítása a különböző években.

Mivel sok más *Falco* nemzetségbe tartozó fajnál működött a közel rokon fajoknál leírt mikroszatellita markerek alkalmazása, mi is lehetségesnek találtuk, hogy ezen több *Falco* fajnál is előforduló mikroszatelliták megtalálhatóak a kék vércsében. Tehát vizsgálatom során „cross- species amplification” technikát alkalmaztunk.

A sólyomalkatúak többsége monogám szaporodási rendszerben él, így több EPF-et kutató vizsgálatnak is alanyául szolgáltak. Mi egy nappali ragadozómadarakra jellemző alacsony EPF mértéket vártunk vizsgálatunk eredményéül, azonban ezt az eredményt nagyban befolyásolhatja a tény, hogy a kék vércsék kolóniákban költenek, amely esetleg az átlagosnál több lehetőséget biztosíthat EPC-k és ezen keresztül EPF számára.

Mivel a kék vércse fokozottan védett, bármilyen jellegű információ a faj ökológiájával és viselkedésével kapcsolatban segítséget nyújthat a megfelelő fajvédelmi eljárások kidolgozásában és végrehajtásában. Továbbá egy extra-pár viselkedést tanulmányozó vizsgálat segítheti az EPF jelensége és a kolóniák kialakulása mögött húzódó okok megértését.

4. Anyag és módszerek

4.1 A vizsgált faj

A *Falco vespertinus*, Carl von Linné, 1766, angolul *Red-footed falcon*, magyarul kék vércse, a Falconidae vagyis a sólyomfélék családjába tartozó nappali ragadozómadár. Termete kicsi (testhossz: 28-31 cm, tömeg: 130-197 g), szárnyai viszonylag hosszúak (szárnyfesztávolság: 65-75 cm) (Bagyura and Palatitz, 2004), így nagy távolságokat is képes repülve megtenni. A felnőtt egyedek megjelenését tekintve erős ivari dimorfizmus figyelhető meg. A kifejlett hímek tollruhája többnyire kékeszürke, az alsó farokfedőket és a lábukat leszámítva, amelyek vöröses színezetűek. A tojók hátoldala és farka szürke alapon feketével harántcsíkozott, fejük és hasi oldaluk vörössárga. A fiókák a tojókra hasonlítanak, hátoldaluk barnásabb, hasi oldalon fekete foltok találhatóak (Heinzel, 2001). Főként rovarokkal táplálkoznak, de kisebb gerinceseket is gyakran zsákmányul ejtenek (Bagyura and Palatitz, 2004).

Nyílt, füves pusztákat kedvelik, elterjedési területük Kelet-Európától Közép-Ázsiáig, a Bajkál-tóig húzódik. Magyarországnál nyugatabbra csak ritkán fészkel (del Hoyo et al., 1994). Vonuló madarak, szeptember végén vándorolnak el délnyugat-afrikai telelő területeikre (Palatitz et al., 2014), majd április végén térnek vissza.

A költési időszak május végén, június elején veszi kezdetét, ekkor párt választanak maguknak és vele maradnak a fiókák kirepülésig (Purger, 1998; Ille et al., 2002) vagyis szociálisan monogámnak tekinthetők. Tojásrakás előtt a kék vércse párok sok időt töltenek külön, a fészektől távol, amely lehetőséget ad EPC-re a hímeknek és a tojóknak egyaránt (Ille et al., 2002). A kék vércse hazánk egyetlen kolóniákban költő ragadozómadara. Fészket nem épít általában vetési varjak (*Corvus frugilegus*) elhagyatott fészkeit foglalják el. A vetési varjak számának csökkenésével azonban a kék vércsék által elfoglalható fészkekből is egyre kevesebb van, így némely vércsepár kénytelen a kolóniákon kívül, magányosan fészkelni (Bagyura and Palatitz, 2004). A hátrahagyott fészkeken kívül a kihelyezett költőládákat is gyakran használják fészkelőhelynek. Egy fészkealj 2-5 tojásból áll, a fiókákat mindkét szülő gondozza. A költési idő 23-25 napig tart, a fiókák a kikelés után 27-28 nap múlva repülnek ki.

4.2 A felhasznált minták

Vizsgálatainkban a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület, Kékvércse-védelmi Munkacsoportjának természetvédelmi állományfelmérései során begyűjtött kék vércse toll-, és vérmintákat használtuk fel. A mintákat a Körös-Maros Nemzeti Park Igazgatóság fennhatósága alá tartozó Cserebökényi, Vásárhelyi- és Csanádi-pusztákon gyűjtötték. A felhasznált minták összesen kilenc év különböző gyűjtéseiből származtak, 2007-től 2015-ig.

A vizsgálatba olyan egyedeket vettünk bele, melyek fészekaljairól, párjukról, fiókáikról elérhető információnk volt. Az adatok alapján 51 fészekaljat vettünk bele a vizsgálatba, amelyek az alábbi hat évből származtak: 2008, 2009, 2011, 2013, 2014 és 2015. Abban az esetben, ha egy adult egyedről a hozzátartozó fészekalj megmintázásának évében nem volt elérhető mintánk, a korábbi években gyűjtött, fiókakori mintáját használtuk. A fészekaljokról az adatokat Fehérvári Péter (MTM) és Solt Szabolcs (MME) szolgáltatta. Összesen 218 egyed mintáit használtuk fel a genetikai vizsgálatok folyamán.

A tollminták fiókák hátáról tépett tokos tollak voltak, amelyeket 96%-os etil-alkoholban, cryo-csővekben, -20°C-on tároltuk, hogy a DNS ne roncsolódjon. A vérmintákat adult és fióka egyedek szárnyvénájából vették és a tollakhoz hasonlóan tároltuk. Amennyiben egy egyedről volt elérhető toll és vérmintánk is, a vérmintából vontuk ki a DNS-t, a gyorsabb DNS-izolációs eljárás miatt. A minták feldolgozására az Állatorvostudományi Egyetem Biológiai Intézetében, a Konzervációgenetikai Kutatócsoport laboratóriumában került sor.

4.3 Az apasági vizsgálatokhoz felhasznált genetikai markerek kiválasztása

Vizsgálatainkban a mintákból kivont DNS felszaporításához, kék vércsére specifikusan kifejlesztett markerkészlet hiányában, „cross-species” amplifikációs technikát alkalmaztunk. Tehát más közeli rokon *Falco* fajokon alkalmazott mikroszatellita markereket használtunk fel, olyanokat, amelyek más *Falco* fajokban is polimorfnek bizonyultak. Kiválasztott markereink az alábbi fajokra lettek eredetileg kidolgozva: északi sólyom (*F. rusticolus*), vándorsólyom (*F. peregrinus*), fehérkarmú vércse (*Falco naumanni*), kerecsensólyom (*Falco cherrug*). Genetikai eredmények alapján ezek a fajok taxonómiaiilag elég közel állnak a kék vércséhez, ahhoz hogy markereik használata kék vércsében indokolt legyen (Griffiths et al., 2004; Wink and Sauer-Gürth, 2004).

Az apasági vizsgálatok során fontos, hogy a vizsgálandó egyedeket specifikus genotípussal jellemezzük. Ehhez minél több, minél polimorfabb markert szükséges alkalmazni, ellenkező esetben lehetséges extra-pár fiókákat határozhatunk meg tévesen páron-belüli fiókákként. A fentebb felsorolt fajok markerei közül azokat válogattuk ki, amelyek a megadott publikációk szerint a legtöbb allélszámot adták „cross-species” amplifikációkban (Nesje et al., 2000; Nesje & Røed, 2000; Nittinger et al., 2007; Padilla et al., 2009). Összesen 24 mikroszatellita lókuszt választottunk ki vizsgálatunkhoz.

Az alkalmazott markerek listája az 1. Táblázatban látható.

4.4 DNS kivonás vér-, és tollmintákból

A DNS-izolálás folyamatának lényege, hogy elválasszuk a mintákban található, tiszta DNS-t a többi szöveti elemtől, lehetővé téve a DNS felszaporítását a későbbiekben. A DNS kinyeréséhez a vérmintákból, Geneaid® valamint NucleoSpin® DNS-izoláló kitéket használtam a gyártó utasítása szerint. A következőkben a Geneaid® kit használatához szükséges protokollt ismertetem.

A DNS-izolálás első lépéseként az alkoholban tárolt koagulált vérmintából áthelyeztem egy darabkát tiszta eppendorf csőbe steril pipettahegy segítségével. Ezután emésztéses eljárás során szabaddá tettem a DNS-t a többi szöveti elemtől. Mivel az alkohol denaturálja az emésztéshez felhasznált emésztőenzimet, az eljárás előtt hagytam az alkoholt felszáradni a mintákról légmozgásmentes helyen. A emésztéshez 200µl GT puffert és 20µl proteináz-K fehérjebontó emésztőenzimet adtam a mintákhoz, majd a vérdarabkát „tissue grinder” -rel szétmorzsoltam, hogy a proteináz enzim számára a fehérjék jobban hozzáférhetőek legyenek. Az eppendorf csöveket 60°C-os vízfürdőbe helyeztem 1 órára, majd 200µl GBT puffer hozzáadása után további 10 percre melegítettem. A melegítés befejeztével az oldatot vortex és centrifuga segítségével homogenizáltam. A fehérjék ekkorra már megemésztődtek, a DNS molekulák szabaddá váltak.

Tollminták esetében az emésztés során máshogy kell eljárni, mivel DNS csak a tollcsévék végében található és a tollakat alkotó nagy mennyiségű keratin nehezen emésztődik. A tollminták előkészítéséhez a tollakat Parafilm® lapra helyeztem és a tollcsévék végét steril szikével lemetszettem, majd eppendorf csőbe helyeztem. Az alkohol megszáradása után a puffer és az emésztőenzim mellett 10µl DTT-t (1,4-ditiothreitol) adtam a mintákhoz, amely a diszulfid-hidakat bontja a fehérjékben. A vérmintákkal ellentétben a tollminták nem egy óráig álltak meleg vízfürdőben emésztődni, hanem egy éjszakán át, minimum 14 óráig. Az emésztés

1. Táblázat. A vizsgálatban felhasznált 24 lókuszt.

Faj	Lókuszt	Primer szekvenciák 5'-3'	Mérettartomány (bp)	Ismétlődő motívumok	Allélek száma
<i>F.c.</i>	MSFp01	F: GACTAAACTCTATTCAG R: TCGCAAAGCATTCTTGTC	152-208	tetranukleotid	13
<i>F.r.</i>	NVHfr34	F: TATTTAGCTGCTGGTTTCCTAT R: TTTAGTATCTCAAAGACCTGGT	148-152	(GT) ₉	2
<i>F.r.</i>	NVHfr144-2	F: GGGCTTTAGGTCTTCTATTTTC R: GCCTACTATTTCCGTTTACTGG	130-142	(CA) ₁₅	4
<i>F.r.</i>	NVHfr164-1	F: CTGTTCCGGATGGTTCCTACAATT R: CTCACAGGGAGGCAGGTTACTT	126-148	(GT) ₁₂	4
<i>F.r.</i>	NVHfr190-2	F: CCACACAAAATCCCTCCAAC R: GTTTTGCTACTGTTTCTCCTGCTG	139-153	(CA) ₁₂	7
<i>F.n.</i>	Fnd1.2	F: GCAGTCTTGAGATGGCTTT R: TGAAGTGTGACTCCGCTATGA	152-178	(TA) ₈ (GA) ₉	9
<i>F.n.</i>	Fnd1.3	F: GCCTAAGGTTTCCCTCAGCTA R: TCATCAGACTGCAAACTGGA	199-217	(AG) ₅	8
<i>F.n.</i>	Fnd1.5	F: CCATTGATTTTCATCAACTACA R: CCTGTTGAGAATGCGTGAAA	229-241	(TC) ₁₅	7
<i>F.n.</i>	Fnd1.6	F: ATTTGTGGCAAACCAGAGGA R: CCCACATTTTCCAAACAAGG	300-378	(GATG) ₁₃ N ₄ (GATG) ₃ N ₃₀ (GA) ₁₃	20
<i>F.n.</i>	Fnd1.7	F: TACCGTCCTTGTTCCGGAAGT R: CTACAGTCTGCCCAAGAA	232-240	(CT) ₁₀	5
<i>F.n.</i>	Fnd1.8	F: CAGTGACGCCTGAAAGATGA R: GCTTGGAAAGTCCCTCTGCTG	180-194	(TC) ₁₂	5
<i>F.n.</i>	Fnd2.1	F: AGTCATGGCTTCCGATCAAG R: TCAGGCAGCCTTATTTTGG	195-213	(TG) ₉	8
<i>F.n.</i>	Fnd2.2	F: AACTTTGCCCCAGATCACAC R: GCACAGAGACCCCGTTACAT	184-220	(CA) ₈ (TA) ₃	6
<i>F.n.</i>	Fnd2.3	F: CAAGCAGGGTGAAAATCCAT R: GTTTTCCCTCATTGCCTGAA	220-248	(AC) ₁₂	11
<i>F.n.</i>	Fnd2.5	F: CACTACCAGCCCTGAACCAT R: CTTCTTGACAGGGGTGTGGT	209-241	(CA) ₁₂ (TA) ₄	10
<i>F.n.</i>	Fnd2.6	F: TCCGGTGTACATTTCCATT R: AAGCCCTTTCTACACAGCA	201-239	(GT) ₈	11
<i>F.p.</i>	NVHfp13	F: AGCTTGATTGAGGCTGTG R: CCAAATCCCTGCTGAAG	96-108	(CA) ₁₂	5
<i>F.p.</i>	NVHfp31	F: ATCACCTGCACATAGCTG R: TTTAGCTCCTCTCTCAC	154-160	(CA) ₁₇	5
<i>F.p.</i>	NVHfp54	F: TGATTGCAGGAATAAGAC R: TACATTCGCCAAAGGACG	104-110	(GT) ₁₆	3
<i>F.p.</i>	NVHfp79-4	F: TGGCTTCTTATCAGTAAC R: GGCTGGGTGGAATTAAG	151-171	(CA) ₁₆	11
<i>F.p.</i>	NVHfp82-2	F: CTGACAGGAGATGATG R: CCAGATAGCTGTGAAATGG	132-140	(GT) ₁₀	3
<i>F.p.</i>	NVHfp89	F: CTCTGCCCTGAATACTTAC R: GAATCTGTTTGCATTGGAG	121-139	(AT) ₁₂	8
<i>F.p.</i>	NVHfp92-1	F: TTACTAGAAGGCTGCTCAG R: CGTATTCCAAATTTATGGC	116-128	(CA) ₁₀	5
<i>F.p.</i>	NVHfp347	F: CAAGACAAGCAAAGGTGATG R: ATTTCCGTTCTCAACATGCC	133-155	dinukleotid	10

Az első oszlopban azok a fajnevek találhatóak, melyeknél először írták le az adott lókuszt: *F.*= *Falco*, *r.* = *rusticolus*, *n.* = *naumanni*, *p.* = *peregrinus*, *c.*=*cherrug*. Primer szekvenciánál „F” jelöli a forward és „R” a reverz primert. A mérettartományok bázispárok számában (bp) vannak megadva.

után a tollakkal a vérmintákhoz hasonlóképp jártam el.

A következő lépés a DNS kivonása a többi anyag közül, ez adhéziós oszlop segítségével történt, mely megköti a DNS-t, de a többi anyagot (fehérjék, lipidek, egyéb sejtalkotók) nem. A homogenizált oldathoz 200µl, 96%-os etil-alkoholt adtam, majd az egész oldatot átmertem adhéziós oszlopra. Az adhéziós oszlophoz tartozik egy egyszerű, felül nyitott, műanyag cső, amely az oszlopok aljához rögzíthető és eltávolítható. Az oszlopot 2 percig 13000 fordulat/percen centrifugáztam, így az oldat DNS-t nem tartalmazó része a cső aljára került, amit a centrifugálás végeztével kiöntöttünk. Ezt még kétszer megismételtem 400µl W1- és 600µl Wash puffer oszlopra juttatása után, átmosva az oszlopot, így biztosítva, hogy az oszlopon csak DNS molekula maradjon. A DNS-t kötő oszlopot ezután eppendorf csőbe helyeztem át és nyitott kupakkal kb. 20 percig hagytam száradni, hogy az alkohol elpárologjon, majd 100µl Elution puffert adtam hozzá, mely feladata DNS oszlopról való leoldása. 5-10 perc inkubáció után fél percig, 13000 fordulat/percen centrifugáztam a mintákat, melynek végén az eppendorf cső aljára került puffer már tiszta DNS molekulákat tartalmazott. A használt oszlopok kidobásra kerültek, mivel az oszlopon maradt DNS maradványok miatt nem újrahasznosíthatóak. Az eljárás hasonló volt a NucleoSpin® izoláló kit esetében, csupán a felhasznált pufferek és mennyiségeik tértek el. Az izolált DNS mintákat -20°C-on tároltuk.

4.5 A PCR reakciók

A vizsgálat következő lépése a kiválasztott mikroszatellita lókuszok felszaporítása volt, amelyet polimeráz láncreakcióval hajtottunk végre („polymerase chain reaction”, innentől röviden PCR). Mivel a felnőtt egyedek nemét a mintavételek során rögzítették, a fiókák neme pedig a vizsgálat szempontjából nem releváns, ezért nem volt szükséges előzetes genetikai vizsgálat a nemek meghatározásához.

Mielőtt elkészítettük volna a DNS profilt minden egyedre a kiválasztott lókuszok alapján, meg kellett győződnünk, hogy az egyéb sólyom fajokra alkalmazott markerek polimorfak kék vércsében is. A markerek teszteléséhez 10 véletlenszerűen kiválasztott, feltehetően nem rokon felnőtt hím egyeden végeztünk 24 PCR-t minden markerrel külön-külön. A PCR-ek eredményeiből meg tudtuk mondani, melyik lókuszon hozzátevőlegesen mennyi allél lehet kék vércsében. Ezek az allélszámok a későbbi elemzések során még növekedtek, hiszen 10 egyed nem elég ahhoz, hogy az egész populációban fellelhető összes allélt felfedezzük

bennük. Arra azonban elegendőnek bizonyultak, hogy a legváltozatosabb lókuszt megtaláljuk.

Miután a teszteredmények alapján kiválasztottuk a 10 legpolimorfabb lókuszt, minden vizsgálatomban felhasznált egyedre elvégeztem a 10-10 PCR-t. A reakciókhoz minden esetben ugyanazt a reakcióelegyet használtam, amely összetétele a 2. Táblázatban látható.

2. Táblázat. A PCR reakcióelegyek összetétele

PCR hozzávaló	Mennyiség
Primer (forward és reverz)	2µl
H ₂ O	9,9µl
DreamTaq™ Green puffer	1,7µl
DreamTaq™ polimeráz enzim	0,066µl
MgCl ₂	0,66µl
dNTP	0,66µl
DNS templát	2µl
Végtérfogat	17µl

A PCR programok során egy kétperces, 95°C-on zajló denaturációs szakasz után 37 ciklusban zajlott a DNS felszaporítása. Egy ciklus egy 30 másodperces, 95°C-os denaturációs-, egy egyperces, annellációs szakaszból (markertől függően 58-60 °C-on), és egy egyperces, 72°C-os elongációs szakaszból állt. A ciklusok lejárta után végezetül egy 5 perces elongációs szakasz következett 72°C-on. Az elkészült PCR termékeket 4°C-os hűtőben tároltuk.

4.6 A markerek polimorfizmusának megállapítása, genotipizálás

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük és a sikeres, terméket adó elegyeket mixekbe kevertük. Egy mix egy egyed öt felszaporított lókuszanak termékeit tartalmazta, minden egyedhez két mix tartozott. A mixeket a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumába küldtük kapilláris-elektroforézisre. A kapilláris-elektroforézis Abi 3130 automata szekvenátorral történt. A vizsgálataink során használt primerek az 5' végen fluoreszcensen jelöltek (FAM-6, PET, VIC, vagy HEX festékkel), melyet a szekvenátor érzékelt. A kapilláris-elektroforézis alatt a DNS

mintáink mellett meghatározott méretű DNS szakaszok (belső létra LIZ festéssel) is futottak, így a szekvenátor az eltelt idő és a fluoreszcens jel alapján képes meghatározni az általunk felsokszorosított DNS szakaszok hosszát. Mivel a mikroszatellita markerek alléljai között hosszbeli eltérések vannak, nekünk ennyi információ elegendő a genotípusok meghatározásához. A fluoreszcens jel erőssége a felsokszorosított DNS mennyiségével arányos. Mivel a DNS amplifikálása során felléphetnek bizonyos hibák a polimeráz enzim működésében, így többféle méretű terméket kapunk. A különböző hosszúságú termékek közül az általunk várt termék lesz a legnagyobb mennyiségben., tehát ehhez fog a legerősebb fluoreszcens jel társulni. Viszont a néhány bázispárral hosszabb és rövidebb termékek („dadogás”) akadályozhatják az allélok hosszának pontos leolvasását. Az allélok hosszát és az egyedek genotípusát a Peak Scanner (Applied Biosystems) szoftver segítségével olvastuk le.

4.7 A markerkészlet leíró statisztikái

Egy markerkészlet pontosságát és megbízhatóságát, az egyedek genotípusának meghatározásával kapcsolatban különböző leíró statisztikákkal lehet jellemezni. Ezek értékei alapján ítélni lehet meg, hogy markerkészletünk mennyire alkalmas vizsgálataink elvégzésére. A „Probability of Identity” (innenről röviden PI) érték megadja annak valószínűségét, hogy két a mintából véletlenszerűen kiválasztott egyed genotípusa azonos. A „Power of Exclusion”, vagy „Probability of Exclusion” értéke (többek között) azt becsüli meg, hogy ismert anya esetén a markerkészletünk mekkora eséllyel zár ki egy hímet az apajelöltek közül, ami ténylegesen nem az adott utód biológiai apja. Az allélok lókuszonkénti átlagos számából és a heterozigócia mértékéből pedig következtethetünk a populáció vagy a lókuszek variabilitására. Az egyedek genotipizálása után, 82 adult költőegyedet felhasználva, ezeket a markerkészletünket jellemző értékeket számoltuk ki GenAlEx 6.0 (Peakall and Smouse, 2006) szoftverrel.

Előfordulhat, hogy a PCR során egyes allélok nem képesek felszaporodni, vagyis nullallélok. Ilyen esetekben heterozigóta egyedeket tévesen homozigótának olvashatjuk le (ha csak az egyik kromoszóma esetén nem történt amplifikáció). A nullallélok előfordulását az egyes lókuszekon a nullallél frekvenciákkal adhatjuk meg, amelyeket a heterozigóták hiányából lehet megbecsülni. Mi a nullallélok gyakoriságát a GenePop 4.0 (Rousset, 2008) szoftverrel becsültük meg.

4.8 Az extra-pár fiókák azonosítása

Az EPF és IBP előfordulásait az adott fészekhez tartozó szülők és fiókák genotípusának összehasonlításával állapítottuk meg. Az összehasonlításokat kézzel, a mendeli öröklődési szabályok alapján végeztük el. Amennyiben egy fióka valamelyik lókuszán nem rendelkezik anyai alléllal, IBP-ből származónak tekinthető. Az EPF-ből származó fiókák azonosításához előzetes feltétel, hogy a fióka ne IBP-ből származzon, hanem az adott anyától. EPF-ből származónak tekinthető egy fióka akkor, ha valamelyik lókuszán nem rendelkezik apai alléllal.

Azonban, ha egy allél gyakorisága magas a populációban, akkor nagy valószínűséggel a biológiai és a feltételezett apa alléljei megegyeznek, amit a kézzel való ellenőrzés során tévesen nem EPF-nek minősítünk. Az ilyen tévedések elkerülésére a legjobb módszer a minél több, egymástól függetlenül öröklődő és változékonnyal lókusz együttes alkalmazása. Amennyiben ez nem kivitelezhető, a markerkészlet különböző mérőszámait (PI, Power of Exclusion, stb.) megbecsülve, illetve egyéb genotipizálási valószínűségek kiszámításával tudjuk validálni.

A végső analízisben használt markerkészlet ilyen validálását mi a Cervus 3 (Kalinowski et al., 2007) szoftverrel végeztük el, amely az egész populáció mintázott genotípusainak ismeretében likelihood alapú módszerekkel képes megadni, hogy a feltételezett apa mekkora valószínűséggel nem a biológiai apa. Ennek során 57, ismert apával és anyával rendelkező (biztosan nem EPF) fiókat párosítottuk az összes ismert teljes genotípusú (n=40) hím egyeddel, és megnéztük, hogy a program a 40 apajelölt közül milyen arányban találja meg a tényleges apát.

5. Eredmények

5.1 A kiválasztott markerek polimorfizmusa kék vércsében és a nullallélgyakoriságok

Az általunk kiválasztott 24 mikroszatellita lókusz polimorfizmusát először 10 egymástól független kifejlett, hím egyed genotípusából állapítottuk meg. Majd az ebből kiválasztott 10 legvariábilisebb lókusz allélszámait a vizsgálatban felhasznált összes, azaz 218 egyed genotípusa alapján pontosítottuk.

A 24 lókuszból négy nem adott terméket PCR során, négy monomorfnak, vagyis egyallélesnek bizonyult. A maradék 16 polimorf lókuszból hat csak két allélt, 10 pedig legalább három allélt adott. Ez utóbbi 10 lókuszt használtuk fel az összes egyed genotípusának meghatározásához. A pontos allélszámok és a markerek használhatósága a 3. Táblázatban láthatók.

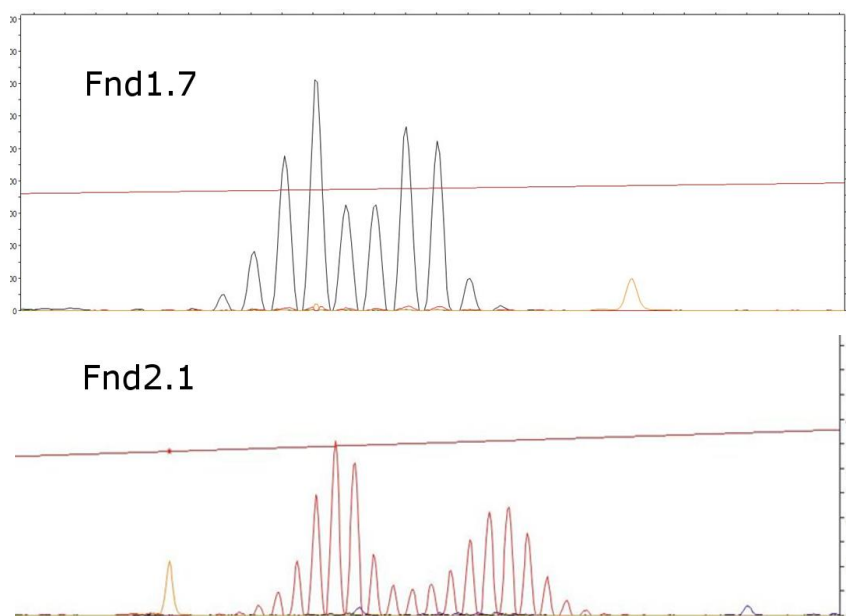
3. Táblázat. A vizsgált 24 lókuszból eredményei kék vércsében

Faj	Lókuszból	Allélek száma eredeti fajban	Allélek száma (F.v.)	Allélek mérete (F.v.) (bp)	Eredmény
<i>F.c.</i>	MSFp01	13	0	0	nem ad terméket
<i>F.n.</i>	Fnd1.5	7	0	0	nem ad terméket
<i>F.p.</i>	NVHfp79-4	11	0	0	nem ad terméket
<i>F.r.</i>	NVHfr144-2	4	0	0	nem ad terméket
<i>F.n.</i>	Fnd1.3	8	1	200	monomorf
<i>F.n.</i>	Fnd1.6	20	1	298	monomorf
<i>F.n.</i>	Fnd2.2	6	1	186	monomorf
<i>F.r.</i>	NVHfr164-1	4	1	129	monomorf
<i>F.n.</i>	Fnd1.2	9	2	152-178	dimorf
<i>F.n.</i>	Fnd1.8	5	2	182-184	dimorf
<i>F.n.</i>	Fnd2.5	10	2	205-211	dimorf
<i>F.n.</i>	Fnd2.6	11	2	201-239	dimorf
<i>F.p.</i>	NVHfp13	5	2	95-97	dimorf
<i>F.r.</i>	NVHfr190-2	7	2	139-153	dimorf
<i>F.n.</i>	Fnd1.7	5	kb. 6	231-241	dadog, nem megbízható
<i>F.n.</i>	Fnd2.1	8	kb. 8	192-220	dadog, nem megbízható
<i>F.p.</i>	NVHfp31	5	5	155-161	nullalléles, nem megbízható
<i>F.p.</i>	NVHfp92-1	5	6	104-114	nullalléles, nem megbízható
<i>F.p.</i>	NVHfp54	3	5	99-109	megbízható
<i>F.r.</i>	NVHfr34	2	5	159-165	megbízható
<i>F.p.</i>	NVHfp347	10	6	136-142	megbízható
<i>F.p.</i>	NVHfp82-2	3	7	129-141	megbízható
<i>F.n.</i>	Fnd2.3	11	9	203-237	megbízható
<i>F.p.</i>	NVHfp89	8	12	123-133	megbízható

Az első oszlopban azok a fajnevek találhatók, melyeknél először írták le az adott lókuszt: F.= *Falco*, r. = *rusticolus*, n. = *naumanni*, p. = *peregrinus*, c.=*cherrug*. Harmadik és negyedik oszlopban a lókuszból kék vércsékben megfigyelt eredményeit tartalmazzák (v. = *vespertinus*). Az allélek mérete bázispárok számában (bp) van megadva.

A 218 egyed genotípusának leolvasása során két lókusznál (Fnd1.7, Fnd2.1) nagy mértékű „dadogást”, vagyis a várt allélhossznál néhány bázispárnál kisebb-nagyobb DNS fragmentumok felszaporodását is tapasztaltuk. A dadogó allélok miatt a genotípus pontos leolvasása ezen a két lókuszon bizonytalanná vált (1. Ábra), ezért az apasági vizsgálatoknál nem vettük figyelembe őket.

A megmaradt nyolc lókuszból becsült nullallél-frekvenciáit mind a 218 egyed genotípusát figyelembe véve számoltuk ki. Az eredmények alapján két lókusznak igen magas volt a nullallél gyakorisága (NVHfp31: 0.1857, NVHfp92-1: 0.2606; Gen4Pop 4.0). Így ezeket a markereket is kihagytuk az apasági vizsgálatokból, mivel nagy az esély rá, hogy több helyen is tévesen homozigótaként jelennek meg a valódi heterozigóta genotípus helyett (2. Ábra). A megmaradt hat lókuszból becsült nullallél frekvenciái alapján, az NVHfr34-es és NVHfp89-es lókuszt kivéve, megvan az esély arra, hogy ezeknél is előfordultak nullallélok, de nem olyan magas, hogy vizsgálatunkból kivegyük őket. A lókuszból becsült nullallél frekvenciái és a hozzájuk tartozó konfidenciaintervallumok a 4. Táblázatban láthatók. A végleges markerkészletünket ez a hat lókuszból alkotta (Fnd2.3, NVHfp54, NVHfp82-2, NVHfp89, NVHfp347, NVHfr34), összesen 44 alléllal (átlagos allélszám: 7,33).



1. Ábra. A két „dadogó” lókuszból A fenti képeken egy- egy példa látható az Fnd1.7-es (fekete) és Fnd2.1-es (piros) lókuszból alléljairól, ahogy a PeakScanner szoftver felhasználói felületén megjelennek. A csúcsok magassága az adott nagyságú felszaporított DNS mennyiségétől függ. A képeken látható, hogy ennél a két lókusznál több DNS fragmentum szaporodott fel, amelyek hosszukban csak néhány bázispárban különböznek. Általában az adott allélt jelölő csúcs magasan kiemelkedik a többi közül. Ilyen esetekben viszont nem tudjuk pontosan meghatározni a sok csúcs közül, melyik jelenti az általunk felszaporítani kívánt allélt.

Év	Fészekalj	Minta	Nem	fp92-1	fp92-1	comm	fp31	fp31	comm
2014	195	HA18367	hím	105	115		161	161	
2014	195	HA18368	tojó	107	109		155	155	
2014	195	HA18369	fióka	105	109		161	161	anyai allél nincs
2014	195	HA18370	fióka	105	109		161	161	anyai allél nincs
2014	195	HA18371	fióka	105	109		161	161	anyai allél nincs
2014	200	HA10110	hím	109	109		157	158	
2014	200	395488	tojó	105	105		157	157	
2014	200	HA18321	fióka	109	109	anyai allél nincs	157	157	
2014	200	HA18323	fióka	109	109	anyai allél nincs	158	158	anyai allél nincs
2014	200	HA18324	fióka	105	105	apai allél nincs	157	157	
2014	200	HA18322	fióka	105	109?		157	158	
2014	2014_CS89	HA18265	hím	113	113		157	161	
2014	2014_CS89	HA10215	tojó	109	111		157	157	
2014	2014_CS89	HA18294	fióka	109	113		157	161	
2014	2014_CS89	HA18295	fióka	113	113	anyai allél nincs	157	157	
2014	2014_CS89	HA18296	fióka	113	113	anyai allél nincs	157	161	
2014	2014_CS89	HA18297	fióka	113	113	anyai allél nincs	157	157	

2. Ábra. Az NVHfp92-1 és NVHfp31 lókuszok lehetséges nullallél előfordulásai A fenti ábrán három fészekalj genotípusai láthatók a két lókuszon. A számok a mikroszatellita allélek méretét jelölik bázispárban megadva. Az ábráról leolvasható, hogy a két lókuszon igen gyakoriak a homozigóták és általában vagy az apai vagy az anyai eredetű alléljük hiányzik.

4. Táblázat A polimorf, nem „dadogó” markerek lókuszonkénti allélfrekvenciái

Lókusz	Nullallél frekvencia	CI 2.5%	CI 97.5%
NVHfp31	0.1857	0.1443	0.2304
NVHfp92-1	0.2606	0.2175	0.3074
NVHfp54	0.118	0.0768	0.1611
NVHfr34	0	-	-
NVHfp347	0.0727	0.0404	0.1128
NVHfp82-2	0.0822	0.0417	0.1351
Fnd2.3	0.0667	0.0343	0.1087
NVHfp89	0.019	0	0.0512

CI 2.5% = 95%-os konfidenciaintervallum alsó határa, CI 97.5% = 95%-os konfidenciaintervallum felső határa

5.2 A markerkészletünk megbízhatósága

A markerkészletünk erejét 82 független, adult egyed genotípusait felhasználva teszteltük az apasági vizsgálatokban felhasznált hat lókuszon. A markerkészlet erejét leíró összefoglaló statisztikák az 5. Táblázatban láthatók. Kiszámoltuk a hat lókuszra kombinált PI értéket ($PI = 1.95 \cdot 10^{-5}$), a PI_{sibs} értéket (= 0.012) – ez a PI valószínűsége olyan populációban, melyben nagy a testvérek aránya -, a „Power of Exclusion” -t két ismert szülő esetén ($P1 = 0.968$) és egy ismert szülő esetén ($P2 = 0.848$). Kiszámoltuk továbbá a hat lókusz átlagos várt heterozigóciáját ($He = 0.624$, $SE = 0.063$) és a megfigyelt heterozigóciát ($Ho = 0.606$, $SE = 0.091$).

5. Táblázat A markerkészlet erejét leíró statisztikák 82 független egyed alapján

Lókusz	Na	He	Ho	PI	PIsibs	P1	P2
NVHfp54	5	0.515	0.317	0.297	0.567	0.272	0.139
NVHfr34	5	0.633	0.671	0.193	0.482	0.373	0.214
NVHfp347	6	0.436	0.402	0.339	0.617	0.26	0.105
NVHfp82-2	7	0.545	0.549	0.265	0.544	0.302	0.159
Fnd2.3	9	0.802	0.866	0.065	0.365	0.62	0.443
NVHfp89	12	0.812	0.829	0.058	0.359	0.639	0.465
Átlagos/Kombinált értékek	7.33	0.624	0.606	$1.95 \cdot 10^{-5}$	0.012	0.968	0.848

Na = allélok száma, He = várt heterozigócia, Ho = megfigyelt heterozigócia, PI = Probability of Identity, PIsibs = Probability of Identity for Siblings, P1 = Power Exclusion 2 ismert szülő esetén, P2 = Power of Exclusion 1 ismert szülő esetén

A Cervus3 program paternitási vizsgálatában (ami annak a valószínűségét becsüli meg, hogy 40 apajelölt hím közül milyen valószínűséggel találjuk meg a tényleges apát) minden tesztelt fióka esetén pozitív LOD értékeket (ami a log-likelihood arányok összege minden egyes lókuszra kiszámolva) kaptak a tényleges apák. 30 fiókánál (52%) csak egyetlen apajelölt kapott pozitív LOD értéket, és ez mindig a valódi apa volt. 15 fiókánál (26%) több lehetséges apát valószínűsített (mindegyik LOD érteke pozitív volt), de ezek közül a tényleges apának volt a legnagyobb LOD értéke. 12 fióka (21%) esetén viszont a több javasolt apajelölt közül nem a valódi apát tette a legvalószínűbbnek (más hím kapta legnagyobb LOD értéket). Így elmondhatjuk, hogy a végső analízishez használt hatlókuszos markerkészlet az esetek többségében alkalmas volt a vizsgált populációban a tényleges apa-

gyermek párosokat megtalálni (és így az esetleges szociális, de nem genetikai apát kiszűrni). Viszont az a tény, hogy a fiókák kb. egy ötödében ez nem sikerült, mindenképpen a markerkészlet hiányosságait jelzi.

5.3 Az extra pár fiókák azonosítása

Az EPF és IBP előfordulásait 48 fészekaljban vizsgáltuk meg. A vizsgálatba csak olyan fészekaljakat vettük be, amelyekhez tartozó hímről, tojóról és legalább egy fiókaról volt elérhető mintánk, így három fészekalj nem került be az apasági vizsgálatokba. A 48 fészekalj összesen 210 egyedre foglalt magába, 128 fiókát (átlagos fészekalméret = 2,67) és 82 felnőttet. A 82-ből 11 felnőtt egyednek két külön évből is volt fészekalja, egy egyednek háromból és még egy hím egyed két fészekaljjal is rendelkezett a 2014-es évben. Az EPF-ből és IBP-ből származó fiókák azonosításához szükséges feltételeket módosítottuk a nullallélek frekvenciáit figyelembe véve.

Egy fiókát IBP-ből származónak tekintettük, ha (1) legalább két lókusznán nem rendelkezett anyai eredetű alléllal, ha (2) egy lókusznán nem rendelkezett anyai eredetű alléllal és mind a fióka mind a szociális anya heterozigóták voltak, vagy ha (3) az NVHfp89-es vagy az NVHfr34-es lókusznok valamelyikén (ezeknél a lókusznoknál igen alacsony volt a nullallélek becsült aránya) nem rendelkezett anyai alléllal. IBP esetén nem feltétel, hogy a fióka apai eredetű alléllal is rendelkezzen.

Ha egy adott fióka nem IBP-ből származott, akkor vizsgálhattuk, hogy EPF eredménye-e. Egy fiókát EPF-ből származónak ítéltünk, ha (1) legalább két lókusznán nem rendelkezett apai eredetű alléllal, vagy ha (2) egy lókusznán nem rendelkezett apai eredetű alléllal és mind a fióka mind a szociális apa heterozigóták voltak, vagy ha (3) az NVHfp89-es vagy az NVHfr34-es lókusznok valamelyikén nem rendelkezett apai alléllal.

A 48 fészekaljon elvégzett rokonsági vizsgálatok során, adott feltételek mellett négy fészekben sikerült EPF-ből származó fiókát azonosítanunk, valamint 12 fészekben IBP-ből származót. A 128 fiókából összesen öt EPF-ből és 21-IBP-ből származót azonosítottunk. Hat különböző év összesített adatai alapján a fészekaljak 8,3%-a tartalmazott EPF fiókát és 25%-a IBP fiókát. A fiókák 3,9%-a származott EPF-ből, 16,41 %-a pedig IBP-ből. A jól mintázott éveket külön nézve, 2014-ben a fészkek 10%-ban, a fiókák 4,54%-a volt EPF, IBP-nél ugyanez 20% és 15,5%. 2015-ben az EPF aránya fészkenként 5,56%, fiókánként 2,63%, az IBP aránya fészkenként 38,89%, fiókánként 26,32%. A különböző évek EPF és IBP esetei a 6. Táblázatban láthatók.

6. Táblázat A különböző évek EPF és IBP mennyiségei 6 év fészekaljaiból

Év	Családok	Egyedek	Fiókák	EPF	EPF	IBP	IBP
	száma	száma	száma	Fészkek	Fiókák	Fészkek	Fiókák
2008	2	8	4	1	1	0	0
2009	2	9	5	0	0	1	1
2011	1	5	3	0	0	0	0
2013	5	22	12	0	0	0	0
2014	20	105	66	2	3	4	10
2015	18	74	38	1	1	7	10

EPF Fészkek = EPF-et tartalmazó fészekaljok száma, EPF Fiókák = EPF-ből származó fiókák száma, IBP Fészkek = IBP-t tartalmazó fészekaljok száma, IBP Fiókák = IBP -ből származó fiókák száma

6. Diszkusszió

Vizsgálatunkban egy olyan markerkészletet igyekeztünk kék vércsére kidolgozni, amely képes EPF-ből vagy IBP-ből származó fiókák detektálására. Eredményeink alapján a felhasznált, egyéb *Falco* fajokra kifejlesztett 24 markerből 20 kék vércsében is ad terméket PCR során. Ebből a 20 lókuszból 16 bizonyult polimorfoknak, és 10 rendelkezett legalább három alléllal. A polimorf lókuszek jelenléte igazolja, hogy a „cross-species” amplifikációs technika használható kék vércsében. „Cross-species” technikát használva már számos *Falco* és egyéb ragadozómadár fajnál sikerült polimorf lókuszeket kimutatni az általunk alkalmazott markerekkel (Nesje and Røed, 2000; Nesje et al., 2000; Nittinger et al., 2007; Dawnay et al., 2009; Padilla et al., 2009). A mi esetünkben az eredetileg vándorsólyomra (*F. peregrinus*) kidolgozott markerek bizonyultak az apasági vizsgálatok során a legváltozatosabbaknak (nyolc kipróbált markerre 43 allél). A polimorf lókuszek variabilitása fajoként más és más, például az NVHfp54-es lókuszt egyes fajokban (*F. tinnunculus*, *F. subbuteo*, *F. columbarius*) nem ad terméket (Nesje et al., 2000), míg kék vércsében öt alléllal is rendelkezett. Az Fnd1.5-ös lókuszt viszont kék vércsében nem mutatható ki annak ellenére, hogy északi sólyomban (*F. rusticolus*) és vörös vércsében (*F. tinnunculus*) polimorf, legalább 7 alléllal (Padilla et al., 2009). Ezért eredményeink a 24 marker variabilitásáról kék vércsében információval szolgálhatnak más, kék vércsék rokonsági kapcsolatait feltáró vizsgálatokban, és segítheti a megfelelő markerek kiválasztását.

A 10 legpolimorfabb bizonyuló lókuszból azonban csak hat lókuszt volt alkalmas rokonsági viszonyok megállapítására. Az Fnd1.7-es és 2.1-es lókusztok „dadogása” akadályozta az allélek leolvasását, így ki kellett vennünk markerkészletünkéből. A genotipizálás során több allélt is el tudtunk különíteni egymástól ezeken a lókusztokon, de az allélek pontos méretét nem tudtuk meghatározni, mivel több DNS fragmentum is nagy mértékben felszaporodott. Az ehhez hasonló lókusztok káros hatását minél több egyed, minél többszöri genotipizálásával lehet csökkenteni., szakdolgozati munkám során erre azonban nem adódott lehetőség.

Az NVHfp31-es és az NVHfp92-1-es lókusztokat a hozzájuk tartozó magas nullallélgyakoriságuk miatt (>0.15) vettük ki végső markerkészletünkéből. A mikroszatellita lókusztok esetében gyakori jelenség, hogy az egyik allél konzisztensen nem vagy csak ritkán szaporodik fel a PCR során (Dakin and Avise, 2004). Ennek fő oka a mikroszatellita lókusztok melletti DNS régiókban előforduló mutációk, elsősorban a primer szekvencia bekötési helyén (Callen et al., 1993). A nullallélok következményeként egyes heterozigóta egyedeket tévesen homozigótának olvasunk le a genotipizálás során, amely az apasági vizsgálatokat (is) megbízhatatlanabbá teheti (Dakin and Avise, 2004; Chapuis and Estoup, 2007). Ilyen magas nullallélfrekvencia értékeknél az adott lókuszt eltávolítása az allélkészletből indokolt (Dakin and Avise, 2004; Rutkowski et al., 2014). Nullallél frekvenciák csökkentésére megoldás lehet még a primer szekvenciák újratervezése, ez azonban költséges folyamat és nem garantálja, hogy az összes nullallélt megszünteti a lókuszt (Chapuis and Estoup, 2007; Oddou-Muratorio et al., 2009).

A megmaradó hat lókuszból álló markerkészletünkkel végeztük el az apasági vizsgálatokat. A hat lókuszt összesen 44 allélt találtunk, ez 7.33 átlagos lókusztankénti allélszámot jelent, amely nem túl magas. Markerkészletünk variabilitását tovább csökkenti, hogy az átlagos lókusztankénti megfigyelt heterozigócia ($H_o = 0.606$) mértéke alacsonyabb, mint a várt heterozigócia mértéke ($H_e = 0.624$), vagyis a homozigóta genotípusok előfordulása gyakoribb, mint azt Hardy-Weinberg egyensúly alapján váránk. A heterozigócia és a markerek száma nagy szerepet játszik a rokonsági viszonyok feltárásában, mivel, ha nem elég nagy a heterozigócia és nincs elég marker akkor nagy az esély, hogy nem rokon szülőket tévesen rokonnak feltételezünk. A markerkészlet további allélekkel való bővítésével ki lehet egyenlíteni a homozigóták gyakoriságából származó hátrányokat (Blouin et al., 1996). A markerkészletünk ereje sem volt megfelelő. A $PI (= 1.95 \cdot 10^{-5})$ értéke magasabb, a „Power of Exclusion” (két ismert szülő esetén: $P_1 = 0.968$; egy ismert szülő esetén: $P_2 = 0.848$) értékei alacsonyabbak voltak, mint vártuk, a kevés lókuszt és a

homozigóták nagy arányának köszönhetően. Más rokonsági vizsgálatokban általában ennél erősebb markerkészleteket alkalmaznak (pl.: Nesje et al., 2000; Kempnaers et al., 2001). Ráadásul a paternitási teszt az analizált esetek egy ötödében nem volt képes a tényleges apa-gyermek párosokat megtalálni (és így az esetleges szociális, de nem genetikai apát kiszűrni). Mindezek alapján a markerkészletünk megbízhatósága nem kielégítő, nehezen zár ki nem-rokon szülőket, ami az extra-pár fiókák téves elmulasztását eredményezi. Így a további vizsgálatokba újabb polimorf markerek bevonása erősen ajánlott. A legjobb eredményt két vércsére specifikus markerkészlettel lehetne elérni, mivel az eredeti fajban általában polimorfbabak és megbízhatóbbak a markerek, mint más fajokon (Nesje et al., 2000; Rutkowski et al., 2006, 2014).

A gyenge markerkészlet ellenére, mégis sikerült néhány EPF és IBP esetet azonosítanunk két vércsében hat év teljes fészkaljai alapján. Mivel az egyes lókuszekre a nullallél gyakoriságok magasak voltak (>0.05), kivéve az NVHfp89-es és NVHfr34-es lókuszeket, ezért ezt figyelembe véve azonosítottuk az EPF-ből és IBP-ből származó fiókat. A magas nullallél gyakoriságok torzítanák eredményeinket, ha nem vennék őket figyelembe, és felülbecsülhetnék az EPF/IBP esetek számát (Chapuis and Estoup, 2007). A felülbecslés elkerülésére megoldás lehet, ha nem egy hanem több lókuszon kell a fiókanak és a szülőnek eltérnie gyakori nullallélekkel rendelkező lókuszekon ahhoz, hogy extra-párnak nyilváníthatassuk (Dakin and Avise, 2004). Más esetekben a nullalléles lókuszeket mind ki lehet venni a markerkészletből, ha elég sok nem nullalléles marad, de mivel mi már két lókuszt eltávolítottunk emiatt, és így csak hat maradt az előbbi megoldást választottuk (Dakin and Avise, 2004; Chapuis and Estoup, 2007). Ezzel a módszerrel van esély a EPF és IBP esetek alulbecslésére, de nem akkora, mint a felülbecslésre nullallélek figyelembe vétele nélkül. Erős markerkészletek esetében két vagy több lókuszon való eltéréseket ítélnék extra-pár fiókanak (Primmer et al., 1995; Kempnaers et al., 2001; Jones et al., 2010). Gyenge markerkészletek esetén azonban egy lókuszt eltérést is már annak szoktak venni (Alcaide et al., 2005). A mi markerkészletünk gyengesége ($PI = 1.95 \cdot 10^{-5}$) miatt indokolt volt az egy lókuszon való eltérés extra-pár azonosítása, amennyiben a lókuszekon a nullallélek ritkák voltak, vagy az utód és a feltételezett szülő egyaránt heterozigóta volt.

Az általunk vizsgált 48 fészkaljban egy sólyomfélére és egyéb nappali ragadozómadarakra jellemző alacsony EPF rátát kaptunk (fiókanként 3,9%; fészkenként 8,33%). Fontos megjegyezni, hogy ez a 48 család 6 év külön mintavételeiből származik, de mivel a 2008-, 2009-, 2011-, 2013-as évekből kevés teljes fészkalj mintái álltak rendelkezésünkre, ezért egy évre lebontott extra-pár fióka ráta csak a 2014-15-ös években

lenne informatív. Ugyan akadt néhány egyed, amelynek külön évekből származó fészekaljai többször is szerepeltek a mintában, de mivel az extra-pár fiókáik mennyiségében a külön években nem volt szembetűnő különbség, a fészekaljakat egymástól függetlennek tekintettük. Kék vércse esetében először sikerült kimutatni EPF jelenlétét egy populációban. Az alacsony EPF ráta nem meglepő eredmény sólyomféléknél. Más Falconidae családba tartozó madaraknál is hasonlóan alacsony fiókánként 3-5% közötti EPF rátákat figyeltek meg (Korpimäki et al., 1996; Negro et al., 1996; Villarroel et al., 1998; Alcaide et al., 2005). Az alacsony EPF ráta ezeknél a madaraknál feltételezhetően annak köszönhető, hogy a hímek nagy szerepet vállalnak a fiókák gondozásában és tojó etetésében a költési időszak alatt (Møller and Curie, 2000; Arnold and Owens, 2002; Ille et al., 2002). A tojók az EPC-ben való részvétellel kockáztatják, hogy szociális párjuk elhagyja őket (Cezilly and Nager, 1995), jelentősen csökkentve a fiókák túlélési esélyeit. Olyan fajokban, amelyek mortalitási rátája magasabb és a hím elvesztése nem csökkenti nagy mértékben a fiókák túlélési esélyeit, mint például az énekes madarak esetében, sokkal nagyobb EPF ráták figyelhetők meg (Primmer et al., 1995; Li and Brown, 2000; Webster et al., 2001; Arnold and Owens, 2002). További vizsgálatokban érdemes lenne az EPF-ből származó fiókák minőségét, túlélését páron belüli féltestvéreikkel összevetni, valamint a tojók EPC partnereinek minőségét szociális párjukéval.

A kék vércse azon kevés sólyomfélék egyike, amely telepesen költ. Ennek ellenére nem tapasztaltunk nagyobb EPF rátákat, mint a nem telepesen költő fajtársaiknál. Westneat és Sherman (1997) már kimutatták, hogy a kolóniákban költő madaraknál átlagosan nem magasabb az EPF ráta, mint a magányosan költőknél, de a költőhelyi denzitás növelésével az EPF ráta is nőni fog. Mivel a sólyomfélék többsége magányosan költ, a kék vércse pedig magányosan és kolóniákban is, azt feltételeztük a nagyobb költőhely denzitás miatt, a kék vércsék EPF rátája esetleg kicsit magasabb lesz, mint a többi sólyomfélének. Esetleg érdemes lenne további vizsgálatok során a magányosan és telepesen költő családok EPF rátája közti különbséget megfigyelni.

A vizsgált populációban viszont magas volt az IBP aránya (fiókánként 16,41%; fészkenként 25%). Kék vércse esetében először sikerült kimutatni IBP jelenlétét egy populációban. Más fészeklakó madarak esetében az IBP ráta ennél jelentősen kisebb. Sólyomfélék esetében 2-7% közötti IBP rátát figyeltek meg (Negro et al., 1996; Alcaide et al., 2005). Magas IBP ráták olyan fajok esetében alakulhatnak, ahol eggyel több fióka felnevelése „olcsó”, nem csökkenti a tojó jövőbeni szaporodási sikerét vagy a túlélését (Sorenson, 1992; Arnold and Owens, 2002). A kék vércsék esetében a hím is aktív részt

vállal a fiókák gondozásában csökkentve a tojóra nehezedő terhet. Továbbá a kék vércsék életük nagy részét vándorlással töltik a költőhely és a telelőhely között és szeptember végén már kezdetét veszi a vándorlási időszak. Mivel a tojásaikat június végén rakják le és egy hónapig tart a költési időszak, nem kell sok időt a fiókák nevelésével tölteniük. Ezért elképzelhető, hogy kék vércsék számára nem jár nagy költségekkel plusz fiókák felnevelése, így IBP ellenes stratégiák híján magasabb lesz az IBP szint náluk, mint várható. Persze nem szabad kizárnunk a lehetőségét, hogy az általunk rögzített IBP arány a markerkészletünkben előforduló nullallélek miatt lett ilyen magas. Ennek ellenőrzésére a fajra specifikus markerek bevonásával hamarosan lehetőségünk lesz.

Végeredményben elmondható, hogy közeli rokon fajokra kifejlesztett markerek polimorfak lehetnek kék vércsében. Továbbá az általunk kifejlesztett markerkészlet, bár nem túl megbízható, alkalmas extra-pár fiókák azonosítására, valamint az általunk vizsgált kék vércse populációban EPF-ből és IBP-ből származó fiókák egyaránt előfordulnak. Kék vércsénél először sikerült EPF és IBP eseteket kimutatni. Hangsúlyoznunk kell, hogy az általunk megállapított EPF IBP arányok egy nem túl erős és sok nullallélt tartalmazó markerkészlet alapján lettek megállapítva. Az eredményeink pontosítására új markerek és több család bevonására van szükség. A kék vércsére specifikus markerek kifejlesztése jelenleg folyamatban van a Konzervációgenetikai Kutatócsoport laboratóriumában. Eredményeinkkel jobban megismerhetjük ennek a fokozottan védett fajnak a szaporodási szokásait, segítve ezzel a természetvédők munkáját a kék vércse állomány fenntartásában Magyarországon. Továbbá vizsgálatunk eredménye információt szolgáltat az EPF és IBP háttérben meghúzódó evolúciós folyamatokat kutató vizsgálatokban, valamint számos kék vércsék extra-pár viselkedését kutató vizsgálat kiindulópontjául szolgálhat.

7. Összefoglalás

Az extra-pár fertilizáció (EPF), vagyis mikor egy monogám madárfaj fészkében található egy vagy több fióka biológiailag nem a szociális apától származik, széles körben elterjedt a korábban monogámnak gondolt madarak körében. Hasonlóan különleges jelenség madaraknál a fajon belüli fészekparazitizmus (IBP), mely során egy tojó egy fajtársa fészkébe rakja le tojásait. Habár számos kutatási téma foglalkozik ezekkel a különböző szaporodási stratégiákkal, a kialakulásuk mögött húzóó okok és az általuk szolgáltatott előnyök még mindig nem teljesen tisztázottak.

Szakdolgozati munkám során EPF és IBP mértékét vizsgáltam mikroszatellita markerek alapján egy Magyarországon fokozottan védett, nappali ragadozómadárnál a kék vércsénél (*Falco vespertinus*). Mivel kék vércsére kidolgozott markerkészlet nem elérhető ezért célom volt továbbá egy markerkészlet összeállítása, amely alkalmas a nem a fészekhez tartozó szülőktől származó fiókák azonosítására.

Vizsgálatomban hat különböző év fészekaljainak mintáit használtam fel, amelyek a Körös-Maros közti kék vércse állományból származtak. A markerkészlet összeállításához „cross-species amplification” technikát alkalmaztam, vagyis más közeli rokon fajok markereit használtuk fel, összesen 24-et. A mintákból kivont DNS-en PCR reakciókat végeztem majd a felszaporított termékek alapján meghatároztam az egyedek genotípusát.

Eredményeim alapján a 24 lókuszból 16 polimorf kék vércsében, amelyből 10 legalább 3 alléllal rendelkezik. Ebből a tízből azonban kettőn bizonytalan a genotípusok pontos meghatározása, még kettőn a nullallélok gyakorisága igen magas. Az apasági, illetve anyasági tesztek a fennmaradó hat lókuszt segítségével végeztem el. Ez a markerkészlet gyengének és megbízhatatlannak bizonyult, a nem-rokon szülőket nehezen azonosítja ($PI = 1.95 \cdot 10^{-5}$), és a viszonylag magas nullallél gyakoriságok tovább torzíthatják eredményeinket. Az extra-pár fiókákat erre tekintettel azonosítottam. A 48 fészket és 128 fiókát magába foglaló mintánkból a fiókánkénti EPF ráta 3,9%, a fiókánkénti IBP ráta 16,41%.

Kék vércsében először sikerült EPF és IBP jelenlétét kimutatni. Azonban figyelembe kell venni, hogy a genetikai vizsgálatainkban használt markerkészlet megbízhatósága kétséges. A vizsgálat eredményeinek pontosítása új, kék vércsére specifikus markerekkel, valamint még több fészekalj bevonásával erősen javallott.

8. Summary

Extra-pair fertilization (EPF) occurs, when in a clutch of a socially monogamous bird some hatchlings are not sired by their mother's social mate. EPF is widely spread among bird species that were considered strictly monogamous before. Another strange phenomena among birds is the intraspecific brood-parasitism (IBP), which occurs when a female lays some of its eggs in a conspecific's nest rather than its own. Although numerous studies have assessed these cases of alternative reproductive strategies the mechanisms behind their evolution and their adaptive function is still a mystery.

During my study I examined EPF and IBP rates of a diurnal raptor, the red-footed falcon (*Falco vespertinus*), using microsatellite markers. Since there is no markerset developed for red-footed falcons, my further goal was to create a markerset, which is able to detect cases of EPF and IBP.

For our research I used samples of clutches, taken from the red-footed falcon population in Körös-Maros Köze. The clutches came from six different breeding seasons. We applied cross-species amplification methods to create our markerset using markers developed for other closely related species. We chose 24 markers for this purpose. I amplified the DNA retrieved from the falcon samples with PCR and identified the genotypes for all individuals.

According to our results 16 out of 24 loci were polymorphic in red-footed falcon, out of which ten had at least three alleles. However, from these ten, two had unidentifiable genotypes, another two had high frequencies of null alleles. I performed the paternity and maternity tests using the remaining six markers. This markerset proved weak and unreliable, excluding nonrelated parents with difficulty ($PI = 1.95 \cdot 10^{-5}$), and the relatively high null allele frequencies further bias our results. We identified extra-pair hatchlings taking these results into account. Our sample, included 48 clutches and 128 hatchlings and had an EPF rate of 3,9% and an IBP rate of 16,41% per hatchlings.

It is the first time EPF and IBP was detected in red-footed falcons. Although our markerset used for paternity tests was not completely reliable. Further research with a markerset developed specifically for red-footed falcons and involving even more clutches is highly recommended.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek Szabó Krisztiánnak szakértelmét, útmutatásait, jótanácsait, amellyel dolgozatom megírását lehetővé tette és támogatta.

Köszönettel tartozom a Magyar Természettudományi Múzeum és a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület tagjainak, Fehérvári Péternek, Solt Szabolcsnak és Piross Imre Sándornak, akik a kék vércse mintákat és a hozzájuk tartozó adatokat szolgáltatták nekünk.

Külön köszönet Piross Imre Sándornak és Saliga Rebekának a minták katalogizálásában nyújtott segítségért

Végezetül köszönöm a Konzerváció Genetikai Munkacsoport munkatársainak, a labormunkák során nyújtott útmutatásukat, segítségüket, Dr. Pásztory-Kovács Szilviának, Nemesházi Edinának, Czikkelyné Ágh Nórának és Jakab Szilviának.

10. Irodalomjegyzék

- Akçay, E. and Roughgarden, J. (2007) 'Extra-pair paternity in birds: Review of the genetic benefits', *Evolutionary Ecology Research*, 9(5), pp. 855–868.
- Alcaide, M., Negro, J. J., Serrano, D., Tella, J. L. and Rodríguez, C. (2005) 'Extra-pair paternity in the Lesser Kestrel *Falco naumanni*: A re-evaluation using microsatellite markers', *Ibis*, 147(3), pp. 608–611. doi: 10.1111/j.1474-919x.2005.00429.x.
- Arnold, K. E. and Owens, I. P. F. (2002) 'Extra-pair paternity and egg dumping in birds: life history, parental care and the risk of retaliation', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1497), pp. 1263–1269. doi: 10.1098/rspb.2002.2013.
- Bagyura, J. and Palatitz, P. (2004) *Fajmegőrzési tervek, Kék vércse*. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Természetvédelmi Hivatal.
- Bateman, A. J. (1948) 'Intrasexual selection in *Drosophila*', *Heredity*, 2, pp. 349–368.
- Birkhead, T. R., Atkin, L. and Moller, A. P. (1987) 'Copulation behaviour of birds', *Behaviour*, 101, pp. 101–138.
- Birkhead, T. R., Burke, T., Zann, R., Hunter, F. M. and Krupa, a. P. (1990) 'Extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in wild zebra finches *Taeniopygia guttata*, revealed by DNA fingerprinting', *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 27(5), pp. 315–324. doi: 10.1007/BF00164002.
- Birkhead, T. R. and Møller, A. P. (1995) 'Extra-pair copulation and extra-pair paternity in birds', *Animal Behaviour*, 49(3), pp. 843–848. doi: 10.1016/0003-3472(95)80217-7.
- Blouin, M. S., Parsons, M., Lacaille, V. and Lotz, S. (1996) 'Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness', *Molecular Ecology*, 5, pp. 393–401.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C. and Sutherland, G. R. (1993) 'Incidence and Origin of " Null " Alleles in the (AC) n Microsatellite Markers', *American Journal of Human Genetics*, 52, pp. 922–927.
- Cezilly, F. and Nager, R. G. (1995) 'Comparative Evidence for a Positive Association between Divorce and Extra-Pair Paternity in Birds', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 262, pp. 7–12. doi: 10.1098/rspb.1995.0169.
- Chapuis, M. and Estoup, A. (2007) 'Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation', *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), pp. 621–631. doi: 10.1093/molbev/msl191.
- Dakin, E. E. and Avise, J. C. (2004) 'Microsatellite null alleles in parentage analysis', *Heredity*, 93, pp. 504–509. doi: 10.1038/sj.hdy.6800545.
- Danchin, E. and Wagner, R. H. (1997) 'The evolution of coloniality: the emergence of new perspectives.', *Trends in ecology & evolution*, 12(9), pp. 342–347. doi: 10.1016/S0169-5347(97)01124-5.
- Dawnay, N., Ogden, R., Wetton, J. H., Thorpe, R. S. and McEwing, R. (2009) 'Genetic data from 28 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in 6 bird of prey species', *Forensic Science International: Genetics*, 3(2), pp. e63–e69. doi: 10.1016/j.fsigen.2008.07.001.

- Double, M. and Cockburn, a (2000) 'Pre-dawn infidelity: females control extra-pair mating in superb fairy-wrens.', *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 267(1442), pp. 465–470. doi: 10.1098/rspb.2000.1023.
- Dunbar, R. I. M. (1982) 'Intraspecific Variations in Mating Strategy', in Bateson, P. P. G. and Klopfer, P. H. (eds) *Ontogeny*. Boston, MA: Springer US, pp. 385–431. doi: 10.1007/978-1-4615-7578-8_9.
- Dunn, P. O. and Lifjeld, J. T. (1994) 'Can extra-pair copulations be used to predict extra-pair paternity in birds?', *Animal Behaviour*, 47, pp. 983–985.
- Eliassen, S. and Jørgensen, C. (2014) 'Extra-pair mating and evolution of cooperative neighbourhoods', *PLoS ONE*, 9(7), p. e99878. doi: 10.1371/journal.pone.0099878.
- Ellegren, H. (2004) 'Microsatellites: simple sequences with complex evolution', *Nature Reviews*, 5, pp. 435–445. doi: 10.1038/nrg1348.
- Ewen, J. G., Armstrong, D. P., Ebert, B. and Hansen, L. H. (2004) 'Extra-pair copulation and paternity defense in the hihi (or stitchbird) *Notiomystis cincta*', *New Zealand Journal of Ecology*, 28(2), pp. 233–240.
- Foerster, K., Delhey, K., Johnsen, A., Lifjeld, J. T. and Kempenaers, B. (2003) 'Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings.', *Nature*, 425(6959), pp. 714–717. doi: 10.1038/nature01969.
- Forstmeier, W., Nakagawa, S., Griffith, S. C. and Kempenaers, B. (2014) 'Female extra-pair mating: Adaptation or genetic constraint?', *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Ltd, 29(8), pp. 456–464. doi: 10.1016/j.tree.2014.05.005.
- Griffith, S. C., Owens, I. P. F. and Thuman, K. a. (2002) 'Extra pair paternity in birds: A review of interspecific variation and adaptive function', *Molecular Ecology*, 11(11), pp. 2195–2212. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01613.x.
- Griffiths, C. S., Barrowclough, G. F., Groth, J. G. and Mertz, L. (2004) 'Phylogeny of the Falconidae (Aves): A comparison of the efficacy of morphological, mitochondrial, and nuclear data', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1), pp. 101–109. doi: 10.1016/j.ympev.2003.11.019.
- Heinzel, H. (2001) *Collins Pocket Guide - Birds of Britain and Europe(Reissue)*. Collins.
- del Hoyo, J., Elliot, A. and Sargatal, J. (1994) *Handbook of the Birds of the World Vol. 2. New World Vultures to Guinea-fowl*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Ille, R., Hoi, H., Grinschgl, F. and Zink, R. (2002) 'Paternity assurance in two species of colonially breeding falcon: the kestrel *Falco tinnunculus* and the red-footed falcon *Falco vespertinus*', *Etologia*, 10, pp. 11–151.
- Jones, A. G., Small, C. M., Paczolt, K. A. and Ratterman, N. L. (2010) 'A practical guide to methods of parentage analysis', *Molecular Ecology Resources*, 10, pp. 6–30. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L. and Marshall, T. C. (2007) 'Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment.', *Molecular Ecology*, 16, pp. 1099–1106.
- Kempenaers, B., Everding, S., Bishop, C., Boag, P. and Robertson, R. J. (2001) 'Extra-pair paternity and the reproductive role of male floaters in the tree swallow (*Tachycineta*

- bicolor)', *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49(4), pp. 251–259. doi: 10.1007/s002650000305.
- Korpimäki, E., Lahti, K., May, C. a, Parkin, D. T., Powell, G. B., Tolonen, P. and Wetton, J. H. (1996) 'Copulatory behaviour and paternity determined by DNA fingerprinting in kestrels: effects of cyclic food abundance', *Animal Behaviour*, 51(4), pp. 945–955. doi: 10.1006/anbe.1996.0098.
- Lack, D. L. (1968) *Ecological adaptations for breeding in birds*. Methuen, London.
- Li, S. and Brown, J. L. (2000) 'High frequency of extrapair fertilization in a plural breeding bird , the Mexican jay , revealed by DNA microsatellites', *Animal Behaviour*, 60, pp. 867–877. doi: 10.1006/anbe.2000.1554.
- Li, Y.-C., Korol, A. B., Tzion, F., Beiles, A. and Nevo, E. (2002) 'Microsatellites : genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms : a review', *Molecular Ecology*, 17, pp. 2453–2465. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x.
- McKinney, F., Cheng, K. M. and Bruggers, D. J. (1984) 'Sperm competition in apparently monogamous birds', in Smith, L. R. (ed.) *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. London: Academic Press, pp. 523–545.
- Moller, A. P. and Birkhead, T. R. (1993) 'Cuckoldry and Sociality : A Comparative Study of Birds', *The American Naturalist*, 142(1), pp. 118–140. doi: 10.1086/285531.
- Møller, A. P. and Curie, M. (2000) 'Male parental care , female reproductive success , and extrapair paternity', *Behavioral Ecology*, 11(2), pp. 161–168.
- Negro, J. J., Donázar, J. and Hiraldo, F. (1992) 'Copulatory behaviour in a colony of lesser kestrels: Sperm competition and mixed reproductive strategies', *Animal Behaviour*, 43(6), pp. 921–930. doi: 10.1016/0003-3472(92)90005-T.
- Negro, J. J., Villarroel, M., Tella, J. L., Kuhnlein, U., Hiraldo, F., Donazar, J. a and Bird, D. M. (1996) 'DNA fingerprinting reveals a low incidence of extra-pair fertilizations in the Lesser Kestrel', *Animal Behaviour*, 51(4), pp. 935–943. doi: 10.1006/anbe.1996.0097.
- Nesje, M. and Røed, K. H. (2000) 'Microsatellite DNA markers from the gyrfalcon (*Falco rusticolus*) and their use in other raptor species', *Molecular Ecology*, 9(9), pp. 1438–1440. doi: 10.1046/j.1365-294X.2000.00999-4.x.
- Nesje, M., Røed, K. H., Lifjeld, J. T., Linberg, P. and Steen, O. (2000) 'Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers', *Molecular Ecology*, 9(1), pp. 53–60.
- Neudorf, D. L. H. (2004) 'Extrapair paternity in birds : understanding variation among species', *The Auk*, 121(2), pp. 302–307.
- Nittinger, F., Gamauf, A., Pinsker, W., Wink, M. and Haring, E. (2007) 'Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization : mitochondrial and microsatellite data', *Molecular Ecology*, 16, pp. 1497–1517. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03245.x.
- Oddou-Muratorio, S., Vendramin, G. G., Buiteveld, J. and Fady, B. (2009) 'Population estimators or progeny tests : what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci ?', *Conservation Genetics*, 10, p. 1343. doi: 10.1007/s10592-008-9648-4.
- Padilla, J. a., Parejo, J. C., Salazar, J., Martínez-Trancón, M., Rabasco, A., Sansinforiano,

- E. and Quesada, A. (2009) 'Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in lesser kestrel (*Falco naumanni*) and cross-amplification in common kestrel (*Falco tinnunculus*)', *Conservation Genetics*, 10(5), pp. 1357–1360. doi: 10.1007/s10592-008-9711-1.
- Palatitz, P., Solt, S., Horváth, É. and Fehérvári, P. (2014) 'A Kékvércse-védelmi Munkacsoport 2014 . évi beszámolója', *Heliaca*, pp. 12–17.
- Parker, G. A. (1990) 'Sperm Competition Games: Sneaks and Extra-Pair Copulations', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 242(February), pp. 127–133. doi: 10.1098/rspb.1990.0115.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. (2006) 'GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research', *Molecular Ecology Notes*, 6, pp. 288–295.
- Petrie, M. and Kempnaers, B. (1998) 'Extra-pair paternity in birds: Explaining variation between species and populations', *Trends in Ecology and Evolution*, 13(2), pp. 52–57. doi: 10.1016/S0169-5347(97)01232-9.
- Petrie, M. and Moller, A. P. (1991) 'Laying eggs in others' nests : Intraspecific brood parasitism in birds', *Trends in Ecology and Evolution*, 6(10), pp. 315–320. doi: 10.1016/0169-5347(91)90038-Y.
- Primmer, C. R., Møller, A. P. and Ellegren, H. (1995) 'Resolving genetic relationships with microsatellite markers : a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*', *Molecular Ecology*, 4, pp. 493–498.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U. and Merilä, J. (2005) 'Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification', *Journal of Avian Biology*, 36(4), pp. 348–360. doi: 10.1111/j.0908-8857.2005.03465.x.
- Purger, J. J. (1998) 'Diet of Red-footed Falcon *Falco vespertinus* nestlings from hatching to fledging', *Ornis Fennica*, 75, pp. 185–191.
- Puurtinen, M., Ketola, T. and Kotiaho, J. S. (2009) 'The Good-Genes and Compatible-Genes Benefits of Mate Choice.', *The American Naturalist*. The University of Chicago Press, 174(5), pp. 741–752. doi: 10.1086/606024.
- Reid, J. M., Arcese, P., Keller, L. F., Germain, R. R., Duthie, A. B., Losdat, S., Wolak, M. E. and Nietlisbach, P. (2015) 'Quantifying inbreeding avoidance through extra-pair reproduction', *Evolution*, 69(1), pp. 59–74. doi: 10.1111/evo.12557.
- Rousset, F. (2008) 'GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux', *Molecular Ecology Resources*, 8(1), pp. 103–106.
- Rutkowski, R., Krupiński, D., Kitowski, I. and Gryczyńska, A. (2014) 'Preliminary Analysis of Genetic Variability in Montagu's Harrier (*Circus pygargus*) using Cross-Amplified Microsatellites', *Annales Zoologici*, 64(3), pp. 535–547. doi: 10.3161/000345414X684849.
- Rutkowski, R., Mazgajski, T. D. and Rejt, L. (2006) 'Cross-species amplification of microsatellite loci in european woodpeckers (Picidae)', *Annales Zoologici*, 56(4), pp. 819–826.
- Sheldon, B. C. and Mangel, M. (2014) 'Behavioural ecology: Love thy neighbour.', *Nature*, 512(7515), pp. 381–382. doi: 10.1038/512381a.

- Sorenson, D. (1992) 'Comment : Why is conspecific nest parasitism more frequent in waterfowl than in other birds ?', *Canadian Journal of Zoology*, 67, pp. 239–253.
- Tienhoven, A. (1983) *Reproductive physiology of vertebrates*. 2nd edn. Ithaca: Cornell University Press.
- Villarroel, M., Bird, D. and Kuhnlein, U. (1998) 'Copulatory behaviour and paternity in the American kestrel: the adaptive significance of frequent copulations.', *Animal Behaviour*, 56(2), pp. 289–299. doi: 10.1006/anbe.1998.0788.
- Wagner, R. H. (1993) 'The pursuit of extra-pair copulations by female birds: A new hypothesis of colony formation', *Journal of Theoretical Biology*, pp. 333–346. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.1993.1123>.
- Webster, M. S., Chuang-dobbs, H. C. and Holmes, R. T. (2001) 'Microsatellite identification of extrapair sires in a socially monogamous warbler', *Behavioral Ecology*, 12(4), pp. 439–446.
- Westneat, D. F. and Sherman, P. W. (1997) 'Density and extra-pair fertilizations in birds: A comparative analysis', *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(4), pp. 205–215. doi: 10.1007/s002650050381.
- Westneat, D. F., Sherman, P. W. and Morton, M. L. (1990) 'The Ecology and Evolution of extra-pair copulations in birds.', *Current Ornithology*, 7, pp. 331–339.
- Wink, M. and Sauer-Gürth, H. (2004) 'Phylogenetic relationships in diurnal raptors based on nucleotide sequences of mitochondrial and nuclear marker genes', *Raptors worldwide WWGBP*. Berlin, pp. 483–498.
- Wittenberger, J. F. and Tilson, R. L. (1980) 'The evolution of monogamy: hypotheses and evidence', *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 11, pp. 197–232.
- Yom-tov, Y. (2001) 'An updated list and some comments on the occurrence of intraspecific nest parasitism in birds', *Ibis*, 143, pp. 133–143.