

Állatorvostudományi Egyetem
Ökológiai Tanszék

Kék vércse (*Falco vespertinus*) populációk genetikai elkülönítése

Készítette: Ludányi András Máté

Témavezető:

Dr. Vili Nóra - ÁTE, Ökológiai Tanszék

Dr. Fehérvári Péter - ÁTE, Biomatematikai és Számítástechnikai Tanszék

Budapest, 2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke és szómagyarázat.....	1
Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1 A vizsgált faj.....	4
2.2 A populáció- és konzervációgenetikai vizsgálatok célja és jelentősége.....	6
2.3 A mitokondriális DNS minták elemzésének előnyei.....	8
3. Célkitűzések.....	10
4. Anyag és módszer.....	12
4.1 A felhasznált minták.....	12
4.2 A DNS kivonása toll-, és vérmintákból.....	13
4.3 A PCR reakciók.....	15
4.4 Eredmények kiértékelése agaróz gélelektroforézis segítségével.....	18
4.5 A rokonsági viszonyok megállapításához felhasznált genetikai markerek.....	19
4.5.1 Pseudogének („numts“).....	19
4.5.2 D-loop.....	20
4.5.3 Primer tervezés.....	20
4.5.4 Gélextrakciós eljárás.....	22
4.5.5 Plazmid izolálás.....	23
4.6 Szekvenálás.....	24
4.7 Használt programok, statisztikai módszerek.....	25
4.7.1 Staden Package programcsomag.....	25
4.7.2 MEGA.....	25
4.7.3 GenAlEx.....	26
4.7.4 PopART 1.7 (Population Analysis with Reticulate Trees).....	26
4.7.5 DnaSP version 6 (DNA Sequence Polymorphism).....	27
5. Eredmények.....	28
5.1 Az ND1 gén használata.....	28
5.2 A D-loop vizsgálata.....	28
5.2.1 Plazmidizolálás.....	31
5.2.2 FVcr2.....	32
5.3 A D-loop eredmények értékelése.....	32

6. Diskusszió, következtetések	36
7. Összefoglalás	39
8. Summary	40
9. Irodalomjegyzék	41
10. Köszönetnyilvánítás.....	45
11. Mellékletek	46

Rövidítések jegyzéke és szómagyarázat

bp	- Bázispár
CR	- Control régió (Control Region)
D-loop	- Displacement-loop. A mitokondriális DNS kontroll régiójában található nem kódoló szakasz, melyre magas mutációs ráta jellemző.
ddNTP	- Didezoxinukleotid-trifoszfát
dNTP	- Dezinukleotid-trifoszfát
Dupla csúcs	- Olyan nukleotid pozíció, mely esetén a szekvenálási kromatogram alapján nem dönthető el két bázis közül melyik a valós. Okai között megemlítendő például a pszeudogén, heteroplazmia vagy egyszerű leolvasási hiba
Frameshift mutáció	- Kereteltolódást okozó mutáció, ahol egy vagy több bázispár kiesés, beékelődés hatására a leolvasási keret a kódoló szekvencián belül eltolódik, így a mutáció helye után a DNS teljesen más aminosav sorrendet határoz meg.
Ghost band	- Gél elektroforézis során megjelenő másodlagos, a termékénél halványabb sávok.
Haplotípus	- A genotípusnak az a része, amelyet egy kromoszómán elhelyezkedő, szorosan kapcsolt gének határoznak meg
Lókus	- A lókus vagy génhely a biológiában a gén vagy egyéb fontos szekvencia a kromoszómán vagy genetikai térképen elfoglalt helyét jelenti.
Marker	- A genetikai marker egy ismert elhelyezkedésű gén vagy DNS szekvencia a kromoszómán, melynek segítségével fajok vagy egyedek beazonosíthatók.
Monomorf	- Amennyiben adott populációban egy lókuszon csak egy allél fordul elő, azt monomorfnek nevezzük.

mtDNS	- Mitokondriális DNS
NAD	- Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
ND1	- NADH-dehidrogenáz gén 1-es alegység
PCR	- Polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
SNP	- Single nucleotide polymorphism. Egy DNS szekvencia-variáció, mely akkor jön létre, ha egy nukleotid a genomban megváltozik
Stop kodon	- A genetikai kódban a stop kodon egy olyan bázis hármass a messenger RNS-en, amely a transzlációt leállítja.
TAE	- Tris-edta-acetát
Tm	- Melting temperature. Az a hőmérséklet, amelyen a DNS kettős spirált összetartó kötések felbomlanak és a két szál elválik egymástól
Törzsfa	- Egy ábra, amely a különböző rendszertani csoportok evolúciós kapcsolatát szemlélteti. Az ágvégeken egyedi genotípusok (molekuláris alapon készített fák esetén), illetve tipikusan fajok (morfológiai alapon készített fák esetén) vannak.
Tranzíció	- Tranzícióról beszélünk, ha egy bázis hozzá hasonló kémiai tulajdonságú bázisra cserélődik (purin vázas bázis purin vázassal, pirimidin vázas pirimidin vázassal cserélődik ki).
Tranzverzió	- Tranzverzióról beszélünk, ha egy bázis vele ellentétes kémiai tulajdonságú bázisra cserélődik (purin és pirimidin vázas bázisok cseréje).

Bevezetés

A kék vércse (*Falco vespertinus*) Magyarországon költő ragadozó madár, országunk a faj elterjedési területének legnyugatibb szélén fekszik. A magyar alföld faunájában meghatározó szerepet betöltő állatnak azonban sok más társával együtt az utóbbi évtizedek során drasztikusan megcsappant mind a populációja, mind az élőhelyének a területe. Így a természetvédelmi célkitűzések listájának élére kerültek a védelmére irányuló törekvések.

A kék vércsék többnyire kolóniákban költő madarak, melyek az esetek jelentős részében vetési varjú (*Corvus frugilegus*) költőtelepein, azok elhagyatott fészkeit hasznosítják újra. Az utóbbi időben ugyan a varjak száma is drasztikusan csökkent, ez azonban nem volt hatással az elterjedési mintázatukra, ellentétben a kék vércsékkel, melyeknek a költőterülete lecsökkent.

Jelen kutatás célja, hogy megismerjük a faj genetikai változatosságát és populációszerkezetét. Ehhez eszközül mitokondriális DNS minták elemzését alkalmaztuk, melyeket számos magyar régió több kolóniájából, és egy romániai régió különböző kolóniáiból gyűjtöttünk. A minták alapján megpróbáltuk feltárni a kék vércsék fragmentált szubpopulációi közötti genetikai kapcsolatot vagy távolságot.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A vizsgált faj

1. ábra A kék vércse (fotó: Palatitz Péter)



A Magyarországon fokozottan védett¹ kék vércse (*Falco vespertinus*, Linné 1766), angolul red-footed falcon, a sólyomfélék (Falconidae) családjába tartozó ragadozó madárfaj. A Természetvédelmi Világszövetség Vörös Listáján² a közel veszélyeztetett³ kategóriába sorolják (IUCN 2008). Közepesen kis méretű (testhossz 28-34 cm, szárnyfesztávolság 65-76 cm, tömeg 130-197 g), alakja a vörös vércsére (*Falco Tinnunculus*) és a kabasólyoméra (*Falco subbuteo*) emlékeztet (Mullarney et al., 1999). Legközelebbi rokona az amuri vércse (*Falco amurensis*), mely tőle területileg jól elkülönülten, Kelet - Ázsiában költ (del Hoyo et al., 1994; Wink and Sauer-Gürth, 2004; Palatitz, 2012).

Megjelenése alapján jól elkülöníthető az Európában előforduló hasonló ragadozómadaraktól. Erős ivari dimorfizmus jellemzi. A hímek tollazata kékes - palaszürke, fakóvörös „gatyával“

¹ 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet, 4. melléklet

² IUCN - International Union for Conservation of Nature

³ Near Threatened

és alsó farkfedőkkel. Ezen felül a hímek viaszhártája és lába is sötétvörös. Innen ered az angol elnevezése (Bagyura and Palatitz, 2004). A tojó esetében az alsótest világos vörhenyessárga, míg a hát palaszürke és keresztsávós. A fej sárgásfehér, a viaszhártya és a lábak színe pedig a híméhez hasonló (Mullarney et al., 1999; Bagyura and Palatitz, 2004). A fiatal madarak leginkább a tojókhoz hasonlítanak, alsótestük barnássárga, fekete foltokkal, hátoldaluk barnásszürke (Bertók, 2017).

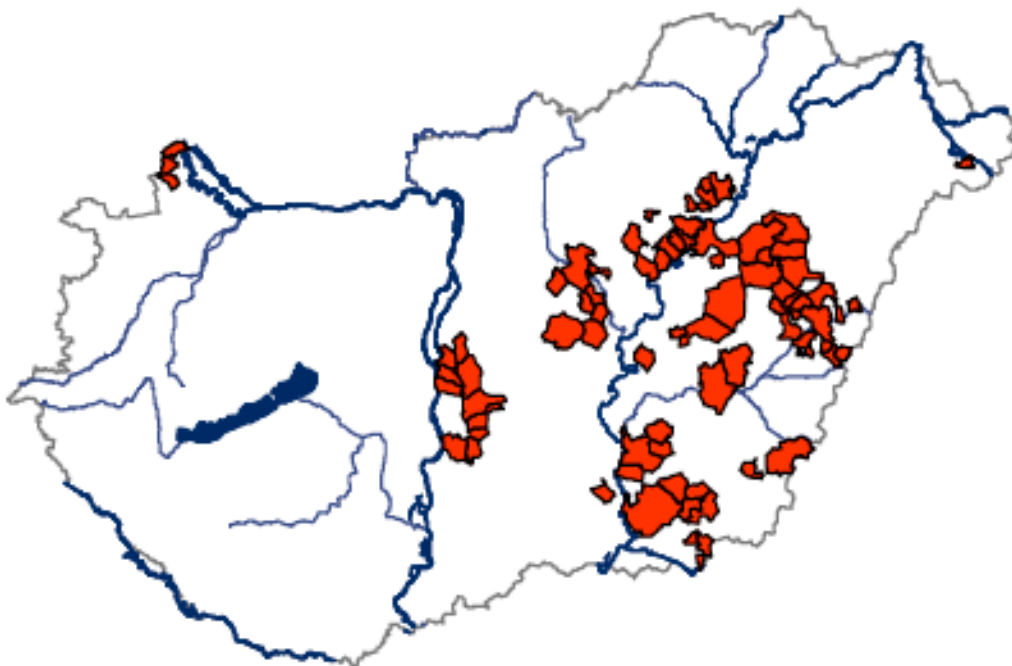
A kék vércsék szaporodási területe a palearktikus faunartományon belül, az északi mérsékelt öv sztyeppe, erdős-sztyeppe és szántóföldi területein át húzódik. Előfordulásának nyugati széle Magyarország nyugati határáig nyúlik Közép-Európában (Purger, 1996), míg keleti irányban egészen a Bajkál-tóig megfigyelhető (Bagyura and Palatitz, 2004). Obligát vonuló madár, mely a telet Afrika szubszaharai, délnyugati részén, a Dél-Afrikai Köztársaság, Angola, Zambia, Botswana, Namíbia és Zimbabwe területén tölti. Szeptember végén vándorolnak el, majd áprilisban térnek vissza az északi féltekére, hogy a költési szezon kezdetét vehesse (Bagyura and Palatitz, 2004; Bertók, 2017). A madárfaj ezen kívül migrációra is hajlamos, olyannyira, hogy gyakran megfigyelik kóborló egyedeit a kelet-európai, ázsiai előfordulási területén kívül is (Nightingale and Allosopp, 1994; Harrop et al., 2013; Haraszthy and Palatitz, 2009).

Fészkelési szokásait tekintve ez a madár országunk egyetlen telepesen is fészkelő ragadozó madara (fakultatív telepes költő). Más sólyomfélékhez hasonlóan a kék vércse sem épít fészket, hanem leggyakrabban varjúfélék, azon belül vetési varjak, dolmányos varjak (*Corvus cornix*) és szarkák (*Pica pica*) fészkeit foglalja el, illetve mesterséges költőládákban is költenek. Varjútelepek hiányában szoliter költések is megfigyelhetők elsősorban a hazai varjúpopuláció méretének nagy mértékű megcsappanása óta. Azonban nem kizárólag ebben az esetben fordul elő, mivel megfigyelték, hogy a madarak akkor is költenek laza telepeken vagy szoliter módon, ha az adott területen nagy sűrűségű fészektelepek is megtalálhatók (Végvári et al., 2002). Ilyenkor elsősorban szarkák fészkeit részesítik előnyben, ezt a folyamatot pedig az utóbbi időben megfigyelhető szarka-állomány koncentrációknak köszönhetően kialakuló laza fészkelő közösségek megjelenése is segítette (Bagyura and Palatitz, 2004).

Hazánk fészkelő állományáról felmérés először az 1900-as évek közepén készült, akkor a párok számát 2200-2500 párra becsülték (Bagyura and Palatitz, 2004). Sajnos később, főképp a varjútelepek 80-as, 90-es évekbeli tudatos irtásának, illetve a varjak városias területekre húzódásának köszönhetően ez a szám drasztikusan csökkent (Fehérvári et al., 2008). Ezen

kívül negatívan hatott az állományra a hagyományos legelői állattartás csökkenése, az alföldi fasorok és erdők kivágása, és a nagyfeszültségű elektromos vezetékek szigetelésének hiánya is (Bagyura and Palatitz, 2004). Az 1990 körüli években még 2000 - 2200 körülre becsülték (Haraszthy, 1998), azonban 2003-re már csupán nagyjából 700 pár maradt, és a dunántúli költőterületekről teljesen el is tűnt (Bagyura and Palatitz, 2004). Szerencsére a fajmegőrzési erőfeszítéseknek köszönhetően azóta növekvő tendenciát mutat a madarak száma: 2009-ben az Európai Unió teljes állományának mintegy 40%-a költött hazánkban, mely mintegy 1000-1100 párt jelent (Palatitz, 2012; Palatitz et al., 2015).

2. ábra A Kék vércse elterjedési területe Magyarországon 2006 évi felmérés alapján.



A piros sokszögek olyan közigazgatási területeket fednek le, melyekben kolóniákban vagy szoliter módon költő párokat jegyeztek föl. (Fehérvári et al., 2008)

2.2 A populáció- és konzervációgenetikai vizsgálatok célja és jelentősége

A populációgenetika az egyes populációk genetikai felépítését befolyásoló hatásokkal foglalkozik, azaz elsősorban a genetikai kompozíció időbeli változását vizsgálja, ahogy azt a természetes szelekció, mutáció, migráció és egyéb faktorok befolyásolják. Ahhoz, hogy megpróbáljuk előre jelezni egy populáció vagy állatfaj jövőbeli sorsát, esetleges esélyét a kihalásra, szükségünk van ökológiai és genetikai információkra. Az elsődleges populációs

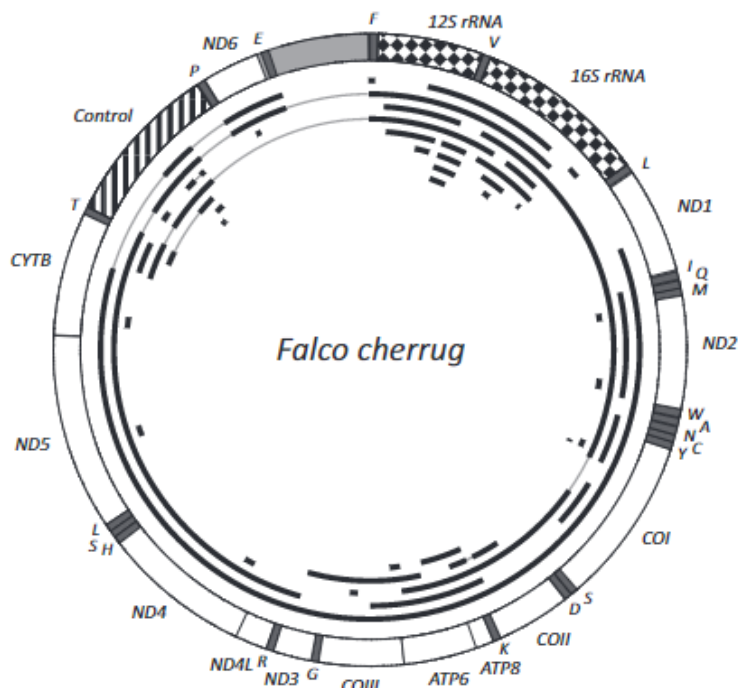
dinamikát befolyásoló demográfiai faktorok közé sorolhatjuk a szociális struktúrát, környezeti hatások ingadozását, a faj egyedeinek eloszlását heterogén környezetben valamint a helyi kihalásokat, kolonizációkat. Kis méretű populációkban megnő az esélye a genetikai sodródásnak, ami allélek vesztéshez, vagy fixálódáshoz vezethet, a beltenyésztés pedig ezt a folyamatot felgyorsítja. Így nagy mértékben csökken az átlagos egyedi fitness. A genetikai változatosság ilyen módon bekövetkező véletlenszerű elvesztése pedig csökkenti az alkalmazkodóképességet a jövőben esetlegesen megváltozó környezeti feltételekhez. Ezen felül, kis, vadon élő populációkban a kihalás esélye is szignifikánsan nő, párhuzamosan a heterozigócia csökkenésével (Li et al., 2014). Ahogy a természetközeli élőhelyek területe csökken és egyre inkább fragmentálódik, egyre fontosabb, hogy megismerjük a kis populációk ökológiai és evolúciós dinamikáját annak érdekében, hogy hatékonyabban tudjuk megőrizni és kezelni őket egy olyan időszakot várva, amikor remélhetőleg élőhelyeik jövőbeli restitúciójával újra terjeszkedésbe kezhetnek (Lande, 1988).

Manapság sajnálatos módon, a példa nélküli mértékű fajkihalások korában élünk: 3000-30000 közötti értékre becsülik az évente kiháló állatfajok számát. Kihalás fenyegeti a következő pár évtizeden belül körülbelül az emlősfajok 23%-át, a madárfajok 12%-át, a teknősfajok 42%-át, a kételtű fajok 32%-át, a halfajok 34%-át és a nagyobb növény taxonok 9-34%-át (Allendorf et al., 2013). Ennél azonban még elkésőbb lehet a valós helyzet, mivel a világon élő állat és növényfajok nagy részének kevéssé vagy egyáltalán nem ismert a konzervációs státusza. A konzervációbiológia tehát talán a legnagyobb és legnehezebb kérdéseket veti föl, amivel a tudománynak valaha szembe kellett néznie.

A genetikai diverzitás és a konzerváció nagyon sok szinten összekapcsolódik: gének, egyedek, populációk, variációk, alfajok, fajok, nemzetségek szintjén. A genetikai diverzitás felmérése retrospektív módon betekintést nyújt egy faj evolúciós vonalainak alakulásába (filogenetika), megmutatja a pillanatnyilag fennálló genetikai struktúrát populációkon belül és azok között (populáció- és ökológiai genetika), és bizonyos keretek között előre jelzi egyes populációk és fajok jövőbeli evolúciós potenciálját (evolúciós biológia) (Allendorf et al., 2013).

2.3 A mitokondriális DNS minták elemzésének előnyei

3. ábra A kerecsensólyom (*F. cherrug*) mtDNS felépítése



(Nacer and Raposo do Amaral, 2017)

A mitokondrium elsősorban a sejtlégzés folyamatában játszik szerepet, azaz abban a folyamatban, mely során a tápanyagokból energiát nyer a szervezet. Az állati mtDNS 13 fehérjekódoló, 22 transfer RNS és 2 riboszómális RNS kódoló szakaszt tartalmaz. Ezen felül található még rajta egy kontroll régiót is (CR), ami a replikáció és a transzkripció iniciációjához szükséges szakaszokat foglalja magában.

A mtDNS több oknál fogva népszerű alapanyaga a populációgenetikai kutatásoknak. Először is viszonylag könnyű dolgozni vele. Kis mérete és a gének viszonylagos konzervált elhelyezkedése lehetővé teszi univerzális primerek használatát fajok széles palettáján.

A második ok az, hogy a mutációs ráta kifejezetten magas ezekben a DNS gyűrűkben (Freeland et al., 2011). A mitokondriális genom nincs hiszton fehérjék által védve, mint a sejtmagban található DNS, ráadásul nagyon közel helyezkedik el az energiatermelő folyamatokhoz, ezáltal a reaktív oxigén szabadgyökök romboló hatásainak is ki van téve. Ezek a faktorok, illetve a mitokondriális DNS replikáció kisebb mértékű pontossága együttesen megnövekedett mutációs rátát eredményez. Ezek a gyakori mutációk azonban ellensúlyozottak a sejtben található nagy számú mitokondrium által. Sejttípustól függően akár ezres nagyságrendben is jelen lehetnek. Mindazonáltal ez a csökkent szelektív nyomás

lehetővé teszi, hogy a mutálódott mtDNS szakaszok idővel akkumulálódjanak, ennél fogva pedig jó indikátorai lehetnek minden belső és környezetből származó roncsoló anyagnak, és általában a sejtszintű állapotromlásnak (Quispe-Tintaya et al., 2013).

A harmadik ok pedig, az az előnyös tulajdonsága, hogy mtDNS a legtöbb állatfaj, így madarak esetében is, anyai ágon öröklődik. Ez azt jelenti, hogy rekombináció nélkül kerül az utódokba, ezáltal pedig nagymértékben egyszerűsíti és egyértelműbbé teszi az öröklődési vonalak alakulását a nukleáris DNS-hez képest.

A negyedik ok valamilyen szinten még az előzőhöz kapcsolható. Mivel a mtDNS haploid és egy szülő örökíti, ebből adódóan különösen érzékeny olyan demográfiai eseményekre, mint az úgynevezett palacknyak hatás. Ez a jelenség olyan esetekben figyelhető meg, amikor a populáció mérete hirtelen csökken, például járvány vagy mérgezés következtében. Ilyen esetekben, ha a populáció állapota stabilizálódik is, a mtDNS haplotípusok száma kevesebb lesz a nukleáris DNS genotípusok alapján várhatóhoz képest (Freeland et al., 2011).

Az utolsó és egyben legellentmondásosabb ok, hogy a mtDNS evolúciója viszonylag neutrális. Ez azt jelenti, hogy hasznos mutációk nagyon ritkák, annak köszönhetően, hogy nem sok, de funkcionálisan nagyon specifikus fehérjét kódol. Ebből következően a változások leginkább kétfélek lehetnek: vagy káros, ezáltal a szelekció során eltűnő, vagy semleges tehát megtartott. Ezt az elméletet azonban több kutatás megkérdőjelezi. Egy kutatás (Castoe et al., 2009) fehérjekódoló változásokat talált kígyók és agámák mitokondriális genomjában, ami konvergens evolúcióra utaló jel, tehát pozitív szelekció. Egy másik, általánosabb, a mtDNS semlegességét vizsgáló kutatás (Bazin et al., 2006), 3000 állatfajt vizsgálva kimutatta, hogy fajokon átívelően a mtDNS átlagos változatossága feltűnően konstans volt, nem tükrözi a fajgazdagságot és az ökológiai hatásokat. Ezzel ellentétben a sejtmagi DNS variabilitása a várakozásoknak megfelelő volt. Ezt a szerzők azzal magyarázzák, hogy a mtDNS relatív változatlansága visszatérő szelekciós folyamatok hatására kialakuló adaptív evolúciós válaszreakciók eredménye. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy annak ellenére, hogy ez a módszer máig az egyik legnépszerűbb a populációgenetikai kutatásokban, a molekuláris evolúció semlegességének elméletét megfelelő körültekintéssel, és a fent említett fenntartások tudatában kell alkalmazni. Ebből következően a mtDNS biodiverzitással kapcsolatos és konzervációgenetikai kutatásokban való használatának a helyénvalóságát is esetenként felül kell vizsgálni. (Freeland et al., 2011).

3. Célkitűzések

A kék vércse Magyarországon fokozottan védett madárfaj, eszmei értéke 500 000 Ft. Élőhelyeinek folyamatos pusztulása nagymértékben veszélyezteti az állomány mind hazai, mind európai fennmaradását. Ebből kifolyólag magyar és európai uniós védelmi programok indultak a közelmúltban (<http://falconproject.eu>). Szakdolgozati kutatásom is egy ilyen a programnak a részét képezi (2012-2018 Conservation of the Red-footed Falcon in the Carpathian Basin LIFE11/NAT/HU/000926), ez a program szolgáltatta az anyagi fedezetet is a vizsgálatainkhoz. Ilyen programok segítségével igyekszünk jobban megismerni a veszélyeztetett madarak viselkedését, tulajdonságait, hogy ezáltal minél hatékonyabb fajvédelmi programok indulhassanak a jövőben. A projekt keretein belül, a korábban feltérképezett magyar költőállományokból gyűjtött DNS mintákat hasonlítottam össze, egy másik jelentős európai állomány genetikai tulajdonságaival. Ezek a minták földrajzilag a Kárpátok hegyvonulatának köszönhetően egy, a magyar Alföldről kifejezetten elszigetelt, romániai területről, azon belül a Román-alföldről származtak. Referenciaként pedig felhasználtunk a kék vércse legközelebbi rokonától, az amuri vércsétől (*Falco amurensis*) származó mintákat is. Az amuri vércse mintákat a kék vércse LIFE program partnerprogramjaként (Amur Falcon Partnership) folyó amuri vércse védelmi program szolgáltatta (Amuri vércse műholdas követése Indiában). Az én vizsgálataimmal párhuzamosan az Állatorvostudományi Egyetem Biológia Intézetének konzervációgenetikai laboratóriumában mikroszatellita marker tesztelésen alapuló kutatás is folyt, melyet szintén ennek a védelmi programnak a keretein belül, ugyanazokat a mintákat felhasználva végeztek. Vizsgálatunk során a különböző, földrajzilag egymástól elkülönülő költőállományokból származó, vér és tollmintákból izolált mitokondriális DNS szekvenciákat vizsgáltuk. A DNS-eken igyekeztünk jól másolható és karakterisztikus szakaszokat keresni, melyek segítségével, azok bázis szekvenciáit összehasonlítva, következtethessünk az egyes egyedek és ezen keresztül az egyes állományok között fennálló genetikai információáramlás meglétére, mértékére és nem utolsósorban annak irányára.

Szakdolgozatom célkitűzései tehát:

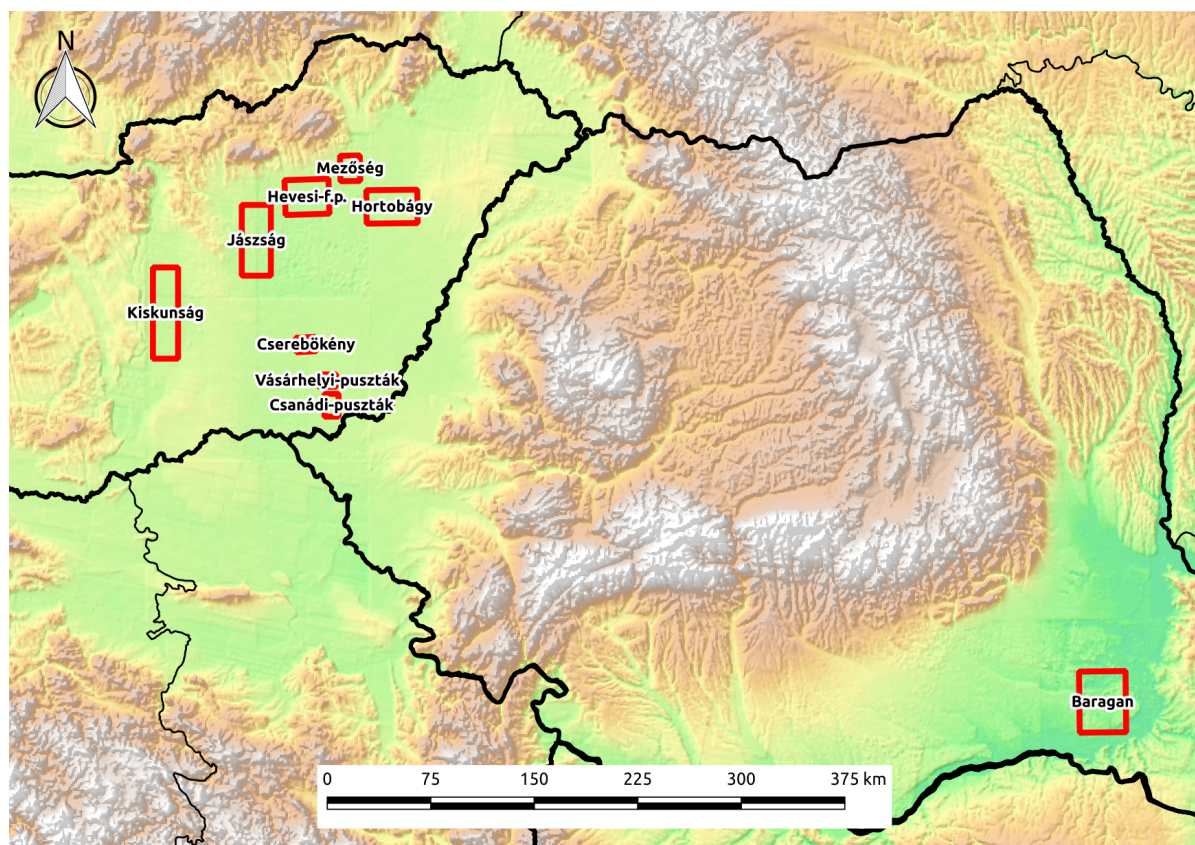
- Egy megfelelő gén vagy szekvencia és primer pár keresése, amely ezen a madárfajon megfelelően és hatékonyan használható.
- A talált marker segítségével ismereteket gyűjteni a különböző költőállományok genetikai eltéréseiről.
- Az így gyűjtött ismeretek alapján modellezni a génáramlás mértékét és előfordulását mind a magyar állományokon belül, mind a magyar és a román állományok között.
- Az általunk kifejlesztett mitokondriális markerekkel segíteni az amuri vércse program genetikai kutatását.

4. Anyag és módszer

4.1 A felhasznált minták

A vizsgálatokhoz a kék vércse LIFE program keretein belül elvégzett természetvédelmi állományfelmérési munkák során összegyűjtött kék vércse vér-, és tollmintákat használtam fel, melyeket a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület - Kékvércse-védelmi Munkacsoportjának munkatársai gyűjtöttek be. A gyűjtéshez a megmintázandó területeket a kék vércse LIFE program korábbi felmérései alapján (Fehérvári et al., 2008, Palatitz et al., 2015) választották. Az általam felhasznált minták kilenc év gyűjtéseit felölelő időszakból származtak, 2007-től 2015-ig. A minták összesen 41 magyar és öt román kolóniától, valamint az amuri vércse program keretében végzett gyűjtésből, az észak-kelet indiai Nágaföldről, gyülekezőhelyről származnak. Ez egy olyan terület, ahol a madarak rendszeresen, tömegesen megpihennek a vonulás során. 354 magyar és 12 román, költőterületről gyűjtött kék vércse, valamint 74 gyülekezőhelyről származó amuri minta állt rendelkezésünkre. A román és magyar gyűjtésből is rendelkezésre álltak gyülekezőhelyi minták, de esetükben a vizsgálatokhoz csak költőhelyekről származó mintákat használtunk föl. Ez kiemelkedő fontosságú, mert kutatásunkban a konkrét költőterületekhez köthető egyedek genetikai tulajdonságait kívántuk vizsgálni, hogy így, az egyes populációkra jellemző mintázatokat összehasonlítva, következtetni tudjunk a populációk közötti kapcsolatokra. A magyar gyűjtőhelyeket földrajzi elhelyezkedésük alapján nyolc nagyobb régióba csoportosítottuk, melyek a Borsodi mezőség (1), a Csanádi-puszták (2), Cserebökény (3), Hevesi Füves Puszták (4), Hortobágy (5), Jászság (6), Kiskunság (7) és Vásárhelyi-puszták (8) voltak. (2. és 4. ábra), a román költőhelyek pedig egy önálló régiót alkotnak.

4. ábra A minták gyűjtőhelyei



A tollminták, fiókák hátáról származó tokos tollak voltak, melyek, a DNS roncsolódásának megelőzése érdekében, 96%-os etil-alkoholban, cryo-csővekben, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kerültek tárolásra. A vérminták esetében, a gyűjtés adult és juvenilis egyedek szárnyvénájából történt, és a minták az előbb ismertetett módon lettek tárolva. Amennyiben egy egyed esetében mindkét féle minta elérhető volt, a kedvezőbb és gyorsabb izolációs eljárás miatt a vérminta volt a DNS izolálás preferált forrása. A minták feldolgozása az Állatorvostudományi Egyetem Biológiai Intézetében, a Konzervációgenetikai Kutatócsoport laboratóriumában történt.

4.2 A DNS kivonása toll-, és vérmintákból

A DNS izolálás folyamatának a célja, hogy a toll- vagy vérmintákban található örökítőanyagot elválasszuk a többi szöveti elemtől. Ez egy alapvető fontosságú lépés ahhoz, hogy a későbbiekben a kinyert DNS-t felszaporíthassuk PCR reakcióval. Ehhez mi kétféle, a

Geneaid® és a NucleoSpin® nevű DNS izoláló kiteket, illetve a Quiagen QIAprep® Spin Miniprep plazmid izoláló kitet használtuk, melyről részleteiben a későbbiek során írok. A továbbiakban a Geneaid® kit használatához szükséges protokollt fogom ismertetni.

A folyamat első lépéseként, az alkoholban tárolt koagulált vérmintákból pipettahegy segítségével, egy gombostűfejnyi darabot választottunk le, amit tiszta eppendorf csőbe helyeztünk. Ezt emésztőenzimmel kezeltük, ami megszabadítja a DNS-t a szerkezeti fehérjétől. Megakadályozandó, hogy a tartósításra használt alkohol denaturálja az emésztőenzimet, azt el kellett párologtatni mintáinkból. Ehhez, az eljárás előtt, a nyitott, mintákat tartalmazó eppendorf csöveinket száradásig sötét, légmozgás mentes helyre tettük. A sötét biztosítása azért fontos, mivel az UV sugárzás károsítaná a DNS-t. Az emésztéshez 200 µl GT puffert és 20 µl proteináz-K fehérjebontó emésztőenzimet adtunk a mintához. Ezután a csöveket 60 °C-os vízfürdőbe helyeztük legalább egy órára, majd további 200 µl GBT puffer hozzáadása után, még 20 percig 60 °C-on ráztattuk. A fehérjék ekkorra már, vérminták esetén gyakorlatilag teljesen lebomlanak, így a DNS molekulák szabaddá válnak. Utolsó lépésként, az oldatot vortex segítségével homogenizáltuk, majd centrifugával üleptítettük, hogy az esetlegesen a kupakban megtapadt cseppek ne hogy szétfröccsenjenek a cső nyitásakor.

A tollminták esetén az emésztési eljárást másképp kell végezni, mivel DNS csak a tollcsévék végében, illetve a nagyobb tollak felső köldökében (superior umbilicus) (Horváth et al., 2005) található és a tollakat alkotó nagy mennyiségű keratin nagyon ellenálló, nehezen emészthető. Ezeknek a mintának a feldolgozásához ezért, a folyamat elején, néhány plusz lépés szükséges. Az alkoholban tárolt tokos tollak csévéjét steril szikével lemetszettük, majd eppendorf csőbe helyeztük. Az alkohol elpárologtatása után hozzáadtuk a csévékhez a korábban ismertetett puffert és emésztőenzimet, kiegészítve 10 µl DTT (1,4-dithiothreitol) oldattal, amely a keratin diszulfid-híd kötéseit képes felbontani. Ezt követően a minták szintén vízfürdőbe kerültek, azonban a vérminták feldolgozásához képest jóval hosszabb ideig, nagyjából egy éjszakán át (minimum 14 óráig) kell a mintákat inkubálni. Ettől a ponttól, a két minta feldolgozásának folyamata egyforma, azzal a különbséggel, hogy a tollminták esetében időnként egy úgynevezett „tissue grinder“ használata szükséges, mely szétmorzsolja a mintát, ezáltal a fehérjék könnyebben elérhetővé válnak a proteináz enzim számára.

A következő lépés a homogenizált oldatból a DNS kivonása. Ehhez egy speciális, úgynevezett adhézios oszlopot tartalmazó centrifugacsövet használtunk. Az oszlop speciális tulajdonsága, hogy megköti a nukleotidokat alkoholos közegben, míg a többi anyag (fehérjék, lipidek, szénhidrátok és egyéb sejtalkotók) a cső alsó tartályába folyik a centrifugálás közben. A

homogenizált oldathoz 200 µl, 96%-os etil-alkoholt adtunk, majd ezt átmértük az adhéziós oszlopot tartalmazó csőre. Ezt centrifugába helyeztük, és 2 percig 13000-es fordulatszámmal (rpm) pörgettük. A cső aljában összegyűlt, a felesleges anyagokat tartalmazó folyadékot kiöntöttük, majd ezeket a lépéseket még kétszer ismételtük először 400 µl W1 majd 600 µl Wash puffer hozzáadásával, aminek a célja, hogy biztosítsa minden szennyezőanyag lemosását az oszlopról, hogy így csak tiszta DNS maradjon a mintánkban, ezekben az esetekben a centrifugálás 30 másodpercig tartott. Végül egy utolsó 2 perces centrifugálást végeztünk a mosópufferek maradékának az eltávolítása érdekében. Az oszlopot ezután áthelyeztük egy tiszta eppendorf csőbe, és minimum 20 percig nyitott kupakkal szárítottuk a maradék alkohol elpárolgatása céljából, amely a nukleotidkötési fázisból maradt vissza. Amint ezzel végeztünk 100 µl felmelegített Elution puffert mértünk az oszlopra, melynek a feladata, hogy a DNS molekulákat leoldja az oszlopról és oldatba vigye. Ennek érdekében 5-10 perc inkubálás után újfent 13000-es percenkénti fordulatszámmal centrifugáltuk, ezúttal fél percig. Ennek befejeztével, az eppendorf cső alján összegyűlt a most már tiszta DNS-t tartalmazó puffer. A DNS izoláló oszlopok nem újrahasznosíthatóak, ezért ezután kidobásra kerültek. A kinyert DNS oldatokat -20 °C-on tároljuk.

Az eljárás hasonló a NucleoSpin® izoláló kit használata esetén is, csupán a felhasznált pufferek és mennyiségek tértek el.

4.3 A PCR reakciók

A vizsgálataim alapját mitokondriális DNS markerek felszaporítása jelentette, melyet polimeráz láncreakcióval hajtottunk végre („polimerase chain reaction“, innentől röviden PCR). A PCR segítségével viszonylag könnyedén és szelektíven fel tudunk szaporítani bizonyos genomi szakaszokat. Ez általában úgy történik, hogy a teljes DNS-t izolálják egy mintából, majd páros oligonukleotid primerek segítségével ismételt ciklusokban másolatokat gyártanak a célszekvenciáról, amíg elegendő termék nem keletkezik. A primerek olyan rövid, 15-25 bázisból álló szakaszok, melyek a DNS replikációhoz elengedhetetlen kezdőpontként szolgálnak. Komplementernek kell lenniük a másolás kezdőpontjaként használni kívánt DNS szakasszal, hogy ahhoz specifikusan hozzákötődve megfelelő kiindulási pontként szolgáljanak a replikációnak.

A PCR reakció minden ciklusa 3 fő lépésből áll: a DNS denaturálása, a primerek kapcsolódása („annealing“- anellációs vagy kapcsolódási fázis) és az extenziós vagy meghosszabbítási fázis. Az első, denaturációs lépés során a minta hőmérsékletét olyan magasra (megközelítően 94 °C-ra) emeli a PCR automata, hogy a kettős DNS szálak összekötő hidrogénhidak felszakadjanak. Így egyszálú, templátként használható DNS jön létre. Ezután a hőmérséklet hirtelen lecsökken egy olyan szintre (nagyjából 40 és 65°C közé), ami lehetővé teszi, hogy a primerek kapcsolódjanak a megfelelő komplementer szakaszokhoz a templát szálakon. Az utolsó fázisban a DNS polimeráz enzim, a korábban a reakcióelegyhez adott szabad nukleotidok segítségével, a primerektől kiindulva felépíti a másolat szekvenciákat. Ez a használt enzim hőmérsékleti optimumán történik, általában 72°C-on. Mivel minden ciklusban 2 leánylánc képződik szülő nukleinsavlánconként, a képződő szekvenciák mennyisége exponenciálisan nő a reakció során (Freeland et al., 2011).

Első lépésben kisebb mennyiségekkel teszteltük, hogy a reakció sikeres volt-e, azaz megfelelő tisztaságú terméket eredményezett-e nagyjából a várt mérettartományon belül. Ezt mind a magyar és a román kék vércse, illetve az amuri mintákból, taláalomra kiválasztott 10 mintával végeztük el. A legtisztább terméket adó mintákkal léptünk tovább, mégpedig oly módon, hogy próbáltuk a folyamat szelektivitását és specificitását javítani. Ehhez többféle lehetőség adott: egyrészt a reakcióelegy összetételének változtatása, ezen belül a $MgCl_2$ illetve a dNTP mennyiségének emelése, másrészt a hőmérsékleti viszonyok változtatása. A végleges elegyösszetételt az 1. táblázat szemlélteti.

Tapasztalataink alapján a végleges paraméterek a következők voltak:

PCR hozzávaló	Mennyiség (µl)	
	(marker tesztelés)	(szekvenálás)
Primer mix (forward és reverz 1:1 arányban)	2	8
H₂O	9	24,8
DreamTaq™ Green puffer	1,7	5
DreamTaq™ polimeráz enzim	0,065	0,2
MgCl₂	0,65	2
dNTP	0,65	2
DNS	3	8
Végtérfogat	17,065	50

1. táblázat Az felhasznált reakcióelegyek összetétele

A hőmérsékleti paramétereket illetően különböző variációkat próbáltunk ki, hogy megtaláljuk azt a beállítást, ami mellett megfelelő specificitással kötődnek a primerek a kívánt szakaszhoz. Ehhez meg kell keresni a felhasznált primer hőmérsékleti optimumát (T_m , melting temperature, a primerek olvadási hőmérséklete), és annak megfelelően beállítani az anellációs hőmérsékletet. Ennek megfelelően, eleinte egy sztenderd programmal dolgoztunk, változatlan 55 °C-os anel

lációval. Ez azonban nem adott megfelelően specifikus termékeket, így úgynevezett touchdown programot használtunk helyette. A touchdown program elve, hogy magasabb hőmérsékletről indítja az anellációs szakaszt, majd ciklusonként kis mértékkel csökkenti azt, míg el nem éri a primer optimális anellációs hőmérsékletét. Ez azt eredményezi, hogy csökken a műtermékek mennyisége, mivel a primer a magasabb hőmérsékleten sokkal specifikusabban köt a megfelelő helyre. Az általunk használt program részleteit a 2. táblázat tartalmazza. Az elkészült PCR termékeket ellenőrzésig hűtőben tároltuk 4 °C-on.

	Denaturáció	Annelláció	Amplifikáció	Extenzió
Ciklus	-	12	27	-
Hőmérséklet	95 °C	95 °C 60 °C* 72 °C	95 °C 55 °C 72 °C	72 °C
Időtartam	2 perc	30 s 30 s 30 s	30 s 45 s 45 s	7 perc
Megjegyzés		*Touchdown, ciklusonként fél fokkal csökken a hőmérséklet		

2. táblázat A PCR program részletei

4.4 Eredmények kiértékelése agaróz gélelektroforézis segítségével

A felszaporított szekvenciákat tartalmazó mintákat le kell ellenőriznünk, hogy megbizonyosodjunk a termékünk tisztaságáról, illetve annak ellenőrzése végett, hogy az elvártnak megfelelő méretű szakaszok szaporodtak-e fel a folyamat során. Ennek a legegyszerűbb formája az agaróz gélelektroforézis, melynek során, elektromos erőterben a negatívan töltött DNS molekulák, a méretüktől függő sebességgel, a pozitív elektróda felé vándorolnak. A vizsgálatban 2%-os töménységű agaróz gélét használtunk és a 3 – 5 µl PCR-terméket futtatunk meg ellenőrzésképp.

A mérett

artománytól függően megfelelő ideig (30-45 perc általában) tartó elektroforézis után a DNS szakaszok eloszlása vizualizálható a gélbe kevert ECOSafe® festék és ultraibolya fény segítségével. Ez a festékanyag a korábban széles körben használt etidium-bromidhoz hasonlóan interkalálódik a DNS kettős spiráljának kanyarulataiba, ugyanakkor használata lényegesen kevesebb káros hatással van a vizsgálatot végző személyekre, illetve a környezetre. A gélben futtatott minta ebben a formában rövid hullámhosszú fényel gerjeszthető, így szabad szemmel láthatóvá válik. A felszaporított fragmensek mérettartományára következtethetünk létra használatával, amely ismert méretű DNS szakaszok keveréke.

4.5 A rokonsági viszonyok megállapításához felhasznált genetikai markerek

A vizsgálatok során a mintákból kivont mitokondriális DNS felszaporításához úgynevezett „cross-species“ amplifikációs technikát alkalmaztunk, mivel nem állt rendelkezésre korábbi kutatásokból származó teljes mitokondriális DNS szekvencia a kék vércsétől. A módszer lényege, hogy más rokon fajoknál hatékonyan bizonyult géneket, illetve primereket használunk.

Először a NAD (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) dehidrogenáz enzim 1-es alegység (ND1) génjére specifikus primert használtunk. A választást egy korábbi, rokon fajokkal végzett kutatásra alapoztuk (Szabó, 2015), melyben vándorsólyom (*Falco peregrinus*) és északi sólyom (*Falco rusticolus*) hibridgyanús egyedeinek faji azonosítását végezték sikeresen ezen genetikai markerekkel. A fent említett vizsgálathoz a Fuchs et al. 2015, a Molecular Phylogenetics and Evolution nevű folyóiratban publikált közlemény alapján választották a mitokondriális DNS-en található ND1, és két másik sejtmagi génszakaszt. Az anyai öröklődésű mitokondriális szakaszból az anya fajára tudtak következtetni, mivel ezen a génen nagy a fajok közötti variancia.

A használt primerek neve és szekvenciája: L3827 – GCAATCCAGGTCGGTTTCTATC (Sorenson et al., 1999) és H800Falco – TGWAYCAYATTATTRYRAGGGGTCA (Fuchs et al., 2015)

Sajnos, a kék vércsék esetében, ennek a génnek a vizsgálata nem volt megfelelő. Míg az ND1 gén alkalmas fajok közötti különbségek kimutatására, a fajon belüli varianciája nem tűnt kielégítő mértékűnek, mi több, az amplifikált szekvenciák a mitokondriális gén sejtmagi pszeudogén változatainak bizonyultak bizonyultak.

4.5.1 Pszeudogének („numts“)

Ezek olyan mtDNS szekvencia másolatok, melyek áthelyeződtek a sejtmag genomba. Ennek eredményeként, ezek a nem funkcionális pszeudogének a mtDNS-től független evolúción, átalakulásokon mennek keresztül. Problémákat akkor okoznak a PCR reakció során, ha a primerkötő helyeket is megőrizte a pszeudogén, amiről ennek következtében másolatok fognak képződni a kívánt mitokondriális gén-régió mellett vagy helyett. Ez következményesen hibás eredményeket okoz. Ilyen hibás eredmények lehetnek az

úgynevezett ‘PCR ghost band’-ek, extra sávok restriktions profilokban, kétértelmű, értelmezhetetlen szekvenálási eredmények, frameshift mutációk és stop kodonok váratlan pozíciókban (Bensasson et al., 2001; Freeland et al., 2011).

Kutatások kimutatták, hogy madárfajok pszeudogénjei különösen hajlamosak amplifikációra olyan esetekben, amikor univerzális primereket használnak sejtmagi DNS-ben gazdag szövetminták vizsgálatához (pl. vérminta) (Sorenson and Quinn, 1998). Egy friss elemzés pedig azt az eredményt hozta, hogy a referenciafajnak számító házi tyúkhöz képest (*Gallus gallus domesticus*) a sólyomalkatúak (vándor- és kerecsensólyom) sejtmagi genomjában legalább háromszoros mennyiségű mitokondriális eredetű szakaszt található (0,004% vs. 0.0008%), és ez a szám még néhány sokkal nagyobb genommal rendelkező gerinces fajhoz képest is kirívó. Ráadásul olyan pszeudogént is ki tudtak mutatni, ami a mitokondriális genom több, mint 70%-át lefedte (Nacer and Raposo do Amaral, 2017).

4.5.2 D-loop

Következő lépésben a mitokondriális DNS nem kódoló, kontroll régiójában található ún. *displacement (D) loop* szakaszát próbáltuk meg felhasználni (Wenink et al., 1994; Parker et al., 1998). Ennek a szakasznak a jellemzője, hogy mivel nem kódoló szakasz, a mutációs rátája kifejezetten magas a mtDNS-en található génekkel szemben. Reméltük, hogy ebből következően, érzékenyebb indikátora lehet a fajon belüli genetikai információáramlásnak. Erre a szakaszra azonban nem találtunk korábban megtervezett primer szakaszt, sem a kék vércse, sem közel rokon sólyomfélék esetében.

4.5.3 Primer tervezés

Ennek a hiánynak a kiküszöbölése céljából, az adott szakaszra specifikus primereket terveztünk. A kék vércse esetében azonban, nem állt rendelkezésre olyan adatbázis, mely tartalmazta volna a mitokondriális DNS szekvenciáját, így rokon fajokra alapoztuk a tervezőmunkát. Az NCBI adatbázisában (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) elérhető szekvenciák közül kiválasztottuk a kék vércséhez nagy valószínűséggel hasonlókat, melyek az északi sólyom (*Falco rusticolus*), a vándorsólyom (*Falco peregrinus*), a vörös vércse (*Falco*

tinnunculus), a tarka vércse (*Falco sparverius*), a kis sólyom (*Falco columbarius*) és a kerecsen sólyom (*Falco cherrug*) voltak. Ezek mitokondriális genomját egymással összehasonlítva a nagyon elkülönülő, ezért valószínűsíthetően rokonsági szinten távolabb álló fajokat kizártuk. Így le tudtuk szűkíteni a kört a vörös vércsére, a tarka vércsére, a fehérkarmú vércsére és a kis sólyomra. Ezeknek a fajoknak a D-loop szekvenciáit alapul véve a konzervációgenetikai munkacsoport laboratóriumának vezetője, Szabó Krisztián segítségével három különböző primerpárt terveztünk. A felhasznált mitokondriális genomok alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a D-loop szekvencia elég variábilis hosszúságú, így nem lehetett előre jelezni a kék vércse esetén mekkora lesz. Ezért külön terveztünk a szakasz 5' (600 bp és threonin kódoló szakasz) és 3' (prolin kodonnal) végének vizsgálatához alkalmas primereket. A közbülső rész használatát az előzetes eredmények alapján elvetettük, mivel az meglehetősen invariábilis volt, így kis eséllyel tartalmazott volna SNP-ket (single nucleotide polymorphism) (Wenink et al., 1994). Így a tervezett primerek a következőképp alakultak (3. táblázat):

Régió	Pozíció	Primer	Primer szekvencia (5' – 3')
D-loop	025-048	FVthr	GGTCTTGTAACCAAAGArTGAAG
	701-724	FVer1	GTCCTAGAATGTAkAGATGGCTGT
	1058-1077	FVer2	TCAGGGCCATAACTTGGCTC
	1381-1406	FVer3	CCAATATATATGAATGCTTGTTGGAC
	1890-1912	FVpro1	GTCCTCTTTTTCTGAATTGyGG
	1939-1966	FVpro2	CAGAAGATAGTTTAATrAGAATGCCAGC

3. táblázat D-loop primerek

4.5.4 Gélextrakciós eljárás

Az új primereket felhasználva próba PCR futásokat hajtottunk végre. Ezt olyan módon tettük, hogy az 5' végre tervezett egy primer pár mellett a 3' végre tervezett két forward és két reverz primert minden lehetséges kombinációban kipróbáltunk. Így tehát a primerkombinációink a következőképp alakultak: FVthr-FVcr1 (5'), FVcr2-FVpro1, FVcr2-FVpro2, FVcr3-Fvpro1, FVcr3-Fvpro2 (3'). Az eredmények biztatóak voltak, azonban az egyik pár esetén keletkeztek olyan termékek, melyek több fragmensből álltak (4. ábra). Ezek közül a fragmensek közül csak egy volt elfogadhatóan prominens, és ugyancsak ez esett az általunk várt mérettartományba is. Így amellettt döntöttünk, hogy ezt megpróbáljuk gélextrakciós eljárással a szekvenálás előtt tisztítani.

A kivonási eljárást a Millipore® által forgalmazott Montage™ DNA Gel Extraction Kittel végeztük. Ez egy egyszerű eljárás, melynek segítségével agaróz gélen futtatott DNS fragmenseket tudunk izolálni egy 10 perces centrifugálással.

A folyamat során, a gyártó által mellékelte használati útmutató lépéseit követtük, melyek a következők voltak:

Először a minták fragmenseit gél-elektroforézissel elválasztottam egymástól. Ehhez egy a normálisnál hígabb, <1,25% agaróz gélt használtam (0,5 µg/l ECO-safe festéket tartalmazott), melyet módosított TAE (tris-edta-acetát) puffert tartalmazó kádba helyeztem. Ezt követően, a gélt hosszú hullámhosszú UV fényvel világító munkalapra helyezve, megfelelő védőruházatban, a kívánt méretű csíkokat penge segítségével kimetszettem. Ezeknek a gél szeleteknek a mérete nem haladhatta meg a 100 µl térfogatot és 100 mg tömeget. Ezeket a minta darabokat külön-külön Montage™ DNA Gel Extraction Device-okba kellett helyezni, melyek három egységből álltak össze: egy centrifuga cső, egy minta szűrő oszlop és egy gél porlasztó (nebulizer). Ezeket a szeparáló csöveket centrifugáltam 10 percig 5000 g-vel. A centrifugális erő a gél darabot áterölteti a porlasztó elemen, ami így, azt egy finom péppé alakítja, majd ezt a minta szűrő oszlop felfogja. Az oszlop mikropórus membránján átszűrődik a DNS és a folyékony puffer, ezt pedig a centrifugacső összegyűjti. Ezek után a minta már készen is áll a további feldolgozásra.

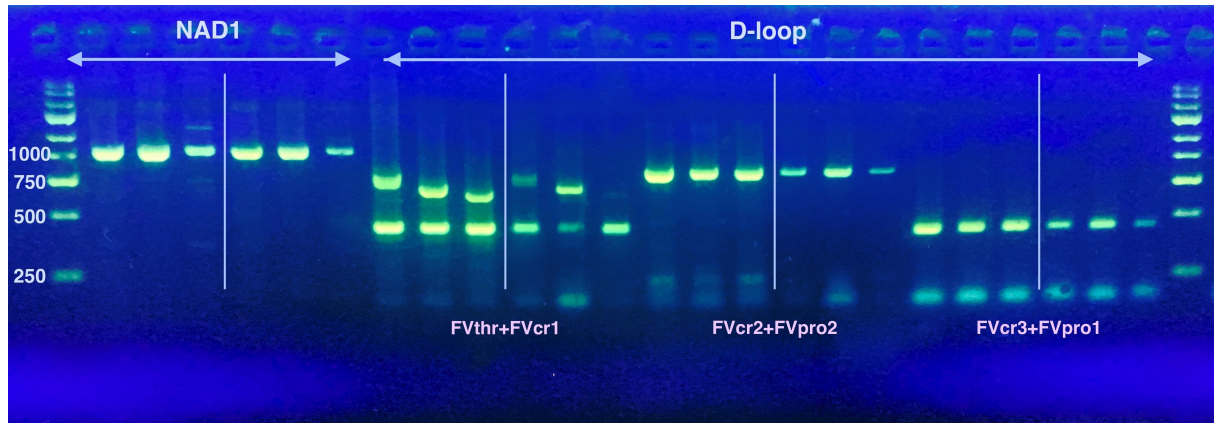
Az ilyen módon előkészített mintákat, a hagyományosan készített társaikkal együtt, elküldtük szekvenáltatni. Az új eredmények kielemezése után azonban, a szekvenciák továbbra sem bizonyultak megfelelően tisztának és egyértelműnek, továbbra sem lettek pszeudogén mentesek.

4.5.5 Plazmid izolálás

Mivel a gélextrakciós módszer sem vezetett kielégítő eredményre, ezért további módszereket kellett keresni a pszeudogének okozta problémák kiküszöbölésére. Irodalmi adatok alapján a következő módszerek jöhettek szóba: DNS kivonás előtti mitokondrium tisztítás, hosszú PCR program, plazmid izoláció, mtDNS-ben különösen gazdag szövet használata és reverz transzkriptáz PCR, melyek közül számunkra kettő volt könnyen realizálható. Az egyik, hogy hosszú PCR programmal izoláljuk és felszaporítjuk a madárfaj teljes mitokondriális DNS-ét, amit aztán szekvenálva rendelkezésünkre állna egy tiszta, egyértelmű DNS szekvencia. A másik, hogy egy speciális, plazmid izoláló kittel kitisztítjuk a DNS mintáinkat, így a mtDNS arányaiban akkora túlsúlyba kerül, hogy az esetleges sejtmagi DNS szennyezés elenyésző, a primerek nem kötődhetnek hibás helyekre, csak a mtDNS-be. Ezt egy közöséges prokarióta plazmid izoláló miniprep kittel el lehet végezni, abból a feltételezésből kiindulva, hogy az eukarióta sejtek mtDNS-e mind alakjában, mind méretében a bakteriális plazmidokhoz rendkívül hasonló (Bensasson et al., 2001; Quispe-Tintaya et al., 2013).

A második lehetőséget választottuk annak egyszerűsége miatt, eredménye az 5. ábrán látható. Ehhez a Quiagen QIAprep® Spin Miniprep szilikát-membrán technológiát alkalmazó plazmid izoláló kitjét használtuk. Ez a korábban ismertetett DNS izolációs kitek működésétől néhány szempontból eltér. Az izoláció során a gyártó által mellékelt utasításokat követtük. A mintákat egy rövid, az alkohol elpárologtatását szolgáló, vízfürdő után 250 µl P1 nevű pufferrel reszuszpendáltuk, majd ehhez hozzáadtunk újabb 250 µl-t a P2 pufferből. Az elegyet alaposan összekevertük, 5 percnél tovább nem volt szabad állni hagyni. A következő lépésben 350 µl N3 puffert mértünk az eppendorf csőbe, ezzel újfent 4-6 átforgatással elkevertük, és ezt a keveréket 10 percig 13000 rpm-mel centrifugáltuk. A lecentrifugált folyadék felülúszójából 800 µl-t QIAprep 2.0 spin oszlopra mértünk pipettával. Ezt 30-60 másodpercig centrifugáltuk, a lefolyt folyadékot eltávolítottuk. Ezután az oszlopot mostuk 0,75 ml PE pufferrel újfent 30-60 s centrifugálással. A lecsurgott folyadékot eltávolítottuk, és újabb 1 percig centrifugáltuk a mintát tartalmazó oszlopot. Az így megtisztított mintát tartalmazó oszlopot áthelyeztük egy tiszta 1,5 ml-es eppendorf csőbe. Belemértünk 100 µl 10 mM TrisCl-t tartalmazó 8,5-ös pH-jú EB puffert, egy percig állni hagytuk, majd 1 percig centrifugáltuk. A folyamat végén a korábban ismertetett kitekhez hasonlóan összegyűlik az eppendorf cső alján a tiszta DNS-t tartalmazó minta, mely ebben az esetben nagyon magas arányban csak mtDNS-t tartalmaz.

5. ábra, gél elektroforézis képe



MtDNS plazmid izoláció előtt (függőleges vonalaktól balra) és után (jobbra). Különösen érzékelhető a különbség az FVcr2+Fvpro2 primer pár esetén

4.6 Szekvenálás

Genetikai mintáink szekvenálását a Macrogen cég (<http://foreign.macrogen.com/eng/>) végezte az európai központjában, Amszterdamban. A minták szekvenálása módja Sanger-féle módszerrel történt.

A Sanger-, vagy diideoxi-szekvenálás a leggyakoribb DNS szekvenálási módszer. A protokoll a PCR reakcióhoz hasonló elven alapul. Lényegében DNS polimeráz enzim segítségével DNS szál szintézis történik nukleotidok felhasználásával, azonban a PCR-hez képest két nagy különbséggel. Az első, hogy egyetlen primert használnak a szintézis kiindulási pontjaként, nem kettőt, ezáltal a templát szál mellett a szekvenciák csak egy irányban képződnek. A második pedig, hogy néhány nukleotid a sztenderd dezoxiribóz helyett dideoziribóz cukormolekulát tartalmaz. A dideoziribózzal hiányzik a 3'-hidroxilcsoport, így egy ilyen dideozinukleotid-trifoszfát (ddNTP) után megszakad a szál szintézise, nem tud újabb nukleotidot rákapcsolni a polimeráz enzim. A szekvenálás négy külön reakcióban zajlik, mindben megtalálható mind a négy nukleotid dezoxinukleotid-trifoszfát formájában (dNTP), és egy kis mennyiség elegyenként külön-külön valamelyik ddNTP formában lévő nukleotidból. A ddNTP molekula beépülése egy idő után mindenképpen megtörténik a DNS szekvencia minden lehetséges kötési helyén, így különböző méretű fragmenseket produkálva, amelyek lefedik a teljes spektrumát a célszekvenciának az első bázistól a teljes

szekvenciahosszig. A folyamat során négy különböző reakcióelegyben különböző fragmensméretek keletkeznek. Esetünkben a szekvenálás automatizáltan zajlott. Ebben az esetben a négy különböző ddNTP molekulát különböző színű fluoreszcens festékanyaggal jelölik meg. A reakciókat nem szükséges elválasztva futtatni, mint a manuális technológia során, mivel a különböző színekkel jelölt bázisokra végződő DNS szakaszok egyértelműen elkülöníthetők egymástól. Az automata szekvenátor lézerrel gerjeszti a fluoreszcens színjeleket, melyeket egy fotocella olvas le és digitális formában különböző színes hullámok formájában jelenít meg a fragmenshossznak megfelelő pozícióban. Általában fekete színnel jelölik a guanint, zölddel az adenint, pirossal a timint és késsel a citozint. A megfelelő bázisokat behelyettesítve a színes csúcsok helyére, egyetlen képről a teljes bázisszekvencia leolvasható.

4.7 Használt programok, statisztikai módszerek

4.7.1 Staden Package programcsomag

A Staden Package egy nyílt forráskódú számítógép szoftver, amely DNS szekvenciák illesztésére, manuális szerkesztésére és szekvencia analízisre alkalmas eszközök gyűjteménye. Mi a programcsomag pregap4 és gap4 elemét használtuk. A pregap4 az előkészítő program, kromatogram analízisre (base calling) és a szekvenciák minőségének ellenőrzésére, alacsony minőségű szakaszok felismerésére és eltávolítására (end clipping) alkalmas. A gap4 feladata pedig a szekvencia illesztés, szerkesztés és véglegesítés (Bonfield et al., 1995).

4.7.2 MEGA

Filogenetikai és molekuláris evolúciós analízisre a MEGA 6 (MEGA version 6) szoftvert használtuk (Tamura et al., 2013). A MEGA egy integrált program, melynek funkciói között a következők szerepelnek: DNS szekvencia összerendezés, filogenetikai törzsfák összeállítása, divergencia idők becslése, online adatbázisok használata, molekuláris evolúciós ráta becslése, felmenői szekvenciák következtetése és evolúciós hipotézisek tesztelése.

4.7.3 GenAlEx

A "GenAlEx", (Peakall and Smouse, 2006; Peakall and Smouse, 2012) egy eredetileg oktatáshoz írt populációgenetikai számításokat (pl. F-statisztikák, AMOVA) végző Microsoft Excel makró.

A programmal végzett számítás:

- AMOVA (Analysis of Molecular Variance): A programban a számítások Excoffier és munkatársai (1992), Huff és munkatársai (1993), Peakall és munkatársai (1995), illetve Michalakis és Excoffier által (1996) publikált módszereket követik. Mitokondriális genom szekvenciák esetén az F_{ST} statisztika módosított verzióját a Φ_{PT} -t ajánlott használni. (V_{AP} : a populációk közti variancia; V_{WP} : a populációkon belüli variancia; V_{AR} : a régiók közötti variancia)

$$F_{ST} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})}$$

$$\Phi_{PT} = \frac{V_{AP} + V_{AR}}{(V_{WP} + V_{AP} + V_{AR})}$$

4.7.4 PopART 1.7 (Population Analysis with Reticulate Trees)

Egy ingyenes populációgenetikai szoftver, ami az Allan Wilson Centre, Imaging Evolution nevű kezdeményezésének részeként lett kifejlesztve. A PopART egy integrált programcsomag, mely haplotípus hálózati módszerek, filogeográfiai vizualizációs módszerek és standard statisztikai tesztek használatára, valamint publikálható ábrák készítésére fejlesztettek ki (Leigh and Bryant, 2015)

A programmal végzett számítások:

- Median Joining módszer: (Bandelt et al., 1999) Az egyik legnépszerűbb gyökértelen fa típus. A módszer algoritmusá úgy van kialakítva, hogy egy hálózatot hozzon létre, mely

számos lehetséges törzsfát foglal össze egyetlen hálózati ábrán. Nagy mintaszámú, kis genetikai különbséggel rendelkező intraspecifikus adat feldolgozására alkalmas.

4.7.5 DnaSP version 6 (DNA Sequence Polymorphism)

Egy szoftvercsomag, mely DNS polimorfizmusok elemzésére alkalmas egy vagy több lókuszt alapján. A DnaSP program számos DNS szekvencia variációt leíró mérőszám kalkulálására alkalmas populációkon belül és populációk között (Rozas et al., 2017)

A programmal végzett számítások:

- Nukleotid diverzitás (π): Egy molekuláris genetikai fogalom, mely egy populáción belül a polimorfizmusok mértékének számolására alkalmas. Nei és Li fejlesztette ki a módszert 1979-ben. A számítása a variábilis pozíciók közötti nukleotid különbség átlaga a két DNS szekvencia között minden lehetséges páron kiszámolva a minta populációban (Nei and Li, 1979).
- Haplotípus diverzitás (h): Egy adott haplotípus egyediségének mértékét fejezi ki az adott populáción belül (Nei and Tajima, 1981).
- Tajima's D: A Tajima's D egy populációgenetikai statisztikai teszt, melyet Fuimo Tajima, japán kutató dolgozott ki (Tajima, 1989). A Tajima's D a páronkénti különbség átlaga és a szegregáló helyek közötti különbséget jelenti. A kiindulási mennyiségek beállítása úgy történik, hogy konstans számú populáció neutrális evolúciója esetén a két érték megegyezik.

$$D = \frac{\pi - \frac{S}{a_1}}{\sqrt{V}}$$

5. Eredmények

5.1 Az ND1 gén használata

Kutatásomat az ND1 mitokondriális gén vizsgálatával kezdtem az L3827 és H800Falco primerek felhasználásával.

A vizsgálatok során első lépésben PCR reakciókat futtattunk le mind a három fő csoportból (magyarországi, romániai, amuri minták) származó, random módon kiválasztott 10-10 mintával. Ezzel a célunk annak az ellenőrzése volt, hogy megfelelő tisztaságú és az elvárható mérettartományba eső termékeket kapunk-e. A kapott szegmensek konzekvensen 700 bp körüli mérettartományba estek és mindhárom csoport esetén tiszta egyértelmű sávokként jelentek meg az agaróz gélen.

Miután erről meggyőződünk, csoportonként öt mintát kiválasztva, szekvenálásra küldtük őket. Az eredmények nem voltak meggyőzőek. Sok gap-et tartalmaztak a szakaszok, leolvasási kerettel ellenőrizve a minták egy része nem volt abba beleilleszthető, ami oda nem illő inzerciókkal magyarázható. Ez azt jelenti, hogy nagy valószínűséggel pszeudogéneket találtunk. Ezen felül sajnos a kék vércse mintáknak az a része sem bizonyult értékelhetőnek, amelyek pszeudogén mentesek voltak, mert teljes mértékben monomorfak voltak.

5.2 A D-loop vizsgálata

Az általunk tervezett korábban leírt D-loop primerek vizsgálatával haladtunk tovább. Először minden lehetséges primer kombinációt kipróbáltunk mindhárom fő csoport egy-egy mintáján. A párosítások következőképp néztek ki: az elejére (5') FVthr-FVcr1, a végére (3') FVcr2-FVpro1, FVcr2-FVpro2, FVcr3-FVpro1 és FVcr3-Fvpro2. A folyamat következő lépéseként véletlenszerűen kiválasztott mintákon próbáltuk ki a párokat, így ki tudtuk választani a termék hossza és tisztasága alapján melyek azok, amikkel a továbbiakban dolgozni érdemes (6. ábra).

6. ábra A D-loop primerek próbája



A gél-elektroforézis eredmények sztenderd 55 °C-os anellációjú PCR programot használva nem tűntek megfelelőnek, így a folyamatot megismételtünk a 60 °C-ról induló touchdown programmal is. A primerpárok közül az FVthr-FVcr1 pár adta a legkevésbé tiszta eredményeket, úgynevezett ghost band-eket eredményezett, ezért a PRC elegy összetételét többféleképp módosítva próbáltuk ennek a primer párnak a specificitástát javítani, melyet a 4. táblázat részletez.

PCR hozzávaló	Mennyiség (µl)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
DreamTaq™ Green puffer	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065
DreamTaq™ polimeráz enzim	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
<i>MgCl₂</i>	0,65	0,5	0,5	0,65	0,65	0,65	0,5	0,5
dNTP	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
<i>Primer mix (forward és reverz 1:1 arányban)</i>	2	2	2	2	1	1	1	1
H₂O	9	9,15	10,65	10,5	11,5	10	10,15	11,65
DNS	3	3	1,5	1,5	1,5	3	3	1,5
Végtérfogat	17							

4. táblázat A módosított összetételű PCR reakcióelegyek (dőlt betűkkel jelezve a módosított összetevők)

A PCR-kondíciók módosítása nem hozta meg a kívánt eredményt, továbbra is amplifikálódtak a nemkívánatos szakaszok. Az új primerek tervezése során figyelembe vett szekvenciák mérete alapján valószínűsítettük, hogy a vizsgálni kívánt szakasz az FVthr - FVcr1 primerpár esetén egy megközelítőleg 250 bp hosszúságú fragmens, mely megjelent a futásban. Fontos azonban megjegyezni, hogy a más fajok genomjára alapozott tervezés pontatlan lehet, így például előfordulhat ismétlődő motívumok megléte vagy hiánya, ami méretbeli eltéréseket eredményez a fajok azonos szakaszai között. A következőkben az anyag és módszerek részben ismertett gélextrakciós eljárást alkalmaztuk. Az eljárás során a legvastagabb,

nagyságrendileg 250 bp hosszúságú DNS szegmenseket penge segítségével kivágtam az agaróz gélből és az extrakciós kit használatával kinyertem belőlük a PCR-termékeket.

A futási képek és a primer tervezés alapján elvárt eredmények összevetése alapján az FVcr2-FVpro2, FVcr3-FVpro1 és a gélből extrahált FVthr-FVcr1 primer párokat szekvenáltattuk meg. Ehhez mindhárom fő csoportból 2-2 mintát készítettünk elő primerpáronként. Ezeket ugyanabból a csoportból választottuk, mint amelyeket az ND1 génre már vizsgáltunk korábban, még hozzá minden párhoz rendeltünk egy olyan DNS mintát, ami ezen a génen pszeudogén eredményt adott és egyet, ami nem, hogy így ellenőrizhessük, ismét pszeudogénes szakasz szaporodik-e föl.

A szekvenálás eredményei a D-loop esetében is pszeudogént mutattak ki, ezért következőkben az anyag és módszerek fejezetben ismertetett plazmid izolációs eljárással folytattuk a vizsgálatainkat.

5.2.1 Plazmidizolálás

A plazmidizoláló kittel újrareparáltunk mintákat, mégpedig referenciaként először ugyanazt a hatót, amelyeket korábban vizsgáltunk. Az így előkészített alapanyagon újra kipróbáltuk a korábban legjobb eredményeket adó D-loop primer párijainkat, így az FVcr2-FVpro2 és FVthr-FVcr1 párost, de megpróbáltuk az eredetileg alkalmazott ND1 primerpárt is (L3827 és H800Falco)

A szekvenálás adatait feldolgozva a D-loop első szakasza nem bizonyult használhatónak, a szekvenciák egy része túl rövid lett, míg másokban repeat szakaszok szaporodtak föl, amik értelmezhetetlenné tették az eredményeket. Az ND1 gén esetében az amuri vércse mintáink ismét numt-ot tartalmaztak, a kék vércsék pedig tökéletes monomorfizmust mutattak, így ezek az eredmények sem voltak értékelhetőek. Azonban ez alkalommal az FVcr2-FVpro2 D-loop primer szakaszai biztató eredményt nyújtottak. Egy mintánk sem utalt pszeudogén jelenlétére, és néhány variábilis pozíciót is találtunk, kettőt fajon belül és nyolcat a két faj között. Ilyen kis mintaszám mellett három haplotípust tudtunk kimutatni, a hazai madarak mind egy csoportba tartoztak, az egy vizsgált romániai kék vércse és két amuri madár saját haplotípussal rendelkezett.

5.2.2 FVcr2

A részletes, nagy mintaszámú vizsgálathoz a mintaszám növelése érdekében csak a forward primerrel szekvenáltattunk az FVcr2-FVpro2 párból, mivel a korábbi eredmények azt mutatták, hogy ettől várhatjuk a legtisztább szekvenciákat. A rendelkezésre álló vérmintákat az anyag és módszer fejezet, felhasznált minták alfejezetben (4.1) ismertetett módon alcsoportokra osztottuk. A rendelkezésre álló plazmidizoláló kit készlet szabta korlátok szerint megpróbáltunk körülbelül azonos számú mintát választani minden régióból. Így a felhasznált minták eloszlása a következőképp alakult: 36 darab minta magyar költőterületekről, ezen belül négy minta a Borsodi mezőségről, öt minta a Csanádi puszták tájegységről, öt minta a Cserebökény régióból, négy minta a Hevesi Füves Puszták tájegységről, öt minta a Hortobágyról, hat minta a Jászságból, hat minta a Kiskunságból és négy minta a Vásárhelyi-pusztákról (a régiókat lásd: 4. ábra). Ezen kívül nyolc mintát használtunk fel a román gyűjtésből és hatot az amuri madarak közül. Azokban az esetekben, amikor az adott csoportban több minta állt rendelkezésre, a vizsgálataimmal párhuzamosan futó hat markerrel végzett mikroszatellita vizsgálat eredményei alapján választottunk ki minden régióból egyedeket.

5.3 A D-loop eredmények értékelése

A szekvenálás eredményeképp kapott szekvenciákat a MEGA programban ellenőriztük és rendeztük össze. A mintáink közül kettőt (egy amuri és egy magyar mintát) kizártunk az elemzésből, mivel esetükben technikai hibát (nem megfelelő tisztaságú DNS, vagy egyéb, a PCR reakció során bekövetkező hiba) véltünk felfedezni. Ez azt jelenti, hogy ezek a többi mintához képest nagy mértékben eltérő, rendezetlen, gap-ekkel tűzdelt szekvenciák voltak, melyeknek a kromatogramja is nehezen értelmezhető volt. Így összesen, 50 helyett 48 mintával végeztük az analízist.

Az amuri madarak egyértelműen elkülönülnek a kék vércsétől, azonban ezen a fajon belül a magyar és román régiók mintái nem. A magyar és román populáción belül hat variábilis pozíciót találtunk és ez alapján három haplotípust tudunk biztosan megkülönböztetni. 11 további csoport esetében viszont egyes variábilis pozíciókban dupla csúcsok okoztak problémát. További vizsgálattal ezek egy részét egyértelműsítettük, így a dupla csúccsal

rendelkező értelmezhetetlen szekvenciákon kívül 5 amuri és 25 kék vércse (ebből 18 magyar 7 román) mintánk maradt. Hét csoportba osztott 17 minta került tehát kizárásra (11.1 függelék). Az így kialakított végleges mintahalmazban hat variábilis pozícióval hat haplotípust tudunk meghatározni (5. táblázat).

Haplotípus	Variábilis pozíció						n
	169	334	390	391	394	424	
a	A	C	C	A	G	C	9
b	A	C	C	A	T	C	3
c	A	C	C	G	G	C	10
d	A	T	T	G	G	C	1
e	G	C	C	G	G	C	1
f	A	C	C	A	<u>K</u>	T	1

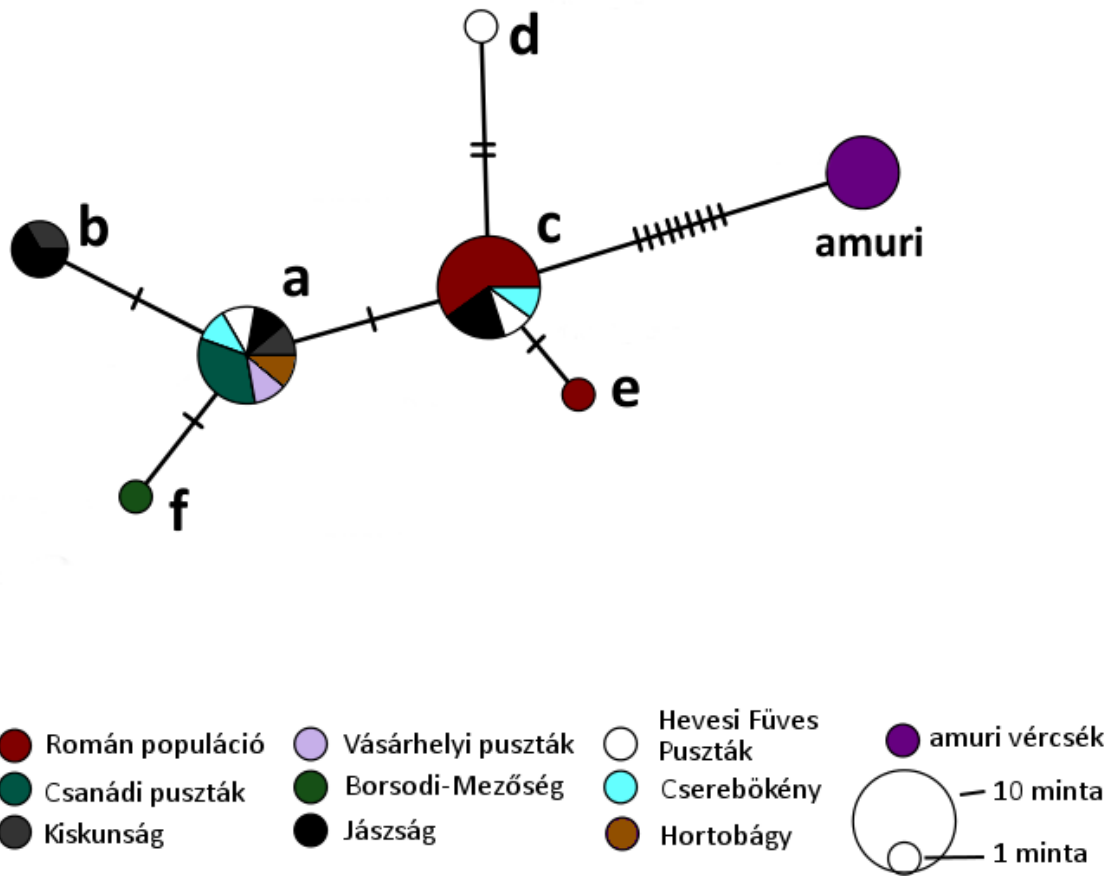
5. táblázat A hat haplotípus.

Félkövér betűkkel jelölve az egyes haplotípusokra jellemző bázisok. Az első öt haplotípus (a-e) egyértelmű, a hatodikban (h) van ugyan egy dupla csúcs (K, jelentése: G vagy T bázis lehet), de ezt is önálló haplotípusnak vettük, mivel a 424-es pozícióban egyedülként rendelkezik timin bázissal. (n a mintaszámot jelenti)

A dupla csúcsok megjelenése újra fölvetette a pszeudogén, illetve a heteroplazmia előfordulásának lehetőségét, de az is elképzelhető hogy ezeket csupán valami szekvenálási hiba okozta. A második esetben a hibákat reverz primer használata kiküszöbölhetné illetve tisztázhatná, de az általunk tesztelt reverz primerek sajnos nem bizonyultak megfelelőnek, mi csak a forward szekvenciákra támaszkodhattunk. Ha a hiba okozója újfent egy numt, annak megoldására további lehetőségek közül lehet választani.

Tapasztalataink alapján nem jelenthetjük ki egyértelműen, hogy a közép-kelet európai terület populációi egyértelműen elkülönülnek (7.ábra). A román minták esetén két haplotípust találtunk, míg a magyarországi állományban öt haplotípus fordul elő.

7. ábra Haplotípus hálózat (median-joining network módszerrel számolva) a kék- és amuri vércsék mitokondriális DNS D-loop haplotípusai alapján.



A körök területe arányos a haplotípusok gyakoriságával, az ágakon található vonások a mutációs lépések becsült számát jelölik. A betű kódok az 5. táblázatban megadott haplotípusok kódjaival egyeznek meg.

A kék vércse és a hozzá nagyon hasonló rokon faj, az amuri vércse genetikai elkülönítésére az általunk kifejlesztett marker alkalmas, a két faj szekvenciái között nyolc variábilis pozíciót találtunk (6. táblázat). Az általunk vizsgált amuri vércse minták monomorfnak bizonyultak, annak ellenére, hogy gyűjtésük eltérő időpontban és helyeken történt.

Faj	Variábilis pozíció							
	321	331	379	380	422	427	438	490
Kék vércse	C	A	T	C	C	A	A	C
Amuri vércse	T	gap	C	T	T	G	C	T

6. táblázat Interspecifikus variábilis pozíciók

A kapott szekvenciákat felhasználva AMOVA-t végeztünk, illetve diverzitási indexeket számítottunk. A fixációs index alapján magyar és a román populáció elkülönül ($\Phi_{PT} = 0,252$, $P = 0,002$). A nukleotid és a haplotípus diverzitási indexek értéke magasabb a magyar populációból származó minták esetén, de meg kell jegyezni, hogy ezt okozhatta a nagyobb magyarországi mintaelemszám is (7. táblázat).

Vizsgált populáció (faj)	n	Haplotípusok száma	Nukleotid diverzitás (π)	Haplotípus diverzitás (h)	Tajima's D	Φ_{PT}
Összes minta (mindkét faj)	30	6	0,00550	0,722	-0,26159*	
Magyar (<i>F. vespertinus</i>)	18	4	0,00149	0,529	-1,04394*	
Román (<i>F. vespertinus</i>)	7	2		0,286	-1,00623*	0,252†
<i>F. amurensis</i>	5	1	N/A	N/A	N/A	

7. táblázat Populációk közötti és populációkon belüli genetikai variabilitás értékek. (n: mintaszám, * $P > 0,10$, nem szignifikáns; † $P = 0,002$) A Φ_{PT} , π , h értékek alapján a két populáció elkülönülését, illetve különbözőségét állapíthatjuk meg.

6. Diszkusszió, következtetések

A kék vércse nem territoriális, hanem fakultatív kolóniákban fészkelő, vonuló madárfaj, mely migrációra hajlamos (Nightingale and Allosopp, 1994; Harrop et al., 2013), hazánkban jelölt példányait is gyakran azonosítják nemcsak a faj költőterületének számító kelet-európai területeken, de Nyugat-Európában is (Haraszthy and Palatitz, 2009). Ennek tudatában próbáltuk felmérni, hogy milyen genetikai kapcsolatot fedezhetünk fel az egymástól kis távolságokban elhelyezkedő magyar költőrégiók és az egymástól megközelítőleg 700 kilométerre elhelyezkedő magyar és román populáció között. Vizsgálataink során, igyekeztünk a mitokondriális genom alapján egy felmérést készíteni a vizsgált régió kék vércse genetikai változatosságáról, illetve a különböző populációk közötti génáramlás mértékéről.

Mitokondriális gének közül ragadozómadarakkal foglalkozó kutatások gyakran használják az ND1 (Sorenson et al., 1999; Fuchs et al., 2015) illetve a cyt-b gént (Hailer et al., 2007; Johnson et al., 2007). Mivel azonban, az irodalmi adatok alapján rendelkezésre álló primererek nem bizonyultak használhatónak ezen a madárfajon, új markereket kerestünk és új primereket fejlesztettünk.

A használt mitokondriális kontroll régió D-loop szakasza populációgenetikai kutatásokban nagyon népszerű (Lau et al., 1998; Nagata et al., 1998; Pourkazemi et al., 1999), mivel a D-loop egy nem kódoló, és ennek köszönhetően nagyon nagy mutációs rátával rendelkező szakasz (Wenink et al., 1994; Parker et al., 1998). Ennek ellenére ragadozó madarakkal foglalkozó publikációkban nem találtam csak ennek a szakasznak korábbi felhasználását, viszont a kontroll régióét igen gyakran. Fontos azonban megjegyezni, hogy a kontroll régiót és a D-loop szakaszt gyakran egymás szinonimájaként használják tudományos cikkekben, annak ellenére, hogy a D-loop csupán a kontroll régió alegysége, igaz annak nagy részét teszi ki. Rokon madárfajok (ragadozó, sólyomalakú) esetén csupán olyan elemzéseket találtunk, amelyekben ezt a régiót (CR) használták (Martínez-Cruz et al., 2004; Cadahía et al., 2007; Nittinger et al., 2007; Hull et al., 2010).

Sólyomalakúak mitokondriális genomjának felhasználását gyakran akadályozza annak nagy mértékű pszeudogén terheltsége (Sorenson and Quinn, 1998; Nacer and Raposo do Amaral, 2017). Ez számunkra is problémát okozott mind az első ND1 vizsgálat esetén, mind később a D-loop vizsgálatok során. A pszeudogénektől megszabadulni nem könnyű, de így is számos

módszer áll rendelkezésünkre. A sejtmagi DNS-ben numt-ként megjelenő, eredetileg mitokondriális DNS szekvenciák általában rövid szakaszok, érdemes ezt a tulajdonságukat kihasználni. Irodalmi adatok alapján következő lehetőségek léteznek: az amplifikált mitokondriális DNS arányának növelése a sejtmagi DNS-hez képest. Ezt elérhetjük ha a DNS extrakció előtt a mitokondriumokat kitisztítjuk, hosszú PCR programmal illetve olyan szövet alkalmazásával, ami különösen gazdag mitokondriális DNS-ben (pl. izomszövet). Ezen kívül reverz transzkriptáz és mtDNS specifikus primerek tervezése is hasznos módszer lehet (Bensasson et al., 2001). Mi a primertervezés módszert használtuk illetve a Wilber Quispe-Tintaya és munkatársai által a *Biotechniques* folyóiratban 2013-ban publikált cikkben javasolt mtDNS extrakciós eljárást.

Ezen metódusok használata sikeresnek bizonyult. A végső soron használt egy irányú (forward) primerrel (FVcr2) készített szekvenciáink ugyan néhány variábilis pozícióban tartalmaztak dupla csúcsokat, ami egy numt jelenlétre utaló jel lehet, ez azonban önmagában kevés ahhoz, hogy ezt teljes biztonsággal kijelentsük (Bensasson et al., 2001, Pons and Vogler, 2005). Ehhez túl tiszták és egyértelműek voltak a szekvenciák. Dupla csúcsokat okozhat ezen kívül heteroplazmia, ami állatokban meglehetősen ritka és kevésbé tanulmányozott (Rokas et al., 2003; Kmiec et al., 2006). Az ilyen kétes pozíciók okára fény derülhetne jobb primer, kétoldali szekvenálás vagy klónozás segítségével, de erre ezen szakdolgozat keretei között már nem volt lehetőség.

Az értékelhető szekvenciák alapján leírtunk a madárfajon hat haplotípust és hat variábilis pozíciót a D-loop szakaszon. Az elvégzett diverzitásra vonatkozó számítások során a magyar populáció esetében jellemzően nagyobb értékeket kaptunk: a nukleotid diverzitás (π) 0,00149 a magyar, 0,00056 a román populációban, a haplotípus diverzitás (h) 0,529 a magyar, 0,286 a román állományban. Ezt az eltérést okozhatta azonban, hogy magyar minták több régióból származnak, míg a román minták ugyan több telepről, de ugyanabból a régióból. A Tajima's D értékek utalhattak egy korábban lejátszódott palacknyak hatásra, de nem voltak szignifikánsak ($P > 0,10$).

A haplotípus hálózat alapján megállapítható, hogy az egyes haplotípusok eredete vegyes és nem egyértelmű az elkülönülés a két populáció között, azonban a román minták közelebb vannak egymáshoz. Hét feldolgozott szekvencia alapján ugyanis ezek a minták két egymás melletti haplotípusba sorolhatók, míg a magyarok 18 minta alapján öt haplotípusba. Ennek megfelelően feltételezhetjük, hogy valamilyen elkülönülés fellelhető. Ezt támasztja alá az

AMOVA elemzés Φ_{PT} -értéke ($\Phi_{PT} = 0,252$, $p = 0,002$), illetve a többi, korábban leírt számítás is. Összességében tehát kijelenthető, hogy különbség mutatható ki a két populáció között. Ennek megerősítéséhez azonban mindenképp további vizsgálatokra van szükség nagyobb mintaszám bevonásával és a kétes helyek ellenőrzésével. A két populáció mérsékelt elkülönülése mindenképp meglepő, ugyanis irodalmi adatok alapján ismert, hogy a faj nem territoriális, nem kötődik egy-egy költőhelyhez, migrációra hajlamos akár nagyobb távolságokat is megtéve. A két költőállományt elválasztó 6-700 km távolság egy ilyen madárfajnál nem feltétlenül jelentős.

További vizsgálatok során indokolt lehet a nagyobb mintaszám használatán felül a pszeudogének kizárása érdekében újabb lépések megtétele.

Kutatásom másik célkitűzése egy olyan marker keresése volt, mely az amuri vércse és a kék vércse fajokon egyaránt használható, és a két faj elkülönítésére alkalmas. Az amuri vércse egy Ázsia keleti részén, a kék vércse elterjedési területének keleti határán túl költő madárfaj. A kék vércse legközelebbi rokonának tartják, kifejezett a hasonlóság mind a morfológia és tollazat terén, mind az életmódjukban (Wink and Sauer-Gürth, 2004; Symes and Woodborne, 2010). A közelmúltban még alfajnak tartották (del Hoyo et al., 1994; Palatitz, 2012). Az általunk kifejlesztett D-loop primer megfelelő markernek bizonyult a célra, 8 variábilis pozíció alapján egyértelműen elkülöníti a két fajt.

7. Összefoglalás

A kék vércse (*Falco vespertinus*) hazánk fokozottan védett ragadozó madárfaja, a magyar alföld karakterisztikus lakója. A közelmúltban bekövetkezett állománycsökkenés megállítása érdekében nemzetközi LIFE program indult, melynek célja a madárfaj alapos megismerésén át (elterjedés, viselkedés, genetikai konstitúció stb.) fajspecifikus védelmi intézkedések és stratégiák kidolgozása.

Jelen kutatásra is ennek a programnak a keretein belül került sor. Nyolc magyar és egy román költőrégióból származó minták felhasználásával elemeztük a fragmentált szub-populációk közötti genetikai kapcsolatokat és távolságot. A vizsgálathoz a mitokondriális DNS nem kódoló, D-loop szakaszára általunk tervezett fajspecifikus primereket használtunk. A szekvenciák analízise alapján hat különböző haplotípust tudtunk leírni. A magyar és román állomány között nem tudtunk egyértelmű genetikai struktúrát kimutatni, de a statisztikai adatok alapján kis mértékű elkülönülést meg tudtunk határozni. Sok szekvencia egy-egy pozíciójában dupla csúcsok megjelenését tapasztaltuk, ami miatt az adott mintákat ki kellett zárni az elemzésből. Ezek kiküszöbölésére további lépések megtétele lehetséges (jobb primer, kétoldali szekvenálás vagy klónozás), de ezek meghaladják a jelen munka kereteit.

Dolgozatom másik témája egy olyan kék vércse marker fejlesztése volt, amely használható a legközelebbi rokona, az amuri vércse (*Falco amurensis*) mitokondriális genomjának kutatására is. Az általunk tesztelt D-loop szakasz alkalmasnak bizonyult, a két, fenotípusosan nagyon hasonló faj elkülönítésére, mivel nyolc fajspecifikus, variábilis pozíciót találtunk. Azonban az általunk vizsgált öt amuri vércse minta monomorf volt, így egyelőre nem találtunk fajon belüli variabilitást ennél a fajnál.

8. Summary

Title: Genetic Differentiation of Red-footed Falcon (*Falco vespertinus*) Populations

The red-footed falcon (*Falco vespertinus*) is an endangered raptor species of Hungary, and a characteristic inhabitant of the Hungarian plains. An international LIFE program was started in order to fight against the population decrease witnessed in recent decades. This program aims to determine species-specific strategies and protection programs based on investigations of the species' characteristics (habitat, distribution, behaviour, genetic constitution, etc).

The research for this thesis has been carried out as part of this program. The genetic distances and relations between the fragmented sub-populations were analysed based on samples collected at eight Hungarian and a Romanian nesting site. For the investigation, custom-designed species-specific primers were built to the non-coding D-loop section of the mitochondrial DNA. Based on the analysis of the sequences, six haplotypes were identified. Although the analysis was unable to detect a clear genetic structure amongst the populations in Hungary and Romania, small genetic differences could be determined based on statistical methods. Double peaks appeared at a few variable nucleotide sites in several samples thus it was necessary to exclude them. It might be possible to eliminate these problems with further steps, such as better primers, two-way sequencing or cloning, however such steps are beyond the scope of this thesis.

The second aim of this project was to develop a mitochondrial marker for the red-footed falcon which could also be used on its closest relative, the amur falcon (*Falco amurensis*). The tested D-loop section has proven to be ideally suited for this purpose. Eight variable positions were located between these two very similar species, however all the five tested amur falcon samples turned out to be monomorphic.

9. Irodalomjegyzék

Allendorf Fred W., Luikart Gordon & Aitken Sally N. 2013. *CONSERVATION AND THE GENETICS OF POPULATIONS*, Chichester, West Sussex, John Wiley & Sons, Ltd. p.

Bagyura János & Palatitz Péter, Környezetvédelmi És Vízügyi Minisztérium Természetvédelmi Hivatal, 2004, KvVM Természetvédelmi Hivatal Fajmegőrzési Tervek Kék vércse (*Falco vespertinus*), Haraszthy László, http://www.termeszetvedelem.hu/_user/downloads/fajmegorzesi%20tervek/K%E9k%20v%E9rcse.pdf, [Megtekintve 2017.09.24].

Bandelt H. J., Forster P. & Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16 /1. 37-48 p.

Bazin Eric, Glémin Sylvain & Galtier Nicolas 2006. Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals. *Science*, 312 /5773. 570-572 p.

Bensasson Doua, Zhang De-Xing, Hartl Daniel L. & Hewitt Godfrey M. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 16 /6. 314-321 p.

Bertók Péter. 2017. *Extra-pár fertilitás vizsgálata egy telepesen költő ragadozó madárnál*. Szakdolgozat, Állatorvostudományi Egyetem, Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék. 35 p. [Megtekintve 2017.09.10]

Bonfield James K., Smith Kathryn F. & Staden Rodger 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 23 /24. 4992-4999 p.

Cadahía Luis, Negro Juan J. & Urios Vicente 2007. Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) from SW Europe (Iberia) and NW Africa. *Journal of Ornithology*, 148 /1. 99-104 p.

Castoe Todd A., De Koning A. P. Jason, Kim Hyun-Min, Gu Wanjun, Noonan Brice P., Naylor Gavin, Jiang Zhi J., Parkinson Christopher L. & Pollock David D. 2009. Evidence for an ancient adaptive episode of convergent molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 /22. 8986-8991 p.

Del Hoyo J., Eliot A. & Sargatal J. 1994. Handbook of the Birds of the World Vol. 2. New World Vultures to Guineafowl, Barcelona, Lynx Edicions. 638 p.

Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.

Fehérvári Péter, Harnos A., Neidert D., Solt Sz. & Palatitz Péter. 2008. MODELING HABITAT SELECTION OF THE RED-FOOTED FALCON (*FALCO VESPERTINUS*): A POSSIBLE EXPLANATION OF RECENT CHANGES IN BREEDING RANGE WITHIN HUNGARY. *Applied Ecology and Environmental Research* [Online], 14 p. 1589-1623. https://www.researchgate.net/publication/267271593_Modeling_habitat_selection_of_the_red-footed_falcon_Falco_vespertinus_A_possible_explanation_of_recent_changes_in_breeding_range_within_Hungary [Megtekintve 2017.08.04].

Freeland Joanna R., Kirk Heather & Petersen Stephen 2011. *Molecular Ecology*, Chichester, West Sussex, John Wiley & Sons, Ltd. p. 464 p.

Fuchs Jérôme, Johnson Jeff A. & Mindell David P. 2015. Rapid diversification of falcons (Aves: Falconidae) due to expansion of open habitats in the Late Miocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82 /Part A. 166-182 p.

- Hailer F., Helander B., Folkestad A. O., Ganusevich S. A., Garstad S., Hauff P., Koren C., Masterov V. B., Nygård T., Rudnick J. A., Shiraki S., Skarphedinsson K., Volke V., Wille F. & Vilà C. 2007. Phylogeography of the white-tailed eagle, a generalist with large dispersal capacity. *Journal of Biogeography*, 34 /7. 1193-1206 p.
- Haraszthy László 1998. Magyarország madarai [Birds of Hungary], Budapest. 517 p.
- Haraszthy László & Palatitz Péter 2009. Kék vércse. In: CSÖRGŐ, T., KARCZA, ZS., HALMOS, G., MAGYAR, G., GYURÁ CZ, J., SZÉP, T., BANKOVICS, A., SCHMIDT, A. & SCHMIDT, E. (eds.) *Magyar Madár vonulási Atlasz*. Kossuth Kiadó, Budapest. 242-243 p.
- Harrop Andrew H. J., Collinson J. Martin, Dudley Steve P., Kehoe Chris & The British Ornithologists' Union Records Committee 2013. The British List: A Checklist of Birds of Britain (8th edition). *Ibis*, 155 /3. 635-676 p.
- Horváth Márton B., Martínez-Cruz Begoña, Negro Juan J., Kalmár Lajos & Godoy José A. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*, 36 /1. 84-88 p.
- Huff, D. R., Peakall, R., & Smouse, P. E. (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 86(8), 927-934.
- Hull Joshua M., Mindell David P., Talbot Sandra L., Kay Emily H., Hoekstra Hopi E. & Ernest Holly B. 2010. Population structure and plumage polymorphism: The intraspecific evolutionary relationships of a polymorphic raptor, *Buteo jamaicensis harlani*. *BMC Evolutionary Biology*, 10 224-224 p.
- Johnson Jeff A., Burnham Kurt K., Burnham William A. & Mindell David P. 2007. Genetic structure among continental and island populations of gyrfalcons. *Molecular Ecology*, 16 /15. 3145-3160 p.
- Kmiec Beata, Woloszynska Magdalena & Janska Hanna 2006. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current Genetics*, 50 /3. 149-159 p.
- Lande Russell 1988. Genetics and Demography in Biological Conservation. *Science, New Series*, 241 /4872. p. 1455-1460
- Lau C. H., Drinkwater R. D., Yusoff K., Tan S. G., Hetzel D. J. S. & Barker J. S. F. 1998. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. *Animal Genetics*, 29 /4. 253-264 p.
- Leigh Jessica W. & Bryant David 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6 /9. 1110-1116 p.
- Li Shengbin, Bo Li, Cheng Cheng, Zijun Xiong, Qingbo Liu, Jianghua Lai, Carey Hannah V, Qiong Zhang, Haibo Zheng, Shuguang Wei, Hongbo Zhang, Liao Chang, Shiping Liu, Shanxin Zhang, Bing Yu, Xiaofan Zeng, Yong Hou, Wenhui Nie, Youmin Guo, Teng Chen, Jiuqiang Han, Jian Wang, Jun Wang, Chen Chen, Jiankang Liu, Stambrook Peter J., Ming Xu, Guojie Zhang, Thomas M., Gilbert P, Huanming Yang, Jarvis Erich D., Jun Yu & Jianqun Yan. 2014. Genomic signatures of near-extinction and rebirth of the crested ibis and other endangered bird species. *Genome Biology*, 15/557. 16 p. <http://genomebiology.com/2014/15/12/557> [Megtekintve 2017.11.13].
- Martínez-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. 2243-2255 p.

- Michalakis, Y., & Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142(3), 1061-1064.
- Mullarney Killian, Svensson Lars, Zetterström Dan & Grant Peter J. 1999. Bird Guide, The Most Complete Field Guide To the Birds of Britain and Europe, London, HarperCollins. p. 400 p.
- Nacer Deborah F. & Raposo Do Amaral Fabio 2017. Striking pseudogenization in avian phylogenetics: Numts are large and common in falcons. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 115 /Supplement C. 1-6 p.
- Nagata J., Masuda R., Kaji K., Kaneko M. & Yoshida M. C. 1998. Genetic variation and population structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido Island, based on mitochondrial D-loop sequences. *Molecular Ecology*, 7 /7. 871-877 p.
- Nei M & Li W H 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 /10. 5269-5273 p.
- Nei Masatoshi & Tajima Fumio 1981. DNA POLYMORPHISM DETECTABLE BY RESTRICTION ENDONUCLEASES. *Genetics*, 97 /1. 145-163 p.
- Nightingale B & Allosopp K. 1994. Invasion of Red-footed Falcons in spring 1992. *British Birds*, 87 /5. 223-231 p.
- Nittinger Franziska, Gamauf Anita, Pinsker Wilhelm, Wink Michael & Haring Elisabeth 2007. Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data. *Molecular Ecology*, 16 /7. 1497-1517 p.
- Palatitz Péter. 2012. *A KÉK VÉRCSE (FALCO VESPERTINUS) VÉDELMEÉNEK TUDOMÁNYOS MEGALAPOZÁSA*. Doktori (PhD) értekezés, SZENT ISTVÁN EGYETEM Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola, 128 p. https://szie.hu/file/tti/archivum/Palatitz_P_PhD_diss_final.pdf [Megtekintve 2017.09.24]
- Palatitz Peter, Fehérvári Peter, Solt Szabolcs & Horváth Éva 2015. Breeding population trends and pre-migration roost site survey of the Red-footed Falcon in Hungary. *Ornis Hungarica*, 23 /1. 77-93 p.
- Parker Patricia G., Snow Allison A., Schug Malcolm D., Booton Gregory C. & Fuerst Paul A. 1998. WHAT MOLECULES CAN TELL US ABOUT POPULATIONS: CHOOSING AND USING A MOLECULAR MARKER. *Ecology*, 79 /2. 361-382 p.
- Peakall, R., Ebert, D., Cunningham, R., & Lindenmayer, D. (2006). Mark-recapture by genetic tagging reveals restricted movements by bush rats (*Rattus fuscipes*) in a fragmented landscape. *Journal of Zoology*, 268(2), 207-216.
- Peakall R. O. D. & Smouse Peter E. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6 /1. 288-295 p.
- Peakall Rod & Smouse Peter E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28 /19. 2537-2539 p.
- Pons Joan & Vogler Alfred P. 2005. Complex Pattern of Coalescence and Fast Evolution of a Mitochondrial rRNA Pseudogene in a Recent Radiation of Tiger Beetles. *Molecular Biology and Evolution*, 22 /4. 991-1000 p.
- Pourkazemi M., Skibinski D. O. F. & A.Beardmore J. 1999. Application of mtDNA d-loop

- region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 15 /4-5. 23-28 p.
- Purger Jenő J. 1996. Number and distribution of red-footed falcon (*Falco vespertinus*) nests in Voivodina (northern Serbia). *Journal of Raptor Research*, 30 /3. 4 p. 165-168
- Quispe-Tintaya Wilber, White Ryan R., Popov Vasily N., Vijg Jan & Maslov Alexander Y. 2013. Fast mitochondrial DNA isolation from mammalian cells for next-generation sequencing. *Biotechniques*, 55(3) /133-136. 9 p.
- Rokas Antonis, Ladoukakis Emmanuel & Zouros Eleftherios 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 18 /8. 411-417 p.
- Rozas Julio, Ferrer-Mata Albert, Sánchez-Delbarrio Juan Carlos, Guirao-Rico Sara, Librado Pablo, Ramos-Onsins Sebastián E. & Sánchez-Gracia Alejandro 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34 / 12. 3299-3302 p.
- Sorenson Michael D., Ast Jennifer C., Dimcheff Derek E., Yuri Tamaki & Mindell David P. 1999. Primers for a PCR-Based Approach to Mitochondrial Genome Sequencing in Birds and Other Vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12 /2. 105-114 p.
- Sorenson Michael D. & Quinn Thomas W. 1998. Numts: A Challenge for Avian Systematics and Population Biology. *The Auk*, 115 /1. 214-221 p.
- Symes Craig T. & Woodborne Stephan 2010. Migratory connectivity and conservation of the Amur Falcon *Falco amurensis*: a stable isotope perspective. *Bird Conservation International*, 20 /2. 134-148 p.
- Szabó Krisztián, Pest Megyei Kormányhivatal Környezetvédelmi és Természetvédelmi Főosztálya, 2015, Vándorsólyom (*Falco peregrinus*) x pusztai sólyom (*Falco rusticolus*) hibridgyanús egyed faji azonosítása molekuláris markerekkel, Ócsai Péter.
- Tajima F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123 /3. 585-595 p.
- Tamura Koichiro, Stecher Glen, Peterson Daniel, Filipowski Alan & Kumar Sudhir 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 /12. 2725-2729 p.
- Végyvári Z., Magnier M. & Nogues J.-B. 2002. Kék vércsék (*Falco vespertinus*) fészekválasztása és állományváltozása a vetési varjak (*Corvus frugilegus*) állományváltozásának tükrében 1995-1999 között a Hortobágyon. *Aquila*, 107-108 9-14. p.
- Wenink P. W., Baker A. J. & Tilanus M. G. 1994. Mitochondrial control-region sequences in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. *Molecular Biology and Evolution*, 11 /1. 22-31 p.
- Wink Michael & Sauer-Gürth Hedi 2004. Phylogenetic relationships in diurnal raptors based on nucleotide sequences of mitochondrial and nuclear marker genes. In: CHANCELLOR, R. D. & MEYBURG, B.-U. (eds.) *Raptors worldwide*. WWGBP, Berlin. 483-489 p.

10. Köszönetnyilvánítás

Rengetegen segítettek ennek a szakdolgozatnak és kutatásnak a megvalósulása érdekében, az alábbiakban megpróbálok mégis néhány személyt kiemelni, akik különösen sok támogatást nyújtottak az utóbbi háromnegyed év során.

Elsősorban témavezetőmnek dr. Vili Nórának szeretnék köszönetet mondani a rengeteg segítségért és iránymutatásért, a fáradhatatlan munkájáért valamint, hogy szakmai tudásával óriási mértékben hozzájárult ezeknek az eredményeknek a létrejöttéhez. Köszönettel tartozom dr. Fehérvári Péternek is a szakdolgozati témáért, és a LIFE projektnek a pénzügyi keret biztosításáért.

Külön kiemelném mennyire hálás vagyok Szabó Krisztiánnak, a Konzerváció Genetikai Labor vezetőjének a közreműködéséért, a primerek tervezésében és az adatok elemzésében nyújtott segítségéért.

Szeretném megköszönni a szakértői tanácsait és egyéb apró vagy kevésbé apró esetekben való közreműködését dr. Pásztory-Kovács Szilviának.

Végezetül köszönettel tartozom még a Falco csoportnak és LIFE projekt munkatársainak a terepi munkájáért, az előzetes kutatásokért és a genetikai minták rendelkezésemre bocsájtásáért. Az Aquilabor és Konzerváció Genetikai Labor munkatársainak a labormunkák során nyújtott útmutatásaikért, kiemelve Magonyi Nórát. És végül de nem utolsó sorban a családomnak és a barátaimnak, akik elviseltek ezalatt az időszak alatt és mindig lelkesen hallgatták történeteimet a legújabb eredményekről.

11. Mellékletek

11.1 A variábilis helyek teljes listája

minta kód_gyűjtési hely	Variábilis pozíciók							Haplotípus
	169	334	390	391	394	399	424	
FV16_033_csanadi_pusztak	A	C	C	A	G	A	C	a
FVN002_kiskunsag	A	C	C	A	G	A	C	
FVN036_jaszszag	A	C	C	A	G	A	C	
FVN045_heves	A	C	C	A	G	A	C	
FVN126_cserebokeny	A	C	C	A	G	A	C	
FVN137_csanadi_pusztak	A	C	C	A	G	A	C	
FVN169_hortobagy	A	C	C	A	G	A	C	
FVN197_csanadi_pusztak	A	C	C	A	G	A	C	
FVN202_vasarhelyi_puszta	A	C	C	A	G	A	C	
FVN001_kiskunsag	A	C	C	A	I	A	C	b
FVN019_jaszszag	A	C	C	A	I	A	C	
FVN025_jaszszag	A	C	C	A	I	A	C	
FVN024_jaszszag	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	c
FVN072_jaszszag	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVN144_vasarhelyi_puszta	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVN176_cserebokeny	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVR_001_roman_kolto	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVR_002_roman_kolto	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVR_004_roman_kolto	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVR_006_roman_kolto	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVR_007_roman_kolto	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVR_009_roman_kolto	A	C	C	<u>G</u>	G	A	C	
FVN068_heves	A	I	I	<u>G</u>	G	A	C	d
FVR_003_roman_kolto	<u>G</u>	C	C	<u>G</u>	G	A	C	e
FVN095_borsodi_mezoseg	A	C	C	A	K	A	I	f

1. táblázat a hat haplotípus

Félkövér betűkkel és aláhúzással jelölve az egyedi bázisokat, félkövér- és dőlt betűkkel jelölve a dupla csúcsokkal rendelkező bizonytalan pozíciókat

FV16_017_vasarhelyi_puszt	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	h01
FV16_030_kiskunsag	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	
FVN010_borsodi_mezoseg	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	
FVN133_csanadi_pusztak	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	
FVN136_cserebokeny	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	
FVN140_kiskunsag	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	
FVN145_csanadi_pusztak	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	
FVN148_hortobagy	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	
FVN173_cserebokeny	A	C	C	<i>R</i>	G	<i>R</i>	C	h02
FVR_013_roman_kolto	A	C	C	<i>R</i>	G	A	C	h03
FVN099_borsodi_mezoseg	A	C	C	<i>R</i>	<i>K</i>	A	C	h04
FVN162_hortobagy	A	C	C	<i>R</i>	<i>K</i>	A	C	
FVN022_jaszszag	A	<u>I</u>	C	<i>R</i>	G	A	C	h05
FVN013_heves	<u>G</u>	C	C	A	<i>K</i>	A	C	h06
FVN064_heves	<u>G</u>	C	C	<i>R</i>	G	A	C	h07
FVN090_borsodi_mezoseg	<u>G</u>	C	C	<i>R</i>	G	A	C	
FVN156_hortobagy	<u>G</u>	C	C	<i>R</i>	G	A	C	

2. táblázat A dupla csúcsokkal rendelkező kizárt szekvenciák